第 2 部 CTD の概要

JAN あるいは販売名：	チオトロピウム臭化物水和物+オロダテロール塩酸塩
剤形・含量：	吸入剤（配合剤）・1 噴霧中チオトロピウム＋オロダテロール 2.5 μg/ 2.5 μg
文書名：	2.6.6 毒性試験の概要文
文書作成日：	15 June 2015

Proprietary confidential information

© **2015** Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies. All rights reserved.

This document may not - in full or in part - be passed on, reproduced, published or otherwise used without prior written permission

略号一覧表

[redacted]	=	[redacted]
ACTH	=	副腎皮質刺激ホルモン (adrenocorticotropic hormone)
ADI	=	1 日摂取許容量 (acceptable daily intake)
ALD	=	概略の致死量 (approximate lethal dose)
ALP	=	アルカリフォスファターゼ (alkaline phosphatase)
ALT	=	アラニンアミノトランスフェラーゼ (alanine aminotransferase)
APTT	=	活性化部分トロンボプラスチン時間 (activated partial thromboplastin time)
AST	=	アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (aspartate aminotransferase)
AUC_{tm-tn}	=	時間 tm から時間 tn までの血漿中濃度-時間曲線下面積
$AUC_{tm-tn,ss}$	=	定常状態における時間 tm から時間 tn までの血漿中濃度-時間曲線下面積
分解生成物M*	=	チオトロピウムの分解生成物
BA 679	=	チオトロピウム（フリー体）の社内コード
BA 679 BR	=	チオトロピウム臭化物水和物（原薬）の社内コード
BAC	=	塩化ベンザルコニウム (benzalkonium chloride)
BALB/c	=	マウスの系統
BASF beagle	=	ビーグル犬の種
BI	=	ベーリンガーインゲルハイム社 (Boehringer Ingelheim)
BI 1744	=	オロダテロール（フリー体）の社内コード
BI 1744 CL	=	オロダテロール塩酸塩（原薬）の社内コード
開発コードE*	=	シクレソニド (ciclesonide)
分解生成物J*	=	チオトロピウムの分解生成物
分解生成物L*	=	チオトロピウムの分解生成物
BR	=	臭化物 (bromide)
BSE/TSE	=	牛海綿状脳症／伝達性海綿状脳症 (bovine spongiform encephalopathy / transmissible spongiform encephalopathy)
CD-1(ICR)	=	マウスの系統
不純物C*	=	オロダテロールの分解生成物
分解生成物D*	=	オロダテロールの分解生成物
CD 1857	=	開発コードE* の活性代謝物質
不純物A*	=	オロダテロールの分解生成物
不純物B*	=	オロダテロールの分解生成物
CDER	=	医薬品評価研究センター (Center for Drug Evaluation and Research)
Chbb: beagle	=	ビーグル犬の種
Chbb:NZW	=	ニュージーランド白色ウサギの種
CK	=	クレアチンキナーゼ (creatine kinase)
CK-MB	=	心筋由来のクレアチンキナーゼアイソザイム
CL	=	塩酸塩 (hydrochloride)
C_{max}	=	最高血漿中濃度
$C_{max,ss}$	=	定常状態における最高血漿中濃度
COPD	=	慢性閉塞性肺疾患 (chronic obstructive pulmonary disease)
CPK	=	クレアチニンフォスフォキナーゼ（creatinine phosphokinase）
Crl:CD(SD)	=	ラットの系統
Crl:CD-1	=	マウスの系統
Crl:NMRI	=	マウスの系統
Crl:WI(Han)	=	ラットの系統
CrlGlxBrlHan:WI	=	ラットの系統

*：新薬承認情報提供時に置き換えた

Crl:WI(Glx/Brl/Han)IGSBR	=	ラットの系統
CTD	=	コモンテクニカルドキュメント (common technical document)
CTF	=	臨床試験製剤 (clinical trial formulation)
cTnI	=	心筋トロポニン I (cardiac troponin I)
C_x	=	投与後 x 時間における血漿中濃度
DEREK	=	構造活性相関に基づく毒性評価 (Deductive Estimation of Risk from Existing Knowledge)
ECG	=	心電図 (electrocardiogram)
EMEA	=	欧州医薬品審査庁 (European Agency for the Evaluation of Medicinal Products)
F1	=	次世代，F0 世代（親）の児
FDA	=	米国食品医薬品局 (Food and Drug Administration)
GD	=	妊娠日 (gestation day)
GLDH	=	グルタミン酸脱水素酵素 (glutamate dehydrogenase)
GLP	=	医薬品の安全性試験の実施に関する基準 (Good Laboratory Practice)
HanCrl:WI	=	ラットの系統
HEC	=	ヒドロキシエチルセルロース (hydroxyethylcellulose)
HsdBrlHan:WIST	=	ラットの系統
Hb	=	ヘモグロビン (hemoglobin)
HCl	=	塩酸 (hydrochloric acid)
Hct	=	ヘマトクリット（hematocrit）
HR	=	心拍数 (heart rate)
ICH	=	日米 EU 医薬品規制調和国際会議 (International Conference on Harmonisation)
IL-2	=	インターロイキン-2 (interleukin-2)
LD_{50}	=	50%致死量 (50% lethal dose)
LDH	=	乳酸脱水素酵素 (lactic dehydrogenase)
MC4PC	=	構造活性相関に基づく毒性評価
MCH	=	平均赤血球ヘモグロビン量 (mean corpuscular haemoglobin)
MMAD	=	エロゾル粒子の平均粒子径 (mass median aerodynamic diameter)
MNPCE	=	小核を有する多染性赤血球 (micronucleated polychromatic erythrocytes)
MTD	=	最大耐用量 (maximum tolerated dose)
Na-EDTA	=	エチレンジアミン四酢酸ナトリウム (sodium ethylenediaminetetraacetic acid)
NALT	=	鼻腔関連リンパ組織 (nasal associated lymphoid tissue)
NCE	=	正染性赤血球 (normochromatic erythrocytes)
NOAEL	=	無毒性量 (no observed adverse effect level)
NZW	=	ウサギの系統 (New Zealand White strain of rabbits)
Olo	=	オロダテロール (Olodaterol)
PCE	=	多染性赤血球 (polychromatic erythrocytes)
PE	=	ポリエチレン (polyethylene)
PEEK	=	ポリエーテルエーテルケトン (polyetheretherketone)
pM	=	報告書には［pmol/L］と表示されている
pM·h	=	報告書には［pmol/L·h］と表示されている
PP	=	ポリプロピレン (polypropylene)
PQRI	=	Product Quality Research Institute
PR	=	心電図中，P 波の起始部から QRS 波の起始部までの時間
PT	=	プロトロンビン時間 (prothrombin time)
QRS	=	心電図の QRS 波形

QT	=	心電図中，Q 波の起始部から T 波の終末部までの時間
QTc	=	補正 QT 間隔
QTcF	=	FRIDERICIA 法による補正 QT 間隔
QTcSE	=	SARMA 法による補正 QT 間隔
QTcV	=	Van der Water 法による補正 QT 間隔
RMV	=	毎分呼吸量 (respiratory minute volume)
RR	=	心電図中の R-R 間隔
分解生成物N*	=	チオトロピウムの分解生成物
Tio	=	チオトロピウム (Tiotropium)
Tio+Olo	=	チオトロピウム+オロダテロール (Tiotropium+Olodaterol)
TTC	=	毒性学的懸念の閾値（threshold of toxicological concern）
USP	=	米国薬局方 (US Pharmacopeia convention)
WBC	=	白血球 (white blood cells)

*：新薬承認情報提供時に置き換えた

目次

略号一覧表 2
1. まとめ 8
2. 単回投与毒性試験 13
2.1 マウス単回投与毒性試験 13
2.1.1 マウスにおける単回吸入投与毒性試験 13
2.1.2 マウスにおけるオロダテロールの単回静脈内投与毒性試験［CTD4.2.3.1-5_U[redacted]-1113］ 15
2.1.3 マウスにおけるオロダテロールの単回経口投与毒性試験［CTD4.2.3.1-6_U[redacted]-1118］ 15
2.2 ラット単回投与毒性試験 15
2.2.1 ラットにおける単回吸入投与毒性試験 15
2.2.2 オロダテロールのラット単回静脈内投与毒性試験［CTD4.2.3.1-11_U[redacted]-1112］ 17
2.2.3 オロダテロールのラット単回経口投与毒性試験［CTD4.2.3.1-12_U[redacted]-1065］ 17
2.3 イヌ単回投与毒性評価 18
2.3.1 イヌにおける単回吸入投与毒性評価 18
3. 反復投与毒性試験 22
3.1 げっ歯類における毒性試験 22
3.1.1 げっ歯類における反復吸入投与毒性試験 22
3.1.2 げっ歯類における反復静脈内投与毒性試験 30
3.1.3 げっ歯類における反復経口投与毒性試験 31
3.2 非げっ歯類における毒性試験 37
3.2.1 非げっ歯類における反復吸入投与毒性試験 37
3.2.2 非げっ歯類における反復静脈内投与毒性試験 47
3.2.3 非げっ歯類における反復経口投与毒性試験 48
4. 遺伝毒性 57
4.1 *IN VITRO* 試験 58
4.1.1 オロダテロールの AMES 試験［CTD4.2.3.3.1-1_U[redacted]-1046］ 58
4.1.2 オロダテロールのマウスリンフォーマ試験［CTD4.2.3.3.1-2_U[redacted]-2188］ 58
4.2 *IN VIVO* 試験 58
4.2.1 オロダテロールの反復吸入投与によるラット骨髄小核試験［CTD4.2.3.2-4_U[redacted]-2133］ 58
4.2.2 チオトロピウム+オロダテロールの反復吸入投与によるラット骨髄小核試験（用量比 1：1）［CTD4.2.3.2-7_U[redacted]-1893］ 59
4.2.3 チオトロピウム+オロダテロールの反復吸入投与によるラット骨髄小核試験（用量比 1：6 及び 2：1）［CTD4.2.3.2-8_U[redacted]-1892］ 59
4.2.4 オロダテロールの単回静脈内投与によるラット骨髄小核試験［CTD4.2.3.3.2-1_U[redacted]-1834］ 59
4.2.5 オロダテロールの静脈内投与による雄ラットにおける造血亢進作用機序解明試験（GLP 非適合）［CTD4.2.3.3.2-2_U[redacted]-1845］ 60

5. がん原性試験 62
5.1 マウスがん原性試験 62
5.1.1 オロダテロールのマウス吸入投与がん原性試験［CTD4.2.3.4.1-1_U[redacted]-1065］ ...62
5.2 ラットがん原性試験 64
5.2.1 オロダテロールのラット吸入投与がん原性試験［CTD4.2.3.4.1-2_U[redacted]-2661］ ...64
6. 生殖発生毒性試験 68
6.1 受胎能及び初期胚発生に関する試験 69
6.1.1 オロダテロールの吸入投与によるラット受胎能及び初期胚発生毒性試験［CTD 4.2.3.5.1-1_U[redacted]-2297］ 69
6.2 胚及び胎児発生に関する試験 70
6.2.1 オロダテロールの吸入投与によるラット胚・胎児発生毒性試験［CTD 4.2.3.5.2-1_U[redacted]-2534］ 70
6.2.2 オロダテロールの吸入投与によるウサギ胚・胎児発生毒性に関する用量設定試験（GLP 非適合）［CTD 4.2.3.5.2-2_U[redacted]-2535］ 70
6.2.3 オロダテロールの吸入投与によるウサギ胚・胎児発生毒性試験［CTD 4.2.3.5.2-3_U[redacted]-1019］ 71
6.3 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 72
6.3.1 オロダテロールの吸入投与によるラット出生前・出生後発生及び母体機能毒性試験［CTD 4.2.3.5.3-1_U[redacted]-1971］ 72
7. 局所忍容性試験 76
7.1 皮膚刺激性試験 76
7.1.1 オロダテロールのウサギ皮膚刺激性試験［CTD4.2.3.6-1_U[redacted]-1116］ 76
7.2 眼刺激性試験 76
7.2.1 オロダテロールのウサギ眼刺激性試験［CTD4.2.3.6-2_U[redacted]-2189］ 76
7.3 静脈内及び筋肉内投与刺激性試験 76
7.3.1 オロダテロールのウサギ単回静脈内及び筋肉内投与局所刺激性試験［CTD4.2.3.6-3_U[redacted]-2144］ 76
7.4 動脈内投与刺激性試験 77
7.4.1 オロダテロールのウサギ単回動脈内投与局所刺激性試験［CTD4.2.3.6-4_U[redacted]-2164］ 77
7.5 傍静脈投与刺激性試験 77
7.5.1 オロダテロールのラット単回傍静脈投与局所刺激性試験［CTD4.2.3.6-5_U[redacted]-2178］ 77
8. その他の毒性試験 78
8.1 抗原性試験 78
8.2 免疫毒性試験 78
8.3 依存性試験 78
8.4 代謝物の毒性試験 78
8.5 光毒性試験 78
8.6 幼若動物を用いた毒性試験 79

8.6.1 オロダテロールの幼若イヌを用いた吸入投与用量設定試験（GLP 非適合）［CTD4.2.3.7.7-1_U[redacted]-1442］ 79
8.6.2 オロダテロールの幼若イヌを用いた 13 週間吸入投与毒性試験［CTD4.2.3.7.7-2_U[redacted]-1257］ 79
8.7 併用投与試験 83
8.7.1 チオトロピウム，オロダテロール及びシクレソニド（開発コードE* ）のラットにおける 4 週間併用投与毒性試験［CTD4.2.3.7.7-3_U[redacted]-1530］ 83
8.7.2 チオトロピウム，オロダテロール及びシクレソニド（開発コードE* ）のイヌにおける 4 週間併用投与毒性試験［CTD4.2.3.7.7-4_ U[redacted]-2354］ 84
8.8 不純物，分解生成物及び包装材料 85
8.8.1 原薬 85
8.8.2 製剤 87
9. 安全域 92
10. 考察及び結論 93
11. 表及び図 100
12. 付録 101

*：新薬承認情報提供時に置き換えた

1. まとめ

チオトロピウム（社内コード BA 679）については，チオトロピウム申請時に新有効成分医薬品の製造（輸入）承認申請に必要な試験を実施している（チオトロピウム：スピリーバ吸入用カプセル 18μg［SRA HH］の申請概要を参照［CTD 1.13.1-2_SRA HH］）。

一方，オロダテロール（社内コード BI 1744）は，新規の長時間作用性ヒト β_2 アドレナリン受容体（β_2 受容体）選択的部分刺激薬であることから，オロダテロールを塩酸塩として投与したときの毒性について評価するために，ヒトで予定されている投与経路である吸入投与法により一連の非臨床安全性試験を実施した。さらに，静脈内投与及び経口投与経路を用いた試験も実施した。すなわち，マウス，ラット，ウサギ及びイヌに投与可能な最高用量又は最大耐用量までのオロダテロールを吸入投与し，単回投与毒性試験（マウス，ラット），用量設定試験（ラット，イヌ），4 週間毒性試験（ラット，イヌ），13 週間毒性試験（マウス，ラット，イヌ），慢性毒性試験（ラット 26 週間，イヌ 52 週間），がん原性試験（マウス及びラット），遺伝毒性試験（*in vitro* 及び *in vivo*），受胎能及び初期胚発生に関する試験（ラット），出生前及び出生後の発生に関する試験（ラット），胚・胎児発生に関する試験（ラット，ウサギ）などを実施し，さらに，静脈内及び経口投与試験として，ラット及びイヌにおける 2 週間毒性試験を実施した。局所刺激性については経皮投与及び点眼投与により評価した。

チオトロピウム+オロダテロール配合剤についてはヒトで予定されている投与経路である吸入投与法を用いて検討を行った。すなわち，マウス，ラット及びイヌに投与可能な最高用量又は最大耐用量までのチオトロピウム及びオロダテロールを様々な用量比で吸入併用投与し，単回投与（マウス，ラット），4 週間（ラット，イヌ）及び 13 週間（イヌ）反復投与毒性試験を実施した。オロダテロール及びチオトロピウム+オロダテロールの毒性評価プログラムとして実施した試験を表 1: 1 に示す。

特に明記しない限り，すべての試験は GLP 及び試験実施時点で有効な国際的ガイドラインに従って実施した。特に明記しない限りチオトロピウムは臭化物水和物（BA 679BR），オロダテロールは塩酸塩（BI 1744CL）として投与を行った。チオトロピウム+オロダテロールを併用した場合はチオトロピウム+オロダテロールと表記する。また，特に明記しない限り，本文内に示す用量又は濃度はすべて，チオトロピウムは遊離カチオン換算（1.2494 g のチオトロピウム臭化物水和物が 1 g チオトロピウム遊離カチオンに相当する），オロダテロールは遊離塩基換算（1.0945 g のオロダテロール塩酸塩が 1 g の遊離塩基に相当する）で表示し，変化量（パーセント値又は倍数）は，対応する対照と比較した値を示す。ラット及びイヌを用いた反復投与毒性試験（GLP）における病理組織学的検査に関してはピアレビューを実施し，特に明記しない限り，国際的ガイダンスに従って，対照群を含むすべての群についてトキシコキネティクスを行った。

毒性試験でその使用が広く受け入れられていることから，安全性試験に使用するげっ歯類としてラットを選択した。同様に，β_2 刺激薬に対して感受性が高く非臨床安全性評価に適した非げっ歯類動物種としてイヌを選択した。

オロダテロール及びチオトロピウム+オロダテロールの吸入投与は 2 種類の経路，すなわち，マウス，ラット及びウサギでは鼻経路，イヌでは口腔咽頭経路により実施した。吸入投与試験の場

合，試験計画書には設定用量を，報告書には到達用量を記載した。到達用量は特に明記しない限り，体重及びげっ歯類では McMahon 式［CTD4.3-31_R97-0663］に従って算出した理論的 RMV，イヌでは実測 RMV を用いて算出した。本概要文では，特に明記しない限りすべての吸入投与試験において到達用量を示す。

反復吸入投与後に実施したトキシコキネティクスにより，検討したすべての動物種において，毒性学的評価に十分な，良好かつ用量依存的なオロダテロール又はチオトロピウム+オロダテロールの全身曝露が確認された。

表 1: 1　チオトロピウム+オロダテロール配合剤開発中に実施された主要非臨床安全性試験（GLP 適合）の概要

試験の種類	期間	投与した化合物（用量比，チオトロピウム：オロダテロール）	投与経路	動物種・試験系
単回投与毒性試験		オロダテロール	吸入，静脈内，経口	マウス，ラット
		チオトロピウム+オロダテロール（1:1, 2:1, 1:6）	吸入	マウス，ラット
反復投与毒性試験	2 週間	オロダテロール	静脈内，経口	ラット，イヌ
	4 週間	オロダテロール	吸入	ラット，イヌ
		チオトロピウム+オロダテロール（1:1, 1:6, 2:1）	吸入	ラット，イヌ
	13 週間	オロダテロール	吸入	マウス，ラット，イヌ
		チオトロピウム+オロダテロール（1:1, 2.5:1, 1:2）	吸入	イヌ
	26 週間	オロダテロール	吸入	ラット
	52 週間	オロダテロール	吸入	イヌ
遺伝毒性試験		オロダテロール	*in vitro*	ネズミチフス菌 マウスリンフォーマ細胞
		オロダテロール	吸入，静脈内	ラット（小核試験）
		チオトロピウム+オロダテロール（1:1, 1:6, 2:1）	吸入	ラット（小核試験）
がん原性試験	104 週間	オロダテロール	吸入	マウス，ラット
生殖発生毒性試験				
受胎能及び初期胚発生に関する試験		オロダテロール	吸入	ラット
胚・胎児発生に関する試験		オロダテロール	吸入	ラット，ウサギ
出生前及び出生後の発生に関する試験		オロダテロール	吸入	ラット
局所忍容性試験		オロダテロール	経皮，点眼，静脈内，動脈内，筋肉内 傍静脈	ウサギ ラット

マウス及びラットの単回吸入投与毒性試験では，オロダテロールあるいはチオトロピウム+オロダテロールの急性毒性は非常に弱かった。高用量でチオトロピウムの抗コリン作用及びオロダテロールの β_2 刺激作用に特徴的な一般症状の変化，及び非特異的な毒性が用量と関連して認められた。

オロダテロールの反復吸入投与毒性試験で認められた所見は，いずれの動物種においても，明らかな用量依存性を示す，特に同化作用や心血管系作用などの β_2 刺激薬に特徴的な全身性作用であった。

マウス（63～3258 μg/kg/日）及びラット（0.42～3400 μg/kg/日）の反復吸入投与毒性試験では，摂餌量，体重及び骨格筋量の増加が認められた。

イヌの反復吸入投与毒性試験では，検討したすべての用量（2.2～330 μg/kg/日）において，β_2 受容体刺激作用，特に心拍数増加や血圧低下等の心血管系への作用が認められた。52 週間試験において，60 及び 330 μg/kg/日投与群で心室性期外収縮及び心室性頻拍が認められた。心筋の病理組織学的変化（心筋の限局性線維化）は，推奨臨床用量を大きく上回る高用量のみで認められ，過剰な薬理作用に起因するものと考えられた。心臓に明らかな病理組織学的変化が認められた用量と，不整脈が検出された用量は一致していた。しかし，不整脈の発現率は低く，散発的であったことから，推奨臨床用量（5 μg/日/ヒト）のオロダテロールを投与したときに，ヒトに不整脈が誘発されるリスクは低いと考えられた。その他，オロダテロール投与による変化として，肝臓におけるグリコーゲン分布の変化が認められた。

チオトロピウム+オロダテロールのラット及びイヌにおける反復投与による毒性は，チオトロピウムによる全身性の抗コリン作用及びオロダテロールによる β_2 刺激作用に特徴的なものであり，明らかな用量依存性を伴っていた。用量及び血漿中薬物濃度に基づくと，イヌはラットよりも配合剤に対して感受性が高かった。ほとんどの全身性作用はそれぞれの試験で用いられた用量での両薬剤の薬力学的作用に直接的あるいは間接的に関連した変化であるとみなされた。

チオトロピウム+オロダテロールの試験における所見として，散瞳，鼻腔及び口腔粘膜の乾燥，唾液腺の変化，心拍数増加，肝臓におけるグリコーゲン分布の変化，血中アルブミン及びトリグリセリドの減少がみられた。涙腺及び唾液腺における抗コリン作用の影響のため，角結膜炎，摂餌量の減少及びそれに続く体重増加量の減少が発現した。唾液腺の変化はラットにおける死亡の原因にもなった。喉頭及び食道上部における餌の滞留は，動物が窒息により死亡したことを示唆していた。これら器官におけるすべての変化は用量依存的で，臨床的にも明らかなことからモニターが容易であり，本質的に回復性を示す変化であった。一方，心筋の不可逆性の変化がチオトロピウム+オロダテロールの 57+62 μg/kg/日（用量比 1:1）の用量から発現し，すべての用量比の高用量群及びオロダテロールを 13 週間投与したイヌで認められた。この心筋線維化はオロダテロールの投与によるものであり，β_2 刺激薬のクラス効果とみなされた。

オロダテロールの Ames 試験及びマウスリンフォーマ試験では，代謝活性化系存在下及び非存在下ともに細菌／細胞毒性を示す最高濃度まで，陰性であった。ラット骨髄小核試験（4 週間吸入投与毒性試験で実施）でも，同様に陰性結果が得られた。致死量以下のオロダテロールを静脈内投与したラット骨髄小核試験では，小核を有する多染性赤血球数が，用量とは無関係に，わずかではあるが統計学的に有意に増加した。この所見は，本薬の薬理特性及び機序解明試験成績から，心拍数増加及び血圧低下による低酸素状態，及びこれが引き起こす赤血球造血に伴う，非遺伝毒性的作用機序に基づく自然発生的な小核形成であると結論付けられた。したがって，これら一連の遺伝毒性試験から総合的に判断すると，小核出現頻度の上昇は，オロダテロールの遺伝毒

性によるものではなく，非常に高い用量投与による，過度の薬理作用に起因するものと考えられた。

配合剤を用いたラットにおける骨髄小核試験（4 週間吸入投与試験の一部として実施）でも遺伝毒性を示す所見は認められなかった。

オロダテロールのマウス及びラットの吸入投与がん原性試験において，β_2 刺激薬のクラス効果によるげっ歯類に特異的な腫瘍性変化が誘発された。マウスでは子宮で平滑筋腫瘍（平滑筋腫，平滑筋肉腫），ラットでは卵巣間膜に平滑筋腫が認められた。これらの変化はすべて，ヒトに推奨臨床用量を投与したときの血漿中オロダテロール濃度をはるかに超える曝露量のみで認められた。これらの所見は，げっ歯類を用いたがん原性試験でこれまでに報告されている β_2 刺激薬のクラス効果に一致するもので，これらの腫瘍がヒトで発現する可能性は極めて低いと考えられた。これら以外に投与と関連した腫瘍性変化は認められなかった。したがって，げっ歯類を用いたオロダテロールの 2 つのがん原性試験において，ヒトにおいて問題となるような発がん性はみられなかった。

ラット及びウサギを用いたオロダテロールの吸入投与による胚・胎児発生試験において，いずれの用量にも母動物毒性は認められなかった。ラットにおいては，胚・胎児発生に対する有害な作用は認められなかった。ウサギにおいて， 2489 μg/kg/日投与群（ヒトに推奨臨床用量を投与したときの血漿中濃度をはるかに上回る曝露量を示す）で，主に母動物 22 例中 2 例由来の同腹児に，骨化異常，口蓋裂，心血管系異常などの重大な異常が認められた。他の市販されている β_2 刺激薬の非臨床試験でも胎児毒性が認められている（そのため，妊娠カテゴリーC に分類されている）。一方，β_2 刺激薬が臨床で広く使用されているにもかかわらず，げっ歯類及びウサギで認められた異常がヒトにおいて問題となる成績は確認されていない。

ラットを用いたオロダテロールの吸入投与による受胎能及び初期胚発生試験において，用量 3068 μg/kg/日まで，発情周期，交配，受胎能及び妊娠成績に対する影響は認められなかった。ラットを用いた吸入投与による出生前及び出生後発生試験においても，用量 3665 μg/kg/日まで，生殖成績（交配，受胎能及び正常妊娠の成立）並びに出生前及び出生後の発生に対する影響は認められなかった。

チオトロピウム+オロダテロール配合剤の原薬及び製剤の規格に基づくと，不純物について安全性を確認する必要はないと考えられた。チオトロピウム+オロダテロール配合剤のヒトでの推奨臨床 1 日量である 5 μg+5 μg の合成過程において，TTC（threshold of toxicological concern）を超える量の不純物が混入する可能性はない。チオトロピウム+オロダテロール配合剤中のチオトロピウムの 2 種の分解物の安全性について検討し，さらに，製剤に使用される医薬品添加物及びレスピマットの吸入器をガイドラインに従って評価したが，ヒト使用に伴う毒性学的な懸念事項は見いだされなかった。

以上のように，「Guidance for Industry: Nonclinical safety evaluation of drug or biologic combinations, FDA 2006」［CTD4.3-6_R12-5450］，「Guideline on the non-clinical development of fixed combinations of medicinal products, EMEA 2008」［CTD4.3-7_R11-2414］及び「ICH Guidance on nonclinical safety studies for the conduct of human clinical trials and marketing authorization for pharmaceuticals M3(R2)」

［CTD4.3-55_R10-5669］に準拠して，一連の非臨床安全性試験によりチオトロピウム+オロダテロール配合剤の安全性を十分に評価し，起こり得る毒性所見について多面的検討を行った。チオトロピウム及びオロダテロールを技術的に投与可能な最高用量又は最大耐用量まで投与した動物で認められた一般状態，血液学的検査，あるいは血液生化学的検査の変化及び形態学的変化の特徴は，それぞれの単剤における試験成績あるいは他の抗コリン薬あるいは β_2 刺激薬で報告されている成績と一致するものであった。オロダテロールの薬理効果は強く，検討したすべての用量で薬理作用に基づく変化が認められた。毒性所見は推奨臨床用量を大きく上回る用量のみで認められ，おおむね軽微なものであるとともに，概して可逆的であった。非臨床安全性試験で認められた変化は，全般的にムスカリン受容体の阻害または β_2 受容体刺激に関連していると考えられた。以上のように，「毒性試験の概要文」に示すすべての毒性試験の結果は，チオトロピウム+オロダテロール配合剤 5 μg /5 μg の COPD 治療薬としての承認申請資料として適切であると考えられた。

2. 単回投与毒性試験

マウス及びラットにオロダテロール又はチオトロピウム+オロダテロールを単回吸入投与したときの毒性について，投与後 14 日間の観察期間を設けて評価した。チオトロピウム+オロダテロールについては用量比 1：1，2：1 及び 1：6 に設定して併用投与における検討を行った。オロダテロールについては，静脈内及び経口経路により単回投与したときの毒性についても評価した。すべての単回投与毒性試験の概要を表 2.2.1.4: 1 に示す。これらの試験はすべて GLP に準拠して実施した。

吸入投与試験の場合，試験計画書には設定用量を，報告書及び関連資料には到達用量をそれぞれ記載した。到達用量は，体重及びげっ歯類では McMahon 式［CTD4.3-31_R97-0663］により求めた理論的 RMV，イヌでは実測 RMV を用いて算出した。本概要文では，すべての吸入投与試験において到達用量を示す。

オロダテロールの吸入投与毒性試験においては，0.5%オロダテロール，[redacted]% BAC，[redacted]% Na-EDTA，[redacted]%クエン酸を含有するオロダテロール水溶液を用いてエロゾルを調製した。チオトロピウム+オロダテロールの吸入毒性試験においては，1.0%チオトロピウムあるいは 1.0%オロダテロール，[redacted]% BAC，[redacted]% Na-EDTA，1 M 塩酸（pH 2.9）を含有するチオトロピウム並びにオロダテロール水溶液を用いてエロゾルを調製した。

2.1 マウス単回投与毒性試験

2.1.1 マウスにおける単回吸入投与毒性試験

2.1.1.1 オロダテロールのマウス単回吸入投与毒性試験［CTD4.2.3.1-1_U[redacted]-1101］

雌雄各 5 例の Crl:NMRI マウスに，投与可能な濃度までのエロゾルを 4 時間にわたり吸入曝露（鼻経路）した。使用した動物は約 7 週齢，体重は雄 34～39 g，雌 26～31 g の範囲であった。投与可能な到達用量の最大値は，雄 47.7 mg/kg，雌 51.7 mg/kg であった。また，重量測定法による MMAD は 2.67 µm であり，マウスにおいて吸入可能であると考えられた。

死亡は認められなかった。投与後最初の 4 日間において，雌雄のマウスに自発運動の低下，歩行失調，振戦，閉眼，腹式呼吸，立毛などの一般状態の変化が認められた。剖検時に被験物質に関連した肉眼的病変は認められなかった。

以上より，マウスにオロダテロールを吸入投与したときの ALD は雄で>47.7 mg/kg，雌で>51.7 mg/kg であった。雌雄合わせた ALD 平均値は>49.7 mg/kg と判断された。

2.1.1.2 チオトロピウム+オロダテロールのマウス単回吸入毒性試験（用量比 1：1）［CTD4.2.3.1-2_U[redacted]-1184］

雌雄各 5 例の Crl:NMRI マウスに 4 時間にわたり吸入曝露（鼻経路）を行った。使用した動物は約 8 週齢，体重は雄 30～33 g，雌 25～28 g の範囲であった。投与可能な到達用量の最大値は，雄では 33.8+35.5 mg/kg，雌では 35.8+37.6 mg/kg であった。重量測定法による MMAD はチオトロピウム 2.71 µm，オロダテロール 2.67 µm であり，マウスにおいて吸入可能であると考えられた。

投与 2 日目及び 3 日目に雄各 1 例が死亡した。瞳孔強直を伴う散瞳，閉眼，自発運動低下，背弯姿勢，腹式呼吸，粗毛などの一般状態の変化が認められた。剖検時に投薬に関連した肉眼的病変は認められなかった。

以上より，マウスにチオトロピウム+オロダテロールを用量比 1：1 で吸入投与したときの ALD は雄で<33.8+ <35.5 mg/kg，雌で>35.8+ >37.6 mg/kg であった。

2.1.1.3 チオトロピウム+オロダテロールのマウス単回吸入毒性試験（用量比 2：1）

[CTD4.2.3.1-3_ U[redacted]-1201]

雌雄各 5 例の Crl:NMRI マウスに 4 時間にわたり吸入曝露（鼻経路）を行った。使用した動物は約 9 週齢，体重は雄 34～37 g，雌 26～30 g の範囲であった。投与可能な到達用量の最大値は，雄では 40.1+21.4 mg/kg，雌では 43.7+23.3 mg/kg であった。重量測定法による MMAD はチオトロピウム 2.92 µm，オロダテロール 2.90 µm であり，マウスにおいて吸入可能であると考えられた。

投与 3 時間後に雄 1 例が，また投与 3 日目に雌 1 例がそれぞれ死亡した。散瞳，瞳孔強直，閉眼，身づくろい行動増加，粗毛，呼吸困難，鎮静，運動失調などが主に投与当日に認められた。剖検時に投薬に関連した肉眼的病変は認められなかった。

以上より，マウスにチオトロピウム+オロダテロールを用量比 2：1 で吸入投与したときの ALD は雄で<40.1+ <21.4 mg/kg，雌で<43.7+ <23.3 mg/kg であった。雌雄合わせた ALD 平均値は<41.9+ <22.3 mg/kg であった。

2.1.1.4 チオトロピウム+オロダテロールのマウス単回吸入毒性試験（用量比 1：6）

[CTD4.2.3.1-4_ U[redacted]-1197]

雌雄各 5 例の Crl:NMRI マウスに 4 時間にわたり吸入曝露（鼻経路）を行った。使用した動物は約 8～9 週齢，体重は雄 33～39 g，雌 26～31 g の範囲であった。到達用量は，雄では 2.4+15.7, 4.4+28.2 及び 9.9+63.3 mg/kg，雌では 2.6+17.2, 4.7+30.2 及び 10.7+68.7 mg/kg であった。重量測定法による MMAD はチオトロピウム 1.63～2.44 µm，オロダテロール 1.64～2.39 µm であり，マウスにおいて吸入可能であると考えられた。

10.7+68.7 mg/kg を投与した雌 1 例が投与日に, 2 例が投与 2 日目に死亡した。また 9.9+63.3 mg/kg を投与した雄 1 例が投与 4 日目に死亡した。この群のその他の動物も瀕死状態のため投与 4 日目に屠殺した。4.4+28.2 mg/kg 群では，雄 4 例が死亡した（1 例が投与 2 日目，2 例が投与 3 日目，1 例が投与 4 日目）。雄の 2.4+15.7 mg/kg 群及び雌の 2.6+17.2 及び 4.7+30.2 mg/kg 群では死亡はみられなかった。一般状態の変化として，散瞳，瞳孔強直，閉眼，鎮静，粗毛，呼吸困難，運動失調，末梢の充血，体温上昇，後弯などが認められた。これらの所見の頻度及び重症度は用量依存性に増加した。死亡あるいは屠殺した動物の多くは胃腸の拡張及び胃及び腸内にガス状内容物が認められた。また，高用量群の死亡例では，肝臓の変色が認められた。それ以外には剖検時に投薬に関連した肉眼的病変は認められなかった。

以上より，マウスにチオトロピウム+オロダテロールを用量比 1：6 で吸入投与したときの ALD は雄では 2.4+15.7～4.4+28.2 mg/kg，雌では 4.7+30.2～10.7+68.7 mg/kg であった。

2.1.2 マウスにおけるオロダテロールの単回静脈内投与毒性試験

[CTD4.2.3.1-5_U[redacted]-1113]

1 群当たり雌雄各 3 例の Crl:NMRI マウスに生理食塩液（pH 4.8）に溶解したオロダテロールを 10，20 又は 40 mg/kg の用量，10 mL/kg の容量で急速静脈内投与した。使用した動物は約 7 週齢，体重は雄 32～35 g，雌 24～29 g の範囲であった。

10 及び 20 mg/kg 投与群では死亡は認められなかった。40 mg/kg 投与群の雄 2 例及び雌 1 例が投与中又は投与直後に一般状態の変化を示すことなく死亡した。10 及び 20 mg/kg 投与群において，投与後に自発運動の低下，腹臥位及び呼吸促迫などの一般状態の変化が認められたが，2 日目までに正常状態に回復した。死亡例の剖検時，肉眼的に様々な器官の変色が認められた。

以上より，マウスにオロダテロールを静脈内投与したときの ALD は雌雄とも 20～40 mg/kg であった。

2.1.3 マウスにおけるオロダテロールの単回経口投与毒性試験

[CTD4.2.3.1-6_U[redacted]-1118]

1 群当たり雌雄各 3 例の Crl:NMRI マウスに 0.5% HEC 水溶液（Natrosol® 250 HX）に懸濁したオロダテロールを 100，316，1000 又は 2000 mg/kg の用量，10 mL/kg の容量で経口投与した。使用した動物は約 7 週齢，体重は雄 30～36 g，雌 24～33 g の範囲であった。

100，316 及び 1000 mg/kg 投与群で死亡は認められなかった。2000 mg/kg 投与群の雌 2 例が，それぞれ投与後約 75 分以内及び投与翌日の朝に死亡した。この成績に基づき，動物福祉の観点から，雄マウスには 2000 mg/kg の投与は行わなかった。すべての動物において，自発運動の低下及び呼吸促迫が認められた。一般状態の観察において，100，316 又は 1000 mg/kg 投与群では 1 日目のみに毒性所見が認められたが，2000 mg/kg 投与群ではより長期間に及び，閉眼が 2 日目にみられ，立毛は 2～5 日目まで持続した。2000 mg/kg 投与群の雌生存例で認められた副腎肥大を除いて，剖検時に病理学的変化は認められなかった。

以上より，マウスにオロダテロールを経口投与したときの ALD は雄で>1000 mg/kg，雌で 1000～2000 mg/kg であった。

2.2 ラット単回投与毒性試験

2.2.1 ラットにおける単回吸入投与毒性試験

2.2.1.1 オロダテロールの単回吸入投与毒性試験 [CTD4.2.3.1-7_U[redacted]-1100]

雌雄各 5 例の CrlGlxBrlHan:WI ラットに投与可能な最高濃度までのエロゾルを 4 時間にわたり吸入曝露（鼻経路）した。使用した動物は約 10～12 週齢，体重は雄 297～318 g，雌 182～206 g の範囲であった。投与可能な最高到達用量は雄 22.8 mg/kg，雌 26.6 mg/kg であった。また，重量測定法による MMAD は 2.67 μm であり，ラットにおいて吸入可能であると考えられた。

死亡は認められなかった。投与日のみに，自発運動の低下，閉眼，腹式呼吸，反復掻鼻，咀嚼亢進などの一般状態の変化が認められた。剖検時に被験物質に関連した肉眼的病変は認められなかった。

以上より，ラットにオロダテロールを吸入投与したときの ALD は雄で>22.8 mg/kg，雌で>26.6 mg/kg であった。雌雄を合わせた ALD 平均値は>24.7 mg/kg であった。

2.2.1.2 チオトロピウム+オロダテロールのラット単回吸入毒性試験（用量比 1：1）

[CTD4.2.3.1-8_U[redacted]-1182]

雌雄各 5 例の Crl:WI(Han)ラットに 4 時間にわたり吸入曝露（鼻経路）を行った。使用した動物は 10 週齢，体重は雄 248～260 g，雌 162～174 g の範囲であった。投与可能な到達用量の最大値は，雄では 16.7+17.5 mg/kg，雌では 19.1+20.1 mg/kg であった。重量測定法による MMAD はチオトロピウム 2.71 µm，オロダテロール 2.67 µm であり，ラットにおいて吸入可能であると考えられた。

観察期間中，死亡は認められなかった。散瞳，瞳孔強直などの投薬に関連する一般状態の変化が投与 9 日目まで認められた。また，自発運動低下，腹式呼吸，鼻部身づくろいの反復，皮膚の蒼白あるいは発赤，鼻口部の赤色痂皮形成，背弯姿勢，粗毛などの一般状態の変化は投与当日及び 2 日目のみに認められた。剖検時に投薬に関連した肉眼的病変は認められなかった。

以上より，ラットにチオトロピウム+オロダテロールを用量比 1：1 で吸入投与したときの ALD は雄では>16.7+>17.5 mg/kg，雌では>19.1+>20.1 mg/kg であった。雌雄合わせた ALD 平均値は>17.9+>18.8 mg/kg であった。

2.2.1.3 チオトロピウム+オロダテロールのラット単回吸入毒性試験（用量比 2：1）

[CTD4.2.3.1-9_U[redacted]-1199]

雌雄各 5 例の Crl:WI(Han)ラットに 4 時間にわたり吸入曝露（鼻経路）を行った。使用した動物は約 11 週齢，体重は雄 282～296 g，雌 184～196 g の範囲であった。投与可能な到達用量の最大値は，雄では 19.7+10.5 mg/kg，雌では 22.7+12.1 mg/kg であった。重量測定法による MMAD はチオトロピウム 2.92 µm，オロダテロール 2.90 µm であり，ラットにおいて吸入可能であると考えられた。

観察期間中，死亡は認められなかった。散瞳，瞳孔強直などの投薬に関連する一般状態の変化が投与 4 日目まで認められた。また，営巣行動低下，鎮静，咀嚼増加，自発運動低下，身づくろい行動の増加，呼吸困難などの所見はすべての動物において投与日のみにみられた。粗毛は雌のみで 2 日目まで認められた。剖検時に投薬に関連した肉眼的病変は認められなかった。

以上より，ラットにチオトロピウム+オロダテロールを用量比 2：1 で吸入投与したときの ALD は雄では>19.7+>10.5 mg/kg，雌では>22.7+>12.1 mg/kg であった。雌雄合わせた ALD 平均値は>21.2+>11.3 mg/kg であった。

2.2.1.4 チオトロピウム+オロダテロールのラット単回吸入毒性試験（用量比 1：6）[CTD4.2.3.1-10_U[redacted]-1185]

雌雄各 5 例の Crl:WI(Han)ラットに 4 時間にわたり吸入曝露（鼻経路）を行った。使用した動物は約 11 週齢，体重は雄 280～294 g，雌 184～195 g の範囲であった。投与可能な到達用量の最大値は，雄では 4.8+30.8 mg/kg，雌では 5.5+35.5 mg/kg であった。重量測定法による MMAD はチオトロピウム 2.39 µm，オロダテロール 2.33 µm であり，ラットにおいて吸入可能であると考えられた。

観察期間中，死亡は認められなかった。粘膜乾燥，散瞳，瞳孔強直，粗毛などの投薬に関連する一般状態の変化が認められた。また，営巣行動低下，咀嚼増加，鎮静，自発運動低下，身づくろい行動の増加，呼吸困難などの所見は投与日のみにみられた。剖検時に投薬に関連した肉眼的病変は認められなかった。

以上より，ラットにチオトロピウム+オロダテロールを用量比 1：6 で吸入投与したときの ALD は雄では>4.8+ >30.8 mg/kg，雌では>5.5+ >35.5 mg/kg であった。雌雄合わせた ALD 平均値は>5.2+ >33.2 mg/kg であった。

2.2.2 オロダテロールのラット単回静脈内投与毒性試験［CTD4.2.3.1-11_U[redacted]-1112］

1 群当たり雌雄各 3 例の CrlGlxBrlHan:WI ラットに生理食塩液（pH 4.8）に溶解したオロダテロールを 10，20，40 又は 80 mg/kg の用量，10 mL/kg の容量で急速静脈内投与した。使用した動物は約 7～8 週齢，体重は雄 190～217 g，雌 133～165 g の範囲であった。

10，20 及び 40 mg/kg 投与群では，死亡は認められなかった。80 mg/kg 投与群の雌 2 例が投与中に一般状態の変化を示すことなく死亡し，雌 1 例が投与後 2.5 時間以内に死亡した。この成績に基づき，動物福祉の観点から，雄ラットには 80 mg/kg の投与は行わなかった。10 及び 20 mg/kg 投与群では，投与 1 日目に自発運動の低下，腹臥位及び呼吸促迫などの一般状態の変化が認められた。40 mg/kg 投与群では，これに加えて立毛が認められ，これらの毒性所見は投与 6 日後まで持続した。剖検時の肉眼的病理所見として，80 mg/kg 投与群の死亡例のみで，肺，肝，腎におけるうっ血が認められた。

以上より，ラットにオロダテロールを静脈内投与したときの ALD は雄で>40 mg/kg，雌で 40～80 mg/kg であった。

2.2.3 オロダテロールのラット単回経口投与毒性試験［CTD4.2.3.1-12_U[redacted]-1065］

1 群当たり雌雄各 3 例の CrlGlxBrlHan:WI ラットに 0.5% HEC 水溶液（Natrosol® 250 HX）に懸濁したオロダテロールを 100，316 又は 1000 mg/kg の用量，10 mL/kg の容量で経口投与した。使用した動物は約 7 週齢，体重は雄 159～187 g，雌 121～145 g の範囲であった。

100 及び 316 mg/kg 投与群では死亡は認められなかった。1000 mg/kg 投与群の雌 2 例が，それぞれ投与 1 及び 4 日目に死亡した。すべての動物において，呼吸促迫を伴う自発運動の低下が認められた。これらの一般状態の変化は，100 及び 316 mg/kg 投与群では投与 1 日目に認められたのみ

であったが，1000 mg/kg 投与群ではより長期間に及び，立毛は 7 日目まで持続した。剖検時の肉眼的病理所見として，死亡例のみで，様々な器官のうっ血，変色が認められた。

以上より，ラットにオロダテロールを経口投与したときの ALD は雄で>1000 mg/kg，雌で 316～1000 mg/kg であった。

2.3 イヌ単回投与毒性評価

2.3.1 イヌにおける単回吸入投与毒性評価

非げっ歯類を用いた単回投与毒性試験は実施していないが，イヌにおける急性毒性は反復投与毒性試験の一部として評価した。

オロダテロールの反復吸入投与毒性試験では，330 µg/kg/日までの吸入投与［CTD4.2.3.2-14_U[redacted]-1740］，29.5 µg/kg/日までの静脈内投与［CTD4.2.3.2-21_U[redacted]-1051］あるいは 5000 µg/kg/日までの経口投与［CTD4.2.3.2-22_U[redacted]-1139，CTD4.2.3.2-23_U[redacted]-2169］を行い，いずれの試験においても死亡は認められなかった。オロダテロールを 1 群当たり雌雄各 4 例のビーグル犬に，0（溶媒対照），15，60 又は 330 µg/kg/日の用量で吸入投与した試験［CTD4.2.3.2-14_U[redacted]-1740］では，オロダテロールの初回投与後の一般状態における変化として，心収縮力の増大，心拍数の増加，口腔粘膜の乾燥などが用量依存性に増加して認められた。心収縮力の増大及び心拍数の増加は投与の継続に伴って減弱した。

チオトロピウム+オロダテロールの反復吸入投与毒性試験では，用量比 1：1 で 290+310 µg/kg/日［CTD4.2.3.2-18_U[redacted]-2249］まで死亡は認められなかった。チオトロピウム+オロダテロールを 1 群当たり雌雄各 4 例のビーグル犬に 0（溶媒対照），14+16，57+62，290+310 ，310+0 又は 0+290 µg/kg/日の用量で吸入投与した試験［CTD4.2.3.2-18_U[redacted]-2249］では，初回投与後の一般状態における変化として，散瞳及び口腔粘膜及び鼻部の乾燥がチオトロピウムを投与した動物でほぼ用量依存性に増加してみられた。

いずれのイヌを用いた試験においても，単回投与後にみられた一般症状は抗コリン作用あるいは ß2 刺激作用によるものないしは非特異的な毒性反応であり，局所及び全身性ともに忍容性は良好であった。

表 2.2.1.4: 1　　げっ歯類を用いたオロダテロール又はチオトロピウム+オロダテロールの単回投与毒性試験

動物種 系統	投与方法 バッチ番号 製剤	一群の 動物数 (雄/雌)	投与量 Olo 又は Tio+Olo (mg/kg)[a]	投与後 観察期 間	ALD Olo 又は Tio+Olo (mg/kg)[a]	特記すべき所見	CTD 番号/ 社内資料 番号
マウス Crl:NMRI	吸入投与 鼻経路 4 時間 Olo: 8460120 CTF	 5/0 0/5	平均 49.7 雄 47.7 雌 51.7	14 日間	雄　>47.7 雌　>51.7 雌雄　>49.7	死亡：なし 1～4 日目：自発運動低下，歩行失調，振戦，腹式呼吸，閉眼，立毛 5～14 日目：一般状態の変化なし 剖検時に肉眼的病理所見なし	CTD4.2.3.1-1 _U[redacted]-1101
マウス Crl:NMRI	吸入投与 鼻経路 4 時間 Tio: 1012809 Olo: 8460261 CTF	 5/0 0/5	用量比 1：1 雄 33.8+35.5 雌 35.8+37.6	14 日間	雄 <33.8 + <35.5 雌 >35.8 + >37.6	死亡：雄 2 1～5 日目：閉眼，自発運動低下，腹式呼吸，背弯姿勢，粗毛 1～9 日目：時に瞳孔強直を伴う散瞳 剖検時に肉眼的病理所見なし	CTD4.2.3.1-2 _U[redacted]-1184
マウス Crl:NMRI	吸入投与 鼻経路 4 時間 Tio: 1012809 Olo: 8460261 CTF	 5/0 0/5	用量比 2：1 雄 40.1+21.4 雌 43.7+23.3	14 日間	雄 <40.1 + <21.4 雌 <43.7 + <23.3 雌雄 <41.9 + <22.3	死亡：雌雄各 1 1 日目：散瞳，瞳孔強直，閉眼，身づくろい行動増加，粗毛，呼吸困難，鎮静，運動失調 剖検時に肉眼的病理所見なし	CTD4.2.3.1-3 _U[redacted]-1201
マウス Crl:NMRI	吸入投与 鼻経路 4 時間 Tio: 1012809 Olo: 8460261 CTF	 5/0 5/0 5/0 0/5 0/5 0/5	用量比 1：6 雄 2.4+15.7 4.4+28.2 9.9+63.3 雌 2.6+17.2 4.7+30.2 10.7+68.7	14 日間	雄 2.4+15.7～4.4+28.2 雌 4.7+30.2～10.7+68.7	死亡：高用量：雄 1，雌 3（生存動物も瀕死のため 4 日目に屠殺）；中間用量：雄 4 一般状態：散瞳，瞳孔強直，閉眼，鎮静，粗毛，呼吸困難，運動失調，末梢充血，体温上昇，後弯 剖検：死亡動物及び途中殺動物の多くで胃及び腸の拡張。高用量群の 3 例では肝が斑状に変色（ピンク－黄色）	CTD4.2.3.1-4 _U[redacted]-1197

a: 1 日平均到達用量は，McMahon 式による理論的 RMV を用いて計算した（CTD4.3-31_R97-0663）

表 2.3.1: 1　　げっ歯類を用いたオロダテロール又はチオトロピウム+オロダテロールの単回投与毒性試験（続き）

動物種 系統	投与方法 バッチ番号 製剤	一群の 動物数 (雄/雌)	投与量 Olo 又は Tio+Olo (mg/kg)[a]	投与後 観察期 間	ALD Olo 又は Tio+Olo (mg/kg)[a]	特記すべき所見	CTD 番号/ 社内資料 番号
マウス Crl:NMRI	急速静脈内投与 10 mL/kg Olo: 8460120 生理食塩液	3/3 3/3 3/3	10 20 40	14 日間	雄　20～40 雌　20～40 雌雄　20～40	死亡：40 mg/kg：雄 2，雌 1 死亡例の剖検：様々な器官のうっ血，変色 1 日目：10，20 mg/kg：自発運動低下，腹臥位，呼吸促迫 2～14 日目：一般状態の変化なし	CTD4.2.3.1-5 _U[redacted]-1113
マウス Crl:NMRI	経口投与 10 mL/kg Olo: 8460120 HEC 懸濁液	3/3 3/3 3/3 0/3	100 316 1000 2000	14 日間	雄 >1000 雌 1000～2000	死亡：2000 mg/kg：雌 2 死亡例の剖検：様々な器官のうっ血，変色 1 日目：全用量：自発運動低下，呼吸促迫 1000 mg/kg：閉眼，腹臥位 1～5 日目：2000 mg/kg：自発運動低下，呼吸促迫，閉眼，立毛	CTD4.2.3.1-6 _U[redacted]-1118
ラット CrlGlxBrl Han:WI	吸入投与 鼻経路 4 時間 Olo: 8460120 CTF	5/5 5/5	平均 24.7[a] 雄 22.8 雌 26.6	14 日間	雄　>22.8 雌　>26.6 雌雄　>24.7	死亡：なし 1 日目：全用量：自発運動低下，閉眼，腹式呼吸，反復掻鼻，咀嚼亢進 2～14 日目：一般状態の変化なし，剖検時に肉眼的病理所見なし	CTD4.2.3.1-7 _U[redacted]-1100
ラット Crl:WI (Han)	吸入投与 鼻経路 4 時間 Tio: 1012809 Olo: 8460261 CTF	 5/0 0/5	用量比 1：1 雄 16.7+17.5 雌 19.1+20.1	14 日間	雄　>16.7＋>17.5 雌　>19.1＋>20.1 雌雄　>17.9＋>18.8	死亡：なし 1～2 日目：自発運動低下，腹式呼吸，鼻部身づくろいの反復，皮膚の蒼白あるいは発赤，鼻口部の赤色痂皮形成，背弯姿勢，粗毛 1～9 日目：散瞳，瞳孔強直	CTD4.2.3.1-8 _U[redacted]-1182
ラット Crl:WI (Han)	吸入投与 鼻経路 4 時間 Tio: 1012809 Olo: 8460261 CTF	 5/0 0/5	用量比 2：1 雄 19.7+10.5 雌 22.7+12.1	14 日間	雄　>19.7＋>10.5 雌　>22.7＋>12.1 雌雄　>21.2＋>11.3	死亡：なし 1 日目：営巣行動低下，鎮静，咀嚼増加，自発運動低下，身づくろい行動の増加，呼吸困難 1～2 日目：粗毛（雌のみ） 1～4 日目：散瞳，瞳孔強直	CTD4.2.3.1-9 _U[redacted]-1199

a: 1 日平均到達用量は，McMahon 式による理論的 RMV を用いて計算した（CTD4.3-31_R97-0663）

表 2.3.1: 1　　げっ歯類を用いたオロダテロール又はチオトロピウム+オロダテロールの単回投与毒性試験（続き）

動物種 系統	投与方法 バッチ番号 製剤	一群の 動物数 (雄/雌)	投与量 Olo 又は Tio+Olo (mg/kg)[a]	投与後 観察期 間	ALD Olo 又は Tio+Olo (mg/kg)[a]	特記すべき所見	CTD 番号/ 社内資料 番号
ラット Crl:WI (Han)	吸入投与 鼻経路 4 時間 Tio: 1012809 Olo: 8460261 CTF	 5/0 0/5	用量比 1：6 雄 4.8+30.8 雌 5.5+35.5	14 日間	雄 >4.8＋>30.8 雌 >5.5＋>35.5 雌雄 >5.2＋>33.2	死亡：なし 1 日目：営巣行動低下，咀嚼増加，鎮静，自発運動低下，身づくろい行動の増加，呼吸困難 1～4 日目：粘膜乾燥，散瞳，瞳孔強直，粗毛	CTD4.2.3.1- 10_U[redacted]-1185
ラット CrlGlxBr lHan:WI	急速静脈内投与 10 mL/kg Olo: 8460120 生理食塩液	3/3 3/3 3/3 0/3	10 20 40 80	14 日間	雄 >40 雌 40～80	死亡：80 mg/kg：雌 3 死亡例の剖検：様々な器官のうっ血 1 日目：全用量：自発運動低下，腹臥位，呼吸促迫，立毛 2～6 日目：40 mg/kg：自発運動低下，呼吸速迫，立毛	CTD4.2.3.1- 11_U[redacted]-1112
ラット CrlGlxBr lHan:WI	経口投与 10 mL/kg Olo: 8460120 HEC 懸濁液	3/3 3/3 3/3	100 316 1000	14 日間	雄 >1000 雌 316～1000	死亡：1000 mg/kg：雌 2 死亡例の剖検：様々な器官の変色 1 日目：全用量：自発運動低下，呼吸促迫 1000 mg/kg：立毛 2～7 日目：1000 mg/kg：自発運動低下，呼吸促迫，立毛	CTD4.2.3.1- 12_U[redacted]-1065

a: 1 日平均到達用量は，McMahon 式による理論的 RMV を用いて計算した（CTD4.3-31_R97-0663）

3. 反復投与毒性試験

げっ歯類及びイヌにオロダテロール又はチオトロピウム+オロダテロールを反復投与したときの毒性について，ヒトで予定されている吸入投与経路を用いた試験で評価するとともに，オロダテロールについては静脈内及び経口投与経路による試験を実施し，詳細な毒性学的評価を行った。特に明記しない限り，これらの試験は 1 日 1 回投与で，GLP に準拠して実施した。

吸入投与毒性試験の場合，試験計画書には設定用量を，報告書及び関連資料には到達用量をそれぞれ記載した。到達用量は，げっ歯類を用いた試験では体重及び McMahon 式［CTD4.3-31-_R97-0663］により求めた理論的 RMV を用いて算出した。一方，イヌでは，実測 RMV を用いて算出した。本概要文では，すべての吸入投与試験において到達用量を示す。

オロダテロールの吸入投与毒性試験においては，0.5%オロダテロール，[redacted]% BAC，[redacted]% Na-EDTA，[redacted]%クエン酸を含有するオロダテロール水溶液を用いてエロゾルを調製した。チオトロピウム+オロダテロールの吸入投与毒性試験においては，1.0%チオトロピウムあるいは 1.0%オロダテロール，[redacted]% BAC，[redacted]% Na-EDTA，1 M 塩酸（pH 2.9）を含有するチオトロピウム並びにオロダテロール水溶液を用いてエロゾルを調製した。

すべての反復投与毒性試験においてトキシコキネティクスを行った。マウス及びラットを用いた試験では，トキシコキネティクスのために動物を追加したが，これらの動物数などについてはそれぞれの項で記載していない。チオトロピウムあるいはオロダテロールの濃度は確立された方法によって分析した［CTD4.2.3.7.7-5_U[redacted]-2430, CTD4.2.3.7.7-6_U[redacted]-1524, CTD4.2.3.7.7-7_U[redacted]-2165, CTD4.2.3.7.7-8_U[redacted]-1347，CTD4.2.3.7.7-9_U[redacted]-1397］。

3.1 げっ歯類における毒性試験

げっ歯類を用いて実施したすべての反復投与毒性試験の概要を表 3.1.3.1: 1 に示す。第 3.1.1 項には，吸入投与により実施したすべてのげっ歯類毒性試験を，第 3.1.2 項及び第 3.1.3 項にはそれぞれ静脈内及び経口投与により実施したすべてのげっ歯類毒性試験を示す。

3.1.1 げっ歯類における反復吸入投与毒性試験

げっ歯類を用いた試験では，特に明記しない限り，1 日 1 回，鼻経路により 35 分間吸入投与した。

3.1.1.1 オロダテロールのマウスにおける 13 週間吸入投与毒性試験

［CTD4.2.3.2-1_U[redacted]-1341，CTD4.2.3.2-2_U[redacted]-1975］

1 群当たり雌雄各 10 例の CD-1 マウスにオロダテロールを 0（空気対照），0（溶媒対照），63，211，900 又は 3258 µg/kg/日（投与可能な最高用量）の用量で，少なくとも 91 日間にわたり吸入投与した［CTD4.2.3.2-1_U[redacted]-1341］。解析データに基づく MMAD は 0.39～0.96 µm の範囲であり，マウスにおいて吸入可能であると考えられた。試験開始時，動物は約 8～9 週齢，体重は雄 26～39 g，雌 23～31 g の範囲であった。

1 日目及び 13 週目に, 曝露量を測定するためトキシコキネティクス群から血液試料を採取した。低用量 3 群における 1 日目の曝露量は，13 週目に比べて有意に高かった。その理由が不明であったため，単回投与により 1 日目の再試験を行い，曝露量を測定した［CTD4.2.3.2-2_U[redacted]-1975］。その結果，1 日目の曝露量はやはり 13 週目に比べて高かったものの，桁数は同じであった。2 回目の試験結果を 1 日目のデータとして採用した。

オロダテロールの全身曝露を確認した結果，13 週目における各用量の血漿中オロダテロールの $C_{max,ss}$ 平均値（雄／雌）は 5110／4320, 15500／17600, 92200／91200, 254000／284000 pM, $AUC_{0-24,ss}$ 平均値（雄／雌）は 12100／15400，35000／49700，150000／125000，413000／699000 pM·h であった。87 日目の曝露量は用量に比例して増加したが，単回投与後の曝露量増加は用量比を下回っていた。血漿中オロダテロール濃度のばらつきは中等度であり，明らかな性差は認められなかった。

オロダテロール投与群の動物で流涎が認められた。10 週目以降，900 及び 3258 µg/kg/日投与群で用量依存的な軽度の骨格筋量増加が認められた。また，投与に関連して，摂餌量の増加を伴う体重増加が認められた。さらに，用量とは無関係に，オロダテロール投与群の動物で血清中カリウムが上昇し，オロダテロール投与との関連が明らかなトリグリセリドの低下が認められた。トリグリセリドの低下は 3258 µg/kg/日投与群で最大であった。これらの変化はオロダテロールの薬理作用に関連した変化と判断された。

オロダテロール投与によって，雌雄で肺及び脾臓重量が増加し，雌のみで心臓重量が増加したが，これらに関連する病理組織学的所見は認められなかった。喉頭に，移行上皮過形成を含む投与に関連した病理組織学的変化が認められた。この変化は溶媒投与でも誘発されるものであったが，オロダテロール投与により用量依存的に顕著となり，オロダテロール 211 µg/kg/日以上の投与群では扁平上皮化生も認められた。卵巣では，対照群に比べて 3258 µg/kg/日投与群で黄体数が増加する傾向がみられた。また，子宮では，3258 µg/kg/日投与群のすべての雌において，子宮筋層の肥厚及び嚢胞状子宮内膜腺の増加が認められた。これらの変化は，卵巣及び子宮重量の増加を伴い，卵巣［CTD4.3-80_R15-0723］と子宮筋層の肥厚［CTD4.3-79_R15-0648］については，げっ歯類の雌生殖器官に対する β_2 刺激薬の既知の報告と一致していた。嚢胞状子宮内膜腺の増加については，β_2 刺激薬によるプロゲステロン産生促進の結果と考えられる［CTD4.3-64_R12-0188, CTD4.3-81_R15-0724］。オロダテロール投与に関連した標的器官毒性を示す病理組織学的異常所見は認められなかった。

以上より，マウス 13 週間吸入投与毒性試験における NOAEL は 63 µg/kg/日と判断され，この用量での $C_{max,ss}$ 平均値（雄／雌）は 5110／4320 pM，$AUC_{0-24,ss}$ 平均値（雄／雌）は 12100／15400 pM·h であった。検討したすべての用量で薬理作用が発現していた。

3.1.1.2 オロダテロールのラットにおける 2 週間吸入投与用量設定試験（GLP 非適合）［CTD4.2.3.2-3_U[redacted]-2143］

1 群当たり雌雄各 5 例の Crl:WI(Glx/BRL/Han)IGS BR ラットにオロダテロールを 0（溶媒対照），0.422，4.26，40.1 又は 538 µg/kg/日の用量で 14 日間，9 分間／日で吸入投与した。重量測定法に

よる MMAD は 3.47～4.21 μm の範囲であり，ラットにおいて吸入可能であると考えられた。試験開始時，動物は約 6～7 週齢，体重は雄 150～241 g，雌 137～165 g の範囲であった。

1 及び 14 日目に，曝露量を測定するためトキシコキネティクス群から血液試料を採取し，オロダテロールの全身曝露を確認した。14 日目における各用量の血漿中オロダテロールの $C_{max,ss}$ 雌雄平均値は 82.6，192，3540，40100 pM，$AUC_{0-24,ss}$ 雌雄平均値は 0.422 μg/kg/日群では曝露量が低いため算出されず，それ以上の用量群では，それぞれ 802，11350，111500 pM·h であった。

40.1 及び 538 μg/kg/日投与群のすべての動物で摂餌量の増加を伴う体重増加が認められた。投与に関連した一般状態の変化及び眼科学的検査所見は認められなかった。また，血液学的検査，血液生化学的検査及び尿検査でも，投与に関連した所見は認められなかった。

ラット骨髄小核試験において，オロダテロール投与による影響は認められなかった。

投与終了時，オロダテロール投与に関連した器官重量変化及び剖検所見は認められなかった。また，病理組織学的検査においても，オロダテロールの全身曝露に起因する所見は認められなかった。538 μg/kg/日投与群の動物において，喉頭に軽微／軽度の扁平上皮化生及び軽微／軽度の U 字型軟骨の限局性壊死が認められた。溶媒対照群を含むすべての群の動物の鼻腔粘膜に溶媒に起因すると考えられる軽微な変化がみられた。538 μg/kg/日投与群の動物で喉頭の扁平上皮化生及び壊死が顕著であったが，その後の試験における用量制限毒性とはみなされなかった。

3.1.1.3 オロダテロールのラットにおける 4 週間吸入投与毒性試験

[CTD4.2.3.2-4_U[redacted]-2133]

1 群当たり雌雄各 10 例の HsdBrlHan:WIST ラットにオロダテロールを 0（溶媒対照），78，260 又は 1360 μg/kg/日の用量で，少なくとも 28 日間吸入投与した。対照群及び高用量群に雌雄各 8 例の動物を追加し，4 週間回復群とした。重量測定法による MMAD は 3.7～4.4 μm の範囲であり，ラットにおいて吸入可能であると考えられた。試験開始時，動物は約 8 週齢，体重は雄 179～239 g，雌 123～191 g の範囲であった。

1，7 及び 28 日目に，曝露量を測定するためトキシコキネティクス群から血液試料を採取し，オロダテロールの全身曝露を確認した。28 日目における血漿中オロダテロールの $C_{max,ss}$ 雌雄平均値は 2230，12900，102000 pM，$AUC_{0-24,ss}$ 雌雄平均値は 6840，25000，170000 pM·h であった。

すべてのオロダテロール投与群の動物で，摂餌量及び体重増加量の増加がみられた。死亡例はなく，オロダテロール投与に関連した一般状態の変化及び眼科学的検査所見は認められなかった。すべての用量で認められた 1 回換気量の増加は，オロダテロールの薬理作用に関連していると考えられた。

血清中の AST 及び ALT の増加がみられたが，肝臓にこれと関連した病理組織学的変化が認められなかったことから，これらの活性上昇は，血漿中オロダテロール濃度が高くなったことによる肝臓の代謝的適応と関連するものであり，毒性学的に問題ではないと考えられた。グルコースは用量依存的に低下した。すべての投与群において，絶対及び相対心臓重量に有意な増加が認められ，特に 260 及び 1360 μg/kg/日群で顕著であった。これに関連した病理組織学的所見は認められなかったが，78 μg/kg/日を超える用量での心臓負荷を示唆しているものと考えられた。用量に

依存しない胸腺重量の減少が雄のみで認められた。喉頭の U 字軟骨領域において，上皮の扁平上皮化生及び軟骨の壊死が認められた。げっ歯類の呼吸器系の中でも，喉頭は特に BAC のような吸引物質に対する感受性が高い領域である。所見は主に 260 及び 1360 µg/kg/日投与群で認められたが，溶媒対照群の動物にも認められた。特に 1360 µg/kg/日群の雌における U 字型軟骨壊死の発生頻度及び程度は溶媒対照群を上回っていた。オロダテロール投与群の動物の肺において，用量依存性はないものの，肺胞マクロファージ集簇巣が高頻度に認められた。しかし，マクロファージの活性化はみられず，形態は正常であった。すべての群において，一部の動物の鼻腔粘膜に杯細胞数の増加がみられた。U 字型軟骨の壊死を除いて，これらの呼吸器系の変化はすべて軽微～軽度であり，回復期間後完全に回復した。

ラット小核試験において，オロダテロールによる骨髄小核及び骨髄毒性を示す所見は認められなかった。

喉頭の U 字軟骨領域における変化の重篤度及び頻度に基づき，NOAEL は 260 µg/kg/日と判断された。この用量での $C_{max,ss}$ 雌雄平均値は 12900 pM, $AUC_{0-24,ss}$ 雌雄平均値は 25000 pM·h であった。検討した用量で薬理作用が生じない用量はなかった。

3.1.1.4 オロダテロールのラットにおける 13 週間吸入投与毒性試験

[CTD4.2.3.2-5_U[redacted]-1342]

1 群当たり雌雄各 10 例の Crl:WI(Han)ラットにオロダテロールを 0（空気対照），0（溶媒対照），62，239，971 又は 2833 µg/kg/日の用量で，少なくとも 91 日間吸入投与した。対照群及び高用量群に雌雄各 8 例のラットを追加し，4 週間回復群とした。重量測定法による MMAD は 2.93～3.28 µm の範囲であり，ラットにおいて吸入可能であると考えられた。試験開始時，動物は約 6～7 週齢，体重は雄 151～240 g，雌 125～188 g の範囲であった。

1 及び 91 日目に，曝露量を測定するためトキシコキネティクス群から血液試料を採取し，オロダテロールの全身曝露を確認した。91 日目における血漿中オロダテロールの $C_{max,ss}$ 雌雄平均値は 2550，17800，93250，279500 pM，$AUC_{0-24,ss}$ 雌雄平均値は 8645，37400，189500，514000 pM·h であった。全体として，血漿中オロダテロール濃度のばらつきは中等度であり，血漿中濃度は雌雄で同程度であった。血漿中濃度は曝露終了後速やかに最高値に達した。

一般状態の変化として，主に投与後まもなく用量依存的に流涎が発現し，971 µg/kg/日以上の用量で体重増加亢進，摂餌量のわずかな増加がみられ，すべてのオロダテロール投与群で総白血球数増加が認められた。

血中の AST の増加がオロダテロール投与群で 7 週にすべての投与群で，13 週目に 2833 µg/kg/日の雄のみで認められたが，肝臓にこれと関連した病理組織学的変化が認められなかったことから，血漿中オロダテロール濃度が高くなったことによる肝臓の代謝的適応と関連するものであり，毒性学的に問題ではないと考えられた。血中カルシウムの増加は全ての投与群で認められた。グルコースの低下が全ての投与群で雄は 7 週及び 13 週目，雌は 13 週目に，トリグリセリドの低下が 971 µg/kg/日以上の用量で 13 週目に認められた。また 7 週目及び 13 週目にオロダテロール投与群の大部分の雄でクレアチニンが増加するとともに，7 週目にカリウムの増加も認められた。し

かし，これらの変化に用量依存性はなく，4 週間の回復期間後に回復した。7 週目の 971 µg/kg/日以上の用量の雌雄両方で尿比重及びカリウム濃度が低下し，尿量が増加した。

心臓及び脾臓重量の有意な増加が雌の投与群で，腎臓重量の減少がすべての投与群で，精巣上体重量の減少が雄の 239 µg/kg/日以上の用量群でそれぞれ認められたが，これらに関連する病理組織学的所見は認められなかった。また，これらの器官重量における変化はすべて 4 週間の回復期間後に回復した。

病理組織学的検査では，溶媒投与群に喉頭腹側における扁平上皮化生及び U 字型軟骨の壊死が認められた。4 週間の回復期間後もこれらの変化は回復しなかった。239 µg/kg/ 日以上のオロダテロール投与群の動物において，喉頭腹側における扁平上皮化生及び U 字型軟骨壊死の発現率及び重症度が上昇したが，239 µg/kg/日にみられた扁平上皮化生の程度はいずれも軽微であり，所見が増悪したとは考えられなかった。これらの所見については，4 週間の回復期間後に部分的な回復が認められた。

以上より，ラット 13 週間吸入投与毒性試験において認められた変化のほとんどは，オロダテロールの薬理作用あるいは溶媒の刺激に関連するものであったが，喉頭における変化の重篤度及び頻度に基づき NOAEL は 239 µg/kg/日と判断された。この用量での $C_{max,ss}$ 平均値（雄／雌）は 16400／19200 pM，$AUC_{0-24,ss}$ 平均値（雄／雌）は 34800／40000 pM·h であった。検討した用量で薬理作用が生じない用量はなかった。

3.1.1.5 オロダテロールのラットにおける 26 週間吸入投与毒性試験

［CTD4.2.3.2-6_U[redacted]-1691］

1 群当たり雌雄各 20 例の Crl:WI (Han)ラットにオロダテロールを 0（溶媒対照），49，200 又は 3400 µg/kg/日の用量で，少なくとも 182 日間吸入投与した。対照群及び高用量群に雌雄各 10 例のラットを追加し，4 週間回復群とした。解析データに基づく MMAD 推定値は 1.49～1.72 µm の範囲であり，ラットにおいて吸入可能と考えられた。試験開始時，動物は約 10 週齢，体重は雄 236～280 g，雌 162～202 g の範囲であった。

1, 114 及び 177 日目に, 曝露量を測定するためトキシコキネティクス群から血液試料を採取し，オロダテロールの全身曝露を確認した。177 日目における血漿中オロダテロールの $C_{max,ss}$ 雌雄平均値は 3380，12750，305500 pM，$AUC_{0-24,ss}$ 雌雄平均値は 8445，37700，773000 pM·h であった。曝露量は中等度から高度で，$AUC_{0-24,ss}$ 値は用量比を上回る増加を示した。反復投与後の血漿中オロダテロール濃度に特に変化は認められず，性差もみられなかった。

死亡例は認められなかった。被験物質に関連した問題となる一般状態の変化は認められなかった。

オロダテロール投与によって誘発された主な変化は，体重増加亢進，骨格筋の肥大及び壊死，白色脂肪組織の減少等によって代表される同化作用によるものであった。これらの変化は β_2 刺激薬に特徴的なものであった［CTD4.3-17_P89-3120，CTD4.3-19_P92-68423］。

すべての群において，試験期間を通して体重が持続的に増加したが，オロダテロール投与群の体重増加量は対照群に比べて一貫して高かった。この体重増加はオロダテロールの同化作用によ

るものと考えられた。すべてのオロダテロール投与群の動物で認められた絶対及び相対平均心臓重量の用量に依存しない軽微な増加についてもこの同化作用が原因であると考えられた。この作用は本化合物に典型的なクラス効果である。すべてのオロダテロール投与群において，試験期間及び回復期間を通して，摂餌量が対照群に比べてわずかに高かった。

眼科学的検査において，オロダテロール投与群のほぼすべての動物で，両眼球突出が認められた。これらの変化は，オロダテロールの顕著な同化作用による二次的なものであり，ヒトにおいて毒性学的に意味のあるものではないと考えられた。

オロダテロール投与群の動物において，ALT，AST 及び ALP に軽度で可逆的な上昇が認められた。3400 µg/kg/日投与群の雄では AST が 2.1 倍増加した。肝臓にこれと関連した病理組織学的変化が認められなかったことから，これらの活性上昇は，血漿中オロダテロール濃度が高くなったことによる肝臓の代謝的適応と関連するものであり，毒性学的に問題ではないと考えられた。

剖検において，骨格筋肥大，白色脂肪組織の減少及び卵巣の変色が認められた。

骨格筋肥大及び白色脂肪組織の減少はすべてのオロダテロール投与群で認められ，オロダテロールの同化作用によるものであると考えられた［CTD4.3-17_P89-3120，CTD4.3-19_P92-68423］。3400 µg/kg/日投与群では骨格筋線維の壊死が散在性に認められ，毒性所見と考えられた。しかし，この変化は，骨格筋肥大が毛細血管の分布に影響し，骨格筋への酸素供給量が低下した結果と考えられている［CTD4.3-21_P04-01456，CTD4.3-24_P07-14956，CTD4.3-20_P98-2777］。トキシコキネティクス群を用いて実施した非絶食動物の肝臓の病理組織学的検査において，オロダテロール投与に関連してグリコーゲン蓄積に軽度の変化が認められた。すなわち，対照群動物では肝細胞における軽微から中等度のグリコーゲン蓄積が肝小葉内のすべての領域で認められたが，200 及び 3400 µg/kg/日投与群では，肝細胞におけるグリコーゲン量が肝小葉内のすべての領域で用量相関的に減少した。β_2 刺激薬にはグリコーゲン分解を促進させる作用があり，この所見は他の β_2 刺激薬でも報告されているものである［CTD4.3-22_P04-08784］。3400 µg/kg/日投与群のみで，子宮拡張及び卵巣における黄体嚢胞及び黄体出血の発現率及び重症度がわずかに上昇した。これらの変化はげっ歯類の雌生殖器に対する β_2 刺激薬の既知の報告と一致していた。肺では投与群において肺胞マクロファージ集簇が高頻度に認められた。すべての用量で角膜上皮の可逆的萎縮が認められたが，これは同化作用及び細い「経鼻」チューブを用いて毎日，長期間にわたり実施した吸入投与手技に起因するものと考えられた。つまり，眼窩内筋量が増加するとともに，連日の 35 分間の吸入期間中，眼球が吸入チューブに押し付けられた結果と考えられる。さらに，眼球突出により眼瞼の閉鎖不全が生じたことで，角膜表面が乾燥した可能性が考えられた。鼻腔，喉頭及び気管分岐部の扁平上皮化生などの病理組織学的変化が認められたが，これらは長期間にわたる吸入投与を受けたげっ歯類で認められる特徴的所見であった。これらの変化は用量依存的で，多くは可逆的なものであり，ヒトで問題となるものではないと考えられた。

以上より，ラット 26 週間吸入投与毒性試験における NOAEL は 200 µg/kg/日と判断された。この用量での $C_{max,ss}$ 平均値（雄／雌）は 13500／12000 pM，$AUC_{0-24,ss}$ 平均値（雄／雌）は 43000／32400 pM·h であった。検討した用量で薬理作用が生じない用量はなかった。

3.1.1.6 チオトロピウム+オロダテロールのラットにおける 4 週間吸入毒性試験（用量比 1：1）［CTD4.2.3.2-7_U[redacted]-1893］

1 群当たり雌雄各 10 例の Crl:WI (Han)ラットにチオトロピウム+オロダテロールを 0（溶媒対照），85.2+78.6，577+555 又は 2266+2174 μg/kg/日の用量で，少なくとも 28 日間吸入投与した。対照群及び 2266+2174 μg/kg/日群に雌雄各 6 例の動物を追加し，4 週間回復群とした。各群各 5 例の雄動物については，安全性薬理の評価（単回投与後の Irwin 変法及び呼吸器パラメータの測定）も併せて行った。その結果については，薬理試験の概要文［CTD 2.6.2］に記載する。さらに，小核試験も併せて実施した。その結果は第 4.2.2 項に記載する。重量測定法による MMAD はチオトロピウムが 1.81～2.71 μm オロダテロールが 1.84～2.41 μm の範囲であり，ラットにおいて吸入可能であると考えられた。投与開始時，動物は約 9 週齢，体重は雄 241～338 g，雌 188～224 g の範囲であった。

1 及び 28 日目に，曝露量を測定するためトキシコキネティクス群から血液試料を採取し，チオトロピウム及びオロダテロールの全身曝露を確認した。両被験物質とも血漿濃度のばらつきは小さく，性差は認められなかった。85.2+78.6 μg/kg/日群では，28 日目における AUC_{0-24} が 1 日目と比較して高かったが，577+555 及び 2266+2174 μg/kg/日群では低い傾向にあった。28 日目における $C_{max,ss}$ 雌雄平均値は 85.2+78.6, 577+555 又は 2266+2174 μg/kg/日群でそれぞれ 17300+17800, 96800+76500，296000+190000 pM，$AUC_{0-24,ss}$ 雌雄平均値は 23600+39800，95700+156000，238000+301000 pM·h であった。

投薬期間中 3 例が途中死亡した。2266+2174 μg/kg/日群の雄 2 例（407，415）及び 577+555 μg/kg/日群の雄 1 例（301）はそれぞれ 23，14，又は 29 日目に死亡しているのが発見された。動物番号 407 の死因は肺膿瘍及び胸膜炎と考えられた。301 及び 415 はそれぞれ食道上部又は喉頭に滞留していた餌による窒息が死亡原因である可能性が高いと考えられた。

散瞳はチオトロピウム+オロダテロールを投与したすべての動物で投与 1-2 時間後に認められ，577+555 及び 2266+2174 μg/kg/日群のほとんどの動物では 24 時間後まで継続していた。体重増加量及び摂餌量の減少はすべての被験物質投与群で認められた。これらの影響は回復期間後回復した。

好中球数，リンパ球数及び単球数増加に伴う白血球数の有意な増加がほとんどの被験物質投与群で認められた。この所見は 2266+2174 μg/kg/日群の雄では回復期間後にも認められた。すべての被験物質投与群で PT の延長が認められ，577+555 及び 2266+2174 μg/kg/日群で APTT の短縮が認められた。血中グルコース及びトリグリセリドはすべての被験物質投与群の雌動物で減少していた。尿検査では，尿中ナトリウム，クロライド及びカリウム濃度の減少を伴う尿量増加及び尿比重減少が認められ，チオトロピウムの薬理作用に起因する口渇のため摂水量が増加したことによる可能性が考えられた。

肺重量の増加及び唾液腺，胸腺及び腎重量の減少が被験物質投与群で認められた。回復群では臓器重量における有意な変化はみられなかった。剖検時，被験物質投与群の動物で肺暗赤色化及び気管内泡沫状物の貯留が認められたが，その頻度には用量依存性は認められなかった。病理組織学的検査では，鼻腔の主にレベル 1，まれにレベル 2 領域における背側鼻道上皮の萎縮が

2266+2174 µg/kg/日群の雄動物で認められた。腹側鼻道の扁平上皮化生は 577+555 及び 2266+2174 µg/kg/日群の動物でみられた。これらの所見は回復期間後には認められなかった。披裂軟骨部上皮の軽微から軽度の扁平上皮化生は 577+555 及び 2266+2174 µg/kg/日群の動物で認められた。喉頭 U 字型軟骨の壊死と喉頭蓋底部上皮の扁平上皮化生は対照群動物を含むほとんどの動物で認められた。回復期間後，U 字型軟骨の壊死は 2266+2174 µg/kg/日群の動物のみで認められ，喉頭蓋底部における扁平上皮化生の頻度も 2266+2174 µg/kg/日群で高かった。鼻腔及び喉頭における変化はチオトロピウムの抗コリン作用及び溶媒中の BAC の影響の両方が関係していると考えられた。肺におけるうっ血の頻度及び程度は被験物質投与群動物で高かった。肺におけるうっ血は回復期間後にも散見されたが，被験物質投与群と対照群間で差はなかった。

軽度の抗コリン作用に起因する変化を除外すれば，用量比 1：1 のチオトロピウム+オロダテロールの本試験における NOAEL は 85.2+78.6 µg/kg/日と判断され，この用量群での 28 日目における C_{max} 雌雄平均値は 17300+17800 pM，AUC_{0-24} 雌雄平均値は 23600+39800 pM·h であった。2 剤投与による相乗あるいは相加効果的な毒性所見は認められなかった。

3.1.1.7 チオトロピウム+オロダテロールのラットにおける 4 週間吸入毒性試験（用量比 1：6 及び 2：1）［CTD4.2.3.2-8_ U[redacted]-1892］

1 群当たり雌雄各 10 例の Crl:WI (Han)ラットにチオトロピウム+オロダテロールを 0（溶媒対照），13+75 又は 393+2032 µg/kg/日（用量比 1：6）及び 143+73 又は 3263+1747 µg/kg/日（用量比 2：1）の用量で，少なくとも 28 日間吸入投与した。対照群及び高用量群に雌雄各 6 例の動物を追加し，4 週間回復群とした。1 群当たり各 5 例の雄動物については，安全性薬理の評価（単回投与後の Irwin 変法及び呼吸器パラメータの測定）も併せて行った。その結果については，薬理試験の概要文［CTD 2.6.2］に記載する。さらに小核試験も併せて実施した。その結果は第 4.2.3 項に記載する。重量測定法による MMAD はチオトロピウムが 1.60～1.82 µm，オロダテロールが 1.62～2.26 µm の範囲であり，ラットにおいて吸入可能であると考えられた。投与開始時，動物は約 9 週齢，体重は雄 236～298 g，雌 179～223 g の範囲であった。

投与 1 及び 28 日目に，曝露量を測定するためトキシコキネティクス群から血液試料を採取し，チオトロピウム及びオロダテロールの全身曝露を確認した。両被験物質とも血漿濃度のばらつきは小さく，性差は認められなかった。対照群の 1 例のサンプル（動物番号 116，28 日目投与 24 時間後）で低濃度のオロダテロールが検出された。28 日目における 13+75，393+2032，143+73 及び 3263+1747 µg/kg/日群における $C_{max,ss}$ 雌雄平均値はそれぞれ 843+7590，69100+193000，12200+7060 及び 596000+148000 pM，$AUC_{0-24,ss}$ 雌雄平均値はそれぞれ 2020+19100，57700+381000，16500+17600 及び 441000+262000 pM·h であった。

投与期間中，6 例が途中死亡した。投与 1 日目に 393+2032 µg/kg/日群の雄 1 例（307）及び 3263+1747 µg/kg/日群の雌 2 例（526 及び 530），15 日目に 3263+1747 µg/kg/日群の雄 1 例（504），24 日目に 393+2032 µg/kg/日群の雄 1 例（316）及び 3263+1747 µg/kg/日群の雄 1 例（510）がそれぞれ死亡または瀕死屠殺された。530 の動物は事故死と確認されたが，それ以外の動物の死亡は

チオトロピウム+オロダテロールの投与に関連したものと考えられた。これらのうち 3 例では食道上部あるいは喉頭に餌が滞留していた。

散瞳はすべての被験物質投与群動物で認められた。393+2032，143+73 ，及び 3263+1747 µg/kg/日群で，投与初期に主に雄で摂餌量の減少を伴った体重増加量の減少がみられた。これらの影響は回復期間後ほぼ回復した。

すべての被験物質投与群で投薬期間中白血球数の増加が認められたが，回復群（393+2032 µg/kg/日及び 3263+1747 µg/kg/日群）における回復期間後の検査ではみられなかった。13+75（雌），393+2032（雄）及び 3263+1747 µg/kg/日群で Hct の増加，雌の 3263+1747 µg/kg/日群で Hb の増加，及び 393+2032, 143+73 及び 3263+1747 µg/kg/日群の雄で網状赤血球数の増加及び MCHC の減少がみられた。用量依存性はないものの，すべての被験物質投与群で血中グルコースの減少が認められ，3263+1747 µg/kg/日群の雌でトリグリセリドの減少が認められた。また，カルシウムとリンの増加がみられた。尿中ナトリウム，クロライド及びカリウム濃度は減少していた。雌における尿量増加及び尿比重減少はチオトロピウムの薬理作用に起因する口渇のため摂水量が増加したことによる可能性が考えられたが，一般状態観察では摂水量の明らかな変化は認められなかった。

すべての投与群の雄で唾液腺重量の減少が認められ，チオトロピウムの薬効に関連する粘膜乾燥及び唾液分泌量減少に関連する可能性が考えられたが，それを示唆する病理組織学的変化は認められなかった。すべてのオロダテロール投与群で肺重量の増加が認められ，病理組織学的にうっ血と泡沫状マクロファージの集積がみられた。両用量比のチオトロピウム+オロダテロールとも高用量群の鼻腔（レベル I）で可逆性の鼻炎と重層扁平上皮化生が認められた。喉頭における U 字型軟骨の壊死及び喉頭蓋及び披裂軟骨部の重層扁平上皮化生が対照群を含むすべての群で投与期間終了時及び回復期間後に認められた。

軽度の抗コリン作用および溶媒中の BAC に起因する変化を除外すれば，用量比 1：6 及び 2：1 のチオトロピウム+オロダテロールを用いた本試験の NOAEL はそれぞれ 13+75 及び 143+73 µg/kg/日と判断され，この用量群での 28 日目における $C_{max,ss}$ 雌雄平均値は 843+7590 及び 12200+7060 pM，$AUC_{0-24,ss}$ 雌雄平均値は 2020+19100 及び 16500+17600 pM·h であった。2 剤投与による相乗あるいは相加効果的な毒性所見は認められなかった。

3.1.2 げっ歯類における反復静脈内投与毒性試験

ガイドラインに従い，ヒト単回静脈内投与代謝試験を実施するためのオロダテロールの安全性評価を目的として本試験を実施した。

3.1.2.1 オロダテロールのラットにおける 2 週間静脈内投与毒性試験

[CTD4.2.3.2-9_U[redacted]-1375]

1 群当たり雌雄各 10 例の HsdBrlHan:WIST ラットに生理食塩液に溶解したオロダテロールを 0，5，25 又は 100 µg/kg/日の用量，5 分間，5 mL/kg/日で 14 日間にわたり低速静脈内投与した。試験開始時，動物は約 9.5～10.5 週齢，体重は雄 226～278 g，雌 173～211 g の範囲であった。

1 及び 15 日目に，曝露量を測定するためトキシコキネティクス群から血液試料を採取し，オロダテロールの十分な全身曝露を確認した。15 日目における $C_{max,ss}$ 雌雄平均値は 2300，19000，49800 pM，$AUC_{0-24,ss}$ 雌雄平均値は 2660，15300，48200 pM·h であった。全体として，$C_{max,ss}$ 及び $AUC_{0-24,ss}$ はほぼ用量に比例して増加した。反復投与後に血漿中オロダテロール濃度の低下が認められた。血漿中オロダテロール濃度は雌雄で同程度であった。

ラットにオロダテロールを静脈内投与したときの忍容性はおおむね良好であり，血液学的検査パラメータの変化（0.92 倍～1.4 倍），グルコース減少（0.72 倍～0.54 倍）及びその他の血液生化学的検査パラメータにおける変化（0.63 倍～1.4 倍），尿検査パラメータの変化（0.56～2.7 倍）体重，摂餌量，器官重量の変化並びに病理組織学的検査所見，すなわち 100 µg/kg/日投与群における雌生殖器の変化（子宮内腔拡張並びに膣及び子宮頸部上皮の角化及び粘液化の発現率低下）及び 100 µg/kg/日投与群の雄 1 例の心臓における心筋変性など，認められた変化の多くは軽微なものであった。注射部位に局所刺激性を示す変化は認められなかった。検討した用量で薬理作用が生じない用量はなかった。

100 µg/kg/日は MTD に近い用量であると考えられ，2 週間静脈内投与毒性試験における NOAEL は 25 µg/kg/日と判断された。この用量での $C_{max,ss}$ 平均値（雄／雌）は 17300／20800 pM，$AUC_{0-24,ss}$ 平均値（雄／雌）は 13400／17300 pM·h であった。

3.1.3 げっ歯類における反復経口投与毒性試験

ガイドラインに従って，ヒト単回経口投与代謝試験を実施するためのオロダテロールの安全性評価を目的として，本試験を実施した。

3.1.3.1 オロダテロールのラットにおける 2 週間経口投与毒性試験

[CTD4.2.3.2-10_U[redacted]-2334]

1 群当たり雌雄各 10 例の Crl:WI(Han)ラットに 0.5% Natrosol 250 HX に懸濁したオロダテロールを 0，0.5，5 又は 50 mg/kg/日の用量，10 mL/kg/日の容量で 14 日間にわたり経口投与した。試験開始時，動物は 8～9 週齢，体重は雄 222～298 g，雌 171～232 g の範囲であった。

1 及び 14 日目に，曝露量を測定するためトキシコキネティクス群から血液試料を採取し，オロダテロールの十分な全身曝露を確認した。14 日目における 0.5，5，50 mg/kg/日投与群の $C_{max,ss}$ 雌雄平均値は 1030，41800，1050000 pM，$AUC_{0-24,ss}$ 雌雄平均値は 8420，129000，4690000 pM·h であった。全体として，$C_{max,ss}$ 及び $AUC_{0-24,ss}$ は，ほぼ用量に比例して増加した。血漿中濃度は投与後 1～4 時間に最高値に達した。血漿中オロダテロール濃度のばらつきは大きかった。

ラットにオロダテロールを経口投与したときの忍容性はおおむね良好であり，認められた変化の多くは軽微なものであった。検討した用量で薬理作用がみられない用量はなかった。オロダテロール投与群の動物において，流涎，体重増加量，摂餌量及び器官重量（心臓及び肺）が増加した。血液学的検査において，網状赤血球数及び好中球数の増加が認められた。血液生化学的検査においては，オロダテロール投与群の雌でグルコースが減少した。器官重量の変化として，オロダテロール投与群のすべての雄で精巣上体重量，雌で子宮重量が減少が認められたた。病理組織

学的検査において，オロダテロール投与群のほとんどの雄で精子滞留が認められ，50 mg/kg/日投与群の雄の精巣では，セルトリ細胞の空胞化がみられた。さらに，オロダテロール投与群の雄の肝臓で肝細胞分裂像が用量依存的に増加し，また，50mg/kg/日群では肝臓に関連する血液生化学的検査所見（GLDH，AST，LDH，ALT の増加）が認められた。NOAEL は 50 mg/kg/日と判断された。この用量での $C_{max,ss}$ 雌雄平均値は 1050000 pM，$AUC_{0-24,ss}$ 雌雄平均値は 4690000 pM·h であった。

表 3.1.3.1: 1　　げっ歯類におけるオロダテロール又はチオトロピウム+オロダテロールの反復投与毒性試験

動物種/系統	投与方法 バッチ番号 製剤	一群の動物数(雄/雌)	投与量(μg/kg/日) [a,b] Olo 又は Tio+Olo	投与期間	$C_{max,ss}$ (pM) [c] Olo 又は Tio+Olo (雄/雌)	$AUC_{0-24,ss}$ (pM·h) [c] Olo 又は Tio+Olo (雄/雌)	特記すべき所見	NOAEL Olo 又は Tio+Olo (μg/kg/日)	CTD 番号/社内資料番号
マウス/CD-1	吸入投与 鼻経路 35 分間/日 Olo: 3052140 CTF	15/15 15/15 15/15 15/15 15/15 15/15	0（空気） 0（溶媒） 63 211 900 3258	13 週間	- - 5110/4320 15500/17600 92200/91200 254000/284000	- - 12100/15400 35000/49700 150000/125000 413000/699000	全用量及び溶媒対照群：喉頭の移行上皮過形成 全用量群：雌雄：流涎，体重↑，摂餌量↑，K^+↑，トリグリセリド↓，肺重量↑，脾臓重量↑。雌：心臓重量↑，子宮重量↑ ≥211 μg/kg/日：雌：卵巣重量↑，喉頭の扁平上皮化生 ≥900 μg/kg/日：骨格筋量の軽度↑ 3258 μg/kg/日：子宮肥厚，黄体↑，子宮筋層の肥厚，子宮内膜の嚢胞状子宮腺↑	63	CTD4.2.3.2-1_U[redacted]-1341 CTD4.2.3.2-2_U[redacted]-1975
ラット/Crl:WI (Glx/BRL/Han) IGS BR	吸入投与 鼻経路 9 分間/日 Olo: 8460030 CTF	5/5 5/5 5/5 5/5 5/5	0（溶媒） 0.422 4.26 40.1 538	2 週間	- 81.7/83.5 163/221 3920/3160 29500/50700	- NC 918/685 11900/10800 100000/123000	全用量及び溶媒対照群：鼻腔粘膜の軽微変化 ≥40.1 μg/kg/日：体重↑，摂餌量↑ 538 μg/kg/日：喉頭における軽微/軽度の扁平上皮化生及び軽微/軽度の U 字型軟骨限局性壊死	該当なし	CTD4.2.3.2-3_U[redacted]-2143
ラット/HsdBrl Han: WI ST	吸入投与 鼻経路 35 分間/日 Olo: 8460120 CTF	18/18 10/10 10/10 18/18	0（溶媒） 78 260 1360	投与：4 週間 回復：4 週間	- 2490/2420 13300/7520 65700/100000	- 6790/7310 23700/21600 141000/156000	全用量及び溶媒対照群：喉頭 U 字型軟骨部における扁平上皮化生及び軟骨壊死，鼻腔における杯細胞数↑ 全用量群：体重↑，摂餌量↑，1 回換気量↑，AST↑，ALT↑，グルコース↓，心臓重量↑，用量非依存的胸腺重量↓（雄）肺胞マクロファージの集簇巣頻度↑	260	CTD4.2.3.2-4_U[redacted]-2133
ラット/Crl:WI (Han)	吸入投与 鼻経路 35 分間/日 Olo: 3052140 CTF	18/18 18/18 10/10 10/10 10/10 18/18	0（空気） 0（溶媒） 62 239 971 2833	投与：13 週間 回復：4 週間	- - 1970/3130 16400/19200 87700/98800 249000/310000	- - 7820/9470 34800/40000 191000/188000 533000/495000	全用量及び溶媒対照群：喉頭の扁平上皮化生及び喉頭 U 字型軟骨の壊死 全用量群：流涎，総白血球数↑，AST↑，Ca^{2+}↑，K^+↑，グルコース↓，尿量↑，尿比重↓，尿中 K^+↓，腎重量↓，雄：クレアチニン↑，雌：心臓重量↑，脾臓重量↑ ≥239 μg/kg/日：雄：精巣上体重量↓ ≥971 μg/kg/日：雌：軽微な体重増加量↑，軽微な摂餌量↑，トリグリセリド↓，局所刺激の発現率↑及び重症度↑（4 週間の回復期間後に部分的に回復）	239	CTD4.2.3.2-5_U[redacted]-1342

NC: 算出されず　　↑: 増加，↓: 減少　　a: 1 日平均到達用量は，McMahon 式による理論的 RMV を用いて計算した（CTD4.3-31_R97-0663）
b: 投与量は雌雄平均値で示した　　c: サテライト群の動物の投与終了時に測定した

表 3.1.3.1: 1　　げっ歯類におけるオロダテロール又はチオトロピウム+オロダテロールの反復投与毒性試験（続き）

動物種/系統	投与方法 バッチ番号 製剤	一群の動物数 (雄/雌)	投与量 (μg/kg/日) [a,b] Olo 又は Tio+Olo	投与期間	$C_{max,ss}$ (pM) [c] Olo 又は Tio+Olo (雄/雌)	$AUC_{0-24,ss}$ (pM·h) [c] Olo 又は Tio+Olo (雄/雌)	特記すべき所見	NOAEL Olo 又は Tio+Olo (μg/kg/日)	CTD 番号/社内資料番号
ラット/ Crl:WI (Han)	吸入投与 鼻経路 35 分間/日 Olo: 5061001 CTF	30/30 20/20 20/20 30/30	0（溶媒） 49 200 3400	投与： 26 週間 回復： 4 週間	- 3450/3310 13500/12000 341000/270000	- 9010/7880 43000/32400 878000/668000	全用量群：体重↑，摂餌量↑，眼球突出，AST↑，ALT↑，ALP↑，骨格筋肥大，白色脂肪組織↓，心臓重量↑，肺胞マクロファージ集簇頻度↑，角膜萎縮，喉頭 U 字型軟骨の壊死 ≥200 μg/kg/日：肝グリコーゲン蓄積変化，鼻腔/喉頭/気管分岐部における扁平上皮化生， 3400 μg/kg/日：筋線維の壊死，子宮拡張，黄体嚢胞↑，黄体出血↑	200	CTD4.2.3.2-6_U[redacted]-1691
ラット/ Crl:WI (Han)	吸入投与 鼻経路 35 分間/日 Tio: 1012809 Olo: 8460261 CTF	16/16 10/10 10/10 16/16 安全性薬理 Irwin[d] 5/0 5/0 5/0 5/0 安全性薬理呼吸器[d] 5/0 5/0 5/0 5/0	用量比 1:1 0 (溶媒) 85.2+78.6 577+555 2266+2174 0 (溶媒) 80.2+71.1 636+592 2386+2246 0 (溶媒) 95.4+87.7 559+524 2022+1905	投与： 4 週間 回復： 4 週間 単回投与 単回投与	- 12700+14800/ 21800+20800 78500+69800/ 115000+83200 217000+155000/ 374000+225000 実施せず 実施せず	- 29700+44600/ 17400+34900 76300+138000/ 115000+173000 204000+280000/ 271000+321000 実施せず 実施せず	全用量及び溶媒対照群：U 字型軟骨の壊死，U 字軟骨部及び喉頭蓋基部粘膜の扁平上皮化生 全用量群：体重増加量↓，摂餌量↓，散瞳，白血球数↑，PT 延長 グルコース↓（雌），トリグリセリド↓（雌），唾液腺重量↓，胸腺重量↓，腎重量↓，肺重量↑，尿量↑，尿比重↓，尿中電解質↓，肺うっ血 577+555 μg/kg/日：29 日目に 1 例死亡 577+555 及び/又は 2266+2174 μg/kg/日：鼻道/喉頭粘膜の上皮萎縮，扁平上皮化生，APTT 短縮 2266+2174 μg/kg/日：14 及び 23 日目に各 1 例死亡	85.2+78.6	CTD4.2.3.2-7_U[redacted]-1893

↑: 増加，↓: 減少
a: 1 日平均到達用量は，McMahon 式による理論的 RMV を用いて計算した（CTD4.3-31_R97-0663）
b: 投与量は雌雄平均値で示した　　c: サテライト群の動物の投与終了時に測定した
d: 安全性薬理試験では単回投与後に Irwin 変法あるいは呼吸器パラメータの測定を実施した

表 3.1.3.1: 1　　げっ歯類におけるオロダテロール又はチオトロピウム+オロダテロールの反復投与毒性試験（続き）

動物種/系統	投与方法 バッチ番号 製剤	一群の動物数(雄/雌)	投与量(μg/kg/日) [a,b] Olo 又は Tio+Olo	投与期間	$C_{max,ss}$ (pM) [c] Olo 又は Tio+Olo (雄/雌)	$AUC_{0-24,ss}$ (pM·h) [c] Olo 又は Tio+Olo (雄/雌)	特記すべき所見	NOAEL Olo 又は Tio+Olo (μg/kg/日)	CTD 番号/社内資料番号
ラット/ Crl:WI (Han)	吸入投与 鼻経路 35 分間/日 Tio: 1012809 Olo: 8460261 CTF	16/16 10/10 16/16 10/10 16/16 安全性薬理 Irwin [d] 5/0 5/0 5/0 5/0 5/0 安全性薬理 呼吸器 [d] 5/0 5/0 5/0 5/0 5/0	0 (溶媒) 13+75 (1:6) 393+2032 (1:6) 143+73 (2:1) 3263+1747(2:1) 0 (溶媒) 13+68 (1:6) 397+1905 (1:6) 141+76 (2:1) 3046+1642(2:1) 0 (溶媒) 11+62 (1:6) 418+1947 (1:6) 155+83 (2:1) 2913+1587(2:1)	投与： 4 週間 回復： 4 週間 単回投与 単回投与	- 646+7450/ 1040+7730 54300+156000/ 83800+229000 5000+4410/ 19300+9700 543000+148000/ 649000+147000 実施せず 実施せず	- 1550+19000/ 2490+19200 50400+342000/ 64900+419000 11700+12900/ 21300+22300 407000+249000/ 475000+274000 実施せず 実施せず	全用量及び溶媒対照群：U 字型軟骨の壊死，喉頭粘膜における扁平上皮化生 全用量群：散瞳，摂餌量↓，白血球数↑，血中グルコース↓，リン↑，尿中 Na^+，K^+（雌）及び Cl^-↓，尿量↑及び尿比重↓（雌），唾液腺重量↓，肺重量↑，肺うっ血↑（雌） 用量比 1:6 13+75 μg/kg/日： Hct↑（雌），Ca^{2+}↑ 393+2032 μg/kg/日：1 日目に 1 例，24 日目に 1 例が死亡／屠殺，体重増加量↓（雄），Hct↑（雄），網状赤血球数↑（雄），MCHC↓，Ca^{2+}↑，鼻炎，鼻腔粘膜の扁平上皮化生 用量比 2:1 143+73 μg/kg/日： 体重増加量↓（雄），網状赤血球数↑（雄），MCHC↓，Ca^{2+}↑ 3263+1747 μg/kg/日： 1 日目に 1 例を屠殺，15 及び 24 日目にそれぞれ 1 例が途中死亡，体重増加量↓（雄），Hct↑，Hb↑（雌），網状赤血球数↑（雄），MCHC↓，トリグリセリド↓（雌），鼻炎，鼻腔粘膜の扁平上皮化生，肺胞マクロファージ集簇↑	用量比 1:6 13+75 用量比 2:1 143+73	CTD4.2.3.2-8_U[redacted]-1892

↑: 増加，↓: 減少
a: 1 日平均到達用量は，McMahon 式による理論的 RMV を用いて計算した（CTD4.3-31_R97-0663）
b: 投与量は雌雄平均値で示した　　c: サテライト群の動物の投与終了時に測定した
d: 安全性薬理試験では単回投与後に Irwin 変法あるいは呼吸器パラメータの測定を実施した

表 3.1.3.1: 1　　げっ歯類におけるオロダテロール又はチオトロピウム+オロダテロールの反復投与毒性試験（続き）

動物種/系統	**投与方法 バッチ番号 製剤**	**一群の動物数 (雄/雌)**	**投与量 (µg/kg/日) Olo 又は Tio+Olo**	**投与期間**	**$C_{max,ss}$ (pM) [a] Olo 又は Tio+Olo (雄/雌)**	**$AUC_{0-24,ss}$ (pM·h) [a] Olo 又は Tio+Olo (雄/雌)**	**特記すべき所見**	**NOAEL Olo 又は Tio+Olo (µg/kg/日)**	**CTD 番号/社内資料番号**
ラット/ HsdBrl Han: WIST	静脈内投与 5 分間の低速静注 5 mL/kg/日 Olo: 3052091 生理食塩液	10/10 10/10 10/10 10/10	0 5 25 100	2 週間	- 1430/3180 17300/20800 61300/38400	- 2460/2870 13400/17300 50700/45700	全用量群：体重↑，摂餌量↑，血液学的検査パラメータの変化，グルコース↓，血液生化学的検査におけるその他の変化，尿検査における変化 25 µg/kg/日：雄生殖器重量↓ 100 µg/kg/日：雌：子宮内腔拡張の発現率↓，膣及び子宮頸部上皮の角化及び粘液化の発現率↓，雄：心臓重量↑，軽微な心室心筋の変性（雄 1）雌：卵巣重量↑	25	CTD4.2.3.2-9_U[redacted]-1375
ラット/ Crl: WI(Han)	強制経口投与 Olo: 3052091 HEC 懸濁液	10/10 10/10 10/10 10/10	0 500 5000 50000	2 週間	918/1140 16200/67400 1050000/1060000	9160/7690 101000/157000 5150000/4240000	全用量群：体重↑，摂餌量↑，グルコース↓，心臓重量↑，肺重量↑，精巣上体重量↓（雄），精子滞留（雄），子宮重量↓（雌） ≥5000 µg/kg/日：流涎，網状赤血球↑，好中球↑，肝細胞有糸分裂像↑（雄） 50000 µg/kg/日：GLDH↑，AST↑（雌），LDH↑，ALT↑（雄），セルトリ細胞空胞化（雄）	50000	CTD4.2.3.2-10_U[redacted]-2334

↑: 増加，↓: 減少
a: サテライト群の動物の投与終了時に測定した

3.2 非げっ歯類における毒性試験

イヌを用いてオロダテロールの非げっ歯類における反復投与毒性試験を実施した。その概要を表 3.2.3.2: 1 に示す。第 3.2.1 項には吸入投与により実施したすべての非げっ歯類試験を，第 3.2.2 項及び第 3.2.3 項には静脈内及び経口投与により実施したすべての非げっ歯類試験を示す。

3.2.1 非げっ歯類における反復吸入投与毒性試験

イヌ吸入投与試験は，口腔咽頭チューブを装着した閉鎖性フェイスマスクを用いて実施し，1 日当たりの投与時間は 10～11 分間とした。

3.2.1.1 オロダテロールのイヌにおける 2 週間吸入投与用量設定試験（GLP 非適合） [CTD4.2.3.2-11_U[redacted]-2134]

雌雄各 2 例のビーグル犬にオロダテロールを 0（溶媒対照），1.3，9.5，32 又は 116 µg/kg/ 日の用量で，14 日間にわたり吸入投与した。重量測定法による MMAD は 1.31～3.84 µm，解析データに基づく MMAD 推定値は 0.62～1.30 µm の範囲であり，吸入粒子の 78.1～98.6 %が粒径 3.8 µm 未満であることが明らかになった。このエロゾルはイヌにおいて吸入可能であると考えられた。試験開始時，動物は 6～7 カ月齢，体重は雄 6.8～8.6 kg，雌 5.8～8.6 kg の範囲であった。

1 及び 13 日目に，曝露量測定のため血液試料を採取した。1.3 µg/kg/日投与群における血漿中オロダテロール濃度は検出限界未満であった。9.5 µg/kg/日より高用量における全身曝露量は，微量から高濃度に及び，用量比を上回る増加を示した。13 日目の血漿中濃度は 1 日目よりも高く，13 日目における 9.5，32，116 µg/kg/日投与群の $C_{max,ss}$ 雌雄平均値は 184，514，4090 pM，$AUC_{0-24,ss}$ 雌雄平均値は 1248，2835，21700 pM·h であった。

32 及び 116 µg/kg/日投与群の動物において，心拍数の増加及び心収縮力の増大（胸部触診によって検出）が認められた。しかし，試験の進行に伴って適応が生じ，これらの症状は軽減された。ECG 検査において，一部の動物で軽度な心拍数増加，並びにこれに伴う PR 間隔及び QT 間隔の軽微な短縮が明らかになった。QT 間隔を心拍数で補正した QTc には対照群との間に差は認められなかった。

摂餌量，眼科学的検査，血圧，血液学的検査，血液生化学的検査，尿検査及び器官重量における毒性所見は認められなかった。9.5，32 及び 116 µg/kg/日投与群において，体重増加量の増加が認められた。

オロダテロール投与に関連した剖検所見は認められなかった。病理組織学的検査では，32 及び 116 µg/kg/日投与群のすべてのイヌの肝臓において軽微～軽度の小葉辺縁性肝細胞におけるグリコーゲン蓄積が認められたが，その後の試験の用量制限毒性とは考えられなかった。

3.2.1.2 オロダテロールのイヌにおける 4 週間吸入投与毒性試験 [CTD4.2.3.2-12_U[redacted]-2146]

1 群当たり雌雄各 3 例のビーグル犬に，オロダテロールを 0（溶媒対照），2.2，13.7 又は 127 µg/kg/日の用量で，少なくとも 28 日間にわたり吸入投与した。また，対照群及び高用量群に雌雄各 2 例

のイヌを追加し，4 週間回復群とした。重量測定法による MMAD は 2.6～4.9 μm であり，吸入粒子の 60～75%が粒径 5 μm 未満であることが明らかになった。このエロゾルはイヌにおいて吸入可能であると考えられた。試験開始時，動物は 7～8 カ月齢，体重は雄 7.3～9.2 kg，雌 5.7～7.1 kg の範囲であった。

1 及び 28 日目に，曝露量を測定するため血液試料を採取した。全身曝露量は用量にほぼ比例して増加した。28 日目の血漿中濃度は 1 日目よりもわずかに高く，28 日目における 13.7，127 μg/kg/日投与群の $C_{max,ss}$ 雌雄平均値は 914，6920 pM，$AUC_{0-24,ss}$ 雌雄平均値は 4300，31500 pM·h であった。28 日目に，対照血漿 70 検体中 26 検体でオロダテロールが検出された。これらの対照検体及び 13.7 μg/kg/日投与群の一部の検体中濃度は不規則な濃度時間推移を示したことから，対照検体中のオロダテロールは血液試料採取後に混入したものであると考えられた。同様に 2.2 μg/kg/日投与群の 28 日目における測定においても不規則な濃度時間推移がみられ，オロダテロールの混入が疑われたため，評価から除外した。

死亡はなく，摂餌量，眼科学的検査，血圧，血液学的検査及び器官重量における毒性所見は認められなかった。13.7 及び 127 μg/kg/日投与群の動物において，投与直後に，胸部触診により心収縮力／心拍数の増大がみられた。しかし，試験の進行に伴い投与に対する適応が認められ，これらの症状は 3 週目までに消失した。2 日目に行った ECG 検査において，一部の動物で PR 間隔及び QT 間隔の軽微な短縮を伴う軽度の心拍数増加がみられ，特に 127 μg/kg/日投与群で顕著であったが，27 日目には認められなかった。QT 間隔を心拍数で補正した QTcF には対照群との間に差は認められなかった。これらの所見はオロダテロールの薬理作用によるものであると考えられた。

4 週間の投与期間にわたり，全オロダテロール投与群の雌雄両方で，対照群に比べて体重増加量が増加した。雄では，体重増加量に用量依存性が認められたが，雌ではあまり顕著ではなかった。4 週間の回復期間中，体重に関する所見は完全に回復した。

オロダテロール投与群において，2 及び 27 日目に血中カリウム及びリンが上昇したが，背景対照値の範囲内に十分収まっていた。4 週間の回復期間後，完全又は部分的な回復が認められた。

オロダテロール投与に関連した剖検及び器官重量所見は認められなかった。13.7 及び 127 μg/kg/日投与群の雌のみで，肝臓に可逆的な小葉辺縁性肝細胞へのグリコーゲン蓄積が認められたが，これは β_2 刺激薬の既知の作用であり，毒性学的に重要なものではないと考えられた。

NOAEL は 13.7 μg/kg/日と判断され，この用量での 28 日目における $C_{max,ss}$ 雌雄平均値は 914 pM，$AUC_{0-24,ss}$ 雌雄平均値は 4300 pM·h であった。検討した用量で薬理作用がみられない用量はなかった。

3.2.1.3 オロダテロールのイヌにおける 13 週間吸入投与毒性試験

[CTD4.2.3.2-13_U[redacted]-1317]

1 群当たり雌雄各 4 例のビーグル犬に，オロダテロールを 0（空気対照），0（溶媒対照），4.9，15 又は 160 μg/kg/日の用量で，少なくとも 91 日間にわたり吸入投与した。また，対照群及び高用量群に雌雄各 2 例のイヌを追加し，6 週間回復群とした。解析データに基づく MMAD 推定値は

2.4～2.92 μm の範囲であり，このエロゾルはイヌにおいて吸入可能であると考えられた。試験開始時，動物は 8～9 カ月齢，体重は雄 5.6～8.5 kg，雌 4.2～6.7 kg の範囲であった。

1 及び 86 日目に，曝露量を測定するため血液試料を採取した。トキシコキネティクスにより，用量依存的な全身曝露が明らかになった。オロダテロール曝露量は用量にほぼ比例して増加した。性差及び反復投与による問題となる影響は認められなかった。86 日目における 4.9，15，160 μg/kg/日投与群の $C_{max,ss}$ 雌雄平均値は 131.5，200.5，2920 pM，$AUC_{0-24,ss}$ 雌雄平均値は 652.5，1810，18550 pM·h であった。

死亡は認められなかった。主に 160 μg/kg/日投与群の動物で認められた顕著な症状は，心拍数の増加及び触診可能な心拍動の増大であった。これらの症状の多くは試験開始時に認められ，試験の進行に伴い，症状の持続時間が短縮した。

投与期間終了時，すべてのオロダテロール投与群で体重及び体重増加量の増加が認められた。体重の差は 10%未満であり，明らかな用量依存性は認められなかった。摂餌量及び眼科学的検査においては，オロダテロールの影響は認められなかった。

心血管系検査において，主に 160 μg/kg/日投与群で 2 日目の投与前，及び 2，23，85 日目の投与後に軽微～中等度の心拍数の増加が認められた。これらの影響はオロダテロールの薬理作用によるものと考えられた。

血液学的検査における変化の大部分は軽微なものであり，多くの場合，明確な用量依存性はなく，毒性学的に重要なものではないと考えられた。血液生化学的検査においては 160 μg/kg/日投与群の雌で AST 及び ALT の増加がみられた。少数の動物で認められた CK の散発的な上昇は，投与中又は採血中に動物が暴れたためと考えられたが，25 及び 88 日目にすべてのオロダテロール投与群において全般的に認められた CK のわずかな増加傾向（約 2 倍）は，クレアチニン及び尿素の軽度の増加を伴い，投与に関連した骨格筋由来によるものと考えられた。しかしながら，これらの軽微な CK の上昇は，マーシャル社由来ビーグル犬の背景対照値の範囲内であり，また，関連する病理組織学的検査所見が認められなかったことから，毒性学的意義は低いと考えられた。

すべての雄のオロダテロール投与群において，肺及び心臓重量がわずかに減少した。これらの器官重量変化は，オロダテロールの同化作用による体重増加の影響とともに，対応する雄溶媒対照群の器官重量が比較的高かったことに起因すると考えられた。

病理組織学的検査において，15 及び 160 μg/kg/日投与群の肝小葉内におけるグリコーゲン分布及び量の可逆的な変化が認められた。すなわち，160 μg/kg/日投与群の雌雄で小葉中心領域の肝細胞内グリコーゲン量減少，15 及び 160 μg/kg/日投与群の雌雄で小葉辺縁領域の肝細胞内グリコーゲン量の増加が認められた。また，溶媒対照群及びすべてのオロダテロール投与群において，空気対照群に比べてわずかに高頻度かつわずかに重篤で，少数例では扁平上皮化生も認められる気管分岐部（気管竜骨）の軽度な局所刺激がみられた。したがって，エロゾルに直接曝露される部位である上部気道において，BAC を含有する溶媒によって軽度の上皮刺激が誘発される可能性を否定することはできなかった。しかし，オロダテロール自体の刺激作用を示す所見は認められなかった。また，全身性毒性を示す形態学的病変も認められなかった。

NOAEL は 160 µg/kg/日と判断され，この用量での $C_{max,ss}$ 平均値（雄／雌）は 2780／3060 pM，$AUC_{0-24,ss}$ 平均値（雄／雌）は 18500／18600 pM·h であった。検討した用量で薬理作用がみられない用量はなかった。

3.2.1.4 オロダテロールのイヌにおける 52 週間吸入投与毒性試験

[CTD4.2.3.2-14_U[redacted]-1740]

1 群当たり雌雄各 4 例のビーグル犬に，オロダテロールを 0（溶媒対照），15，60 又は 330 µg/kg/日の用量で，少なくとも 364 日間にわたり吸入投与した。また，対照群及び高用量群に雌雄各 2 例のイヌを追加し，6 週間回復群とした。解析データに基づく MMAD 推定値は 2.27～2.44 µm の範囲であり，このエロゾルはイヌにおいて吸入可能であると考えられた。試験開始時，動物は約 9 カ月齢，体重は雄 6.4～9.9 kg，雌 5.5～8.8 kg の範囲であった。

-1，1，72，185，267 及び 358 日目に，曝露量を測定するため血液試料を採取した。トキシコキネティクスにより，用量依存的な全身曝露が確認された。オロダテロール曝露量は用量にほぼ比例して増加した。問題となる性差及び反復投与の影響は認められなかった。358 日目における 15，60，330 µg/kg/日投与群の $C_{max,ss}$ 雌雄平均値は 402，1555，10245 pM，$AUC_{0-24,ss}$ 雌雄平均値は 2860，8940，48100 pM·h であった。

オロダテロールを吸入投与したときの忍容性は局所的にも全身的にも良好であった。死亡はみられなかった。

すべてのオロダテロール投与群において，β_2 刺激薬に既知の同化作用に起因すると考えられる体重増加量の増加が認められた。また，これと一致して，CK 及びクレアチニンの増加が認められた。60 及び 330 µg/kg/日投与群の雌で摂餌量増加がみられた。眼科学的検査においては，オロダテロール投与に関連した所見は認められなかった。

一般状態における顕著な変化として，心収縮力の増大，心拍数の増加，口腔粘膜の乾燥などが認められ，すべてが用量依存的であった。心収縮力の増大は，低用量群に比べて高用量群ほどより早期かつ高頻度にみられた。また，心拍数増加は試験開始後初期に高頻度に認められ，投与の継続に伴って発現率が低下し，持続時間が短くなった。これらの所見は投与中及び投与終了直後に認められた。ほとんどの場合，これらの症状は翌日の投与前には消失していた。

心血管系検査において，すべての用量で，投与開始初期に一過性及び持続性の心拍数増加（平均最高値 190 bpm）がみられた。330 µg/kg/日投与群では，2 日目に比較して軽度の心拍数増加が他の測定時にも認められたが，試験経過とともに変動幅は小さくなった。

60 及び 330 µg/kg/日投与群の雌において，2 日目の吸入投与前又は吸入投与後に心室性期外収縮及び心室性頻拍が認められた。この作用はオロダテロールの薬理作用に関連していると考えられ，病理組織学的検査で心筋に病変が認められた用量のみで確認された。しかし，本試験における不整脈の発現率は低く，高用量で散発的に認められただけであったことから，推奨臨床用量のオロダテロールをヒトに投与した場合の催不整脈リスクが生じる可能性は低いと考えられた。QTc に毒性学的に問題となるような，一貫した用量依存性の変動は検出されなかった。330 µg/kg/日投与群の雌で 12 及び 26 週目の投与前後に収縮期及び拡張期血圧の上昇がみられた。

雌雄において，一部の用量及び種々の測定時に，CK のわずかな増加傾向が認められたが，明らかな用量依存性はなく，個別値変動が大きかった。4 日目に，60 及び 330 µg/kg/日投与群の雌雄において，用量依存性の cTnI 上昇が認められ，雄の 1 例では CK-MB の軽微な上昇を伴っていた。cTnI 及び CK-MB でこのように試験初期に変動がみられ，心障害が疑われたものの，試験後半における CK の上昇は，体重増加やクレアチニンの増加と一致していたことから，心筋損傷を反映するものではなく，むしろ，β_2 刺激薬の同化作用に起因する骨格筋由来のものと考えられた。

60 及び 330 µg/kg/日投与群の動物の左室乳頭筋に線維化病巣が認められ，剖検時に 330 µg/kg/日投与群で観察された乳頭筋白色化に対応した所見であった。また，60 及び 330 µg/kg/日投与群の雌雄動物の肝臓において，肝小葉内のグリコーゲン分布及びグリコーゲン量に可逆性の変化が認められた。すなわち，小葉中心領域の肝細胞では軽微から軽度のグリコーゲン量の減少，小葉辺縁領域の肝細胞では軽微から軽度のグリコーゲン量の増加がみられた。さらに，60 及び 330 µg/kg/日投与群では，前立腺に多発性の萎縮が認められ，これと一致して，絶対重量及び相対重量が用量依存的に低下した。前立腺間質にはアドレナリン作用性神経支配が存在することから，前立腺の変化はオロダテロールの薬理活性によるものと考えられた。4 週間の回復期間後，病理組織学的に心筋線維化並びに絶対及び相対重量の減少を伴う前立腺の萎縮がみられた。その他の臨床的及び病理学的所見については，4 週間の回復期間後にはみられなかった。

また，全身毒性に関する NOAEL は 15 µg/kg/日と判断され，この用量での $C_{max,ss}$ 平均値（雄／雌）は 381／423 pM，$AUC_{0\text{-}24,ss}$ 平均値（雄／雌）は 2160／3560 pM·h であった。また本試験において，局所毒性に関する NOAEL は 330 µg/kg/日と判断された。検討した用量で薬理作用が生じない用量はなかった。

3.2.1.5 チオトロピウム+オロダテロールのイヌにおける漸増吸入投与毒性試験 ［CTD4.2.3.2-15_n00177290］（GLP 非適合）

反復吸入投与による毒性がみられる用量を検討すると同時に，毒性標的器官を検出するために，ビーグル犬において，週毎に用量を増やして 4 週間チオトロピウム+オロダテロールの吸入投与毒性試験を実施した。本試験では 3 種の配合比（1：1，1：6，2：1）について検討を行うこととし，オロダテロールの開始用量を 5 µg/kg に設定した。この用量を基に 3 種の配合剤の各用量を決定した。

1 群雌雄各 2 例のビーグル犬に，4 週間にわたり 10 分間／日，3 日間／週投与を行い，4 日間の回復期間を設けた。さらに雌雄各 2 例に同様の手技を施し，空気対照群とした。チオトロピウム+オロダテロールの用量比は 1：1，1：6 又は 2：1 に設定し，1 週目には 5.3+5.9，0.8+5.2 又は 7.4+4.1 µg/kg/日，2 週目には 16+17, 2.0+12 又は 33+17 µg/kg/日，3 週目は 98+102, 12+78 又は 166+90 µg/kg/日，4 週目は 207+224，31+194 又は 380+185 µg/kg/日を投与した。試験開始時，動物は 10～11 カ月齢，体重は雄 7.7～11.5 kg，雌 5.1～10.6 kg の範囲であった。解析データに基づく MMAD 推定値は 0.77 µm で，イヌにおける吸入試験としては低い値であったものの，明らかな薬理作用が認められたことから，許容できるものとみなされた。

チオトロピウム及びオロダテロールの各配合剤において，十分な全身曝露が示された。両薬剤とも全身曝露量はわずかに用量比を上回る増加を示した。

試験期間中，死亡又は体重への影響はみられなかった。散瞳並びに鼻及び口腔粘膜の乾燥は 3 週目と 4 週目のすべての用量比群で認められた。心血管系における検査では用量依存性の心拍数の増加が 2 週目以降すべての用量比のすべての用量で認められた。

血液学的及び血液生化学的検査では，用量比 1：6 及び 2：1 の数例の動物でのみ血小板数，酵素活性（ALT，ALP，GLDH，CK）あるいはカリウムの増加，又はトリグリセリド，グルコースの減少等の軽度の変化がみられた。

すべての被験物質投与群でわずかな肝重量の増加がみられた。剖検では，口腔咽頭チューブによって乾燥した口腔粘膜が機械的に傷害されたことによる口蓋の病変がみられた。病理組織学的検査では，肉眼所見と一致する口蓋の変化，散発的な気管上皮の変化及び肝臓における細胞内グリコーゲン蓄積の軽度増加が認められた。心臓では，用量比 1：1 及び 1：6 の動物で，乳頭筋における軽微から軽度の鉱質沈着あるいは線維化，及び限局性動脈周囲性水腫が認められた。

投薬の影響はチオトロピウム+オロダテロールの 16+17, 2.0+12 又は 33+17 µg/kg/日を投与した 2 週目にすべての群で最初に認められ，明らかな毒性は 207+224, 31+194 又は 380+185 µg/kg/日を投与した 4 週目にすべての群で認められた。標的器官は呼吸器，心臓及び肝臓であった。

3.2.1.6 チオトロピウム+オロダテロールのイヌにおける 4 週間吸入毒性試験（用量比 1：1）［CTD4.2.3.2-16_U[redacted]-1894］

1 群当たり雌雄各 3 例のビーグル犬にチオトロピウム+オロダテロールを 0（溶媒対照），6.07+5.71, 16.8+16.1 又は 157+152 µg/kg/日の用量で，少なくとも 28 日間吸入投与した。対照群及び 157+152 µg/kg/日群に雌雄各 2 例の動物を追加し，4 週間回復群とした。157+152 µg/kg/日群における重量測定法による MMAD は，チオトロピウムが 1.28 µm，オロダテロールが 1.27 µm であり，イヌにおいて吸入可能であると考えられた投与開始時，動物は約 7～8 カ月齢，体重は雄 7.3～9.3 kg，雌 5.9～7.8 kg の範囲であった。

1 及び 28 日目に，曝露量を測定するため血液試料を採取した。チオトロピウム及びオロダテロールとも十分な全身曝露量が確認された。両薬剤とも血漿中濃度のばらつきは中等度であった。AUC_{0-24} の変動係数（CV）はチオトロピウムで投与量・日・性の 7.2～44.0%，オロダテロールは 8.3～60.3%の範囲内であった。血漿中濃度は雌よりも雄で低く，AUC_{0-24} の総平均雄／雌比はチオトロピウムが 0.498～0.930，オロダテロールが 0.467～0.937 であった。チオトロピウム及びオロダテロールの血漿中濃度は 28 日目よりも 1 日目で低く，1 日目に対する 28 日目の AUC_{0-24} の総平均比はチオトロピウム 3.33，オロダテロール 3.11 であった。対照群 172 サンプル中，主に 28 日目に採取された 21 サンプルでチオトロピウムが，また 35 サンプルでオロダテロールが検出されたが，低用量群の値と比較しても十分に低い濃度であった。28 日目における，チオトロピウム+オロダテロールの 6.07+5.71，16.8+16.1 又は 157+152 µg/kg/日群の $C_{max,ss}$ 雌雄平均値は 1190+347, 3230+1030 及び 50700+13400 pM，$AUC_{0-24,ss}$ 雌雄平均値は 2410+3180，6160+6680 及び 56700+50500 pM·h であった。

体重増加量及び摂餌量は 16.8+16.1 及び 157+152 µg/kg/日群で一過性に減少した。散瞳は 16.8+16.1 及び 157+152 µg/kg/日群のすべての動物で投与後に認められた。鼻腔及び口腔粘膜の乾燥はほとんどの被験物質投与群動物で認められ，用量依存性を示した。散瞳及び鼻腔粘膜乾燥は 157+152 µg/kg/日群の回復群で休薬の 1 週目にも認められた。さらに，157+152 µg/kg/日群の雄動物では，結膜あるいは角膜における炎症性所見がみられた。心拍数増加は 16.8+16.1 及び 157+152 µg/kg/日群で試験開始後数日間にわたり臨床的に観察され，投与 2 日目の ECG 検査でも確認された。

Hct 値及び網状赤血球数のわずかな減少（雌のみ），ALP の低値，リン及びカリウムの高値，血中尿素の増加（雌のみ）及びアルブミンの低値がほぼ用量依存的に認められた。すべての被験物質投与群で尿比重が上昇するとともに尿量が低下し，尿中ナトリウム及びカリウム濃度の増加を伴っていた。

胸腺重量の減少が 16.8+16.1 µg/kg/日群の雄及び 157+152 µg/kg/日群の雌雄で認められた。病理組織学的検査では，チオトロピウム及びオロダテロールの投与に関連していると考えられた変化が肝臓（雌雄），眼球（雄），喉頭（雄）及び鼻腔（雌）で認められた。肝細胞におけるグリコーゲン分布の変化はすべての被験物質投与群で認められ，用量依存性を伴っていた。157+152 µg/kg/日群の雄 2 例に軽微から軽度の結膜炎あるいは角膜炎がみられた。軽微から軽度の限局性喉頭炎は 6.07+5.71 µg/kg/日群の雄 1/3 例，16.8+16.1 µg/kg/日群の雄 2/3 例，及び 157+152 µg/kg/日群の雄 2/3 例で認められた。16.8+16.1 µg/kg/日群の雌 1 例及び 157+152 µg/kg/日群の雌 2 例の鼻腔において，軽微から軽度の限局性の粘膜下炎症性細胞浸潤の増加が認められた。

軽度の薬理作用に起因する変化を除外すれば，用量比 1：1 のチオトロピウム+オロダテロールの本試験における NOAEL は 16.8+16.1 µg/kg/日と判断され，この用量での 28 日目における $C_{max,ss}$ は 3230+1030 pM，$AUC_{0-24,ss}$ は 6160+6680 pM·h であった。4 週間の回復期間後，すべての投薬に関連した変化は回復した。2 剤投与による相乗あるいは相加的毒性所見は認められなかった。

3.2.1.7 チオトロピウム+オロダテロールのイヌにおける 4 週間吸入毒性試験（用量比 1：6 又は 2：1） [CTD4.2.3.2-17_U[redacted]-1895]

1 群当たり雌雄各 3 例のビーグル犬にチオトロピウム+オロダテロール（用量比 1:6 又は 2:1）を 0（溶媒対照），2.66+16.4 又は 19.8+124 µg/kg/日（用量比 1:6）及び 28.8+16.5 又は 385+191 µg/kg/日（用量比 2:1）の用量で，少なくとも 28 日間吸入投与した。対照群，19.8+124 及び 28.8+16.5 µg/kg/日群に雌雄各 2 例の動物を追加し，4 週間回復群とした。19.8+124 µg/kg/日及び 385+191 µg/kg/日における重量測定法による MMAD は，チオトロピウムが 1.18～2.23 µm，オロダテロールが 1.12～1.34 µm であり，イヌにおいて吸入可能であると考えられた。投与開始時，動物は約 10～11 カ月齢，体重は雄 6.2～8.7 kg，雌 6.2～8.5 kg の範囲であった。

1 及び 28 日目に，曝露量を測定するため血液試料を採取した。チオトロピウム及びオロダテロールとも十分な全身曝露量が確認された。両薬剤とも血漿中濃度のばらつきは中等度であった。AUC_{0-24} の変動係数（CV）はチオトロピウムで投与量・日・性の 12.1～68.1%，オロダテロールは 4.7～55.3%の範囲内であった。血漿中濃度は雌雄で差はなく，AUC_{0-24} の総平均雄／雌比はチオト

ロピウムが 0.517～1.19，オロダテロールが 0.631～1.38 であった。チオトロピウム及びオロダテロールの血漿中濃度は 28 日目よりも 1 日目で低く，1 日目に対する 28 日目の AUC_{0-24} の総平均比はチオトロピウム 1.53，オロダテロール 1.36 であった。対照群 182 サンプル中 4 サンプルでチオトロピウムが，16 サンプルでオロダテロールが微量検出されたが，低用量群の値と比較して十分に低い濃度であった。28 日目におけるチオトロピウム+オロダテロールの 2.66+16.4，19.8+124，28.8+16.5 及び 385+191 µg/kg/日群の $C_{max,ss}$ 雌雄平均値はそれぞれ 713+1240, 4380+9860, 9610+1170 及び 59500+7150 pM，$AUC_{0-24,ss}$ 雌雄平均値はそれぞれ 825+5320，6500+42300，12400+6900 及び 83200+39100 pM·h であった。

一般状態の観察において，鼻及び口腔粘膜の乾燥及び心拍数の増加がすべての被験物質投与群で認められた。19.8+124，28.8+16.5 及び 385+191 µg/kg/日群の動物では，散瞳，結膜の充血，摂餌量の減少を伴う一過性の体重減少（1 週目）が認められた。投与 2 及び 27 日目に行った心電図検査では，有意な心拍数増加が 19.8+124，28.8+16.5 及び 385+191 µg/kg/日群で投与 4 時間後まで認められた。心拍数増加は投与 2 日目の方が投与 27 日目と比較して程度が大きく，したがって 4 週間投与によってわずかに耐性が生じたことが示唆された。QTcF は 19.8+124, 28.8+16.5 及び 385+191 µg/kg/日群の雌の投与前検査で延長し，QTcV は 19.8+124 µg/kg/日群の雄で投与後に有意に短縮した。

血液学的検査では変化は認められなかった。血液生化学的検査では，尿素窒素及びカリウムの増加が用量依存的に認められた。リンの増加は 28.8+16.5 及び 385+191 µg/kg/日群で認められた。尿検査では，被験物質投与群で尿比重が上昇するとともに尿量が低下し，尿中ナトリウム及びカリウム濃度の増加を伴っていた。19.8+124 及び 28.8+16.5 µg/kg/日群の雌及び 385+191 µg/kg/日群の雌雄で胸腺重量が低かった。雄の被験物質投与群では，肺重量の増加がみられた。病理組織学的検査では，すべての用量群で肝細胞におけるグリコーゲンの分布に変化がみられた。385+191 µg/kg/日群の雄 1 例及び雌 2 例で軽微から中等度の心乳頭筋の心筋線維化が認められた。385+191 µg/kg/日群では，胸腺退縮，角膜炎（1 例のみ）及び軽微から中等度の喉頭の粘膜下への好中球浸潤がみられた。

軽度の薬理作用に起因する変化を除外すれば，用量比 1 : 6 又は 2 : 1 のチオトロピウム+オロダテロールの本試験における NOAEL はそれぞれ 2.66+16.4 又は 28.8+16.5 µg/kg/日と判断され，この用量での 28 日目における $C_{max,ss}$ は 713+1240 又は 9610+1170 pM，$AUC_{0-24,ss}$ は 825+5320 又は 12400+6900 pM·h であった。4 週間の回復期間後，すべての投薬に関連した変化は回復した。2 剤投与による相乗あるいは相加的毒性所見は認められなかった。

3.2.1.8 チオトロピウム+オロダテロールのイヌにおける 13 週間吸入毒性試験（用量比 1：1）［CTD4.2.3.2-18_U[redacted]-2249］

1 群当たり雌雄各 4 例のビーグル犬にチオトロピウム+オロダテロールを 0（溶媒対照），14+16，57+62 又は 290+310 µg/kg/日の用量で，少なくとも 90 日間吸入投与した。さらに 310 µg/kg/日の用量のチオトロピウム単独投与群及び 290 µg/kg/日の用量のオロダテロール単独投与群も設けた。対照群，290+310 µg/kg/日群及び各単独投与群に雌雄各 2 例の動物を追加し，6 週間回復群とした。

重量測定法による MMAD は，チオトロピウムが 1.94～2.22 µm，オロダテロールが 1.90～2.19 µm の範囲であり，イヌにおいて吸入可能であると考えられた。試験開始時，動物は約 7 カ月齢，体重は雄 6.5～10.4 kg，雌 5.6～8.7 kg の範囲であった。

投与前日及び投与 1，30 及び 86 日目に，曝露量を測定するため血液試料を採取した。チオトロピウム及びオロダテロールとも十分な全身曝露量が確認された。両薬剤とも血漿中濃度のばらつきは中等度で，曝露量はほぼ用量に比例して増加した。性差，反復投与による影響及び 2 剤投与による薬物動態学的な相互作用は認められなかった。86 日目におけるチオトロピウム+オロダテロール 14+16，57+62 又は 290+310 µg/kg/日群の $C_{max,ss}$ 雌雄平均値は 2210+320，7060+1550 又は 62100+12500 pM, $AUC_{0-24,ss}$ 雌雄平均値は 3170+2380, 9620+7760 又は 60100+47200 pM·h であった。チオトロピウム単独 310 µg/kg/日群の $C_{max,ss}$ 雌雄平均値は 21200 pM，$AUC_{0-24,ss}$ 雌雄平均値は 33700 pM·h，オロダテロール単独 290 µg/kg/日群の $C_{max,ss}$ 雌雄平均値は 7410 pM，$AUC_{0-24,ss}$ 雌雄平均値は 35600 pM·h であった。

チオトロピウム+オロダテロールは，局所及び全身性ともに忍容性は良好であった。試験中死亡はみられなかった。散瞳及び口腔粘膜及び鼻部の乾燥がチオトロピウムを投与した動物でほぼ用量依存性に増加してみられた。さらに，眼球の変化（乾燥，眼瞼腫脹，結膜充血）がチオトロピウムの高用量（チオトロピウム+オロダテロール 290+310 µg/kg/日及びチオトロピウム単独 310 µg/kg/日）を投与した動物のみでみられた。

軽度で統計学的有意差を示さない体重増加量の増加がチオトロピウム+オロダテロール 14+16 µg/kg/日群及びオロダテロール単独 290 µg/kg/日群で認められ，β2 刺激薬による同化作用に基づく変化と考えられた。チオトロピウム+オロダテロール 57+62 及び 290+310 µg/kg/日群では，体重増加量は減少傾向にあった。摂餌量は試験開始後最初の 4 週間はチオトロピウムの抗コリン作用（口腔粘膜乾燥，胃通過の減少）の影響のためにばらつきが非常に大きかった。乾燥ペレット状の餌とウエットタイプの餌との混合に切り替えた後は摂餌量において投与に関連した影響はみられなくなった。

心血管系検査により，用量依存性で回復性のある中等度から重度の心収縮力の増大及び PR 及び QT 間隔の短縮を伴う心拍数の増加がすべてのオロダテロール投与群で認められた。オロダテロール単独 290 µg/kg/日を投与した群では，投与 22 日目に行った検査で，投与直後にわずかな心拍数の増加と PR 及び QT 間隔の短縮が認められた。QTc 間隔及び動脈圧にはいずれの被験物質投与群でも変化は認められなかった。

cTnI の増加を伴う CK-MB の増加はチオトロピウム+オロダテロール 290+310 µg/kg/日群及びオロダテロール単独 290 µg/kg/日群の数例の動物で投与 3 日目のみに認められたため，心障害作用は投与の初期に発現すると考えられた。cTnI の一過性の増加はチオトロピウム+オロダテロール 57+62 及び 290+310 µg/kg/日群及びオロダテロール単独 290 µg/kg/日群のほぼ全例の動物で観察された。

CK の軽度の増加はチオトロピウム+オロダテロール 14+16 µg/kg/日群の雄及びオロダテロール単独 290 µg/kg/日群の雌雄動物で投与 32 と 88 日目にみられた。これらの増加はオロダテロールの同化作用に関連するもので，骨格筋由来と考えられた。これは血中尿素窒素及びクレアチニンの

わずかな増加とも関連し，蛋白及び骨格筋のターンオーバー亢進及びそれに伴う体重増加における変化を示唆するものと考えられた。血中グルコース及びアルブミンは低値を示した。

病理組織学的検査では，心臓で左心室乳頭筋の線維化巣が，また，肝臓で肝小葉内のグリコーゲン分布と蓄積量に可逆性の変化が共にチオトロピウム+オロダテロール 57+62 及び 290+310 µg/kg/日群及びオロダテロール単独 290 µg/kg/日群の動物で認められた。

軽度の薬理作用に起因する変化を除外すれば，用量比 1：1 のチオトロピウム+オロダテロールを用いたイヌ試験の NOAEL は 14+16 µg/kg/日と判断された。86 日目における NOAEL での $C_{max,ss}$ は 2210+320 pM，$AUC_{0-24,ss}$ は 3170+2380 pM·h であった。2 剤投与による相乗あるいは相加的毒性所見は認められなかった。心筋線維化は修復過程（すなわち部分的な回復）を示唆する所見であるが，それを除くと他のすべての変化は回復性であった。また本試験において，局所毒性に関する NOAEL は 290+310 µg/kg/日と判断された。

3.2.1.9 チオトロピウム+オロダテロールのイヌにおける 13 週間吸入毒性試験（用量比 2.5：1 又は 1：2）［CTD4.2.3.2-19_U[redacted]-1388］

1 群当たり雌雄各 4 例のビーグル犬にチオトロピウム+オロダテロール（用量比 2.5：1 又は 1：2）を 0（溶媒対照），36+16，300+130（用量比 2.5：1）又は 140+300（1：2）µg/kg/日の用量で，少なくとも 90 日間吸入投与した。さらに 300 µg/kg/日の用量のチオトロピウム単独投与群及び 300 µg/kg/日の用量のオロダテロール単独投与群も設けた。対照群，300+130 及び 140+300 µg/kg/日群及びオロダテロール単独投与群に雌雄各 2 例の動物を追加し，6 週間回復群とした。重量測定法による MMAD は，チオトロピウムが 2.11～2.36 µm，オロダテロールが 1.93～2.32 µm の範囲であり，イヌにおいて吸入可能であると考えられた。試験開始時，動物は約 6～8 カ月齢，体重は雄 5.7～10.1 kg，雌 4.1～8.0 kg の範囲であった。

投与前日及び投与 1，30 及び 86 日目に，曝露量を測定するため血液試料を採取した。チオトロピウム及びオロダテロールとも十分な全身曝露量が確認された。両薬剤とも曝露量はほぼ用量に比例して増加した。性差，反復投与による影響及び 2 剤投与による薬物動態学的な相互作用は認められなかった。86 日目におけるチオトロピウム+オロダテロール 36+16，300+130 又は 140+300 µg/kg/日群の $C_{max,ss}$ 雌雄平均値は 4870+384，28500+2340 又は 23400+12400 pM，$AUC_{0-24,ss}$ 雌雄平均値は 6230+2150，35300+12600 又は 26200+45700 pM·h であった。チオトロピウム単独 300 µg/kg/日群の $C_{max,ss}$ 雌雄平均値は 43700 pM，$AUC_{0-24,ss}$ 雌雄平均値は 52600 pM·h，オロダテロール単独 300 µg/kg/日群の $C_{max,ss}$ 雌雄平均値は 10600 pM，$AUC_{0-24,ss}$ 雌雄平均値は 42400 pM·h であった。

チオトロピウム+オロダテロールを用量比 1：1 で 13 週間投与したイヌの試験［CTD4.2.3.2-18_U[redacted]-2249］と同様，チオトロピウム+オロダテロールは用量比 2.5：1 又は 1：2 においても局所，全身性ともに高い忍容性が示された。散瞳，瞳孔強直及び鼻部及び口腔の乾燥は単独投与，併用投与にかかわらずチオトロピウムを投与したすべての投与群で認められた。心拍数及び心収縮力の増大はオロダテロールを投与した動物で主に認められた。投与期間終了時の投与開始前に対する相対体重は，チオトロピウム+オロダテロールの 300+130，140+300 µg/kg/日

群及びチオトロピウム単独 300μg/kg/日群で対照群と比較してわずかに低く，一方，雌のオロダテロール単独投与群では高かった。投与開始初期にチオトロピウム+オロダテロール 300+130 μg/kg/日群及びチオトロピウム単独 300 μg/kg/日群で一過性に摂餌量が減少した。

血液学的及び血液生化学的検査では，チオトロピウム+オロダテロール 300+130 μg/kg/日群の雄 1 例で投与 3 日目に cTnI 及び CK-MB の増加を伴う CK の増加が認められ，心障害が示された。また，cTnI のわずかな増加はチオトロピウム+オロダテロール 300+130 及び 140+300 μg/kg/日群及びオロダテロール単独 300 μg/kg/日群でも認められた。投与 29 日目以降，チオトロピウム+オロダテロール 140+300 μg/kg/日群及びオロダテロール単独 300 μg/kg/日群で CK の増加も認められた。病理組織検査では，血液学的及び血液生化学的検査で心障害が疑われたすべての群（チオトロピウム+オロダテロール 300+130 及び 140+300 μg/kg/日群及びオロダテロール単独 300 μg/kg/日群）で左心室乳頭筋の単細胞壊死あるいは中等度の限局性線維化がみられた。肝臓では肝小葉内のグリコーゲン分布の変化がオロダテロールを投与したすべての群（単独投与，併用投与とも）で認められた。チオトロピウムを投与した動物では，軽微から軽度の涙腺の腺内導管の拡張がやや用量依存的に認められた。

軽度の薬力学的作用に起因する変化を除外すれば，用量比 2.5：1 のチオトロピウム+オロダテロールを用いたイヌ試験の NOAEL は 36+16 μg/kg/日と判断された。86 日目における NOAEL での $C_{max,ss}$ は 4870+384 pM，$AUC_{0-24,ss}$ は 6230+2150 pM·h であった。チオトロピウム投与に起因する毒性は認められなかった。2 剤投与による相乗あるいは相加的毒性所見は認められなかった。修復過程（すなわち部分的な回復）を示唆する心筋線維化所見を除けば，他のすべての変化は回復性であった。

3.2.2 非げっ歯類における反復静脈内投与毒性試験

3.2.2.1 オロダテロールのイヌにおける漸増静脈内投与毒性試験（GLP 非適合）

[CTD4.2.3.2-20_U[redacted]-1625]

生理食塩液（pH 4）に溶解したオロダテロールを低速静脈内注射（2 分間）により，雌雄各 2 例のビーグル犬に 3，9，27 及び 81 μg/kg/日の漸増用量で 1 日 1 回，2～4 日間にわたり投与した。投与開始時における動物は，約 19～23 カ月齢，体重は 12～15 kg であった。

トキシコキネティクスにより，用量依存的な十分な全身曝露が確認された。27 日目における 81 μg/kg/日投与時の C_{max} 雌雄平均値は 666000 pM，AUC_{0-24} 雌雄平均値は 135000 pM·h であった。

最も顕著な所見は，投与約 1 時間後にみられた心拍数の増加及び心拍動の増大であった。4～5 日間の休薬期間を設けて用量 9，27 及び 81 μg/kg/日を投与したとき，個々の動物において，投与前値との比較で最大 2.5～2.8 倍の心拍数増加が認められた。試験期間中，9 μg/kg/日以上の用量で，軟便，粘液便，嘔吐，流涎及び鼻端の乾燥が認められた。

これらの結果から，次に実施するイヌ 2 週間静脈内投与毒性試験の最高用量は，約 27 μg/kg/日が適切であると判断した。

3.2.2.2 オロダテロールのイヌにおける 2 週間静脈内投与毒性試験

[CTD4.2.3.2-21_U[redacted]-1051]

ガイドラインに従って，ヒト単回静脈内投与代謝試験を実施するためのオロダテロールの安全性評価を目的として，本試験を実施した。生理食塩液（pH 4）に溶解したオロダテロールを，雌雄各 3 例のビーグル犬に 0，3.3，9.8 又は 29.5 μg/kg/日の用量で少なくとも 14 日間にわたり低速静脈内投与（約 2 分間，1 mL/kg）した。投与開始時における動物は 8～10 カ月齢，体重は 11～15 kg であった。

トキシコキネティクスにより，用量依存的な全身曝露が確認された。血漿中濃度は 1 日目と 11 日目で同程度であり，性差はなかった。11 日目における 3.3，9.8，29.5 μg/kg/日投与時の $C_{max,ss}$ 雌雄平均値は 21850，75200，140500 pM，$AUC_{0-24,ss}$ 雌雄平均値は 5065，15550，41250 pM·h であった。

オロダテロールを投与したすべての動物において，投与直後に耳介皮膚及び鼻口部粘膜の発赤が認められた。これらの用量に依存しない一過性の発赤は，投与 1 日目からみられたが，軽微～中等度のものであり，試験の後半にはすべての群で減弱又は消失したことから毒性学的な意義はないものと考えられた。

用量に依存しない，QT 間隔及び PR 間隔の短縮を伴う顕著な心拍数の増加，並びに中等度～顕著な収縮期及び拡張期血圧の低下が 1 及び 11 日目の投与直後に認められた。1 日目の投与 24 時間後には，3.3 μg/kg/日投与群の雌 3 例中 1 例，9.8 及び 29.5 μg/kg/日投与群の雌 3 例中 2 例において，顕著な心拍数の増加に伴って，発現率は低いものの多形性心室期外収縮が認められた。3.3 μg/kg/日投与群において，肝グリコーゲンの分布に変化が認められたが，β_2 刺激薬に既知のグリコーゲン分解促進作用によるものと考えられた。9.8 μg/kg/日投与群では，雌 3 例で軽微又は軽度の心筋の限局性線維化が，雄 1 例で心筋の石灰化が認められた。29.5 μg/kg/日群では，初回投与時に，QT 間隔及び PR 間隔の短縮を伴う心拍数の増加及び血圧低下が 24 時間後まで持続して認められ，11 日目にアルブミンの軽微な低下が認められた。さらに，この群では，肝細胞内のグリコーゲン減少及び心筋の石灰化又は線維化が，9.8 μg/kg/日投与群と比較して，より高頻度かつ重度に認められた。

NOAEL は 3.3 μg/kg/日と判断され，この用量での $C_{max,ss}$ 平均値（雄／雌）は 22000／21700 pM，$AUC_{0-24,ss}$ 平均値（雄／雌）は 5120／5010 pM·h であった。この用量での所見（軽度～中等度の頭部皮膚及び粘膜の一過性の発赤，心拍数の増加及びこれに関連する心血管系指標の変化，肝グリコーゲン蓄積の分布変化）は，オロダテロールの薬理作用に起因するものであり，毒性学的意義は低いと考えられた。

3.2.3 非げっ歯類における反復経口投与毒性試験

3.2.3.1 オロダテロールのイヌにおける漸増経口投与毒性試験（GLP 非適合）

[CTD4.2.3.2-22_U[redacted]-1139]

脱塩水（pH 3～4）に溶解したオロダテロールを雌雄各 2 例のビーグル犬に 5 mL/kg で経口投与した。吸入投与及び静脈内投与試験の成績から推定された血漿中濃度に基づいて，5 mg/kg を開始

用量に選択したが，この用量では忍容性が不良であった。そのため，5 日間投与を中止し，7～9 日目に用量 0.5 mg/kg/日で投与を再開し，10～13 日目には 1 mg/kg/日に増量した。投与開始時における動物は 6～15 カ月齢，体重は 9.5～14.8 kg であった。

トキシコキネティクスにより，用量依存的に増加する高い全身曝露が確認された。13 日目における 1 mg/kg 投与時の C_1 平均値は，雄で 67000 pM，雌で 50600 pM であった。

5 mg/kg 単回投与後，1 例を除くすべての動物において，投与 1 時間後に鎮静，軽度～重度の口腔粘膜及び皮膚の発赤，耳介，頭部及び眼窩の軽微な腫脹，鼻鏡及び粘膜の軽度の乾燥（1 例を除くすべての動物で，翌日には重度となった），並びに心拍数の増加（>200 bpm）が認められた。さらに，雄 1 例及び雌 1 例で流涙が認められた。

投与 1 時間後における心拍数増加は，0.5 及び 1 mg/kg/日投与時にも認められたが，5 mg/kg 投与時ほど顕著ではなかった。これらの用量で認められた粘膜の発赤は，5 mg/kg 単回投与後と同程度であったが，腫脹及び流涙は 5 mg/kg 単回投与後に認められたほど顕著ではなかった。

1 日目に餌の残存が認められたため，乾燥餌に加えて，水分を含む缶詰餌を与えた。この摂餌量の減少は，口腔粘膜の乾燥にも原因があると考えられた。ごく少数の例外を除いて，雄では餌の残存が認められなかったのに対して，雌では日常的に餌の残存が認められ，1～10 日目の間に 1 例を除くすべての動物で体重が減少した。しかし，続く用量設定試験の用量選択に関して，これらの体重変化は重要ではないと考えられた。

1 日目に認められた毒性所見（皮膚の発赤等）の精査のため，血漿中ヒスタミン濃度を投与約 1 時間後に測定した。血漿中ヒスタミン濃度は雄 1 例で 2.1 nM，その他の動物で 1 nM 未満であった。血漿中ヒスタミン濃度の正常範囲上限は 10 nM であることから［CTD4.3-35_R04-2414，CTD4.3-36_R04-2415］，皮膚発赤の原因として，偽アレルギー反応は否定された。

以上より，次に実施するオロダテロールのイヌ 2 週間経口投与毒性試験における高用量として，500 µg/kg/日が適切であると判断した。

3.2.3.2 オロダテロールのイヌにおける 2 週間経口投与毒性試験

［CTD4.2.3.2-23_U[redacted]-2169］

ガイドラインに従って，ヒト単回経口投与代謝試験を実施するためのオロダテロールの安全性評価を目的として，本試験を実施した。脱塩水（pH 4）に溶解したオロダテロールを 1 群当たり雌雄各 3 例のビーグル犬に，少なくとも 14 日間にわたり 2 mL/kg/日で経口投与した。投与量は，0，50，160 又は 500 µg/kg/日（第 1 部）及び 0，5 又は 16 µg/kg/ 日（第 2 部）とした。投与開始時における動物は 8～12 カ月齢（試験の第 1 部）又は 11～16 カ月齢（試験の第 2 部），体重は 9～16 kg であった。

トキシコキネティクスにより，用量依存的に増加する高い全身曝露が確認された。血漿中濃度は 1 日目と 13 日目で同程度であり，性差は認められなかった。13 日目における 5，16，50，160，500 µg/kg/日投与時の $C_{max,ss}$ 雌雄平均値は 130，378，1510，6330，61300 pM，$AUC_{0-24,ss}$ 雌雄平均値は 1042，2935，8840，34450，209500 pM·h であった。

50，160 又は 500 μg/kg/日投与群において，用量に依存しない軽度～中等度の眼窩，耳介皮膚及び鼻口部粘膜の一過性の発赤が認められた。これはオロダテロールの β_2 刺激作用によるものと考えられた。血液生化学的検査では，160 及び 500 μg/kg/日投与群において ALP の増加がみられた。

1 日目の投与 1 時間後，用量とは無関係に，軽度～重度の動脈血圧低下を伴う著しい心拍数増加が認められたが，10 日目には顕著ではなかった。1 日目の投与 1 時間後に 16 μg/kg/日以上の用量で QTc 間隔延長が認められた。心拍数増加は過度の薬理作用によると考えられ，用量依存的に増強されることはなかった。他の薬理作用による影響として，肝小葉内におけるグリコーゲン分布及びグリコーゲン量の用量依存的変化が認められた。

50 μg/kg/日以上の用量において，主に左心室の乳頭筋に壊死が認められた。160 μg/kg/日投与群の雄 2 例において，腎臓の遠位尿細管の軽微な細胞質好塩基化が認められた。500 μg/kg/日投与群では，心筋の壊死性線維化が認められ，少数例で細胞浸潤を伴っていた。また，この群のすべての動物で腎臓の遠位尿細管の軽微な細胞質好塩基化が認められた。

この試験の NOAEL は 5 μg/kg/日と判断され，13 日目におけるこの用量での $C_{max,ss}$ 雌雄平均値は 130 pM，$AUC_{0\text{-}24,ss}$ 雌雄平均値は 1042 pM·h であった。

表 3.2.3.2: 1　　非げっ歯類におけるオロダテロール又はチオトロピウム+オロダテロールの反復投与毒性試験

動物種/系統 投与方法 バッチ番号 製剤	一群の動物数 (雄/雌)	投与量 (μg/kg/日) [a] Olo 又は Tio+Olo	投与期間	$C_{max,ss}$ (pM) Olo 又は Tio+Olo (雄/雌)	$AUC_{0-24,ss}$ (pM·h) Olo 又は Tio+Olo (雄/雌)	特記すべき所見	NOAEL (μg/kg/日) Olo 又は Tio+Olo	CTD 番号/ 社内資料 番号
イヌ/ ビーグル 吸入投与 口腔咽頭経路 4 分間/日 Olo:8460030 CTF	2/1 2/2 2/2 2/2 2/2	0（溶媒） 1.3 9.5 32 116	14 日間	- NC/26.9 97.6/271 283/745 3870/4310	- NC/12.3 435/2060 1440/4230 13000/30400	≥9.5 μg/kg/日：体重↑ ≥32 μg/kg/日：心収縮力↑，PR 間隔及び QT 間隔↓を伴う心拍数↑，小葉辺縁性肝細胞のグリコーゲン↑	該当なし	CTD4.2.3.2 -11_U[redacted]-21 34
イヌ/ ビーグル 吸入投与 口腔咽頭経路 11 分間/日 Olo:8460120 CTF	5/5 3/3 3/3 5/5	0（溶媒） 2.2 13.7 127	投与期間： 4 週間 回復期間： 4 週間	- NC/NC 967/860 6880/6950	- NC/NC 4270/4320 27800/35200	全用量群：体重↑，用量依存的な心拍数↑（2 日目，27 日目には消失），K^+↑ ≥13.7 μg/kg/日：心収縮力↑，PR 間隔及び QT 間隔↓を伴う心拍数↑，小葉辺縁性肝細胞のグリコーゲン↑（雌），リン↑	13.7	CTD4.2.3.2 -12_U[redacted]-21 46
イヌ/ ビーグル 吸入投与 口腔咽頭経路 10 分間/日 Olo:8460120 CTF	6/6 4/4 4/4 6/6	0（溶媒） 4.9 15.0 160	投与期間：13 週間 回復期間： 6 週間	- 195/67.9 143/258 2780/3060	- 616/689 1540/2080 18500/18600	全用量及び溶媒投与群：局所刺激↑ 全用量群：体重↑，CK↑（2 倍，25 及び 88 日目），尿素↑（1.5 倍未満），クレアチニン↑（1.5 倍未満），肺重量↓（雄），心臓重量↓（雄） ≥15 μg/kg/日：軽微な小葉辺縁性グリコーゲン↑ 160 μg/kg/日：心拍数↑（2 日目），心収縮力↑，ALT↑（雌），AST↑（雌）	160	CTD4.2.3.2 -13_U[redacted]-13 17

↑: 増加，↓：減少　　NC:算出されず
a: 投与量は雌雄平均値で示した

表 3.2.3.2: 1　　非げっ歯類におけるオロダテロール又はチオトロピウム+オロダテロールの反復投与毒性試験（続き）

動物種/系統	**投与方法 バッチ番号 製剤**	**一群の動物数 (雄/雌)**	**投与量 (μg/kg/日) [a] Olo 又は Tio+Olo**	**投与期間**	**$C_{max,ss}$ (pM) Olo 又は Tio+Olo (雄/雌)**	**$AUC_{0-24,ss}$ (pM·h) Olo 又は Tio+Olo (雄/雌)**	**特記すべき所見**	**NOAEL (μg/kg/日) Olo 又は Tio+Olo**	**CTD 番号/ 社内資料 番号**
イヌ/ ビーグル	吸入投与 口腔咽頭経路 10 分間/日 Olo:5061001 CTF	6/6 4/4 4/4 6/6	0 15 60 330	投与期間： 52 週間 回復期間： 6 週間	- 381/423 1620/1490 8990/11500	- 2160/3560 7970/9910 46000/50200	全用量群：体重↑，心収縮力↑，心拍数↑及び試験進行に伴う減弱化，口腔粘膜乾燥↑，CK↑，クレアチニン↑ ≥60 μg/kg/日：摂餌量↑（雌），心室性不整脈，cTnI↑（4 日目），前立腺重量↓，左室乳頭筋の線維化病巣，肝グリコーゲンの分布及び量の変化，前立腺萎縮 330 μg/kg/日：収縮期及び拡張期血圧↑（雌），CK-MB↑（4 日目，雄 1 例のみ）	15	CTD4.2.3.2 -14_U[redacted]-17 40
イヌ/ ビーグル	吸入投与 口腔咽頭経路 10 分間/日 Tio: 1012809 Olo: 8460261 CTF	2/2 （対照群） 2/2 （用量比 1:1） 2/2 （用量比 1:6） 2/2 （用量比 2:1）	0 (空気対照) 1 週: 5.3+5.9 0.8+5.2 7.4+4.1 2 週: 16+17 2.0+12 33+17 3 週: 98+102 12+78 166+90 4 週: 207+224 31+194 380+185	各用量毎に 3 日間/週の用量漸増投与 4 日間休薬 4 週間	3 日目 [b] 882+154 89.1+174 1160+93.9 10 日目 [b] 2200+358 283+508 4160+360 17 日目 [b] 13000+2470 3110+5410 45300+6860 24 日目 [b] 52500+15100 14100+25900 79600+10700	3 日目 [b] 452+669 70.8+1060 1750+642 10 日目 [b] 3160+2550 590+2920 6590+2340 17 日目 [b] 23400+14600 6350+20200 60700+26100 24 日目 [b] 67000+64000 12000+51900 172000+61300	全用量群：散瞳，鼻及び口の粘膜乾燥，口腔粘膜の病変，気管上皮変化，心拍数↑，肝重量↑，肝細胞内グリコーゲン蓄積↑ 用量比 1:1 及び 1:6：左心室乳頭筋の鉱質沈着線維化，心筋における動脈周囲水腫 用量比 1:6 及び 2:1：血小板数↑，酵素（AST，ALT，ALP，GLDH，CK）活性↑，K^+↑，グルコース↓，トリグリセリド↓	該当なし	CTD4.2.3.2 -15_n00177 290

↑: 増加，↓: 減少

a: 投与量は雌雄平均値で示した　　b: 雌雄平均として表した

表 3.2.3.2: 1　　非げっ歯類におけるオロダテロール又はチオトロピウム+オロダテロールの反復投与毒性試験（続き）

動物種/系統	投与方法 バッチ番号 製剤	一群の動物数(雄/雌)	投与量(μg/kg/日)[a] Olo 又は Tio+Olo	投与期間	$C_{max,ss}$ (pM) Olo 又は Tio+Olo (雄/雌)	$AUC_{0-24,ss}$ (pM·h) Olo 又は Tio+Olo (雄/雌)	特記すべき所見	NOAEL (μg/kg/日) Olo 又は Tio+Olo	CTD 番号/社内資料番号
イヌ/ビーグル	吸入投与 口腔咽頭経路 10 分間/日 Tio: 1012809 Olo: 8460261 CTF	5/5 3/3 3/3 5/5	用量比 1:1 0 (溶媒) 6.07+5.71 16.8+16.1 157+152	投与： 4 週間 回復： 4 週間	28 日目: 1070+190/ 1300+503 2580+747/ 3880+1310 47300+10600/ 54100+16100	28 日目: 2040+2560/ 2780+3800 5590+5690/ 6730+7670 44300+48800/ 69100+52100	全用量群：鼻口部乾燥，喉頭炎，Hct↓（雌），網状赤血球数↓（雌），アルブミン↓，尿量↓，尿中 Na^+及び K^+↑，肝グリコーゲン分布の変化 16.8+16.1 及び 157+152 μg/kg/日：体重増加量↓，摂餌量↓，散瞳，心拍数↑，ALP↓，リン↑，K^+↑，尿素↑（雌），胸腺重量↓ 157+152 μg/kg/日：充血及び滲出を伴う角結膜炎，鼻炎	16.8+16.1	CTD4.2.3.2-16_U[redacted]-1894
イヌ/ビーグル	吸入投与 フェイスマスク及び口腔咽頭チューブ 10 分間/日 Tio: 1012809 Olo: 8460261 CTF	5/5 3/3 5/5 5/5 3/3	0 （溶媒） 用量比 1:6 2.66+16.4 19.8+124 用量比 2:1 28.8+16.5 385+191	投与： 4 週間 回復： 4 週間	28 日目: 用量比 1:6 552+1020/ 874+1460 3600+9770/ 5160+9940 用量比 2:1 10600+1300/ 8610+1030 58200+6120/ 60700+8170	28 日目: 用量比 1:6 609+4120/ 1040+6520 5940+36500/ 7060+48000 用量比 2:1 13500+6850/ 11300+6950 80300+45200/ 86100+32900	全用量群：鼻及び口腔の乾燥，心拍数↑，血中尿素↑，尿中 Na^+及び K^+↑，肺重量↑（雄），肝内グリコーゲン分布の変化 用量比 1:6： 2.66+16.4 μg/kg/日：摂餌量↑，尿量↓（雌） 19.8+124 μg/kg/日：散瞳，結膜充血，摂餌量↓，体重↓（1 週目のみ），QTcF 延長（2 日目の投与前，雌），QTcV 短縮（雄），尿量↓及び尿比重↑（雌），胸腺重量↓（雌） 用量比 2:1： 28.8+16.5 及び 385+191 μg/kg/日: 散瞳，結膜充血，摂餌量↓，体重↓（1 週目のみ），QTcF 延長（2 日目の投与前，雌），リン↑，尿量↓及び尿比重↑（雌），胸腺重量↓（雌） 385+191 μg/kg/日：尿量↓及び尿比重↑（雌雄），胸腺重量↓（雌雄），心筋線維化，胸腺退縮，角膜炎（1 例のみ），喉頭粘膜下への好中球浸潤	用量比 1:6 2.66+16.4 用量比 2:1 28.8+16.5	CTD4.2.3.2-17_U[redacted]-1895

↑: 増加，↓：減少
a: 投与量は雌雄平均値で示した

表 3.2.3.2: 1　　非げっ歯類におけるオロダテロール又はチオトロピウム+オロダテロールの反復投与毒性試験（続き）

動物種/系統	投与方法 バッチ番号 製剤	一群の動物数(雄/雌)	投与量(μg/kg/日)[a] Olo 又は Tio+Olo	投与期間	$C_{max,ss}$ (pM) Olo 又は Tio+Olo (雄/雌)	$AUC_{0-24,ss}$ (pM·h) Olo 又は Tio+Olo (雄/雌)	特記すべき所見	NOAEL (μg/kg/日) Olo 又は Tio+Olo	CTD 番号/社内資料番号
イヌ/ビーグル	吸入投与 口腔咽頭経路 10 分間/日 Tio: 1026724 Olo: 06147 CTF	6/6 4/4 4/4 6/6 6/6 6/6	用量比 1:1 0（溶媒） 14+16 57+62 290+310 0+290 310+0	投与： 13 週間 回復： 6 週間	86 日目 1500+231/ 2910+409 6140+1550/ 7970+1540 45800+9540/ 78300+15500 0+7300/ 0+7520 16700+0/ 25700+0	86 日目: 2040+1850/ 4290+2910 9310+8140/ 9920+7370 51000+43400/ 69200+51000 0 +30600/ 0+40600 19800+ 0/ 47600+0	全用量群：心拍数↑，尿素窒素↑，アルブミン↓ すべてのチオトロピウム投与群：散瞳，鼻及び口粘膜の乾燥 すべてのオロダテロール投与群：心収縮力↑，PR 及び QT 間隔↓を伴う心拍数↑，グルコース↓，クレアチニン↑ 14+16 及び 0+290 μg/kg/日: 体重増加量↑，CK↑，クレアチニン↑ 290+310 及び 310+0 μg/kg/日: 眼球の変化 57+62, 290+310 及び 0+290 μg/kg/日：体重増加量↓（0+290 群は除く），左心室乳頭筋の限局性線維化，肝内グリコーゲン分布の変化，cTnI の一過性増加（3 日目） 290+310 及び 0+290 μg/kg/日: CK-MB↑	14+16	CTD4.2.3.2-18_U[redacted]-2249
イヌ/ビーグル	吸入投与 口腔咽頭経路 10 分間/日 Tio: 1026724 Olo: 06147 CTF	6/6 4/4 6/6 6/6 6/6 4/4	0（溶媒） 用量比 2.5:1 36+16 300+130 用量比 1:2 140+300 Olo 単独 0+300 Tio 単独 300+0	投与： 13 週間 回復： 6 週間	86 日目 用量比 2.5:1 6730+474/ 3010+293 28400+1850/ 28500+2830 用量比 1:2 28300+12100/ 18400+12600 Olo 単独 0+9110/ 0+12000 Tio 単独 45700+0/ 41600+0	86 日目 7560+2410/ 4900+1890 37800+12300/ 32700+12900 27600+42500/ 24700+48800 0+38300/ 0+46500 51000+0/ 54100+0	すべてのチオトロピウム投与群：散瞳，瞳孔強直，鼻部及び口腔の乾燥，涙腺の排出管拡張 すべてのオロダテロール投与群：心拍数↑，心収縮力↑，肝内グリコーゲン分布の変化 300+130，140+300 及び/または 0+300 μg/kg/日： cTnI↑，CK↑，左心室乳頭筋の単細胞壊死/限局性線維化	用量比 2.5:1 36+16	CTD4.2.3.2-19_U[redacted]-1388

↑: 増加，↓：減少
a:投与量は雌雄平均値で示した

表 3.2.3.2: 1　　非げっ歯類におけるオロダテロール又はチオトロピウム+オロダテロールの反復投与毒性試験（続き）

動物種/系統	**投与方法 バッチ番号 製剤**	**一群の動物数(雄/雌)**	**投与量(μg/kg/日) Olo 又は Tio+Olo**	**投与期間**	**$C_{max,ss}$ (pM) Olo 又は Tio+Olo (雄/雌)**	**$AUC_{0-24,ss}$ (pM·h) Olo 又は Tio+Olo (雄/雌)**	**特記すべき所見**	**NOAEL (μg/kg/日) Olo 又は Tio+Olo**	**CTD 番号/社内資料番号**
イヌ/ビーグル	静脈内投与 2分間の低速静注 Olo: 8460120 生理食塩液（pH 3-4）	2/2 3/3 3/3 3/3	0（溶媒） 3 9 27 81	用量ごとに2～4日間の用量漸増	- 26700/26900 74700/88300 193000/256000 691000/641000	- 4900/5450 13600/16000 38400/46800 133000/137000	全用量群：心拍数↑ ≥9 μg/kg/日：軟便，粘液便，嘔吐，流涎，鼻端の乾燥	該当なし	CTD4.2.3.2-20_U[redacted]-1625
イヌ/ビーグル	静脈内投与 2分間の低速静注 Olo: 8460120 生理食塩液（pH 4）	3/3 3/3 3/3 3/3	0（溶媒） 3.3 9.8 29.5	2週間	- 22000/21700 81900/68500 141000/140000	- 5120/5010 15600/15500 40400/43900	全用量群：心拍数↑，耳介皮膚及び鼻口部粘膜の発赤，心室性期外収縮（雌），血圧↓，肝グリコーゲン分布変化 ≥9.8 μg/kg/日：アルブミン↓，心筋石灰化，左室乳頭筋における心筋線維化	3.3	CTD4.2.3.2-21_U[redacted]-1051

↑: 増加，↓：減少

表 3.2.3.2: 1　　非げっ歯類におけるオロダテロール又はチオトロピウム+オロダテロールの反復投与毒性試験（続き）

動物種/系統	投与方法 バッチ番号 製剤	一群の動物数 (雄/雌)	投与量 (μg/kg/日) Olo 又は Tio+Olo	投与期間	$C_{max,ss}$ (pM) Olo 又は Tio+Olo (雄/雌)	$AUC_{0-24,ss}$ (pM·h) Olo 又は Tio+Olo (雄/雌)	特記すべき所見	NOAEL (μg/kg/日) Olo 又は Tio+Olo	CTD 番号/ 社内資料 番号
イヌ/ ビーグル	経口投与 Olo: 3052140 酸性化脱塩水 （pH 4）	2/2	5000 500 1000	用量ごとに 3～4 日間 の用量漸増	128000/214000 7590/34300 67000/50600	測定せず	500 及び 1000 μg/kg/日：心拍数↑，粘膜及び皮膚の発赤，鼻の乾燥 5000 μg/kg/日：鎮静，口腔粘膜及び皮膚の発赤，耳介・頭部及び眼窩領域の腫脹，鼻の乾燥，心拍数↑，流涙	該当なし	CTD4.2.3.2 -22_U[redacted]-11 39
イヌ/ ビーグル	経口投与 Olo: 3052140 酸性化脱塩水 （pH 4）	3/3 3/3 3/3 3/3 3/3 3/3 3/3	0（溶媒） 0（溶媒） 5 16 50 160 500	2 週間	- - 131/129 312/443 1130/1890 5910/6750 54300/68300	- - 954/1130 2390/3480 8580/9100 37200/31700 165000/254000	全用量群：心拍数↑，血圧↓，肝グリコーゲン分布/量の変化 ≥16 μg/kg/日：QTc 間隔↑（1 日目） ≥50 μg/kg/日：皮膚及び粘膜の発赤，心筋壊死 ≥160 μg/kg/日：腎遠位尿細管細胞質好塩基化 500 μg/kg/日：心筋壊死性線維化	5	CTD4.2.3.2 -23_U[redacted]-21 69

↑: 増加，↓: 減少

4. 遺伝毒性

チオトロピウムの遺伝毒性試験（Ames 試験，チャイニーズハムスターV79 細胞を用いた *in vitro* 遺伝子突然変異試験，ヒトリンパ球を用いた *in vitro* 染色体異常試験，*in vitro* 不定期 DNA 合成試験及び *in vivo* 小核試験）では遺伝毒性を示唆する所見はみられていない（SRA HH の概要を参照：SRA HH 承認時申請資料ニ-31）。オロダテロールについては *in vitro*（Ames 試験，マウスリンフォーマ試験）及び *in vivo*（反復投与後の小核試験）試験を実施し遺伝毒性を評価した。*In vitro* 試験は，細菌毒性あるいは細胞毒性がみられる濃度まで，*in vivo* 試験は，MTD までの用量で実施した。*In vitro* 試験では，代謝活性化系としてラット由来のミクロソーム肝酵素画分（S9 mix）を用いた。特に明記しない限り，これらの試験は GLP に準拠して実施した。チオトロピウム+オロダテロールの遺伝毒性試験については，第 4.2 項に記載する *in vivo* 小核試験を実施した。オロダテロール及びチオトロピウム+オロダテロールについて実施した遺伝毒性試験の概要を表 4: 1 に示す。

表 4: 1 オロダテロールの遺伝毒性試験

試験	指標細胞 動物種／系統	用量／濃度	主な結果	**CTD 番号/ 社内資料** 番号
オロダテロールの細菌を用いる復帰突然変異試験（Ames 試験）	*S. typhimurium* （TA 1535，1537，98，100 及び 102）	Olo: 100～ 5000 µg/plate	陰性 毒性>300 µg/プレート 復帰変異コロニー数の増加なし	CTD4.2.3.3.1 -1_U[redacted]-1046
オロダテロールのマウスリンフォーマ試験	L5178Y $tk^{+/-}$細胞株	Olo: 10～250 µg/mL	陰性 毒性>100 µg/mL 突然変異頻度の増加なし	CTD4.2.3.3.1 -2_U[redacted]-2188
オロダテロールの骨髄小核試験 （4 週間投与）	ラット/ HsdBrlHan:WIST	Olo: 0，78，260， 1360 µg/kg/日，吸入投与 [a]	陰性 骨髄小核の誘導なし，骨髄毒性を示す徴候なし	CTD4.2.3.2-4 _U[redacted]-2133
チオトロピウム+オロダテロールの反復吸入投与によるラット骨髄小核試験（用量比 1 : 1）	ラット/ Crl:WI(Han)	Tio+Olo (用量比 1:1) 0, 85.2+78.6, 577+555, 2266+2174 µg/kg/日， 吸入投与 [a]	陰性 骨髄小核の誘導なし，骨髄毒性を示す徴候なし	CTD4.2.3.2-7 _U[redacted]-1893
チオトロピウム+オロダテロールの反復吸入投与によるラット骨髄小核試験（用量比 1 : 6 及び 2 : 1）	ラット/ Crl:WI(Han)	Tio+Olo (用量比) 13+75 (1:6), 393+2032 (1:6), 143+73 (2:1) , 3263+1747 (2:1) µg/kg/ 日，吸入投与 [a]	陰性 骨髄小核の誘導なし，骨髄毒性を示す徴候なし	CTD4.2.3.2-8 _U[redacted]-1892
オロダテロールの骨髄小核試験 （単回投与）	ラット/ Crl:WI(Han)	Olo: 0，1，10， 40 mg/kg，静脈内投与	MNPCE：高用量で増加 陰性対照：0.1% 10 mg/kg：0.28% 40 mg/kg：0.27% 赤血球造血亢進の徴候 （PCE/NCE 比↑）	CTD4.2.3.3.2 -1_U[redacted]-1834

a: 1 日平均到達用量は，McMahon 式による理論的 RMV を用いて計算した（CTD4.3-31_R97-0663）

4.1 *IN VITRO* 試験

4.1.1 オロダテロールの AMES 試験［CTD4.2.3.3.1-1_U[redacted]-1046］

ネズミチフス菌（*Salmonella (S.) typhimurium*）／哺乳類ミクロソーム試験（Ames 試験）を実施してオロダテロールの変異原性を検討した。ネズミチフス菌 TA 1535，TA 100，TA 102，TA 1537 及び TA 98 菌株を使用した。試験は，プレート法又はプレインキュベーション法により， ラット肝 S9 mix 存在下又は非存在下，濃度 100～5000 µg/plate の範囲で実施した。

S9 mix 存在下又は非存在下，いずれの菌株についても，オロダテロールは細菌毒性がみられる濃度まで突然変異を誘発しなかった。適切な陰性及び陽性対照の併設により本試験の妥当性を確認し，オロダテロールは「Ames 陰性」と判断された。

4.1.2 オロダテロールのマウスリンフォーマ試験［CTD4.2.3.3.1-2_U[redacted]-2188］

マウスリンパ腫細胞株 L5178Y $tk^{+/-}$を用いて，ラット肝 S9 mix 存在下又は非存在下で，オロダテロールの遺伝子又は染色体突然変異誘発作用を検討した。脱塩水に溶解したオロダテロールを細胞培地に濃度 10～250 µg/mL となるように添加した。細胞毒性作用により細胞数が減少した（S9 mix 存在下又は非存在下，200 µg/mL，4 時間処理で 22%，S9 mix 存在下，250 µg/mL 処理で 5%）。評価可能濃度は，4 時間処理で 25～200 µg/mL，24 時間処理で 10～100 µg/mL であった。適切な陰性及び陽性対照を併設し，本試験の妥当性を確認した。

代謝活性化系存在下及び非存在下のいずれにおいても，オロダテロールは，細胞毒性を示す濃度まで，マウスリンパ腫細胞株 L5178Y $tk^{+/-}$の *tk* 遺伝子座において遺伝子又は染色体突然変異を誘発しなかった。

4.2 *IN VIVO* 試験

4.2.1 オロダテロールの反復吸入投与によるラット骨髄小核試験［CTD4.2.3.2-4_U[redacted]-2133］

HsdBrlHan:WIST ラットにオロダテロールを 0（溶媒対照），78，260 又は 1360 µg/kg/日の用量で 4 週間投与した反復吸入投与毒性試験で小核試験を実施した。最終投与 24～30 時間後の剖検時，1 群当たり雌雄各 5 例の動物から骨髄塗抹標本を作製し，染色処理後，顕微鏡検査を行った。動物当たり PCE 2000 個について，小核の有無を評価した。さらに，赤血球 200 個について PCE/NCE 比を算出し，骨髄毒性の評価指標とした。

溶媒対照又は背景対照値と比較したとき，各投与群において小核を有する PCE 数の出現頻度に増加は認められなかった。したがって，ラットに明らかな毒性を誘発する用量まで 4 週間経口投与しても，オロダテロールは *in vivo* で染色体の損傷（構造及び数的異常）を誘発しないと判断された。

4.2.2 チオトロピウム+オロダテロールの反復吸入投与によるラット骨髄小核試験（用量比 1：1）［CTD4.2.3.2-7_U[redacted]-1893］

1 群当たり雌雄各 10 例の Crl:WI(Han)ラットにチオトロピウム+オロダテロール（用量比 1：1）を 0（溶媒対照），85.2+78.6，577+555 又は 2266+2174 μg/kg/日の用量で 4 週間投与した反復吸入投与毒性試験の剖検時に大腿骨から骨髄サンプルを採取し，1 群当たり雌雄各 5 例の動物から骨髄塗抹標本を作製，染色処理後，顕微鏡検査を行った。動物当たり PCE 2000 個について，小核の有無を評価した。さらに，赤血球 500 個について PCE/NCE 比を算出し，骨髄毒性の評価指標とした。チオトロピウム+オロダテロール投与によって骨髄における小核は誘発されず，骨髄毒性も認められなかった。

4.2.3 チオトロピウム+オロダテロールの反復吸入投与によるラット骨髄小核試験（用量比 1：6 及び 2：1）［CTD4.2.3.2-8_U[redacted]-1892］

1 群当たり雌雄各 10 例の Crl:WI(Han)ラットにチオトロピウム+オロダテロールを 0（溶媒対照），13+75 又は 393+2032 μg/kg/日（用量比 1：6）及び 143+73 又は 3263+1747 μg/kg/日（用量比 2：1）の用量で 4 週間投与した反復吸入投与毒性試験で小核誘発能の有無を評価した。チオトロピウム+オロダテロール投与によって骨髄における小核は誘発されず，骨髄毒性も認められなかった。

4.2.4 オロダテロールの単回静脈内投与によるラット骨髄小核試験［CTD4.2.3.3.2-1_U[redacted]-1834］

雄 Crl:WI(Han)ラット各群 5 例にオロダテロールを 1，10 又は 40 mg/kg の用量で単回静脈内投与した。陰性及び陽性対照を併設し，投与 24 時間後（及び 40 mg/kg 投与群では 48 時間後）の骨髄塗抹標本を作製した。赤血球造血又は骨髄毒性の評価指標として，赤血球 2×400 個について，PCE/NCE 比を算出した。

投与群のすべてのラットにおいて，投与約 5 分後以降に腹臥位及び重度の呼吸深大が発現し，1 mg/kg 投与群で 5 時間未満，10 及び 40 mg/kg 投与群では 5 時間以上にわたり持続した。

10 mg/kg 以上のオロダテロール投与群で，PCE はわずかに増加し，40 mg/kg 投与群（24 及び 48 時間後でそれぞれ 34.6%）では，陰性溶媒対照（25.0%）と比較して，統計学的に有意であった。この PCE のわずかな増加は，背景対照値の範囲内であったが，赤血球造血亢進を示唆する所見と考えられた。

オロダテロールの静脈内投与により，10 及び 40 mg/kg では統計学的に有意なものの，軽度で用量との明らかな相関を示さない MNPCE の増加が認められた。前述のように，オロダテロール投与群では赤血球造血の亢進が 10 mg/kg 以上で認められており，PCE は 40 mg/kg では統計学的に有意な変動を示している。このことから，小核のわずかな増加は，オロダテロールを静脈内投与した時に生じる過度の薬理作用に起因する赤血球造血に付随した所見であることが考えられた。ラットを用いたテレメトリー試験において，10 及び 40 mg/kg の静脈内投与により，著しい心拍数増加及び血圧低下が確認されている。著しい心拍数増加及び血圧低下は低酸素状態を誘発し，エリスロポエチンの産生を誘導することが知られている。さらに，エリスロポエチンの遊離は大腿

骨髄において赤血球産生を促進させ，その結果として自然発生性の小核形成率が上昇する。この一連の事象を検証するため機序解明試験を実施した［CTD4.2.3.3.2-2_U[redacted]-1845］。

4.2.5 オロダテロールの静脈内投与による雄ラットにおける造血亢進作用機序解明試験（GLP 非適合）［CTD4.2.3.3.2-2_U[redacted]-1845］

単回静脈内投与によるラット骨髄小核試験［CTD4.2.3.3.2-1_U[redacted]-1834］において，小核のわずかな増加が認められた。さらに，ラットを用いた探索的安全性薬理試験において，オロダテロールを静脈内投与したときに著しい心拍数増加及び血圧低下が明らかになったことから，オロダテロールの造血亢進作用機序解明のための試験を実施した。

雄 Crl: WI(Han)ラット各群 10 例に生理食塩液に溶解したオロダテロールを 0 又は 40 mg/kg の用量，10 mL/kg の容量で単回静脈内投与し，投与 6 時間後（血液のみ）及び投与 24 及び 48 時間後の剖検時に標本を採取した。トキシコキネティクスのため，雌雄各 4 例からなるサテライト群を追加し，さらにトキシコキネティクス用としてオロダテロール 10 mg/kg 群を追加した。投与開始時の動物は 8～9 週齢，体重は 253.3～295.8 g の範囲であった。

トキシコキネティクスにより，すべてのオロダテロール投与群において，線形で用量依存的な全身曝露が確認された。$AUC_{0\text{-}24}$ は用量にほぼ比例して増加した。10 及び 40 mg/kg 投与群での C_{max} 平均値はそれぞれ 3490 及び 18700 nM，$AUC_{0\text{-}24}$ 平均値は 8770 及び 33600 nM·h であった。

オロダテロール 40 mg/kg を投与したすべての動物で，少なくとも投与後 8 時間にわたり腹臥位が認められ，剖検時に体重はわずかに減少（約 5%）した。

オロダテロール 40 mg/kg 単回投与後，6 時間及び 24 時間における血漿中エリスロポエチン濃度は，対照群では常に検出限界未満であったのに対し，オロダテロール投与群ではそれぞれ検出限界値の約 25 倍及び 5 倍の明確な上昇を示し，造血機能亢進を裏付ける所見と考えられた。

投与 24 及び 48 時間後の剖検時に，骨髄塗抹検査，骨髄細胞のフローサイトメトリー解析，末梢血の血液学的検査及び脾臓の病理組織学的検査を実施した。その結果，オロダテロール投与群において，前赤芽球（+89%）及び大赤芽球画分（+55%）の増加，赤血球系前駆細胞数の相対的増加，赤血球系前駆細胞の成熟促進（未熟多染性赤血球系前駆細胞から成熟正染性赤血球系前駆細胞への移行），末梢血における網状赤血球数の増加，及び脾臓における軽微～中等度の赤血球系髄外造血の亢進が認められた。

オロダテロールの心血管系への作用として，心臓における炎症性変化を伴う軽微～軽度の多発性心筋細胞変性及び壊死が認められた。

以上のように，オロダテロール 40 mg/kg の静脈内投与により，赤血球造血が亢進されることが明らかになった。赤血球造血亢進を示す所見として，血漿中エリスロポエチン濃度の顕著な上昇，骨髄における赤血球系前駆細胞数の相対的増加及び赤血球系前駆細胞の成熟促進，これに伴う末梢血網状赤血球数の増加，並びに脾臓における髄外造血が認められた。したがって，これらの成績及び一連の *in vitro* 遺伝毒性試験で陰性結果が得られたことを総合評価すると，オロダテロール投与で認められる小核の増加は，オロダテロールの遺伝毒性によるものではなく，非常に高用量

の投与によって薬理作用が過剰に発現した結果生じる赤血球造血亢進に付随した所見であると考えられた。

5. がん原性試験

ガイドラインに従い［CTD4.3-6_R12-5450, CTD4.3-7_R11-2414］，チオトロピウム+オロダテロールのがん原性試験は実施しなかった。チオトロピウム及びオロダテロールのそれぞれの単剤については，吸入投与により 104 週間までのがん原性試験を実施している。

チオトロピウムのがん原性については，CD-1 マウスを用いて雌は 180.6 µg/kg/日まで，雄は 8.6 µg/kg/日までの用量で，また，Wistar ラットを用いて 74.1 µg/kg/日までの用量で検討を行った。いずれの試験でもチオトロピウム投与による腫瘍性病変は認められなかった（SRA HH の概要を参照：SRA HH 承認時申請資料ニ-37）。

オロダテロールのがん原性については，CD-1 マウスを用いて 255 µg/kg/日までの用量で，Wistar ラットを用いて 270 µg/kg/日までの用量で検討を行った。[redacted]%BAC，[redacted]%Na-EDTA 及び[redacted]%クエン酸を含む水溶液にオロダテロールを溶解してエロゾルを調製した。各試験ではトキシコキネティクス用試料採取のためのサテライト群を設けたが，動物数などについては以下の概説では記載していない。マウス及びラットのがん原性試験のいずれも到達用量は目標用量を上回っていた。特に明記しない限り，これらの試験は GLP に準拠し，1 日 1 回投与により実施した。マウス及びラットを用いて実施したがん原性試験の概要を表 5.2.1: 1 に示す。

5.1 マウスがん原性試験

5.1.1 オロダテロールのマウス吸入投与がん原性試験［CTD4.2.3.4.1-1_U[redacted]-1065］

1 群当たり雌雄各 60 例の Crl:CD-1(ICR)マウスにオロダテロールを 0（空気対照），0（溶媒対照），26.1，76.9 又は 255 µg/kg/日の用量で，1 日 40 分間，少なくとも 104 週間にわたり吸入投与した。ただし，雌の 76.9 µg/kg/ 日群については，生存率が 25%に達したため，103 週目に試験を終了した。解析データに基づく MMAD 推定値は 0.31～0.48 µm の範囲であり，マウスにおいて吸入可能であると考えられた。試験開始時の動物は 6～8 週齢，体重は雄 25.7～37.4 g，雌 19.1～33.2 g の範囲であった。

1，85，176，359 及び 722 日目に，曝露量を測定するため血液試料を採取した。359 日目における血漿中オロダテロールの $C_{max\ ss}$ 平均値（雄／雌）は 2410／3020，4610／6650，19300／28400 pM，$AUC_{0\text{-}24,ss}$ 平均値（雄／雌）は 5750／5680，15400／14300，61200／42800 pM·h であった。曝露量は高く，AUC は用量比を上回る増加を示した。血漿中オロダテロール濃度に反復投与，あるいは性差による影響は認められなかった。

600 例中 293 例が切迫屠殺に至るか，又は死亡した。死亡率は概して雄に比べて雌で高かった。雄では被験物質投与群と対照群との間に死亡率に差は認められなかった。雌 76.9 µg/kg/日群の死亡率が 75%に達したため，FDA がん原性評価委員会と相談し，試験 718 日目（103 週目）に雌 76.9 µg/kg/日群の試験を終了した。すべての群について，Kaplan-Meier 生存曲線を作成した。その結果，溶媒対照群とその他の群の対比較によると，雌 76.9 µg/kg/日投与群の死亡率が雌溶媒対照群に比べて有意に高かったが，この群における偶発的死亡数が多かったためと考えられた。この他には死亡率に溶媒対照群と他の群との間に統計学的有意差は認められず，総死亡率にもオロダテロール投与の影響はみられなかった。

骨格筋，心臓，喉頭，膣及び白血球数にオロダテロールに関連した非増殖性所見が認められた。

オロダテロール投与群の動物で，190 日目以降，薬理作用に関連する骨格筋量の増加が認められた。この所見は，雌に比べて雄で高頻度かつより早い時点で発現した。病理組織学的検査において，すべてのオロダテロール投与群の雄，並びに 76.9 及び 255 μg/kg/日投与群の雌で骨格筋量の増加が低用量群に比べて高用量群でより顕著に認められた。オロダテロール投与に関連して，雌雄で摂餌量の増加を伴う体重増加が認められた。

すべての用量で心筋線維化及び空胞化の発現率が上昇した。心筋線維化の発現数（雄／雌）は，各 60 例中 31／9 例（空気対照），28／6 例（溶媒対照），43／11 例（26.1 μg/kg/日），38／17 例（76.9 μg/kg/日），45／26 例（255 μg/kg/日）であり，心筋空胞化の発現数はそれぞれ 27／5 例，16／5 例，　33／7 例，34／15 例，36／15 例であった。255 μg/kg/日投与群の雄で心外膜線維化の発現率も上昇し（それぞれ，3，1，　7，5，12 例），オロダテロールの高用量投与による過剰な薬理作用に起因する二次的変化と考えられる心筋肥大も，少数例で認められた。オロダテロール投与群の雄で左心房内血栓の発現率がわずかに上昇し（それぞれ，0，0，3，6，3 例），偶発的な変化と推察されたが，オロダテロールの過剰な薬理作用との関連性を否定することはできなかった。

すべての溶媒投与群において，溶媒に関連した喉頭の U 字型軟骨壊死が発現した。また，すべてのオロダテロール投与群及び溶媒投与群において，喉頭の扁平上皮化生が認められたが，255 μg/kg/日投与群でやや顕著であった。これらの変化は，げっ歯類に特異的かつ毒性とはみなされない所見であり，また程度が弱く，炎症性反応を伴っていなかったことから，ヒトには問題にならない所見と考えられた。

すべてのオロダテロール投与群で加齢性の膣萎縮の発現率が低下した。この所見は，げっ歯類に特異的な卵巣機能に関連するものであり，ヒトにおける毒性学的意義はないと考えられた。

255 μg/kg/日投与群の雄及び雌で，オロダテロール投与に関連して，総白血球数が減少した。しかし，影響を受けた白血球は雄では好中球であったのに対し，雌ではリンパ球及び単球であった。これらの変化は，程度が小さく，関連する病理組織学的変化を伴わず，白血球の種類に一貫性が認められなかったことから，毒性学的意義のない所見と考えられた。

雌の生殖器にオロダテロールに関連した増殖性変化が認められた。すべてのオロダテロール投与群において，子宮平滑筋腫及び平滑筋肉腫の発現率が上昇した。また，76.9 及び 255 μg/kg/日投与群の雌の卵巣において，限局性性索／間質過形成の発現率が上昇し，255 μg/kg/日投与群で限局性黄体過形成の発現率が上昇した。これらの腫瘍性及び増殖性病変は他の β_2 刺激薬でも知られており［CTD4.3-67_R12-0264，CTD4.3-62_R12-0102］，既知のげっ歯類に特異的な β_2 刺激作用機序によって誘発されたものであることから，ヒトにおける発がんリスクを示す所見ではないと考えられた。

以上のように，マウスにオロダテロールを 76.9 μg/kg/日の用量で 104 週間（雄）あるいは 103 週間（雌），並びに 26.1 及び 255 μg/kg/日の用量で 104 週間吸入投与しても，総死亡率に影響は認められなかった。オロダテロール投与群で骨格筋量の増加，体重増加及び摂餌量増加が認められた。オロダテロールはげっ歯類に特異的なクラス効果として，子宮平滑筋腫瘍（平滑筋腫，平

滑筋肉腫）を誘発するとともに，卵巣において限局性性索／間質過形成及び限局性黄体過形成の発現率を上昇させた。本試験の結果から，ヒトに推奨臨床用量のオロダテロールを投与したとき，がん原性に関連するリスクが生じることはないと判断された。

5.2 ラットがん原性試験

5.2.1 オロダテロールのラット吸入投与がん原性試験［CTD4.2.3.4.1-2_U[redacted]-2661］

1 群当たり雌雄各 55 例の Crl:WI(Han)ラットにオロダテロールを 0（空気対照），0（溶媒対照），25.8，75.9 又は 270 µg/kg/日の用量で，1 日 35 分間，少なくとも 104 週間にわたり吸入投与した。解析データに基づく MMAD 推定値は 1.33～1.61 µm の範囲であり，ラットにおいて吸入可能であると考えられた。試験開始時の動物は 6～7 週齢，体重は雄 120～190 g，雌 100～186 g の範囲であった。

1，88，178，360 及び 726 日目に，血液試料を採取し，オロダテロールの十分な全身曝露を確認した。360 日目における $C_{max,ss}$ 平均値（雄／雌）は 1710／1020，4440／4830，20800／32400 pM，$AUC_{0-24,ss}$ 平均値（雄／雌）は 4620／4550，16300／15000，55100／65700 pM·h であった。すべての用量において，全身曝露量は高く，AUC は用量比をわずかに上回る増加を示した。性差は認められなかった。

550 例中 153 例の動物が切迫屠殺に至るか，又は死亡した。死亡率は概して雄に比べて雌で高かった。雌雄いずれについても死亡率に用量依存的な影響は認められなかった。

オロダテロール投与によって，β_2 受容体刺激を介した同化作用が誘発され，すべての雄投与群並びに雌の 75.9 及び 270 µg/kg/日投与群で骨格筋量が増加した。この同化作用に関連して全用量の雌雄で摂餌量が増加し，雌で用量反応関係が認められたが，雄では認められなかった。摂餌量が増加したにもかかわらず，すべての用量の雄で体重増加抑制が認められ，肥大した骨格筋組織における高いエネルギー消費によるものと考えられた。雌では摂餌量が増加した結果，一過性に体重増加が亢進したが，全期間を通した体重増加量に影響は認められなかった。

オロダテロール投与群で赤血球数，Hct 及び Hb の軽微な減少が認められた。また，雄の 75.9 µg/kg/日投与群並びに雌雄の 270 µg/kg/日投与群で白血球数がわずかに増加した。赤血球指標の抑制作用又は白血球数に対する作用は他の β_2 刺激薬でも報告されている［CTD4.3-62_R12-0102, CTD4.3-57_R12-0088］。また，10%未満の赤血球指標の低下は有害ではないと考えられている［CTD4.3-66_R12-0254］。したがって，これらの血液学的所見は推奨臨床用量を大きく上回る用量で発現したことを考慮すると，ヒトにおける毒性学的意義はないと考えられた。

すべての雌雄オロダテロール投与群で血中グルコースが低下した。β_2 受容体はラット骨格筋におけるグルコースの取り込みに関与していることから［CTD4.3-59_R12-0090］，β_2 刺激薬で血糖値低下が起こることはよく知られている［CTD4.3-57_R12-0088，CTD4.3-65_R12-0251］。すべての用量の雌雄で血中クレアチニンの増加が認められたが，骨格筋量増加による二次的な影響であると考えられた［CTD4.3-57_R12-0088］。尿検査でオロダテロールに関連した変化は認められなかった。剖検及び病理組織学的検査において，喉頭及び卵巣にオロダテロール投与に関連した非腫瘍性所見が認められた。喉頭上皮に溶媒に関連した軽微～軽度の扁平上皮化生が認められ，溶

媒対照群よりも 270 μg/kg/日投与群でわずかにより顕著であった。この所見はげっ歯類に特異的なものであり，毒性学的意義のない変化であるとともに，病変程度が低く炎症性反応を伴っていなかったことから，ヒトでは問題にならないものと考えられた。また，オロダテロール投与群において卵巣嚢胞の発現率が上昇したが，この変化は卵巣に対するげっ歯類に特異的な β_2 刺激作用によるものであり，ヒトにおける毒性学的意義はないと考えられた。

触診可能な腫瘤の発現頻度及び平均発現時間に投与に関連した変化は認められなかった。

雌の生殖器に被験物質に関連した増殖性所見が認められた。270 μg/kg/日投与群の雌で卵巣間膜平滑筋腫の発現率が上昇した。また，75.9 及び 270 μg/kg/日投与群の雌において，卵巣間膜平滑筋の過形成が誘発された。これらの増殖性及び腫瘍性所見は β_2 刺激作用機序によってげっ歯類に特異的に誘発されることがよく知られており，ヒトにおける毒性学的意義は低く，ヒト発がんリスクを示すものではないと考えられた［CTD4.3-26_P12-00303，CTD4.3-51_R10-1209］。

以上のように，ラットにオロダテロールを 25.8，75.9 及び 270 μg/kg/日の用量で，104 週間吸入投与したとき，骨格筋量の増加，雄における体重増加抑制，卵巣嚢胞の発現率上昇が認められた。270 μg/kg/日投与群において，卵巣間膜平滑筋腫が誘発されたが，この変化はげっ歯類に特異的な卵巣に対する β_2 刺激薬のクラス効果であることから，ヒトに対する発がんリスクを示唆するものではないと考えられる。したがって，このラット試験からヒトで懸念されるがん原性のリスクはないと判断された。

表 5.2.1: 1　　オロダテロールの吸入投与がん原性試験

動物種 系統	**投与方法 バッチ番号 製剤**	**一群の 動物数 (雄/雌)**	**投与量 Olo (μg/kg) [a,b]**	**投与期間**	**C_{max} (pM) [c] Olo (雄/雌)**	**AUC_{0-24} (pM·h) [c] Olo (雄/雌)**	**特記すべき所見**	**CTD 番号/ 社内資料 番号**
マウス／ Crl:CD-1 (ICR)	吸入投与 鼻経路 40 分間/日 Olo: 5061021 CTF	60/60 60/60 60/60 60/60 60/60	0（空気） 0（溶媒） 26.1 76.9 255	104 週間, 雌の 76.9 μg/kg 投与群のみ 103 週目に屠殺	- - 2410/3020 4610/6650 19300/28400	- - 5750/5680 15400/14300 61200/42800	**死亡数（雄/雌）** 空気対照群：19/32 溶媒対照群：27/30 26.1 μg/kg/日：23/32 76.9 μg/kg/日：27/45 255 μg/kg/日：22/36 **一般状態の変化，臨床検査所見** 全用量群：骨格筋量↑，体重↑，摂餌量↑ 255 μg/kg/日：白血球数↓ **病理組織所見－非腫瘍性病変** 全用量及び溶媒対照群：喉頭 U 字型軟骨壊死，喉頭の扁平上皮化生 全用量群：心筋線維化及び空胞化の発現率↑，加齢性膣萎縮↓（雌），心房内血栓発現率↑（雄） ≥76.9 μg/kg/日：心筋肥大（雄各 1），卵巣性索／間質過形成の発現率↑ 255 μg/kg/日：心外膜線維化発現率↑（雄），喉頭扁平上皮化生発現率↑，限局性黄体過形成の発現率↑ **病理組織所見－腫瘍性病変** 子宮平滑筋腫／子宮平滑筋肉腫発現数： 空気対照群：5/1 溶媒対照群：9/2 26.1 μg/kg/日：18/5 76.9 μg/kg/日：19/10 255 μg/kg/日：22/4	4.2.3.4.1-1_ U[redacted]-1065

↑: 増加，↓：減少
a: 1 日平均到達用量は，McMahon 式による理論的 RMV を用いて計算した（CTD4.3-31_R97-0663）
b: 投与量は雌雄平均値で示した
c: サテライト群の動物を用いて 359 日目に測定

表 5.2.1: 1　　オロダテロールの吸入投与がん原性試験（続き）

動物種 系統	**投与方法 バッチ番号 製剤**	**一群の 動物数 (雄/雌)**	**投与量 Olo (μg/kg) [a,b]**	**投与期間**	**C_{max} (pM) [c] Olo (雄/雌)**	**AUC_{0-24} (pM·h) [c] Olo (雄/雌)**	**特記すべき所見**	**CTD 番号/ 社内資料 番号**
ラット／ Crl:WI (Han)	吸入投与 鼻経路 35 分間/日 Olo: 5061021 CTF	55/55 55/55 55/55 55/55 55/55	0（空気） 0（溶媒） 25.8 75.9 270	104 週間	- - 1710/1020 4440/4830 20800/32400	- - 4620/4550 16300/15000 55100/65700	**死亡数（雄/雌）** 空気対照群：11/20 溶媒対照群：7/9 25.8 μg/kg/日：21/16 75.9 μg/kg/日：12/21 270 μg/kg/日：15/21 **一般状態の変化，臨床検査所見** 全用量群：骨格筋量↑，体重↓（雄），体重↑（雌），摂餌量↑，赤血球パラメータ↓，グルコース↓，クレアチニン↑ ≥75.9 μg/kg/日：白血球数↑ **病理組織所見－非腫瘍性病変** 全用量及び溶媒対照群：喉頭上皮の扁平上皮化生（270 μg/kg/日で顕著） 全用量群：卵巣嚢胞発現率↑ ≥75.9 μg/kg/日：卵巣間膜平滑筋過形成 **病理組織所見－腫瘍性病変** 卵巣間膜平滑筋腫/子宮平滑筋腫発現数： 空気対照群：0/0 溶媒対照群：0/0 25.8 μg/kg/日：1/1 75.9 μg/kg/日：0/0 270 μg/kg/日：4/0	4.2.3.4.1-2_ U[redacted]-2661

↑: 増加，↓：減少
a: 1 日平均到達用量は，McMahon 式による理論的 RMV を用いて計算した（CTD4.3-31_R97-0663）
b: 投与量は雌雄平均値で示した
c: サテライト群の動物を用いて 360 日目に測定

6. 生殖発生毒性試験

ガイドラインに従い［CTD4.3-6_R12-5450，CTD4.3-7_R11-2414］，チオトロピウム+オロダテロールにおける生殖発生毒性に関する試験は特に実施しなかった。チオトロピウム及びオロダテロールの単剤については，それぞれ吸入投与により生殖発生毒性評価を行っている（SRA HH の概要を参照：SRA HH 承認時申請資料ニ‐22）。チオトロピウムの生殖発生毒性試験は 1991～1994 年にその時点でのガイドラインに従って実施されたものであるため，Segment I（ラット），II（ラット及びウサギ）及び III（ラット）試験として以下に記載する。

チオトロピウムの Segment I（ラットの受胎能及び一般生殖能）試験では， 100 µg/kg/日（設定濃度）までを投与した雌雄ラットにおいて，受胎能及び一般生殖能に投薬に関連した影響は雄で 2000 µg/kg/日（設定濃度）まで認められなかったが，雌では 100 µg/kg/日（設定濃度）以上で影響が認められた。親動物の生殖能に対する NOAEL は雄では 2000 µg/kg/日（設定濃度），雌では 10 µg/kg/日（設定濃度），胚／胎児に対する NOAEL は 2000 µg/kg/日（設定濃度）であった。

Segment II 試験はラット及びウサギで実施され，それぞれ 2000 及び 500 µg/kg/日（設定濃度）までを投与した。これらの試験の結果，チオトロピウムによる催奇形性は認められなかった。ラット Segment II 試験では，母動物の生殖毒性に対する NOAEL は 10 µg/kg/日（設定濃度），胎児に対する NOAEL はともに 2000 µg/kg/日（設定濃度）であった。ウサギにおける Segment II 試験では，100 及び 500 µg/kg/日（設定濃度）群の胎児で，13 肋骨の発生率が有意に増加した。母動物の生殖毒性に対する NOAEL は 500 µg/kg/日未満（設定濃度），胚・胎児に対する無毒性量は 10 µg/kg/日（設定濃度）と判断された。いずれの試験においても出生率における影響（吸収，着床後胚損失，胎児生存等）は母動物に対する毒性用量のみで認められた。

Segment III 試験では，100 µg/kg/日（設定濃度）以上で全児死亡が増加し，出生時の体重発達の遅れ，反射機能及び性成熟の遅れがみられた。その結果，母動物の生殖毒性に対する NOAEL は 10 µg/kg/日（設定濃度），周産期及び出生後発生における NOAEL は 10 µg/kg/日（設定濃度）と判断された。

オロダテロールについては，ICH ガイドライン S5(R2) ［CTD4.3-52_R10-1514］に従い，ラットの受胎能及び初期胚発生に関する試験，ラット及びウサギの胚・胎児発生に関する試験，ラットの出生前及び出生後の発生並びに母動物の機能に関する試験を実施した。すべての試験において，ヒトで予定されている吸入投与経路を用いた。ラット及びウサギを用いて実施したすべての生殖・発生毒性試験の概要を表 6.3.1: 1 に示す。

生殖・発生毒性試験において，サテライト群の動物からトキシコキネティクス用の試料を採取した。特に明記しない限り，これらの試験は GLP に準拠して実施した。ラット及びウサギにおいて，吸入投与は鼻経路曝露により実施した。ほとんどの場合，到達用量は設定用量を超えていた。[redacted]%BAC，[redacted]% Na-EDTA 及び[redacted]%クエン酸を含む溶媒にオロダテロールを溶解，さらに必要に応じ溶媒で希釈してオロダテロール水溶液を作成し，エロゾルを調製した。

6.1 受胎能及び初期胚発生に関する試験

6.1.1 オロダテロールの吸入投与によるラット受胎能及び初期胚発生毒性試験［CTD 4.2.3.5.1-1_U[redacted]-2297］

Crl:CD® (SD)ラットを 1 群当たり雌雄各 24 例となるよう，無作為に群分けした。投与は 1 日 1 回，35 分間の吸入投与とした。雄には，交配前 4 週間，交配期間中及び交配後の屠殺時まで，雌には，交配前 2 週間，交配期間中及び妊娠 7 日（妊娠 0 日=交尾検出日）までオロダテロールを投与した。雌は妊娠 14，15 又は 16 日に屠殺し，生殖器官を検査するとともに，着床状態を記録した。剖検時，生殖器官の重量を測定し，病理組織学的検査用に固定保存した。到達用量は 0（溶媒対照），58, 193 及び 3068 µg/kg/ 日であった。解析データに基づく MMAD 推定値は 1.32～1.79 µm の範囲であり，このエロゾルはラットにおいて吸入可能であると考えられた。動物入荷時における動物は雄 6～7 週齢，雌 5～6 週齢，体重は雄 152～178 g，雌 109～137 g の範囲であった。

トキシコキネティクスにより，すべてのオロダテロール投与群において，全身曝露の用量依存的な増加が確認された。58, 193, 3068 µg/kg/日投与群の雄における $C_{0\,583}$ 平均値は，26 日目で 1130，5630，167000 pM，62 日目で 1860，8310，208000 pM であった。また，雌における $C_{0\,583}$ 平均値は，投与 12 日目で 1720，5800，191000 pM であった。

一般状態の観察において，すべての群の雄，並びに 193 及び 3068 µg/kg/日投与群の雌で四肢の皮膚の発赤及び流涎が認められた。また，3068 µg/kg/日投与群の動物で自発運動低下が認められた。

すべての雄のオロダテロール投与群では，投与開始後最初の 3 週間まで，対照群と比較して体重増加が亢進した。雌では，すべてのオロダテロール投与群において，妊娠期投与終了時まで対照群と比較して体重増加が亢進した。3068 µg/kg/日投与群の動物において，投与開始後最初の数日間にわたり，摂餌量が一過性に減少したが，この影響は低用量群では明白でなかった。残りの投与期間には，すべての群で摂餌量が増加した。

発情周期の各ステージ及びその平均持続期間は，すべての群で同様であった。本試験において，雌の生殖能，すなわち交配，受胎能及び妊娠成績に対する影響は認められなかった。また，雄の生殖能も対照群と同様であった。

雄動物の剖検時，精巣上体絶対重量における用量依存的かつ有意な減少が認められた。また，すべてのオロダテロール投与群で精巣重量が対照群よりも低かった。これらは背景対照値の範囲下限に近く，投与期間中の検査及び病理組織学的検査で所見が認められなかったことから，毒性学的意義はないと考えられた。

剖検及び病理組織学的検査において，オロダテロール投与に関連した所見は認められなかった。

親動物毒性に関する NOAEL は 58 µg/kg/日と判断され，この用量での $C_{0\,583}$ 平均値は雄（投与 26 日目）及び雌（投与 12 日目）でそれぞれ 1130 及び 1720 pM であった。また，初期胚発生及び交配，受胎能，着床後胚生存に関する NOAEL は 3068 µg/kg/日と判断され，この用量での $C_{0\,583}$ 平均値は雄（投与 26 日目）及び雌（投与 12 日目）でそれぞれ 167000 及び 191000 pM であった。

6.2 胚及び胎児発生に関する試験

6.2.1 オロダテロールの吸入投与によるラット胚・胎児発生毒性試験［CTD 4.2.3.5.2-1_U[redacted]-2534］

雌 Crl:CD® (SD) IGS BR ラット各群 22 例に，オロダテロールを 0，64，222 又は 1054 µg/kg/日の推定到達用量で妊娠 6 日から 17 日まで，1 日 1 回 60 分間吸入投与した。対照群には，投与期間を通して，同じ速度で溶媒を投与した。妊娠 20 日に動物を屠殺し，生殖能評価及び胎児検査を行った。重量測定法による MMAD は 3.1～3.6 µm の範囲であり，このエロゾルはラットにおいて吸入可能であると考えられた。動物入荷時における動物は 9～10 週齢，体重は 200～220 g の範囲であった。

妊娠 17 日目に，曝露量を測定するため選択した動物から血液試料を採取した。その結果，十分な全身曝露が確認され，64，222，1054 µg/kg/日投与群における C_1 平均値はそれぞれ 3390，7200，37800 pM で，曝露量は用量にほぼ比例して増加した。血漿中オロダテロール濃度のばらつきは中等度であった。

一般状態の観察において，投与に関連した所見は認められなかった。妊娠 6～18 日の期間中，オロダテロール投与群の動物で体重増加の亢進及び摂餌量増加が認められた。

母動物の剖検時に被験物質に関連した所見は認められず，胚・胎児生存及び成長に対する有害な影響も認められなかった。胎児検査で，内臓異常の発現率にオロダテロール投与に関連した変化は認められなかった。222 及び 1054 µg/kg/日投与群において，胸骨分節の不完全骨化が認められる胎児がわずかに増加した。この変化が発達遅延を示唆するものである可能性は否定できないものの，発現が散発的であったことから，投与に関連した変化とは考えられなかった。

妊娠ラットにオロダテロールを投与したときの発生及び母動物毒性に関する NOAEL は，1054 µg/kg/日と判断された。この用量におけるオロダテロールの C_1 平均値は 37800 pM であった。

6.2.2 オロダテロールの吸入投与によるウサギ胚・胎児発生毒性に関する用量設定試験（GLP 非適合）［CTD 4.2.3.5.2-2_U[redacted]-2535］

非妊娠及び妊娠ニュージーランド白色ウサギにオロダテロールを投与したときの毒性を明らかにし，次に実施する胚・胎児発生に関する主試験に適した用量を設定するために，二段階構成の用量設定試験を実施した。第一段階では，非妊娠雌ウサギ各群 3 例にオロダテロールの投与可能な最高濃度（約 120 µg/L）まで，30，60 又は 120 分間/日で，14 日間連続吸入投与した。推定到達用量はそれぞれ 835，1800 及び 3920 µg/kg/日であった。第二段階では，適時交配させたウサギ 3 例からなる 2 群にオロダテロールの投与可能な最高濃度まで，60 又は 120 分間/日で妊娠 6 日から 19 日まで吸入投与した。推定到達用量はそれぞれ 1740 及び 3710 µg/kg/日であった。重量測定法による MMAD は 4.6 µm であり，このエロゾルはウサギにおいて吸入可能であると考えられた。動物入荷時における動物は 18～26 週齢，体重は 3.0～4.0 kg の範囲であった。

非妊娠ウサギに投与可能な最高濃度のオロダテロールを 120 分間吸入投与したときの忍容性は良好であった。非妊娠ウサギにおいて，一般状態，体重及び剖検に対する毒性所見は認められなかった。投与初日に平均摂餌量の低下が認められた。

妊娠ウサギにおいても，体重に対する影響は認められなかった。非妊娠動物同様，投与初日に平均摂餌量の低下が認められた。胚・胎児生存率及び成長に対する影響はみられなかった。

トキシコキネティクスの結果，非妊娠ウサギ及び妊娠ウサギにおけるオロダテロールの全身曝露量は高いものの，ばらつきが大きかった。妊娠 5 日の血漿中濃度は妊娠 1 日よりも低かった。推定到達用量で補正した血漿中濃度は，非妊娠ウサギと妊娠ウサギで同程度であった。以上より，妊娠ウサギに投与可能な最高濃度（約 120 µg/L）を投与したときの曝露は，胚・胎児発生毒性試験に適していると考えられた。

6.2.3 オロダテロールの吸入投与によるウサギ胚・胎児発生毒性試験［CTD 4.2.3.5.2-3_U[redacted]-1019］

適時交配させた雌ニュージーランド白色ウサギ各群 22 例にオロダテロールを 0，289，974 又は 2489 µg/kg/日の用量で妊娠 6 日から 19 日まで 1 日 1 回 90 分間吸入投与した。対照群には，投与期間を通して，高用量群と同じ速度で溶媒を投与した。交配後の妊娠 29 日に動物を屠殺し，生殖能評価及び胎児検査を行った。重量測定法による MMAD は 2.7～4.2 µm の範囲であり，このエロゾルはウサギにおいて吸入可能であると考えられた。投与開始時における動物の週齢は 23～34 週齢，体重は 3.28～4.41 kg の範囲であった。

妊娠 10 日目に，曝露量を測定するため選択した動物から血液試料を採取した。妊娠ウサギの曝露量は，投与量範囲を通して，非線形で用量依存的な動態を示した。289，974，2489 µg/kg/日投与群における C_{max} 平均値はそれぞれ 8170，30400，161000 pM，AUC_{0-24} 平均値は 39700，182000，959000 pM·h であった。血漿中オロダテロール濃度のばらつきは大きかった。対照群の動物から採取した試料の半数及び無処置動物から採取した 4 試料すべてで，低濃度のオロダテロールが検出された。しかし，これらの対照群における濃度測定値は 289 µg/kg/日群の濃度測定値と比べてはるかに低かったことから，試験の全体の結果に影響を与えるものではないと判断された。

一般状態の観察では，オロダテロール投与に関連した異常所見は認められなかった。妊娠 6～7 日には，対照群では体重減少が認められたのに対し，オロダテロール投与群の雌では体重に変化はないか又は増加が認められ，妊娠 9～16 日には，対照群に比べて体重増加が亢進した。

母動物の剖検でオロダテロールに関連した所見は認められず，胚・胎児生存率及び成長に対する毒性影響も認められなかった。

2489 µg/kg/日投与群において，対照群と比較して，重大な異常を有する胎児／同腹児数が増加し，影響が認められた胎児数は背景対照値の範囲を超えていた。異常を認めた胎児の大部分は一腹に集中し，この系統／繁殖施設のウサギでこれまでにみられていない特徴的な異常として認められた。また，これらの異常はこの群のほかの胎児で認められた異常と共通するものではなかった。さらに，異常が集中した同腹児 8 例においては，頭蓋骨／肋骨／長骨の不均一な骨化等の異常も認められた。重大な異常を有する胎児がこの群に集中し，一部の胎児の頭蓋骨／肋骨／長骨に骨化異常が認められたことは，胚・胎児発生に対する投与の影響を示唆するものであった。平均血漿中濃度に約 10 倍のばらつきがあったことから，これらの異常を示した母動物の血漿中濃度が非常に高かった可能性を否定することはできない。

妊娠ウサギにオロダテロールを投与したときの母動物毒性に関する NOAEL は 2489 µg/kg/日と判断され，この用量における AUC_{0-24} 平均値は 959000 pM·h，C_{max} 平均値は 161000 pM と算出された。また，発生毒性に関する NOAEL は 974 µg/kg/日であり，この用量における AUC_{0-24} 平均値は 182000 pM·h，C_{max} 平均値は 30400 pM と算出された。

6.3 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

6.3.1 オロダテロールの吸入投与によるラット出生前・出生後発生及び母体機能毒性試験［CTD 4.2.3.5.3-1_U[redacted]-1971］

Crl:CD® (SD)ラット各群 24 例に，オロダテロールを 0（溶媒対照），59，297 又は 3665 µg/kg/日の用量で，妊娠 6～20 日及び授乳 2～21 日（授乳 0 日=同腹児出生日）の期間，1 日 1 回 35 分間吸入投与した。解析データに基づく MMAD 推定値は 2.86～3.64 µm の範囲であり，このエロゾルはラットにおいて吸入可能であると考えられた。交配確認時における動物は約 9 週齢，体重は 181～267 g の範囲であった。

F0 世代の雌動物のみについて，一般状態を観察するとともに，体重及び摂餌量を測定し，毒性を評価した。可能であれば，各腹につき雌雄各 2 例の F1 離乳動物を継続して飼育し，すべての動物について発育を調べるとともに，身体的及び機能的発達を評価した。さらに，雌雄 1 組について引き続き生殖機能の評価を行った。

妊娠ラットに最高 3665 µg/kg/日のオロダテロールを投与したときの忍容性は良好であった。投与期間中の検査で認められた所見は，投与初日以降の有意な体重増加亢進及び一過性の摂餌量減少のみであった。3665 µg/kg/日投与群のすべての動物において，行動の変化（行動抑制及び亢進）並びに部分閉眼などの症状が，おおむね最初の 2～3 日間に認められた。すべてのオロダテロール投与群で流涎が認められた。

授乳 21 日目までに認められた同腹児数のわずかな差，及び 59 及び 3665 µg/kg/日投与群で認められた生存率の低下は，背景対照値の範囲内でありオロダテロール投与に関連するものではないと考えられた。3665 µg/kg/日投与群の一腹総体重及び出生児体重は，授乳 21 日目まで，対照群に比べてわずかに低値を示したが，この差は統計学的に有意なものではなかった。すべてのオロダテロール投与群において，眼瞼開裂に要した日数にわずかではあるが，用量依存的な短縮傾向が認められ，雌雄ともに統計学的に有意であった。F1 世代動物において，妊娠 14，15 又は 16 日まで，交配，受胎能及び着床後胚生存率に対する影響は認められなかった。

母動物毒性に関する NOAEL，並びに F1 世代の発生・生存及び F1 世代の交配，受胎能，着床後胚生存に関する NOAEL は 3665 µg/kg/日と判断された。

表 6.3.1: 1　　オロダテロールの吸入投与生殖・発生毒性試験

動物種 系統	投与方法 バッチ番号 製剤	一群の 動物数 （雄/雌）	投与量 Olo (μg/kg/日)[a]	投与期間	C (pM) Olo（雄/雌）	$AUC_{0\text{-}24,ss}$ (pM·h)	特記すべき所見	NOAEL Olo （μg/kg/日）	CTD 番号/ 社内資料 番号
ラット／ Crl:CD® (SD)	吸入投与 鼻経路 35 分間/日 Olo: 3052140, 3052091 CTF	24/24 24/24 24/24 24/24	0（溶媒） 58 193 3068	雄：交配 4 週間前から交配後まで 雌：交配 2 週間前から妊娠 7 日まで	-/- 1130/1720 5630/5800 167000/191000 （雄投与 26 日目，雌投与 12 日目の $C_{0\ 583}$）	算出せず	全用量群（58 μg/kg/日の雌は除く）：過度の流涎，皮膚の発赤，体重増加量↑，摂餌量↑（すべての雌），精巣及び精巣上体重量↓ 3068 μg/kg/日：初回投与後に雄 1 例死亡，妊娠 7 日に雌 1 例を屠殺，自発運動低下	父動物／ 母動物：58 受胎能／胚発生／交配：3068	CTD4.2.3.5. 1-1_U[redacted]-22 97
ラット／ Crl:CD® (SD)	吸入投与 鼻経路 60 分間/日 Olo: 8460120 CTF	-/22 -/22 -/22 -/22	0（溶媒） 64 222 1054	妊娠 6～17 日	-/- -/3390 -/7200 -/37800 （C_1）	算出せず	母動物： 全用量群：体重↑，摂餌量↑ 胚・胎児発生： 全用量群：体重↑ 222 μg/kg/日：内臓逆位 1 例，臍帯ヘルニア 2 例，臍帯又は肝静脈と下大静脈の合流異常 1 例，胸骨分節の不完全骨化の軽微な発現率↑ 1054 μg/kg/日：再吸収率↑，雄胎児率↓，臍帯ヘルニア 1 例，臍帯又は肝静脈と下大静脈の合流異常 2 例，胸骨分節の不完全骨化の軽微な発現率↑ 注：所見は背景対照値の範囲内であった	母動物及び胚・胎児： 1054	CTD4.2.3.5. 2-1_U[redacted]-25 34

-：検査せず
a：1 日平均到達用量は，　McMahon 式による理論的 RMV を用いて計算した（CTD4.3-31_R97-0663）

表 6.3.1: 1　　オロダテロールの吸入投与生殖・発生毒性試験（続き）

動物種 系統	**投与方法 バッチ番号 製剤**	**一群の 動物数 （雄/雌）**	**投与量 Olo (μg/kg/日)[a]**	**投与期間**	**C_{max} (pM)[b] Olo**	**$AUC_{0\text{-}24,ss}$ (pM·h)**	**特記すべき所見**	**NOAEL Olo （μg/kg/日）**	**CTD 番号/ 社内資料 番号**
ラット ／ Crl:CD® (SD)	吸入投与 鼻経路 35 分間/日 Olo: 5061021	-/24 -/24 -/24 -/24	0（溶媒） 59 297 3665	妊娠 6～20 日及び授乳 2～21 日	TK 実施せず	TK 実施せず	全用量の母動物：体重増加量↑，一過性の摂餌量↓，流涎 3665 μg/kg/日の母動物：自発運動低下あるいは増加，部分閉眼 全用量の出生児：眼瞼開裂に要した日数↓	F0 及び F1： 3665	CTD4.2.3.5. 3-1_U[redacted]-19 71
ウサギ ／NZW	吸入投与 鼻経路 Olo: 8460120 CTF	-/3 -/3 -/3	835 1800 3920	14 日間 （30，60，120 分間/日）	23400 141000 101000	算出せず	非妊娠雌動物 異常所見なし	該当なし	CTD4.2.3.5. 2-2_U[redacted]-25 35
		-/3 -/3	1740 3710	妊娠 6～19 日 （60，120 分間/日）	136000 85500	算出せず	適時交配させた雌動物 異常所見なし	該当なし	

－：検査せず

a：1 日平均到達用量は，McMahon 式による理論的 RMV を用いて計算した（CTD4.3-31_R97-0663）

b：投与期間終了時の吸入投与終了直後に測定

表 6.3.1: 1　　オロダテロールの吸入投与生殖・発生毒性試験（続き）

動物種 系統	投与方法 バッチ番号 製剤	一群の 動物数 （雄/雌）	投与量 Olo (µg/kg/日)[a]	投与期間	C_{max} (pM)[b] Olo	AUC_{0-24} (pM·h) Olo	特記すべき所見	NOAEL Olo （µg/kg/日）	CTD 番号/ 社内資料 番号
ウサギ／ NZW	吸入投与 鼻経路 90 分間/日 Olo: 8460120 CTF	-/22 -/22 -/22 -/22	0（溶媒） 289 974 2489	妊娠 6～19 日	- 8170 30400 161000	- 39700 182000 959000	母動物： 対照：母体 2 例屠殺 974 µg/kg：母体 1 例屠殺 全用量：体重停滞又は体重↑ 胚・胎児発生： 2489 µg/kg：一腹総体重低値 2 例 催奇形性あり - 母体 1 例由来の胎児 8／9 例で骨化異常（頭蓋骨／肋骨／長骨の非骨化領域／不均一骨化） - 母体 1 例由来の全胎児で重大な異常：肋骨肥厚／胸郭変形，肩甲骨／上腕骨／橈骨／尺骨／大腿骨／脛骨／腓骨の短縮／湾曲及び／又は四肢屈曲併発，部分閉眼又は口蓋裂を有する胎児 - 母体 4 例由来の胎児 6 例で重大な異常：心血管系異常を有する胎児 2 例，無頭蓋，無眼，頸胸椎及び肋骨異常，胸骨裂及び胃壁破裂などの複数の異常を有する胎児 1 例，複数の網膜襞又は心血管系異常を有する胎児 2 例，胸骨の背腹性変形を有する胎児 1 例	胚・胎児：974 母動物：2489	CTD4.2.3.5. 2-3_U[redacted]-10 19

－：検査せず
a：1 日平均到達用量は，McMahon 式による理論的 RMV を用いて計算した（CTD4.3-31_R97-0663）
b：投与 5 日目（妊娠 10 日）の吸入投与終了直後に測定

7. 局所忍容性試験

ガイドラインに従い［CTD4.3-6_R12-5450，CTD4.3-7_R11-2414］，チオトロピウム+オロダテロールの局所忍容性試験は特に実施しなかった。チオトロピウム及びオロダテロールそれぞれの単剤について局所刺激性試験を実施した。チオトロピウムについてはウサギの眼における局所刺激性試験を実施し，20 mg という非常に高い用量でも眼に対して刺激性を示さなかった（SRA HH の概要を参照：SRA HH 承認時申請資料ニ - 46）。オロダテロールについては，以下に示す通り，ウサギを用いて皮膚又は眼における局所刺激性試験を実施するとともに，臨床試験で使用する静脈内投与製剤を静脈内，動脈内及び傍静脈投与したときの局所刺激性を評価する試験をウサギあるいはラットを用いて実施した。特に明記しない限り試験は GLP に従って実施した。

7.1 皮膚刺激性試験

7.1.1 オロダテロールのウサギ皮膚刺激性試験［CTD4.2.3.6-1_U[redacted]-1116］

雌ニュージーランド白色ウサギの皮膚に脱塩水に混和し湿潤させたオロダテロール 500 mg を 4 時間まで単回塗布しても，塗布局所の皮膚に変化はみられず，全身性毒性及び塗布領域以外の皮膚の変化も認められなかった。したがって，オロダテロールは非刺激性及び非腐食性物質に分類された。

7.2 眼刺激性試験

7.2.1 オロダテロールのウサギ眼刺激性試験［CTD4.2.3.6-2_U[redacted]-2189］

雌ニュージーランド白色ウサギ 4 例の片眼の結膜嚢にオロダテロールの 2 又は 10 mg を単回投与した。反対側の眼は無処置対照とした。

用量 2 mg で軽度の刺激作用が誘発され，特徴的所見として，結膜における軽微なうっ血及び眼瞼腫脹が認められた。しかし，すべての動物で，投与後 48 時間以内に正常状態に回復した。10 mg 投与後にも，2 mg 投与後と同様の反応が認められたが，より顕著であった。また，2 mg 投与時に認められた変化に加えて，重度の流涙及び血管識別が困難になるほどの結膜のびまん性深紅色化が投与 1 日目に認められた。さらに，正常状態に回復するまでに 72 時間を要した。

ウサギの眼にオロダテロールを 2 及び 10 mg を適用したとき，用量依存的な軽度～中等度の刺激作用が誘発された。しかし，全身性毒性は認められず，眼の変化は 72 時間以内に回復することが明らかになった。

7.3 静脈内及び筋肉内投与刺激性試験

7.3.1 オロダテロールのウサギ単回静脈内及び筋肉内投与局所刺激性試験［CTD4.2.3.6-3_U[redacted]-2144］

雌ニュージーランド白色ウサギ 8 例に，0.004 又は 0.010 mg/mL のオロダテロール溶液を，0.5 mL の容量で右側耳介外側静脈内に単回投与，あるいは右側背部長筋に単回投与した。対照として，同じ容量の生理食塩液（溶媒）を反対側に投与した。投与 4 日後まで毎日，注射部位局所の変化

を観察した。各濃度について投与 24 及び 96 時間後にウサギ各 2 例を剖検し，病理組織学的検査に供した。

0.004 mg/mL のオロダテロール溶液を単回静脈内投与したときの忍容性は良好であったが，0.010 mg/mL では病理組織学的検査で軽微な局所刺激が観察された。両オロダテロール溶液を単回筋肉内投与したときの忍容性は良好であった。したがって，オロダテロール 0.004 mg/mL 溶液は静脈内投与に適しているが，0.010 mg/mL のヒトへの静脈内投与は避けるべきであると判断された。

7.4 動脈内投与刺激性試験

7.4.1 オロダテロールのウサギ単回動脈内投与局所刺激性試験

[CTD4.2.3.6-4_U[redacted]-2164]

雌ニュージーランド白色ウサギ 8 例に，0.004 又は 0.010 mg/mL のオロダテロール溶液を 0.5 mL の容量で右側耳介中心動脈内に単回投与した。対照として同じ容量の生理食塩液（溶媒）を反対側に投与した。投与 4 日後まで毎日，注射部位局所の変化を観察した。各濃度について投与 24 及び 96 時間後にウサギ各 2 例を剖検し，病理組織学的検査に供した。

両オロダテロール溶液を単回動脈内投与したときの局所忍容性は良好であった。しかし，0.010 mg/mL 溶液を動脈内投与したとき，動物の苦悶がみられたことから，ヒトに 0.010 mg/mL 溶液を投与することは避けるべきであると考えられた。

7.5 傍静脈投与刺激性試験

7.5.1 オロダテロールのラット単回傍静脈投与局所刺激性試験

[CTD4.2.3.6-5_U[redacted]-2178]

雌 Crl:WI(Han)ラット各 4 例に， 0.004 又は 0.010 mg/mL のオロダテロール溶液を 0.2 mL の容量で右頸静脈周囲に単回投与した。対照として，同じ容量の生理食塩液（溶媒）を反対側に投与した。投与 4 日後まで毎日，注射部位局所の変化を観察した。投与 24 及び 96 時間後にラット各 2 例を剖検し，病理組織学的検査に供した。

両オロダテロール溶液を傍静脈投与したときの忍容性は良好であった。

8. その他の毒性試験

8.1 抗原性試験

ガイドラインに従い［CTD4.3-6_R12-5450，CTD4.3-7_R11-2414］，抗原性に関する試験は特に実施しなかった。非げっ歯類及びげっ歯類におけるいずれの反復投与毒性試験においても，抗原性を示唆する血液学的及び病理組織学的所見は認められなかった。

8.2 免疫毒性試験

ガイドラインに従い［CTD4.3-6_R12-5450，CTD4.3-7_R11-2414］，免疫毒性に関する試験は特に実施しなかった。非げっ歯類及びげっ歯類におけるいずれの反復投与毒性試験においても，免疫毒性を示唆する血液学的及び病理組織学的所見は認められなかった。

8.3 依存性試験

In vitro 受容体スクリーニングにおいて，チオトロピウム，オロダテロールとも依存性に関連する各受容体に対する結合が認められなかったことから，ガイドラインに従い［CTD4.3-6_R12-5450, CTD4.3-7_R11-2414］，依存性に関する試験は特に実施しなかった。

8.4 代謝物の毒性試験

ガイドラインに従い［CTD4.3-46_R08-2457］，チオトロピウム及びオロダテロールとも代謝物の安全性を確認する試験は実施しなかった

8.5 光毒性試験

ICH ガイダンス（S10）「ICH harmonised tripartite guideline: photosafety evaluation of pharmaceuticals, S10」［CTD4.3-77_R14-2116］に従い，光毒性に関して以下のように考察した。

チオトロピウムの吸収スペクトラムは 290 nm 未満でのみ認められる（SRA HH の概要を参照：SRA HH 承認時申請資料ロ-4）ため，さらなる検討は不要と考えられた。オロダテロールの吸収スペクトラムは 350 nm 以下のみで認められ，319 nm でのモル吸光係数（Molar Extinction Coefficient, MEC）は 4267 L/mol/cm を示した（エタノール／水酸化ナトリウム溶媒中）［CTD2.3.S.3.1］。しかしながら，ラットを用いて実施した全身オートラジオグラフィー試験で，高用量投与した有色ラットとアルビノラットで組織分布に差は認められなかった（薬物動態試験の概要文［CTD 2.6.4］）。さらに，臨床用量（5 μg/日）でのオロダテロールの全身曝露量は極めて低いことを合わせ考えると，オロダテロールによる光毒性のリスクは極めて低いと考えられた。以上，チオトロピウムの光毒性リスクはなく，オロダテロールの光毒性リスクも極めては低いことから，さらなる光安全性評価は必要ないと考えられた。チオトロピウム+オロダテロール配合剤の第 III 相試験プログラムデータを評価し，光線過敏性反応及び光線性皮膚症状態を示唆する有害事象の発現割合は低く，投与群間で同程度の発現であり，本結論は妥当であると考えられた。

8.6 幼若動物を用いた毒性試験

オロダテロールについて，幼若イヌを用いた反復吸入投与毒性試験を実施した。到達用量は設定用量の近似値で，ほとんどの場合設定用量を超えていた。[redacted]% BAC，[redacted]% Na-EDTA 及び[redacted]%クエン酸を含む水溶液にオロダテロールを溶解してエロゾルを調製した。幼若イヌを用いた毒性試験の概要を表 8.6.2: 1 に示す。

8.6.1 オロダテロールの幼若イヌを用いた吸入投与用量設定試験（GLP 非適合）[CTD4.2.3.7.7-1_U[redacted]-1442]

幼若ビーグル犬におけるエロゾル化オロダテロールの 13 週間吸入投与毒性試験を実施するにあたり，試験計画の妥当性を検証することを目的として予備試験を行った。

動物には閉鎖フェイスマスクシステムを用いて，14～18 日齢から開始して少なくとも 21 日間にわたり，1 日 1 回 10 分間又は 14 分間吸入投与した（グループ 3 の用量漸増期を除く）。推定到達用量の群雌雄平均値は，0，21.9，294 又は 674 µg/kg/日であった。解析データに基づく MMAD 推定値は 0.58～1.47 µm であり，幼若イヌにおいて吸入可能な粒子径範囲であると考えられた。

トキシコキネティクスにより，高い全身曝露量が確認された。血漿中濃度のばらつきは中等度であった。$AUC_{0\text{-}24,ss}$ は用量にほぼ比例して増加した。3 週間の反復投与後に蓄積性は認められず，性差もみられなかった。

オロダテロールを吸入投与したとき，674 µg/kg/日投与群で一過性に心拍数増加及び心収縮力増大が，また，投与期間中，体重増加抑制及び毎分呼吸量の低下がみられた。剖検で異常所見は認められなかった。すべてのオロダテロール投与群の一部の動物において，肝臓の小葉周辺性肝細胞にグリコーゲン増加が認められた。免疫組織化学染色により，β_1 及び β_2 アドレナリン受容体の染色性は幼若イヌに比べて成熟イヌの方がわずかに高いことが明らかになった。以上より，試験計画の妥当性が立証され，幼若イヌを用いた 13 週間吸入投与毒性試験の用量が設定された。

8.6.2 オロダテロールの幼若イヌを用いた 13 週間吸入投与毒性試験 [CTD4.2.3.7.7-2_U[redacted]-1257]

1 群当たり雌雄各 5 例のビーグル犬にオロダテロールを 0（空気対照），0（溶媒対照），120，324 又は 1046 µg/kg/日の用量で，閉鎖フェイスマスクシステムを用い，1 日 1 回 10 分間吸入投与した。対照群及び 1046 µg/kg/日投与群に雌雄各 2 例を追加し，4 週間の回復群とした。投与開始時における動物は 15～19 日齢，体重は雄 0.69～1.68 kg，雌 0.68～1.53 kg の範囲であった。解析データに基づく MMAD 推定値は 0.74～0.98 µm の範囲であり，このエロゾルは幼若イヌにおいて吸入可能であると考えられた。

1 及び 91 日目に，曝露量を測定するため血液試料を採取した。トキシコキネティクスにより，中等度～高い全身曝露が確認された。オロダテロール曝露量は用量にほぼ比例して増加し，性差及び反復投与の影響は認められなかった。91 日目における 120，324，1046 µg/kg/日投与群の $C_{max,ss}$ 雌雄平均値は 1425，5880，32450 pM，$AUC_{0\text{-}24,ss}$ 雌雄平均値は 6125，24400，77950 pM·h であった。

試験期間中 4 例の動物（溶媒対照群 2 例，324 μg/kg/日投与群の 2 例）が死亡あるいは状態悪化のため途中屠殺された。324 μg/kg/日投与群の 1 例の状態悪化（投与 85 日目）の原因は誤嚥性化膿性気管支肺炎であった。他の 324 μg/kg/日投与群の 1 例の死因（投与 8 日目）は明らかでなかったが，最高用量群を含む他の投薬動物では同様の一般症状又は死亡は認められないことから，投薬に関連したものではないと考えられた。この 324 μg/kg/日投与群の死亡動物の代替動物を投与 8 日目に補充した。

一般状態の観察において，投与中及び投与直後に，1046 μg/kg/日投与群で一過性の心拍数増加及び心収縮力の増大が認められた。また，一部の動物（主に 1046 μg/kg/日投与群）で，9～12 週目に，透明鼻汁及び鼻からの雑音が投与前に認められた。

120 及び 324 μg/kg/日投与群における体重増加量は，溶媒対照群に比べて大きかった。一方，1046 μg/kg/日投与群における体重増加量は溶媒対照群に比べて，雄及び雌でそれぞれ 18%及び 11%少なかった。これら群間の体重差は投与期間後半にみられた摂餌量の変化にも関連していると考えられた。1046 μg/kg/日投与群における体重増加量は回復期間中に回復した。

眼科学的検査において，投与 5 週目に水晶体における後極放線明瞭化並びに壁紙における色調変化などの所見がすべての投与群において高頻度に認められたが，13 週目にはほぼ消失した。これらは成長中の若齢犬にみられる所見であり，対照群を含むすべての群で認められ，発生頻度に明らかな差がなかったことから，いずれもオロダテロール投与とは関連のないものと考えられた。

動物の成長に伴い対照群を含む全ての動物で心拍数は徐々に減少し，PR 間隔，QT 間隔及び RR 間隔も徐々に延長した。血圧に対する投与の影響は認められなかった。すべての群において，試験期間を通して毎分呼吸量が増加したが，この毎分呼吸量の増加は 1 回換気量が成長に伴い徐々に増加したことによると考えられ，呼吸パラメータに対する投与に関連した影響はないと考えられた。

溶媒対照群と比較して，324 及び 1046 μg/kg/日投与群において，13 週目に MCH が統計学的に有意な低下を示したが回復期間終了時にはこの変化は明らかではなかった。また，これに関連したほかの血液学的検査所見が認められなかったことから，この変化の毒性学的意義は必ずしも高いとは考えられなかった。

1046 μg/kg/日投与群の雄において，溶媒対照群に比べて，精巣及び胸腺の絶対重量が有意に低値を示した。また，雄の 1046 μg/kg/日投与群において胸腺相対重量が有意に低値を示したが，これらの所見には一貫性がなく，関連する病理組織学的所見が認められなかったことから，毒性学的意義は乏しいと考えられた。

剖検でオロダテロール投与に関連した異常所見は認められなかった。1 例を除くすべての投与動物の肝臓において，小葉周辺性肝細胞に空胞化（あるいは希薄化）を特徴とする小葉周辺性グリコーゲン蓄積が認められた。また，一部の投与動物において，小葉周辺性にグリコーゲン蓄積を伴う軽微～軽度の肝細胞密度増加が認められた。これらは，4 週間の回復期間後には完全に回復していた。これら肝臓の所見は毒性を示すものではなく，β_2 刺激薬にみられる適応反応であると考えられた［CTD4.3-72_R12-1633，CTD4.3-23_P06-09474］。

NOAEL は 324 µg/kg/日と判断され，この用量での $C_{max,ss}$ 平均値（雄／雌）は 6470／5290 pM, $AUC_{0-24,ss}$ 平均値（雄／雌）は 24100／24700 pM·h であった。

表 8.6.2: 1　　幼若非げっ歯類を用いたオロダテロールの毒性試験

動物種 系統	投与方法 バッチ番号 製剤	一群の 動物数 (雄/雌)	投与量 Olo (μg/kg/日)[a,b]	投与期間	$C_{max,ss}$ [pM] Olo (雄/雌)	$AUC_{0-24,ss}$ [pM·h] Olo (雄/雌)	特記すべき所見	NOAEL Olo (μg/kg/日)	CTD 番号/ 社内資料 番号
イヌ／ ビーグル 投与開始時 14～18 日齢	吸入投与 口腔咽頭経路 10 又は 14 分間/日 Olo: 5061021 CTF	2/2 2/2 2/2 2/2	0 21.9 294 674	21 日間	- 541/729 5010/9180 25600/19800	- 3770/7730 26800/45400 97800/82400	674 μg/kg：心拍数↑，心収縮力↑，肝小葉周辺性グリコーゲン蓄積，体重増加量↓，毎分呼吸量↓	該当なし	CTD4.2.3.7.7-1_U[redacted]-1442
イヌ／ ビーグル 投与開始時 15～19 日齢	吸入投与 口腔咽頭経路 10 分間/日 Olo: 5061021 CTF	7/7 7/7 5/5 5/5 7/7	0 0 120 324 1046	投与期間： 13 週間 回復期間： 4 週間	- - 1430/1420 6470/5290 33200/31700	- - 6310/5940 24100/24700 82000/73900	溶媒対照群：早期死亡 2 例（偶発的） 全用量群：肝臓における小葉周辺性の肝細胞空胞化を特徴とする小葉周辺性グリコーゲン蓄積，小葉周辺性領域における軽微から軽度の細胞密度増加，完全に回復 120 μg/kg/日：体重増加量↑ 324 μg/kg/日：早期死亡 2 例（偶発的），体重増加量↑，MCH↓ 1046 μg/kg/日：投与中及び投与直後における一過性の心拍数増加及び心収縮力増大，鼻汁及び鼻からの雑音（投与前），体重増加量↓，MCH↓，胸腺及び精巣重量↓（雄）	324	CTD4.2.3.7.7-2_U[redacted]-1257

↑: 増加，↓: 減少　　-: 算出せず

a: 1 日平均到達用量は，McMahon 式による理論的 RMV を用いて計算した（CTD4.3-31_R97-0663）

b: 投与量は雌雄平均値で示した

8.7 併用投与試験

8.7.1 チオトロピウム，オロダテロール及びシクレソニド（開発コードE* ）のラットにおける 4 週間併用投与毒性試験［CTD4.2.3.7.7-3_U[redacted]-1530］

チオトロピウム，オロダテロール及びコルチコステロイドであるシクレソニド（開発コードE* ）を 1:1:29 の用量比でエタノール化エロゾルとして併用吸入投与し，毒性を評価した。1 群あたり雌雄各 10 例の Crl:WI(Han)ラットにチオトロピウム+オロダテロール+開発コードE* を 0（溶媒対照群），1.0+1.0+30，3.1+3.0+89 又は 9.9+9.8+280 µg/kg/日の用量で少なくとも 28 日間投与した（鼻経路，60 分／日）。対照群及び高用量群に雌雄各 10 例の動物を追加し，2 週間回復群とした。解析データに基づく MMAD 推定値はチオトロピウムが 1.36～1.57 µm，オロダテロールが 1.35～1.57 µm，開発コードE* が 1.32～1.57 µm の範囲であり，ラットにおいて吸入可能であると考えられた。投与開始時，動物は約 12～13 週齢，体重は雄 286～296 g，雌 203～213 g の範囲であった。

投与 1 及び 22 日目に，トキシコキネティクスにより，3 種の投与薬剤及び開発コードE* の活性代謝物 CD 1857 の十分な全身曝露が確認された。血漿中濃度のばらつきは軽度～中等度で，おおむねすべての投与薬剤において性差は認められなかった。曝露量はほぼ用量に比例して増加し，反復投与の影響も認められなかった。トキシコキネティクスパラメータを以下の表 8.7.1: 1 に示す。

表 8.7.1: 1 投与 22 日目におけるチオトロピウム，オロダテロール，開発コードE* 及び CD 1857 のトキシコキネティクスパラメータ（雌雄平均値）

	用量 Tio + Olo +開発コードF* （µg/kg/日）					
	1.0+1.0+30		3.1+3.0+89		9.9+9.8+280	
	Tio	Olo	Tio	Olo	Tio	Olo
$C_{max,ss}$ [pM]	53.7	54.4	158	195	660	452
$AUC_{0-24,ss}$ [pM·h]	69.5	133	663	1040	1840	2480
	開発コードE*	CD 1857	開発コードE*	CD 1857	開発コードE*	CD 1857
$C_{max,ss}$ [nM]	1.46	1.31	2.87	2.68	12.1	8.84
$AUC_{0-24,ss}$ [nM·h]	1.46	1.31	2.87	4.75	15.6	27.9

投与に関連した死亡は認められなかった。また一般症状観察でも毒性は認められなかった。散瞳は 3.1+3.0+89 及び 9.9+9.8+280 µg/kg/日群で認められたが，チオトロピウムの薬理作用に関連する変化とみなされた。体重及び摂餌量に投与による影響は認められなかった。

臨床検査では，血漿中コルチコステロン濃度が雌雄の 1.0+1.0+30 µg/kg/日群で増加，雄の 9.9+9.8+280 µg/kg/日群で減少したが，それ以外には投与に関連した毒性学的に意義のある変化は認められなかった。免疫学的検査では，脾臓及び胸腺からの単離細胞数の可逆性の減少が用量依存的に認められ，3.1+3.0+89 及び 9.9+9.8+280 µg/kg/日群では生物学的に意義があるとみなされた。さらに，これらの群では血中及び脾臓中ともにリンパ球の相対数が減少していた。脾臓におけるフェノタイプ及びナチュラルキラー細胞活性の変化は 2 週間の回復期間後にも回復しなかった。胸腺においては，9.9+9.8+280 µg/kg/日群で，胸腺細胞分化ステージが成熟からより未成熟なものへ可逆性にシフトし，3.1+3.0+89 及び 9.9+9.8+280 µg/kg/日群では IL-2 レセプター発現細胞数の減少が認められた。これらすべての変化は開発コードE* の薬力学的作用によるものとみなされた。

*：新薬承認情報提供時に置き換えた

剖検では，胸腺，脾臓，副腎及び腸間膜リンパ節の絶対及び相対重量の減少が 3.1+3.0+89（胸腺のみ）及び 9.9+9.8+280 µg/kg/日群で認められた。回復期間後，胸腺，脾臓及び副腎の変化は完全に回復したが，リンパ節の重量変化の回復は部分的であった。

投与期間終了時，投薬に関連する用量依存的な病理組織学的変化として，以下のような所見が認められた：角膜上皮の萎縮（≥1.0+1.0+30 µg/kg/日）；喉頭における扁平上皮化生，扁平上皮過形成及び限局性喉頭上皮変性及びびらん（≥3.1+3.0+89 µg/kg/日）；肺における泡沫細胞集簇（≥3.1+3.0+89 µg/kg/日）；胸腺，NALT，脾臓及び腸間膜リンパ節におけるリンパ球数減少（≥3.1+3.0+89 µg/kg/日）；脾臓における髄外造血減少（9.9+9.8+280 µg/kg/日）；副腎皮質束状帯の萎縮 (9.9+9.8+280 µg/kg/日)；膝関節成長板における一次海綿骨の減少 (≥3.1+3.0+89 µg/kg/日)。これらすべての変化は回復期間後完全にあるいは部分的に回復した。眼球及び喉頭における所見は吸入手技に関連したものと考えられたが，それを除くと，他のすべての組織変化は開発コードE* 及びその活性代謝物の薬理作用に直接的あるいは二次的に関連するものと考えられた［CTD4.3-34_R07-2327］。

以上より，チオトロピウム+オロダテロール+開発コードE* を併用投与したときの NOAEL は 1.0+1.0+30 µg/kg/日 と判断され，22 日目における $C_{max,ss}$ はそれぞれ 53.7 pM + 54.4 pM +1.46 nM, $AUC_{0-24,ss}$ は 69.5 pM·h + 133 pM·h +1.46 nM·h であった。

8.7.2 チオトロピウム，オロダテロール及びシクレソニド（開発コードE* ）のイヌにおける 4 週間併用投与毒性試験［CTD4.2.3.7.7-4_ U[redacted]-2354］

チオトロピウム，オロダテロール及び開発コードE* の配合剤を 1:1:29 の用量比でエタノール化エロゾルとして吸入投与し，毒性を評価した。1 群あたり雌雄各 3 例のビーグル犬にチオトロピウム+オロダテロール+開発コードE* を 0（溶媒対照群），2.1+2.0+59，5.1+5.1+150 又は 16+16+460 µg/kg/日の用量で口腔咽頭チューブを装着した閉鎖性フェイスマスクを用い，1 日当たり 10 分間で少なくとも 28 日間投与した。対照群及び高用量群に雌雄各 2 例の動物を追加し，2 週間回復群とした。解析データに基づく MMAD 推定値はチオトロピウムが 2.12～2.17 µm，オロダテロールが 2.11～2.18 µm，開発コードE* が 2.11～2.17 µm の範囲であり，イヌにおいて吸入可能であると考えられた投与開始時，動物は 6～7 カ月齢，体重は雄 6.6～9.6 kg，雌 5.2～7.4 kg の範囲であった。

1 及び 24 日目に，トキシコキネティクスにより，3 種の投与薬剤及び CD 1857 とも十分な全身曝露が確認された。曝露量はすべての投与薬剤でほぼ用量に比例して増加した。全体的に血漿中濃度のばらつきは中等度あった。すべての投与薬剤において性差及び反復投与の影響は認められなかった。24 日目の主なトキシコキネティクスパラメータを以下の表 8.7.2: 1 に示す。

表 8.7.2: 1 投与 24 日目におけるチオトロピウム，オロダテロール，開発コードE* 及び CD 1857 のトキシコキネティクスパラメータ（雌雄平均値）

	用量 Tio + Olo +開発コードE* （µg/kg/日）					
	2.1+2.0+59		5.1+5.1+150		16+16+460	
	Tio	Olo	Tio	Olo	Tio	Olo
$C_{max,ss}$ [pM]	86.1	33.5	428	77.7	969	241
$AUC_{0-24,ss}$ [pM·h]	84.7	29.9	617	477	2000	1640
	開発コードE*	CD 1857	開発コードE*	CD 1857	開発コードE*	CD 1857

*：新薬承認情報提供時に置き換えた

$C_{max,ss}$ [nM]	3.30	1.10	10.5	3.97	27.2	7.95
$AUC_{0-24,ss}$ [nM·h]	1.21	1.11	4.39	6.37	15.6	17.2

チオトロピウム+オロダテロール+開発コードE* 配合剤は，局所及び全身性ともに忍容性は良好であった。試験中死亡はみられなかった。溶媒対照群を含むすべての群で流涎が顕著に認められ，エタノール曝露に起因するものと考えられた。吸入投与終了時の一般状態の変化として，心拍動の増大，心拍数増加，口粘膜乾燥あるいは鼻の乾燥がみられた。これらの変化はおおむね軽度で，投与期間終了後は回復した。16+16+460 µg/kg/日群では摂餌量の軽度の減少を伴って体重がわずかに減少した。これはチオトロピウム投与によって唾液分泌が減少し，乾燥餌の咀嚼及び嚥下が困難になったことによる二次的な影響と考えられた。

臨床検査では ACTH 刺激試験において投薬に関連する変化が認められた。すなわち雄の 16+16+460 µg/kg/日群と雌の 5.1+5.1+150 及び 16+16+460 µg/kg/日群で ACTH 刺激後のコルチゾール上昇程度が低かった。この変化は休薬後完全に回復した。

投与 22 日目に行った心血管系検査では，16+16+460 µg/kg/日群のみで投与前及び投与直後に中等度の心拍数増加が認められ，PR 及び QT 間隔の短縮を伴っていた。これらの変化に関連する QT，QTcSE 又は QTcF 延長，QRS 波の幅，血圧における影響はみられなかった。

副腎重量の減少，軽微の副腎皮質束状帯及び網状帯の萎縮が 16+16+460 µg/kg/日群で認められたが，程度が非常に軽かったことと，回復傾向が認められたことから，毒性とはみなされなかった。前立腺重量の減少及び軽度から中等度の前立腺の小型化がすべての雄の被験物質投与群で認められ，組織学的には上皮丈がび漫性に低下していた。チオトロピウム+オロダテロールの 2 剤併用 4 週間吸入投与毒性試験［第 3.2.1.6 項］では，より高用量のチオトロピウム+オロダテロールを投与したにもかかわらず，前立腺における変化は認められていない。また，副腎皮質ステロイドが精巣/前立腺において重量減少，前立腺上皮増殖抑制を惹起することが報告されていることから［CTD 4.3-82_R15-2075，CTD 4.3-83_R15-2412，CTD 4.3-84_R15-2493］，前立腺における変化は 開発コードE* 及びその活性代謝物の薬理作用に直接的あるいは二次的に関連するものと考えられた。

以上の結果から，チオトロピウム+オロダテロール+開発コードE* を併用投与したときの NOAEL は 16+16+460 µg/kg/日と判断され，24 日目における $C_{max,ss}$ はそれぞれ 969 pM +241 pM + 27.2 nM，$AUC_{0-24,ss}$ は 2000 pM·h + 1640 pM·h + 15.6 nM·h であった。

8.8 不純物，分解生成物及び包装材料

8.8.1 原薬

チオトロピウム臭化物水和物の不純物に関する規格を表 8.8.1: 1 に示す。ICH ガイドライン Q3A（R2）に基づき［CTD4.3-75_R13-5384］，原薬中のチオトロピウムの不純物に関して安全性を確認する必要はないと考えられた。

*：新薬承認情報提供時に置き換えた

表 8.8.1: 1　　チオトロピウム臭化物水和物の不純物に関する規格案*

不純物	規格
分解生成物J*	≤ [redacted]%
不純物K*	≤ [redacted]%
分解生成物L*	≤ [redacted]%
分解生成物M*	≤ [redacted]%
分解生成物N*	≤ [redacted]%
個別規格を設定していないすべての不純物	≤ [redacted]%
不純物総量	≤ [redacted]%

*　本化合物が承認された各国の規格で最も広範な規格を示す

オロダテロール塩酸塩の不純物に関する規格を表 8.8.1: 2 に示す。ICH ガイドライン Q3A（R2）に基づき［CTD4.3-75_R13-5384］，原薬中のオロダテロールの不純物に関して安全性を確認する必要はないと考えられた。

表 8.8.1: 2　　オロダテロール塩酸塩の不純物に関する規格*

不純物	規格
不純物A*	≤ [redacted]%
不純物B*	≤ [redacted]%
不純物C*	≤ [redacted]%
個別に規格設定されていないすべての不純物	≤ [redacted]%
不純物総量	≤ [redacted]%

*　最も広範な申請規格案を示す

チオトロピウム臭化物水和物及びオロダテロール塩酸塩の合成に関連する，出発物質，存在する不純物及び存在する可能性のある不純物，並びに出発物質の反応副生成物などの化学構造評価を実施した。この結果，TTC［CTD4.3-48_R09-1530，CTD4.3-73_R13-1273］である 1.5 μg/日未満に制限する必要がある既知遺伝毒性物質／毒性物質（例えば，アフラトキシン様化合物，*N*-ニトロソ化合物，アゾキシ化合物など）が生成される可能性はないと結論された。

チオトロピウム臭化物水和物及びオロダテロール塩酸塩の合成過程及びヒト推奨臨床用量が 1 日量 5+5 μg と微量であることを考慮すると，TTC を超える量の不純物が混入する可能性はない。原薬不純物が TTC を超えるためには，1 日量の 30%を超える量で存在している必要があるが，これは，現在の原薬規格を大幅に超える値である。両原薬の合成過程におけるすべての不純物同様，存在する可能性のある遺伝毒性不純物は TTC をはるかに下回るレベルに管理されるので，患者に毒性学的懸念が生じることはないと考えられる。

*：新薬承認情報提供時に置き換えた

8.8.2 製剤

チオトロピウム+オロダテロール配合剤において，有効成分は [redacted] として BAC（[redacted] mg/mL），[redacted] として Na-EDTA（[redacted] mg/mL）及び [redacted] [redacted] として塩酸を含有する水溶液で溶解する。これらの添加物の毒性学的懸念はないと考えられる。

8.8.2.1 有効成分分解生成物

チオトロピウム+オロダテロール配合剤中の分解生成物に関する申請規格案を表 8.7.2.1: 1 に示す。ICH ガイドライン Q3B（R2）に従って［CTD4.3-76_R13-5385］，分解生成物H* 及び分解生成物I* は毒性学的に安全性を確認すべきと判断した。（詳細は SRA HH の概要を参照：SRA HH 承認時申請資料ニ-47）

表 8.8.2.1: 1 チオトロピウム+オロダテロール配合剤の分解生成物に関する申請規格案*

チオトロピウム	分解生成物	規格
	分解生成物H*（[redacted]）	≤ [redacted] %
	分解生成物O*	≤ [redacted] %
	分解生成物I*	≤ [redacted] %
	分解生成物P*	≤ [redacted] %
	分解生成物総量	≤ [redacted] %
オロダテロール	分解生成物	規格
	不純物A*	≤ [redacted] %
	分解生成物D*	≤ [redacted] %
	個別規格を設定していないすべての分解生成物	≤ [redacted] %
	分解生成物総量	≤ [redacted] %

* 本剤を申請する各国の規格で最も広範な申請規格案を示す

分解生成物H*（標準物質Q* として調製）は，1 プレート当たり 5000 µg まで Ames 試験陰性であり［CTD4.2.3.7.6-1_U[redacted]-0074］，マウスにおける小核試験において最大耐量である 1000 mg/kg まで静脈内投与しても小核を誘発しなかった［CTD4.2.3.7.6-2_ U[redacted]-1478］。また，ラットにおける 4 週間投与試験［CTD4.2.3.7.6-3_U[redacted]-1104］と併せて行ったラット小核試験でも陰性であった［CTD4.2.3.7.6-4_U[redacted]-1565］。ラットにおいて 0.625 µg/kg/日の用量（チオトロピウムに添加）で 4 週間［CTD4.2.3.7.6-3_U[redacted]-1104］及び 13 週間吸入試験［CTD4.2.3.7.6-5_U[redacted]-1175］を行った結果，チオトロピウムそのものによる変化以外には影響は認められなかった。

分解生成物I* は 1 プレート当たり 5000 µg まで Ames 試験陰性であった［CTD4.2.3.7.6-1_U[redacted]-0074］。また，ラットにおける 4 週間投与試験［CTD4.2.3.7.6-3_U[redacted]-1104］と併せて行ったラット小核試験でも陰性であった［CTD4.2.3.7.6-4_U[redacted]-1565］。ラットにおいて 0.625 µg/kg/日の用量（チオトロピウムに添加）で 4 週間［CTD4.2.3.7.6-3_U[redacted]-1104］及び 13 週間吸入試験［CTD4.2.3.7.6-5_U[redacted]-1175］を行い，さらにラットにおいて分解生成物I* 単体として 1.58 µg/kg/日の用量で 13 週間吸入毒性試験［CTD4.2.3.7.6-6_U[redacted]-2102］を実施した結果，毒性は観察されなかった。

*：新薬承認情報提供時に置き換えた

8.8.2.2 添加物

ラット［CTD4.2.3.7.6-7_U[redacted]-2224］及びイヌ［CTD4.2.3.7.6-8_U[redacted]-2076］を用いた 2 週間反復投与毒性試験において，BAC 及び Na-EDTA を含有するレスピマット用溶媒対照群と空気対照群とを比較した。その結果，一般状態，血液学的検査，血液生化学的検査，剖検，器官重量及び病理組織学的検査において， これら溶媒対照群と空気対照群間に差はないことが明らかになった。

ラットにおいて，チオトロピウム+オロダテロール配合剤の溶媒に含まれる BAC 及び Na-EDTA の毒性を評価した［CTD4.2.3.7.6-9_U[redacted]-1186］。ラットに BAC 及び Na-EDTA を含有する水性エロゾル噴霧剤を 1 日最長 120 分間，連続 91 日間にわたり鼻経路で吸入投与した。検討した *in vivo* パラメータに群間差は認められなかった。これらの製剤を投与したほとんどすべての動物の喉頭に限局性扁平上皮化生が認められ，BAC を含む製剤を投与した動物の鼻腔粘膜に杯細胞過形成が認められた。げっ歯類における喉頭扁平上皮化生は，げっ歯類に特異的な所見であると考えられている［CTD4.3-37_R04-4389，CTD4.3-45_R08-2391］。さらに，口腔から吸入される薬物によって誘発される鼻腔病変は，通常，安全上問題にはならないと考えられる。また，ラットを用いた長期投与試験において，[redacted]% BAC を鼻経路で 1 日 60 分間，2 年間にわたり曝露しても，鼻腔及び肺に対する影響はないことが確認されている［CTD4.2.3.7.6-10_U[redacted]-2727］。この場合にも，喉頭に非常に軽度の扁平上皮化生が認められたが，ヒトにとって問題となる所見ではないと考えられる。

イヌ 13 週間試験において［CTD4.2.3.7.6-11_U[redacted]-2570］，レスピマットの溶媒（[redacted] mg/100 mL BAC，[redacted] mg/100 mL Na-EDTA，0.1N HCl[redacted]）のみを投与しても，一般状態，体重，血液学的検査及び血液生化学的検査に対する影響は認められなかった。また，呼吸器系を含めて，剖検及び病理組織学的検査でも変化は認められなかった。

BAC 及び Na-EDTA の安全性については，2 報の研究論文で詳しく述べられている［CTD4.3-30_R97-0079，CTD4.3-33_R03-2624］。これらの研究論文において，チオトロピウム+オロダテロール配合剤で使用されている[redacted]% BAC を[redacted] µL 吸入したときと同等，又は 10 倍の用量での BAC の安全性が確認されている。すなわち，ラットに有効濃度[redacted]%の BAC を 14 週間吸入投与しても，剖検及び病理組織学的検査で異常所見は認められていない［CTD4.3-30_R97-0079］。Na-EDTA の毒性は非常に低く［CTD4.3-33_R03-2624］，ヒト及びラット試験において，Na-EDTA を経口投与したときの吸収率も低いことが報告されている。げっ歯類及び非げっ歯類で一般毒性作用が誘発される最低用量は 750 mg/kg/日であり，この用量は患者に投与される 1 日量（[redacted] µg/日，約[redacted] µg/kg/日に相当）に比べて約 6 桁高い用量である。マウス及びラットに単回経口投与したときの LD_{50} 値は，ヒト 1 日量に比べてそれぞれ約 5 桁及び 6 桁高い。Na-EDTA は微生物を用いた試験系において弱い変異原性物質に分類されるとともに，非刺激性物質である。ラットに Na-EDTA を経口投与したとき，>325 mg/kg/日（推奨臨床用量に比べて約 4 桁高用量）で奇形が誘発された。FDA の化粧品成分審査委員会は，エロゾル化化粧品製剤（1 回の噴霧使用時に 1 回呼吸）において，用量 1.24×10^{-4} mg/kg（0.124 µg/kg）に相当する濃度を許容している［CTD4.3-33_R03-2624］。また，FDA 及び WHO はいずれも，経口投与による ADI を 2.5 mg/ヒトに設定している。

毒性試験における溶媒曝露期間は，患者における曝露期間とは大きく異なる。患者では，チオトロピウム+オロダテロール配合剤の 2 回の噴霧で送達液量は [redacted] µL である。この送達液量 [redacted] µL は 1 日量として，BAC [redacted] µg 及び Na-EDTA [redacted] µg に相当する（体重 50 kg のヒトでそれぞれ [redacted] µg/kg に相当）。ラットがん原性試験では［CTD4.2.3.7.6-10_U[redacted]-2727］，1 日 1 回 60 分間，2 年間にわたり曝露が行われた。このように長期間にわたり曝露したにもかかわらず，気管，気管支及び肺に溶媒に起因する病変は生じなかったことから，[redacted] として BAC を添加しても患者にリスクは生じないことが示される。なお，げっ歯類における喉頭扁平上皮化生はげっ歯類に特異的な所見であると考えられている［CTD4.3-37_R04-4389，CTD4.3-45_R08-2391］。

以上のように，チオトロピウム+オロダテロール・レスピマット配合剤は 2 回の噴霧で，1 日量として約 [redacted] µg の BAC 及び [redacted] µg の Na-EDTA が投与されるが，これらの用量は毒性学的に問題とならないと考えられた。

8.8.2.3 異物

チオトロピウム+オロダテロール配合剤には少数の微粒子（カートリッジ内の製剤 4 mL 中に粒径 1.5～10 µm の粒子 2900 個以下，10～25 µm の粒子 500 個以下，25～150 µm の粒子 60 個以下）が含まれている可能性があり，チオトロピウム+オロダテロール配合剤の 2 回の噴霧で，これらの粒子が最大 1 日に 19 個患者に投与される可能性がある。元素分析により，元素 C，H，O 及び Si から構成される粒子が明らかになり，一次包装材料である[redacted]，[redacted]及び[redacted]から生じた可能性が高いことが示されている。大気中から 1 日当たりに吸入される粒子数が何百万に達することを考慮すると，この吸入粒子数は非常に少ないことから毒性学的に意味はないと考えられた。

8.8.2.4 カートリッジ及びレスピマットの構成

カートリッジ

チオトロピウム+オロダテロール配合剤のカートリッジは吸入液が充填された容器である。このカートリッジは，[redacted]で密封された[redacted]製容器[redacted]，[redacted]（[redacted]）及び[redacted]を覆う[redacted]から構成されている。吸入液に直接接触するチオトロピウム+オロダテロール配合剤のカートリッジの構成は，一次包装として以下の表 8.8.2.4: 1 に示すとおりである。

表 8.8.2.4: 1 吸入液に直接接触するチオトロピウム+オロダテロール配合剤のカートリッジの構成

構成要素	材料	商品名など
[redacted]		

供給業者の試験成績書によると，一次包装材料はすべて，米国連邦規則集第 21 条の間接食品添加物規則及び BSE/TSE 規則，欧州薬局方の各モノグラフ，並びに欧州委員会規則 10/2011 に適合しており，それ自体，一次包装材料としての使用に適していると考えられる［CTD 3.2.P.2-2］。

FDA の「Guidance for Industry: Nasal Spray and Inhalation Solution, Suspension and Spray Drug Products, 2002」［CTD4.3-38_R05-0225］に従って，すべての一次包装材料について，容器構成成分の抽出試験を実施した。これらの試験から，許容されている[redacted] 例えば，[redacted]），添加剤に起因する[redacted]及び[redacted]（例えば，[redacted]，[redacted]）の存在が明らかになった。これらの化合物について，PQRI の「Best practices for extractables and leachables in orally inhaled and nasal drug products」の概念と照らし合わせて評価した結果［CTD4.3-25_P08-08164］，カートリッジの一次包装材料に由来する浸出物は特定されなかった。

以上より，カートリッジの一次包装材料から毒性学的に問題となる物質が放出することはないと考えられた。

レスピマットの構成

レスピマットの構成及びその成分を表 8.8.2.4: 2 に示す。

表 8.8.2.4: 2　　チオトロピウム+オロダテロール配合剤のレスピマットの構成

構成要素	材料	商品名など
一次（製品接触）要素：		
[redacted]		
一次（口腔接触）要素：		
[redacted]		

供給業者の試験成績書によると，構成成分はすべて，米国連邦規則集第 21 条の間接食品添加物規則及び BSE/TSE 規則，並びに欧州薬局方の各モノグラフに適合しており，それ自体，構成成分としての使用に適していると考えられる［CTD 3.2.P.2-3］。

FDA の「Guidance for Industry: Nasal Spray and Inhalation Solution, Suspension and Spray Products, 2002」に従って［CTD4.3-38_R05-0225］，すべてのレスピマット構成成分及びマウスピース（ケース上部）について，抽出試験を実施した。水抽出試験において，抽出物は検出されなかった。すべての溶出物について，定量限界は 10 µg/g 構成成分と見込まれた。これらの定量限界値は十分

に低く，定量限界未満の濃度で存在する材料は毒性学的に問題にならないと考えられる［CTD 3.2.P.2-3］。例えば，最も重い構成成分は重さ[redacted] g の[redacted]であるが，その約[redacted]%（[redacted] mg）のみが吸入液と接触すると仮定すると，10 µg/g 構成成分は 1 日摂取量[redacted] µg に相当する。これはすべての浸出物が製剤（充填容量[redacted] mL）中に溶解し，1 日投与量が[redacted] µL であると仮定したときの値である。さらに，使用期間中の吸入液とレスピマットの構成成分の適合性についても，3 カ月間使用を想定した安定性試験にて確認されている。［第 3.2.P.8.3 項］.

マウスピース（ケース上部）は灰色の[redacted]である。レスピマットの口腔接触部分から患者の喀痰中に移行する物質も「浸出物」と判断される。吸入時，レスピマットのケース上部（マウスピース）の一部は患者の口腔粘膜と数秒間にわたり接触する。この接触を再現するため，浸出物試験を実施し，ケース上部を[redacted]°C の水に[redacted] 時間にわたり浸漬した。その結果，ケース上部の試料液中に，極微量の[redacted]が検出されたのみであった。材料は FDA の連邦規則集第 21 条，第 178.3297 項「colorants for polymers」, USP＜87＞, USP＜88＞, 欧州薬局方の関連モノグラフ, 並びに欧州委員会規則 10/2011 の要件を満たしており，検出可能な毒性学的リスクをもたらすことはないと考えられる。これらのデータに基づいて, チオトロピウム+オロダテロール配合剤のレスピマットを所定の方法で使用した時，マウスピースから毒性学的に問題となる濃度の物質が放出することはないと結論された［CTD3.2.P.2-3］。

9. 安全域

表 9: 1 にイヌにおける 13 週間毒性試験（用量比 1 : 1）から得られた NOAEL 値と臨床用量で得られた $C_{max,ss}$ 及び $AUC_{0-24,ss}$ を併せて示した。イヌにおける 13 週間毒性試験（用量比 1 : 1）から得られた NOAEL 値における曝露量はヒトの臨床用量における全身曝露量を大幅に上回っていた。

表 9: 1 イヌ 13 週間毒性試験（用量比 1 : 1）における NOAEL とヒトの推奨臨床用量（チオトロピウム+オロダテロール：5+5 µg／日）投与時の $C_{max,ss}$ 及び $AUC_{0-24,ss}$ の比較とそれぞれの安全域

イヌ（CTD4.2.3.2-18_U[redacted]-2249）	13 週間 チオトロピウム +オロダテロール	安全域 チオトロピウム ／オロダテロール
NOAEL (µg/kg/日)	14 + 16	
$C_{max,ss}$ (pM)	2210 + 320	**62 / 28**
$AUC_{0-24,ss}$ (pM·h)	3170 + 2380	**18 / 28**
ヒト （CTD5.3.5.1-9_U09-1588, CTD5.3.5.1-15_U13-1917）	6 週間	
用量 (µg/日)	5 + 5	
$C_{max,ss}$ (pM)[a]	35.4 + 11.4	
$AUC_{0-24,ss}$ (pM·h)[a]	177 + 85.9	

[a] 報告書では濃度は pg/mL で記載されている。この表ではチオトロピウム 392.5 g/mol, オロダテロール 386.5 g/mol の分子量を基に分子量濃度として示した。

10. 考察及び結論

オロダテロール及びチオトロピウム+オロダテロールの毒性プロファイルについて，以下にそれぞれ考察する。

オロダテロールの毒性については，マウス及びラットを用いた単回投与毒性試験，ウサギ及びラットを用いた局所刺激性試験，ラット及びイヌを用いた用量設定試験，ラット及びイヌを用いた 2 週間経口及び静脈内投与毒性試験，マウス（13 週間），ラット（4，13，26 週間）及びイヌ（4，13，52 週間）を用いた反復吸入投与毒性試験，幼若イヌを用いた用量設定試験及び 13 週間投与試験，ラット及びウサギを用いた吸入投与生殖発生毒性試験，マウス及びラットを用いた 104 週間吸入投与がん原性試験並びに *in vitro* 及び *in vivo* 遺伝毒性試験を実施して検討した。

トキシコキネティクスにより，各毒性試験において高濃度の全身性オロダテロール曝露が確認された。

マウス及びラットにおけるオロダテロールの吸入投与急性毒性は弱かった。毒性用量において，オロダテロールの β_2 刺激作用に特徴的かつ非特異的な毒性所見が誘発された。

すべての動物種において，毒性学的プロファイルに明らかな用量依存性が認められ，オロダテロールの全身性 β_2 刺激作用に特徴的な所見，特に同化作用及び心血管系作用が誘発された。これらは特に，反復投与毒性試験及びがん原性試験で顕著であった。

オロダテロールの吸入投与は 2 種類の経路，すなわち，マウス，ラット及びウサギでは鼻経路，イヌでは口腔咽頭経路により実施した。イヌの口腔咽頭経路投与試験では，予定されているヒトでの投与経路及び最初の曝露部位について評価できた。さらに，イヌは β_2 刺激薬及びその薬理作用に関連する作用に対して最も感受性の高い動物種であるため，イヌ吸入投与毒性試験では，ラット試験に比べて，ヒトへの外挿にあたり信頼性の高い結果が得られたと考えられる。

すべてのげっ歯類におけるオロダテロールの反復吸入投与毒性試験では投与局所である喉頭上皮の変化が認められた。近年，吸入投与毒性試験で認められる‘喉頭扁平上皮化生’は‘上皮の変化’として用語が統一され，被験物質にかかわらず‘毒性ではない’とする統一見解が公表された［CTD4.3-50_R09-6371］が，オロダテロール開発当初のマウス及びラットにおける試験では喉頭上皮の変化を重篤度及び頻度に基づき毒性所見と判断しNOAELを決定しているものもある。この投与局所の変化以外で，オロダテロールの最も高い用量まで，最も長期間投与した 26 週間試験において［CTD4.2.3.2-6_U[redacted]-1691］誘発された主な変化は，体重増加，骨格筋の肥大及び変性性病変，心臓肥大，白色脂肪組織の減少によって代表される同化作用，及び肝臓におけるグリコーゲン蓄積の変化，雌生殖器官に対する影響（3400 µg/kg/日投与群：子宮拡張及び黄体嚢胞（黄体化卵胞）の発現率／重症度のわずかな上昇，並びに黄体出血）など，過度の薬理作用に起因するものであった。これらの変化はすべて，β2 刺激薬で既知の特徴的な影響であり，クラス効果であると考えられた［CTD4.3-17_P89-3120，CTD4.3-19_P92-68423，CTD4.3-22_P04-08784］。

イヌを用いた試験では，検討した用量（2.2～330 µg/kg/日）において，β_2 刺激薬の影響，特に心血管系作用が全く認められない用量はなかった。4 週間試験では， 2.2 µg/kg/日でも心拍数が軽微に増加し，体重が軽度に増加した。イヌ 52 週間試験における NOAEL は 15 µg/kg/ 日と判断され，この用量での $C_{max,ss}$ 平均値は 402 pM，$AUC_{0-24,ss}$ 平均値は 2860 pM·h であった。52 週間試験にお

いて，60 及び 330 μg/kg/日投与群の 2 日目のみに，心室性期外収縮及び心室性頻拍が認められた。不整脈は β_2 刺激薬のクラス効果であることが知られており［CTD4.3-32_R03-2623］，オロダテロールの薬理作用機序と関連した変化と考えられた。この所見は，病理組織学的検査で心筋に限局性線維化が認められた用量のみで確認された。この試験における不整脈の発現率は低く，病理組織学的検査で心臓に明らかな変化が認められた高用量群で散発的に認められただけであったことから，推奨臨床用量 5 μg/ヒトのオロダテロールを投与したときに催不整脈リスクが上昇する可能性は低いと考えられた。60 μg/kg/日以上の用量で認められた前立腺の多発性萎縮は，臨床的には問題にならないと考えられる。ラットを用いた受胎能及び初期胚発生に関する試験においても，3068μg/kg/日まで受胎能に対する影響は認められていない。また，本試験では投与局所における毒性はみられず，局所毒性に関する NOAEL は 330 μg/kg/ 日と判断された。

Ames 試験及びマウスリンフォーマ試験（代謝活性化系存在下及び非存在下）において，細菌／細胞毒性を示す濃度まで，陰性結果が得られた。4 週間吸入投与毒性試験で実施したラット骨髄小核試験でも，陰性結果が得られた。オロダテロールを静脈内投与（10 及び 40 mg/kg）したラット骨髄小核追加試験では，小核を有する PCE が，軽度で用量相関性はないものの，統計学的に有意に増加した。この所見は，薬理作用が過剰に発現した結果生じる二次的な低酸素症，そして，引き続いて生じるエリスロポエチン遊離及び赤血球造血亢進に起因するものと考えられた［CTD4.2.3.3.2-2_U[redacted]-1845，CTD4.3-39_R08-2329，CTD4.3-40_R08-2330，CTD4.3-41_R08-2331，CTD4.3-42_R08-2388，CTD4.3-43_R08-2389，CTD4.3-44_R08-2390，CTD4.3-53_R10-2698，CTD4.3-54_R10-2699］。これらの成績及び一連の遺伝毒性試験で得られた陰性結果から総合的に判断して，オロダテロールに遺伝毒性はないと結論付けられた。静脈内投与により小核試験陽性を示した最低用量である 10 mg/kg 投与時の C_{max} 及び AUC_{0-24} は 3490000 pM 及び 8770000 pM·h でヒトにおける臨床推奨用量であるチオトロピウム+オロダテロール 5+5 μg 投与時のオロダテロールの C_{max} 及び AUC_{0-24} と比較したときの曝露量比はそれぞれ 306140 倍及び 102095 倍であった。一方，小核試験陰性を示したオロダテロール 4 週間吸入毒性試験［CTD4.2.3.2-4_U[redacted]-213］における最高用量の 1360 μg/kg/日投与時の C_{max} 及び AUC_{0-24} の雌雄平均値は 102000 pM 及び 170000 pM·h で，ヒトにおける臨床推奨用量であるチオトロピウム+オロダテロール 5+5 μg 投与時のオロダテロールの C_{max} 及び AUC_{0-24} と比較したときの曝露量比はそれぞれ 8947 倍及び 1979 倍であった。このように，小核試験陽性結果については安全域が非常に広いことから，ラット静脈内投与小核試験における曝露量がヒトで再現されることはないと考えられる。さらに小核陽性細胞の増加がオロダテロールの直接的な遺伝毒性によるものではなく，高用量投与時の過剰な薬理作用に起因する赤血球産生亢進によるものであることを考えると，オロダテロールの臨床用量においてヒトの患者における遺伝毒性のリスクはないものと考えられた。

ラットを用いた吸入投与による受胎能及び初期胚発生試験において， 3068 μg/kg/日まで発情周期，交配，受胎能及び妊娠成績に対する影響は認められなかった。この試験で血漿中濃度は $C_{0\,583}$ のみしか測定しなかったが，他の試験で得られたデータに基づく解析結果より全身曝露量を算出し（第 12 項　付録参照），受胎能・初期胚発生・交配に関する NOAEL（3068 μg/kg/日）における AUC は 312335～387972 pM·h と算出された。

ラット及びウサギを用いて，オロダテロールの胚・胎児発生に対する影響を評価した。両試験において，いずれの用量についても，母体毒性は認められなかった。ラットにおいて，222 及び 1054 μg/kg/日投与群で個別異常症例が認められたが，これらの変化はすべて背景対照値の範囲内であり，オロダテロール投与と無関係であると考えられた。この試験では，222 μg/kg/日のみサテライト群を設けて血漿中濃度を測定したが，オロダテロールのトキシコキネティクスはほぼ線形性を示すことから（薬物動態試験の概要文［CTD 2.6.4］），1054 μg/kg/日（母動物毒性及び胚・胎児性に関する NOAEL）における $AUC_{0\text{-}24}$ は 367436 pM·h と算出された（第 12 項　付録参照）。ウサギにおいて，非常に高用量である 2489 μg/kg/日投与群で，主に母動物 2 例由来の同腹児で，骨化異常，口蓋裂，心血管系異常などの奇形発現率が上昇した。他の β_2 刺激薬でも胎児毒性作用が認められている（そのため妊娠カテゴリーC に分類されている）ことを考慮するとともに，患者の安全性確保のために保守的な評価法をとって，ウサギの母動物毒性に関する NOAEL は 2489 μg/kg/日（$AUC_{0\text{-}24}$ 平均値：959000 pM·h），胚・胎児毒性に関する NOAEL は 974 μg/kg/日（$AUC_{0\text{-}24,ss}$ 平均値：182000 pM·h）と判断した。特筆すべきこととして，β_2 刺激薬は汎用されているにもかかわらず，動物で認められた胎児毒性作用でヒトにおいて問題となるものは確認されていない。

ラットを用いた吸入投与による出生前及び出生後発生試験において，3665 μg/kg/日まで，交配，受胎能及び正常妊娠の成立（妊娠 14，15 又は 16 日まで着床後生存胚の数が正常に維持される）の点からの生殖成績など，発生段階に対する影響は認められなかった。

マウス及びラットのがん原性試験において，クラス効果によるげっ歯類に特異的な腫瘍がみられたが，投与に関連したその他の腫瘍発生は認められなかった。げっ歯類及びヒトにおける文献に基づくとげっ歯類で認められたこれらの腫瘍はヒトにとって意義はなく，オロダテロールに伴うヒト発がんリスクを示唆するものではないと結論された［CTD4.3-28_R96-3645，CTD4.3-51_R10-1209］。

マウスにオロダテロール（26.1，76.9 又は 255 μg/kg/日）を 104 週間吸入投与しても総死亡率に対する影響はなかった。雌雄両方において，オロダテロール投与に関連して体重が増加した。マウス及びラットにおける反復投与試験同様，体重，摂餌量及び骨格筋量に対するこれらの影響は，β_2 刺激薬でよく知られている同化作用によるものであった［CTD4.3-19_P92-68423］。

すべてのオロダテロール投与群で，子宮平滑筋腫及び平滑筋肉腫の発現率が背景対照値以上に上昇した。マウスにおける子宮平滑筋腫及び平滑筋肉腫の発現率の用量依存的上昇は，ホルモテロール［CTD4.3-62_R12-0102，CTD4.3-67_R12-0264］及びサルメテロール［CTD4.3-47_R09-0144］でも報告されている。これらの腫瘍は，β 遮断薬を同時に投与することで発生が抑制される［CTD4.3-49_R09-6151，CTD4.3-18_P90-0579］。

また，76.9 及び 255 μg/kg/日投与群の卵巣において，限局性性索／間質過形成の発現率が上昇，255 μg/kg/日投与群で限局性黄体過形成の発現率が上昇，すべてのオロダテロール投与群で加齢に伴う自然発生的な膣萎縮の発現率が低下した。雌の生殖器で認められたこれらの非腫瘍性所見は，オロダテロールを含む β_2 刺激薬に対するげっ歯類に特異的な反応であり，ヒトに対する毒性学的意義はないと考えられた［CTD4.3-62_R12-0102］。このことを裏付けるデータとして，β_2 アドレ

ナリン受容体刺激によってプロゲステロンの産生が亢進し，性腺刺激ホルモンの作用が増強されることが報告されており［CTD4.3-61_R12-0099，CTD4.3-64_R12-0188］，オロダテロールの β_2 刺激作用と卵巣性索／間質過形成及び膣萎縮抑制の間に因果関係があることを示している。ヒト卵巣に対する β_2 刺激作用については，刺激作用［CTD4.3-64_R12-0188］又は影響なし［CTD4.3-63_R12-0104］など，様々な結果が報告されている。

マウスにおいて，26.1 μg/kg/日投与群の雄，並びに 76.9 及び 255 μg/kg/日投与群の雌雄で，心筋線維化及び空胞化の発現率が上昇した。これらは加齢による心筋の変性過程を示す代表的所見であり，慢性進行性心筋症とも呼ばれる。空胞化は変性が進行している状態を，線維化は末期病変を示唆する。持続的なアドレナリン刺激のため心臓の負荷が高くなり，長期的な影響の結果として，心筋壊死及び心筋病変が増加することはよく知られた知見である［CTD4.3-62_R12-0102］。オロダテロールの過度の β_2 刺激作用により，255 μg/kg/日投与群の雄で心外膜線維化の発現率も上昇した。雄マウスにおいて，低い発現率で左心房内血栓が認められ，76.9 μg/kg/日投与群で最高10%に達した。これらの発現率は，毒性試験実施施設の背景対照値（平均 2%，範囲 0～4%）を上回っていた。しかし，同じ系統のマウスに関する文献では，同程度の発現率が報告されており（平均 4.8%，範囲 0～18%，［CTD4.3-68_R12-0291］），さらに，BALB/c マウスでは 50%を超える発現率が報告されている［CTD4.3-70_R12-0364］。β_2 アドレナリン受容体を過剰発現するマウスにおいて，心筋線維化と心房血栓は病理発生的に関連していると考えられており，心筋線維化に起因する機能的障害は，直接的［CTD4.3-69_R12-0292］又は血行動態変化を介して間接的に血栓形成を促進する方向に働く。オロダテロールの試験でも同様の所見の関連性が認められており，心房血栓形成が認められたすべての動物において，心臓に障害を来し結果的に血行動態に影響する可能性のある心筋線維化，心外膜線維化及び心膜炎が併発していた。このほかに心房血栓形成の原因として考えられるのは，内皮損傷，循環うっ滞，凝固亢進などである［CTD4.3-69_R12-0292］。マウスを用いた毒性試験では，凝固パラメータの評価は行われていない。しかし，ラット及びイヌを用いた反復投与毒性試験において，凝固系に対するオロダテロールの影響はないことが明らかになっている。

溶媒のみ，又は同じ溶媒を用いてオロダテロールを投与したすべての群において，同程度の発現率で喉頭の U 字型軟骨壊死が発現した。したがって，この変化は溶媒の主成分である BAC の影響によるものと考えられた。また，すべての溶媒投与群で喉頭に扁平上皮化生が認められ，255 μg/kg/日投与群でその発現率が高かった。喉頭の扁平上皮化生は，刺激物を吸入したときに起こる粘膜の典型的な適応反応であり，マウスで感受性が高いことがよく知られている［CTD4.3-50_R09-6371］。重症度が低く，炎症性反応を伴っていなかったことから，この所見は毒性学的意義がなく，ヒトにとって問題にならないと考えられた［CTD4.3-50_R09-6371］。

ラットにオロダテロール（25.8, 75.9 又は 270 μg/kg/日）を少なくとも 104 週間吸入投与しても，総死亡率に対する影響はなかった。オロダテロール投与に関連して，雌で体重増加が認められたが，雄では認められなかった。マウス及びラットにおける反復投与試験同様，体重，摂餌量及び骨格筋量に対するこれらの影響は，β_2 刺激薬でよく知られた同化作用によるものであった［CTD4.3-19_P92-68423］。雄では骨格筋に対する同化作用が顕著であり，摂餌量の増加にもかか

わらず，骨格筋のエネルギー消費の亢進のため，体重増加が抑制されたと考えられた［CTD4.3-71_R12-1291］。

オロダテロール投与に関連して，270 µg/kg/日投与群で卵巣間膜平滑筋腫が，75.9 及び 270 µg/kg/ 日投与群で卵巣間膜平滑筋過形成が認められた。25.8 µg/kg/日投与群で卵巣間膜平滑筋腫が 1 例にみられたが，用量依存性がなく，この用量で前がん病変が認められず，発現率も低く，また背景対照値の範囲内であったことから偶発的なものであると考えられた。このことは，25.8 µg/kg/日投与群の 1 例で認められた子宮平滑筋腫にも該当する。

ラットにおいて，卵巣間膜平滑筋腫はまれな自然発生腫瘍であるが［CTD4.3-49_R09-6151］，交感神経刺激薬を長期投与したラットで報告されている［CTD4.3-74_R13-2001，CTD4.3-51_R10-1209，CTD4.3-57_R12-0088，CTD4.3-58_R12-0089］。これらの腫瘍は，β 遮断薬であるプロプラノロールを同時に投与することで発生が抑制される［CTD4.3-28_R96-3645］。この腫瘍性所見は，ラットの卵巣間膜における特異的薬理作用による二次的なものである［CTD4.3-28_R96-3645，CTD4.3-16_P78-1531，CTD4.3-49_R09-6151，CTD4.3-18_P90-0579，CTD4.3-60_R12-0092，CTD4.3-29_R96-3647］。β_2 刺激薬が臨床使用されるようになって 20 年以上経過するが，ヒトでこの種の腫瘍の発現は確認されておらず［CTD4.3-26_P12-00303］，したがって，オロダテロールに伴うヒト発がん性リスクを示す所見ではないと考えられた［CTD4.3-27_P12-00453，CTD4.3-51_R10-1209］。

オロダテロール投与群で卵巣嚢胞の発現率が上昇した。卵巣嚢胞は他の β_2 刺激薬でも誘発されている［CTD4.3-62_R12-0102，CTD4.3-56_R12-0087］。β_2 刺激薬はラットの卵巣に影響を及ぼすことが知られており，げっ歯類に特異的な作用である［CTD4.3-61_R12-0099, CTD4.3-64_R12-0188］。ラットにおける卵巣嚢胞の発生はオロダテロールを含む β_2 刺激薬に対するげっ歯類特有な反応のひとつであり，ヒトに対する毒性学的意義はないと結論される。軽微～軽度の喉頭扁平上皮化生についてもげっ歯類特有の反応と考えられ，重症度が低く，炎症性反応を伴っていなかったことからも，毒性所見とみなされず，ヒトにとって問題にならないと考えられた。

チオトロピウム+オロダテロールの毒性については，げっ歯類における単回吸入投与毒性試験，並びにラット（4 週間）及びイヌ（4 及び 13 週間）における反復吸入投与毒性試験により評価した。反復投与毒性試験ではチオトロピウム：オロダテロールの様々な用量比における毒性影響を評価した。さらに，ラットにおいてチオトロピウム+オロダテロールとシクレソニドを併用投与した 4 週間試験も実施した。

トキシコキネティクスにより，各毒性試験において，チオトロピウム及びオロダテロールの高濃度の全身性曝露が確認された。これらの全身曝露量はチオトロピウム+オロダテロールの毒性評価に十分なレベルと考えられた。チオトロピウムとオロダテロール，あるいはチオトロピウムとオロダテロールとシクレソニドの間の薬理学的相互作用はみられなかった。

マウス及びラットにおける単回吸入投与による急性毒性は低かった。ラットでは最大投与可能エロゾル濃度において死亡はみられなかった。マウスにおける ALD はいずれの用量比（チオトロピウム+オロダテロール 1：1，2：1 又は 1：6）でもオロダテロールの用量にほぼ依存していた。一般症状は抗コリン作用あるいは β_2 刺激作用によるものないしは非特異的な毒性反応であった。

チオトロピウム+オロダテロールとそれぞれの単剤との試験を比較すると，急性毒性における 2 剤投与による相加あるいは相乗的毒性作用は認められなかった。

反復吸入投与毒性試験でも，ラット及びイヌとも，チオトロピウムによる全身性の抗コリン作用とオロダテロールの β_2 刺激作用による特徴的な反応が，明らかな用量依存性を伴って認められた。用量及び血漿中薬物濃度に基づくと，ラットと比較してイヌの方がよりチオトロピウム+オロダテロール配合剤に対して感受性が高かった。観察されたほとんどの全身性影響は直接的あるいは間接的に両薬剤の薬理学的作用に基づくものであった。チオトロピウムによる抗コリン作用はラットでより明らかであったが，オロダテロールによる β_2 刺激作用はイヌでより顕著であった。

投与に関連した直接的な影響は眼球（散瞳，瞳孔強直），鼻及び口腔の粘膜（乾燥），涙腺（導管の拡張），唾液腺（重量減少），心臓（心拍数増加，心筋の単細胞壊死及び線維化，血中 CK-MB 及び cTnI の増加），腎臓（ラットにおける尿量増加，イヌにおける抗利尿作用），肝臓（グリコーゲンの分布変化，血中グルコース，アルブミン及びトリグリセリドの減少）及び造血組織（ラットにおける白血球数増加）で認められた。

涙腺及び唾液腺における抗コリン／抗分泌作用により，角結膜炎，摂餌量の減少及びそれに伴う体重増加量減少が発現した。ラットにおける唾液腺の変化（口内乾燥）は乾燥餌の咀嚼及び嚥下を困難にさせ，死亡の原因ともなった。喉頭及び食道上部に餌が停留していたことは，これらの動物が窒息により死亡したことを示唆する所見と考えられた。オロダテロールの体重に与える同化作用は，チオトロピウム+オロダテロールを投与した動物における摂餌量減少の影響により多かれ少なかれ相殺されていた。

病理学的検査でみられた投与に関連する所見は，イヌでみられた心筋線維化を除くと臨床的にモニターが容易であり，本質的に回復性であった。

イヌを用いた 13 週間反復投与試験において，非回復性の心筋病変はチオトロピウム+オロダテロールの 57+62 µg/kg/日（用量比 1 : 1）群から発現し，3 つの用量比のすべての高用量群及びオロダテロール単独群で認められた。したがって，この心筋線維化はオロダテロール曝露によるものであり，β_2 刺激によるクラス効果とみなされた。

イヌを用いた 13 週間反復投与試験において，チオトロピウム+オロダテロールの異なる用量比の高用量群でみられた毒性所見，特にイヌで顕著であった心血管系における影響は，単剤投与群でみられたものと基本的に同質のものであった。それぞれの単剤投与試験成績と比較して，2 剤併用投与による相加的及び相乗的毒性作用は認められなかった。異なる用量比における NOAEL は本質的にオロダテロール投与試験で得られたものと変わらず，チオトロピウムの併用投与によって影響されなかった。

ラットにおける吸入投与試験でみられた上皮の壊死，過形成，化生等の鼻腔及び喉頭における変化は，チオトロピウムの抗コリン作用と溶媒中の BAC による局所作用の両方によるものと考えられる。また近年，これらのラット吸入投与毒性試験で認められた‘喉頭扁平上皮化生’は‘上皮の変化’として用語が統一され，被験物質にかかわらず‘毒性ではない’とする統一見解が公表されている［CTD4.3-50_R09-6371］。イヌにおいてみられた上部呼吸器及び眼球の軽度の変化は投与手技（フェイスマスク）によるものと考えられた。イヌを用いた 13 週間反復投与試験にお

いて投与局所における毒性はみられず，局所毒性に関する NOAEL は 290+310 μg/kg/ 日と判断された。イヌの試験におけるエロゾル調製に使用した溶液の濃度（オロダテロール 0.12%まで，チオトロピウム 0.24%まで）は予定されている最大臨床濃度（オロダテロール 0.023%まで，チオトロピウム 0.023%まで）をそれぞれ約 5 及び 10 倍上回っている。したがって，ヒトで局所不耐性は生じないと考えられた。

以上のように，非臨床安全性試験で得られた結果により，評価した用量比ではチオトロピウム+オロダテロール投与による相加あるいは相乗的毒性作用はみられず，オロダテロールがチオトロピウム+オロダテロールにおける用量制限成分であることが明らかとなった。オロダテロールの薬理作用は強力で，チオトロピウム+オロダテロールのどの用量あるいは用量比でも薬力学的作用がみられた。ほとんどの臨床所見及び病理所見は用量相関性を示し，臨床的に明らかで，臨床的なモニターが容易であり，イヌでみられた心筋線維化（部分的に回復性）を除けば，本質的に回復性を示すものであった。毒性作用は臨床用量を大きく上回る用量のみで認められ，全体的に軽微から軽度で多くは完全に回復性であった。チオトロピウム+オロダテロール+シクレソニドの併用投与による薬物相互作用を示唆する所見は認められなかった。

以上より，FDA ガイダンス「Safety testing of drug metabolites」［CTD4.3-46_R08-2457］，ICH ガイダンス M3（R2）「ICH Guidance on nonclinical safety studies for the conduct of human clinical trials and marketing authorization for pharmaceuticals M3(R2)」［CTD4.3-55_R10-5669］，FDA ガイダンス「Guidance for Industry: Nonclinical safety evaluation of drug or biologic combinations, FDA CDER 2006」［CTD4.3-6_R12-5450］，及び「Guideline on the non-clinical development of fixed combinations of medicinal products, EMEA 2008」［CTD4.3-7_R11-2414］に鑑み，非臨床安全性試験で得られた結果は，チオトロピウム+オロダテロール配合剤を COPD 治療薬として申請することの妥当性を裏付けるものと考えられた。

11. 表及び図

表は本文中に記載した。

12. 付録

ラット生殖毒性試験の AUC 値の計算及び比較

注：以下で用いる計算には，別途実施した試験のトキシコキネティクス評価用動物での到達用量を使用した。それぞれの報告書にも，到達用量が記載されている。しかし，試験間の比較のためには設定用量を用いた方が適切な場合もあると考えられ，以下の本文内では適宜設定用量を用いた。

Sprague-Dawley ラットを用いた胚・胎児発生毒性試験［CTD4.2.3.5.2-1_U[redacted]-2534］において，投与最終日の吸入投与終了直後（1 時間）に血液試料を採取して，主試験用動物を対象として曝露量をモニターした。さらに，中間用量については，サテライト群の動物を対象として，血漿中濃度を測定し $AUC_{0\text{-}24}$ 値を算出した。この試験の吸入投与時間は，主試験群及びサテライト群を含む全ての動物について 1 時間／日であった。本試験でモニターした C_1 値から，オロダテロールのトキシコキネティクスが用量にほぼ比例するという，多数の毒性試験から得られた知見が確認された。したがって，各群の到達用量を用いて，試験内サテライト群から曝露量（$AUC_{0\text{-}24}$）を外挿することができると考えられた。つまり，サテライト群で算出された $AUC_{0\text{-}24}$ 値と到達用量の比 336（到達用量 300.38 µg/kg/日で $AUC_{0\text{-}24}$ 101000 pM·h）を共通係数として用いることにより，主試験群の動物について，それぞれの $AUC_{0\text{-}24}$ 値を推定した。これにより，$AUC_{0\text{-}24}$ は，到達用量 72.9 µg/kg/日で 24494 pM·h，到達用量 263.34 µg/kg/日で 88482 pM·h，到達用量 1093.56 µg/kg/日で 367436 pM·h と算出された。

ラットを用いた吸入投与によるラット受胎能及び初期胚発生毒性試験［CTD4.2.3.5.1-1_U[redacted]-2297］では，試験内に $AUC_{0\text{-}24}$ を算出するサテライト群は組み込まれていなかったが，すべての群について，吸入投与終了直後の 0.583 時間に血漿中オロダテロール濃度を測定した。この試験における吸入投与時間は，Wistar ラットを用いた反復投与毒性試験の吸入投与時間と全く同じであった。したがって，4，13，26 及び 104 週間反復投与した試験のすべての測定ポイント（$C_{0\ 583}$ 及びそれぞれの $AUC_{0\text{-}24}$ 値）について［CTD4.2.3.2-4_U[redacted]-2133，CTD4.2.3.2-5_U[redacted]-1342，CTD4.2.3.2-6_U[redacted]-1691，CTD4.2.3.4.1-2_U[redacted]-2661］，線形回帰モデル（$AUC_{0\text{-}24}=m\times C_{0\ 583}+b$）を用いて，Microsoft Excel で $AUC_{0\text{-}24}$ を計算した。

全体として，ラット受胎能及び初期胚発生毒性試験［CTD4.2.3.5.1-1_U[redacted]-2297］の低用量（設定用量：50 µg/kg/日）及び中間用量（設定用量：200 µg/kg/日）群における用量で補正した血漿中濃度 $C_{0\ 583}$ は 22.2～39.4 (pM)/(µg/kg)の範囲であり，同じ設定用量でのラット 13 週間反復投与毒性試験［CTD4.2.3.2-5_U[redacted]-1342］と同程度であり，ラット 26 週間反復投与毒性試験［CTD4.2.3.2-6_U[redacted]-1691］に比べてわずかに低かった（約 2 分の 1）。また，高用量（設定用量：3000 µg/kg/日）群における用量で補正した血漿中濃度 $C_{0\ 583}$ は 60.5～70.8 (pM)/(µg/kg)の範囲であり，ラット 4 週間反復投与毒性試験［CTD4.2.3.2-4_U[redacted]-2133］（設定用量：1250 µg/kg/日），ラット 13 週間反復投与毒性試験［CTD4.2.3.2-5_U[redacted]-1342］（設定用量：2400 µg/kg/ 日）及びラット 26 週間反復投与毒性試験［CTD4.2.3.2-6_U[redacted]-1691］（設定用量：4000 µg/kg/日）の高用量群と同程度又はごくわずかに低かった。したがって，受胎能及び初期胚発生に関する試験で測定した血漿中濃度 $C_{0\ 583}$ を用いて $AUC_{0\text{-}24}$ 値を計算することは適切と考えられた。

複合デザイン解析により 3 試験［CTD4.2.3.2-4_U[redacted]-2133，CTD4.2.3.2-5_U[redacted]-1342，CTD4.2.3.4.1-2_U[redacted]-2661］すべてから同等の結果が得られ，これをひとつにまとめて式 A（y=1.8448x+4253.8，相関係数（R^2）=0.9745）を得た。また，1 試験［CTD4.2.3.2-6_U[redacted]-1691］では，個々の血漿中濃度-時間推移を用いて $AUC_{0\text{-}24}$ を算出し，式 B（y=2.633x+2901，相関係数（R^2）=0.9966）が得られた。式 A 及び B を用いて，試験［CTD4.2.3.5.1-1_U[redacted]-2297］における血漿中濃度 $C_{0\ 583}$ 測定値に基づいて対応する $AUC_{0\text{-}24}$ を計算し，$AUC_{0\text{-}24}$ 推定値の上限及び下限を得た。

以上より，試験［CTD4.2.3.5.1-1_U[redacted]-2297］の $AUC_{0\text{-}24}$ 計算値は，低用量群（設定用量：50 µg/kg/日）で 6338～7685 pM·h（式 A 使用）／5876～7798 pM·h（式 B 使用），中間用量群（設定用量：200 µg/kg/日）で 14640～19584 pM·h（式 A 使用）／17725～24781 pM·h（式 B 使用），高用量群（設定用量：3000 µg/kg/日）で 312335～387972 pM·h（式 A 使用）／442612～550565 pM·h（式 B 使用）の範囲であった。$AUC_{0\text{-}24}$ 計算値を用量で補正した結果，85.0～132.3 (pM·h)/(µg/kg)（式 A）及び 103.3～187.5 (pM·h)/(µg/kg)（式 B）の範囲の値が得られた。全体として，用量で補正した $AUC_{0\text{-}24}$ 計算値は，各反復投与毒性試験で実際に測定した用量補正 $AUC_{0\text{-}24}$ 値と同程度の全身曝露であることを反映していた。

第 2 部 CTD の概要

JAN あるいは販売名：	チオトロピウム＋オロダテロール
剤形・含量：	吸入剤（配合剤）・1 噴霧中チオトロピウム＋オロダテロール 2.5 μg/ 2.5 μg
文書名：	2.6.7 毒性試験概要表
文書作成日：	2 June 2015

Proprietary confidential information
© 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies. All rights reserved.
This document may not - in full or in part - be passed on, reproduced, published or otherwise used without prior written permission

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

目　次

目　次 2
略号一覧表 5
1. 毒性試験：一覧表 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 15
3. トキシコキネティクス：トキシコキネティクス試験成績の一覧 20
3.1 オロダテロール投与試験におけるトキシコキネティクス 20
3.2 チオトロピウム+オロダテロール投与試験におけるトキシコキネティクス 25
3.3 チオトロピウム+オロダテロール投与試験におけるトキシコキネティクス 27
4. 毒性試験：使用ロット 29
4.1 オロダテロール塩酸塩の使用ロット 29
4.2 チオトロピウム臭化物水和物の使用ロット 32
5. 単回投与毒性試験 33
5.1 オロダテロールのマウス単回吸入投与毒性試験 33
5.2 チオトロピウム+オロダテロールのマウス単回吸入投与毒性試験 34
5.3 チオトロピウム+オロダテロールのマウス単回吸入投与毒性試験 35
5.4 チオトロピウム+オロダテロールのマウス単回吸入投与毒性試験 36
5.5 オロダテロールのマウス単回静脈内投与毒性試験 37
5.6 オロダテロールのマウス単回経口吸入投与毒性試験 38
5.7 オロダテロールのラット単回吸入投与毒性試験 39
5.8 チオトロピウム+オロダテロールのラット単回吸入投与毒性試験 40
5.9 チオトロピウム+オロダテロールのラット単回吸入投与毒性試験 41
5.10 チオトロピウム+オロダテロールのラット単回吸入投与毒性試験 42
5.11 オロダテロールのラット単回静脈内投与毒性試験 43
5.12 オロダテロールのラット単回経口投与毒性試験 44
6. 反復投与毒性試験：重要な試験以外の試験 45
6.1 オロダテロールのラット吸入投与用量設定試験 45
6.2 オロダテロールのイヌ吸入投与用量設定試験 47
6.3 チオトロピウム+オロダテロールのイヌ吸入投与用量設定試験 49
6.4 オロダテロールのイヌ静脈内投与用量設定試験 51
6.5 オロダテロールのイヌ経口投与用量設定試験 52
7. 反復投与毒性試験：重要な試験 53
7.1 オロダテロールのマウス反復吸入投与毒性試験 53
7.2 オロダテロールのマウス反復吸入投与毒性試験 54
7.3 オロダテロールのラット反復吸入投与毒性試験 57
7.4 オロダテロールのラット反復吸入投与毒性試験 60
7.5 オロダテロールのラット反復吸入投与毒性試験 66

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

7.6 チオトロピウム+オロダテロールのラット反復吸入投与毒性試験 71
7.7 チオトロピウム+オロダテロールのラット反復吸入投与毒性試験 75
7.8 オロダテロールのラット反復静脈内投与毒性試験 79
7.9 オロダテロールのラット反復経口投与毒性試験 82
7.10 オロダテロールのイヌ反復吸入投与毒性試験 84
7.11 オロダテロールのイヌ反復吸入投与毒性試験 86
7.12 オロダテロールのイヌ反復吸入投与毒性試験 89
7.13 チオトロピウム+オロダテロールのイヌ反復吸入投与毒性試験 92
7.14 チオトロピウム+オロダテロールのイヌ反復吸入投与毒性試験 96
7.15 チオトロピウム+オロダテロールのイヌ反復吸入投与毒性試験 100
7.16 チオトロピウム+オロダテロールのイヌ反復吸入投与毒性試験 104
7.17 オロダテロールのイヌ反復静脈内投与毒性試験 107
7.18 オロダテロールのイヌ反復経口投与毒性試験 109
8. IN VITRO 遺伝毒性 112
8.1 オロダテロールの Ames 試験 112
8.2 オロダテロールのマウスリンフォーマ試験 114
9. IN VIVO 遺伝毒性 117
9.1 オロダテロールの小核試験 117
9.2 チオトロピウム+オロダテロールの小核試験 118
9.3 チオトロピウム+オロダテロールの小核試験 119
9.4 オロダテロールの小核試験 120
9.5 オロダテロールの造血亢進作用機序解明試験 121
10. がん原性試験 122
10.1 オロダテロールのマウスがん原性試験 122
10.2 オロダテロールのラットがん原性試験 135
11. 生殖発生毒性試験：重要な試験以外の試験 146
12. 生殖発生毒性試験：受胎能および着床までの初期胚発生に関する試験 147
13. 生殖発生毒性試験：胚・胎児発生に関する試験 149
13.1 オロダテロールのラット胚・胎児発生に関する試験 149
13.2 オロダテロールのウサギ胚・胎児発生に関する試験 151
14. 生殖発生毒性試験：出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験 153
15. 新生児を用いた試験 156
16. 局所忍容性試験 157
16.1 皮膚刺激性試験 157
16.2 眼刺激性試験 158
16.3 静脈内及び筋肉内投与刺激性試験 159
16.4 動脈内投与刺激性試験 160
16.5 傍静脈投与刺激性試験 161

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies
17. その他の毒性試験 162
17.1 オロダテロールの幼若イヌ反復吸入投与試験 162
17.2 オロダテロールの幼若イヌ反復吸入投与試験 163
17.3 ラット併用反復吸入投与毒性試験 166
17.4 イヌ併用反復吸入投与毒性試験 170

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

略号一覧表

ALD	approximate lethal dose	概略の致死量
ALP	alkaline phosphatase	アルカリフォスファターゼ
ALT	alanine aminotransferase	アラニンアミノトランスフェラーゼ
APTT	activated partial thromboplastin time	活性化部分トロンボプラスチン時間
AST	aspartate aminotransferase	アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ
AUC_{tm-tn}	area under the plasma/blood/tissue concentration-time curve from time tm to time tn	時間 tm から時間 tn までの血漿／血液／組織中濃度-時間曲線下面積
$AUC_{tm-tn,ss}$	Area under the plasma/blood/tissue concentration-time curve from time tm to time tn at steady state	定常状態における時間 tm から時間 tn までの血漿／血液／組織中濃度-時間曲線下面積
分解生成物I*	degradation product of tiotropium	チオトロピウムの分解物
BA 679	company code of tiotropium (= active moiety of drug substance)	チオトロピウム（フリー体）の社内コード
BA 679 BR	company code of tiotropium bromide monohydrate (=drug substance)	チオトロピウム臭化物水和物（原薬）の社内コード
BAC	benzalkonium chloride	塩化ベンザルコニウム
BI 1744	company code of olodaterol (= active moiety of drug substance)	オロダテロール（フリー体）の社内コード
BI 1744 CL	company code of olodaterol hydrochloride (=drug substance)	オロダテロール塩酸塩（原薬）の社内コード
開発コードE*	ciclesonide	シクレソニド
分解生成物J*	degradation product of tiotropium	チオトロピウムの分解物
分解生成物L*	degradation product of tiotropium	チオトロピウムの分解物
CK	creatine kinase	クレアチンキナーゼ
CK-MB	isoenzyme of creatinkinase released mainly from cardiac muscle	心筋由来のクレアチンキナーゼアイソザイム
C_{max}	maximum concentration of analyte in plasma/blood/tissue	最高血漿／血液／組織中濃度
$C_{max,ss}$	maximum concentration of analyte in plasma/blood/tissue at steady state	定常状態における最高血漿／血液／組織中濃度
CPK	creatinine phosphokinase	クレアチンホスフォキナーゼ
CTD	common technical document	コモンテクニカルドキュメント
CTF	clinical trial formulation	臨床試験製剤
cTnI	cardiac troponin I	心筋トロポニン I
C_x	concentration of analyte in plasma/blood/tissue at x	投与後 x 時間における血漿中濃度
ECG	electrocardiogram	心電図
F	female	雌
GD	gestation day	妊娠日
GLDH	glutamate dehydrogenase	グルタミン酸脱水素酵素
GLP	Good Laboratory Practice	医薬品の安全性試験の実施に関する基準
HEC	hydroxyethylcellulose	ヒドロキシエチルセルロース
Hb	hemoglobin	ヘモグロビン
HCl	hydrochloric acid	塩酸

*：新薬承認情報提供時に置き換えた

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

Hct	hematocrit	ヘマトクリット
HR	heart rate	心拍数
LD_{50}	50% lethal dose	50%致死量
LDH	lactate dehydrogenase	乳酸脱水素酵素
M	male	雄
MCH	mean corpuscular haemoglobin	平均赤血球ヘモグロビン量
MNLD	maximum non-lethal dose	最大非致死量
MNPCE	micronucleated polychromatic erythrocytes	小核を有する多染性赤血球
MTD	maximum tolerated dose	最大耐用量
Na-EDTA	sodium ethylenediaminetetraacetic acid	エチレンジアミン四酢酸ナトリウム
NALT	nasal associated lymphatic tissue	鼻腔関連リンパ組織
NCE	normochromatic erythrocytes	正染性赤血球
NOAEL	no observed adverse effect level	無毒性量
NZW	New Zealand White strain of rabbits	ウサギの系統
Olo	Olodaterol	オロダテロール
PCE	polychromatic erythrocytes	多染性赤血球
PR	P-R interval	心電図中, P 波の起始部から QRS 波の起始部までの時間
PT	prothrombin time	プロトロンビン時間
QT	Time between the start of the Q wave and the end of the T wave (ECG)	心電図中，Q 波の起始部から T 波の終末部までの時間
QTc	QT correction for heart rate	補正 QT 間隔
RR	R-R interval	心電図中の R-R 間隔
分解生成物N*	degradation product of tiotropium	チオトロピウムの分解物
Tio	Tiotropium	チオトロピウム
Tio+Olo	Tiotropium+Olodaterol	チオトロピウム+オロダテロール
TK	Toxikokinetics	トキシコキネティクス
WBC	white blood cells	白血球

*：新薬承認情報提供時に置き換えた

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

1. 毒性試験：一覧表

Test Article: Tiotropium + Olodaterol

Type of Study	Species, Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Test Articles Doses (mg/kg[a])	GLP Compliance	Testing Facility	Doc. Number	Location in CTD
Single-Dose Toxicity								
	Mouse, Crl:NMRI	Inhalation	Single dose	Olo: 49.7	Yes	BI	U[redacted]-1101	4.2.3.1-1
	Mouse, Crl:NMRI	Inhalation	Single dose	Tio+Olo (ratio: 1:1): 34.8 +36.6	Yes	BI	U[redacted]-1184	4.2.3.1-2
	Mouse, Crl:NMRI	Inhalation	Single dose	Tio+Olo (ratio: 2:1): 41.9 +22.3	Yes	BI	U[redacted]-1201	4.2.3.1-3
	Mouse, Crl:NMRI	Inhalation	Single dose	Tio+Olo (ratio: 1:6): 2.5+16.4, 4.5+29.2, 10.3+66.0	Yes	BI	U[redacted]-1197	4.2.3.1-4
	Mouse, Crl:NMRI	Intravenous	Single dose	Olo: 10, 20, 40	Yes	BI	U[redacted]-1113	4.2.3.1-5
	Mouse, Crl:NMRI	Oral (gavage)	Single dose	Olo: 100, 316,1000, 2000	Yes	BI	U[redacted]-1118	4.2.3.1-6
	Rat, CrlGlxBrlHan:WI	Inhalation	Single dose	Olo: 24.7	Yes	BI	U[redacted]-1100	4.2.3.1-7
	Rat, Crl:WI(Han)	Inhalation	Single dose	Tio+Olo (ratio: 1:1): 17.9+18.8	Yes	BI	U[redacted]-1182	4.2.3.1-8
	Rat, Crl:WI(Han)	Inhalation	Single dose	Tio+Olo (ratio: 2:1): 21.2+11.3	Yes	BI	U[redacted]-1199	4.2.3.1-9
	Rat, Crl:WI(Han)	Inhalation	Single dose	Tio+Olo (ratio: 1:6): 5.2+33.2	Yes	BI	U[redacted]-1185	4.2.3.1-10
	Rat, CrlGlxBrlHan:WI	Intravenous	Single dose	Olo: 10, 20, 40, 80	Yes	BI	U[redacted]-1112	4.2.3.1-11
	Rat, CrlGlxBrlHan:WI	Oral (gavage)	Single dose	Olo: 100, 316, 1000	Yes	BI	U[redacted]-1065	4.2.3.1-12

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

1. 毒性試験：一覧表（続き）

Test Article: Tiotropium + Olodaterol

Type of Study	Species, Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Test Articles Doses (mg/kg[a])	GLP Compliance	Testing Facility	Doc. Number	Location in CTD
Repeat-Dose Toxicity								
	Mouse, CD-1	Inhalation	1 day	Olo: 0, 69, 196, 930, 3033 µg/kg	Yes	[redacted]	U[redacted]-1975	4.2.3.2-2
	Mouse, CD-1	Inhalation	13 weeks	Olo: 0, 63, 211, 900, 3258 µg/kg	Yes	[redacted]	U[redacted]-1341	4.2.3.2-1
	Rat, Crl:WI(GLx/ BRL/Han)IGS BR	Inhalation	2 weeks	Olo: 0, 0.422. 4.26, 40.1, 538 µg/kg	No	[redacted]	U[redacted]-2143	4.2.3.2-3
	Rat, HsdBrlHan:WIST	Inhalation	4 weeks	Olo: 0, 78, 260, 1360 µg/kg	Yes	[redacted]	U[redacted]-2133	4.2.3.2-4
	Rat, Crl:WI(Han)	Inhalation	13 weeks	Olo: 0, 61.7, 239, 971, 2833 µg/kg	Yes	[redacted]	U[redacted]-1342	4.2.3.2-5
	Rat, Crl:WI (Han)	Inhalation	26 weeks	Olo: 0, 49, 200, 3400 µg/kg	Yes	BI	U[redacted]-1691	4.2.3.2-6
	Rat, Crl:WI(Han)	Inhalation	4 weeks	Tio+Olo (ratio: 1:1): 0+0, 85.2+78.6, 577+555, 2266+2174 µg/kg	Yes	[redacted]	U[redacted]-1893	4.2.3.2-7
	Rat, Crl:WI(Han)	Inhalation	4 weeks	Tio+Olo (ratio: 1:6 or 2:1) 0+0, 13+75, 393+2032 µg/kg 143+73, 3263+1747µg/kg	Yes	[redacted]	U[redacted]-1892	4.2.3.2-8
	Rat, HsdBrlHan:WIST	Intravenous	2 weeks	Olo: 0, 5, 25, 100 µg/kg	Yes	[redacted]	U[redacted]-1375	4.2.3.2-9
	Rat, Crl:WI(Han)	Oral (gavage)	2 weeks	Olo: 0, 0.5, 5, 50	Yes	[redacted]	U[redacted]-2334	4.2.3.2-10

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

1. 毒性試験：一覧表（続き）

Test Article: Tiotropium + Olodaterol

Type of Study	Species, Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Test Articles Doses (mg/kg[a])	GLP Compliance	Testing Facility	Doc. Number	Location in CTD
Repeat-Dose Toxicity (-continued)								
	Dog, Beagle	Inhalation	2 weeks	Olo: 0, 1.3, 9.5, 32, 116 µg/kg	No	[redacted]	U[redacted]-2134	4.2.3.2-11
	Dog, Beagle	Inhalation	4 weeks	Olo: 0, 2.2, 13.7, 127 µg/kg	Yes	[redacted]	U[redacted]-2146	4.2.3.2-12
	Dog, Marshall:Beagle	Inhalation	13 weeks	Olo: 0, 4.9, 15, 160 µg/kg	Yes	BI	U[redacted]-1317	4.2.3.2-13
	Dog, Marshall:Beagle	Inhalation	52 weeks	Olo: 0, 15, 60, 330 µg/kg	Yes	BI	U[redacted]-1740	4.2.3.2-14
	Dog, Beagle	Inhalation	4 weeks escalating dose	Tio+Olo: Week 1: 0+0, 5.3+5.9, 0.8+5.2, 7.4+4.1 µg/kg Week 2: 0+0, 16+17, 2.0+12, 33+17 µg/kg Week 3: 0+0, 98+102, 12+78, 166+90 µg/kg Week 4: 0+0, 207+224, 31+194, 380+185 µg/kg	No	BI	n00177290	4.2.3.2-15
	Dog, Beagle	Inhalation	4 weeks	Tio+Olo (ratio: 1:1): 0, 6.07+5.71, 16.8+16.1, 157+152µg/kg	Yes	[redacted]	U[redacted]-1894	4.2.3.2-16
	Dog, Beagle	Inhalation	4 weeks	Tio+Olo (ratio: 1:6 or 2:1): 0, 2.66+16.4, 19.8+124 µg/kg 28.8+16.5, 385+191 µg/kg	Yes	[redacted]	U[redacted]-1895	4.2.3.2-17
	Dog, Beagle	Inhalation	13 weeks	Tio+Olo (ratio: 1:1) 0, 14+16, 57+62, 290+310, 0+290, 310+0 µg/kg	Yes	BI	U[redacted]-2249	4.2.3.2-18
	Dog, Beagle	Inhalation	13 weeks	Tio+Olo (ratio: 2.5:1 or 1:2): 0+0, 36+16, 300+130 µg/kg 140+300, 0+300, 300+0 µg/kg	Yes	BI	U[redacted]-1388	4.2.3.2-19
	Dog, Beagle	Intravenous	Escalating Dose, Total 12 days	Olo: 0, 3, 9, 27, 81 µg/kg	No	BI	U[redacted]-1625	4.2.3.2-20
	Dog, Beagle BASF and Chbb: Beagle	Intravenous	2 weeks	Olo: 0, 3.3, 9.8, 29.5 µg/kg	Yes	BI	U[redacted]-1051	4.2.3.2-21
	Dog, Chbb:Beagle	Oral (gavage)	Escalating Dose, Total 8 days	Olo: 0.5, 1.0, 5.0	No	BI	U[redacted]-1139	4.2.3.2-22
	Dog, Beagle BASF and Chbb: Beagle	Oral (gavage)	2 weeks	Olo: 0, 5, 16, 50, 160, 500 µg/kg	Yes	BI	U[redacted]-2169	4.2.3.2-23

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

1. 毒性試験：一覧表（続き）

Test Article: Tiotropium + Olodaterol

Type of Study	Species, Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Test Articles Doses (mg/kg[a])	GLP Compliance	Testing Facility	Doc. Number	Location in CTD
Genotoxicity								
	S. typhimurium Ames Test	*In vitro*		Olo: up to 5000 µg/plate	Yes	BI	U[redacted]-1046	4.2.3.3.1-1
	Mouse lymphoma assay	*In vitro*		Olo: up to 250 µg/mL	Yes	BI	U[redacted]-2188	4.2.3.3.1-2
	Rat, HsdBrlHan:WIST Micronucleus	Inhalation	4 weeks	Olo: 0, 78, 260, 1360 µg/kg	Yes	[redacted]	U[redacted]-2133	4.2.3.2-4
	Rat, HsdBrlHan:WIST Micronucleus	Inhalation	4 weeks	Tio+Olo (ratio: 1:1): 0, 85.2+78.6, 577+555, 2266+2174 µg/kg	Yes	[redacted]	U[redacted]-1893	4.2.3.2-7
	Rat, HsdBrlHan:WIST Micronucleus	Inhalation	4 weeks	Tio+Olo (ratio: 1:6 or 2:1): 0, 13+75, 393+2032 µg/kg 143+73, 3263+1747 µg/kg	Yes	[redacted]	U[redacted]-1892	4.2.3.2-8
	Rat, Crl:WI(Han) Micronucleus	Intravenous	Single Dose	Olo: 0, 1, 10, 40	Yes	BI	U[redacted]-1834	4.2.3.3.2-1
	Rat, Crl: WI(Han) Mechanistic studies	Intravenous	Single Dose	Olo: 0, 40	No	BI	U[redacted]-1845	4.2.3.3.2-2
Carcinogenicity								
	Mouse, Crl:CD-1(ICR)	Inhalation	24 months	Olo: 0, 26.1, 76,9, 255 µg/kg	Yes	[redacted]	U[redacted]-1065	4.2.3.4.1-1
	Rat, Crl:WI(Han)	Inhalation	24 months	Olo: 0, 25.8, 75.9, 270 µg/kg	Yes	[redacted]	U[redacted]-2661	4.2.3.4.1-2

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

1. 毒性試験：一覧表（続き） Test Article: Tiotropium + Olodaterol

Type of Study	Species, Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Test Articles Doses (mg/kg[a])	GLP Compliance	Testing Facility	Doc. Number	Location in CTD
Reproductive and Developmental Toxicity								
	Rat, Crl:CD® (SD) Sprague -Dawley	Inhalation	M: 4 weeks premating and during mating F: 2 weeks premating until GD7	Olo: 0, 58, 193, 3068 µg/kg	Yes	[redacted]	U[redacted]-2297	4.2.3.5.1-1
	Rat, Crl:CD® (SD) IGS BR	Inhalation	GD6-GD17	Olo: 0, 64, 222, 1054 µg/kg	Yes	[redacted]	U[redacted]-2534	4.2.3.5.2-1
	Rabbit, New Zealand White	Inhalation	Unmated phase Days 1-14 Mated Phase Days 6-19	Olo: Unmated phase: 0.835, 1.80, 3.92 Mated phase: 1.74, 3.71	No	[redacted]	U[redacted]-2535	4.2.3.5.2-2
	Rabbit, New Zealand White	Inhalation	GD6-GD19	Olo: 0, 289, 974, 2489 µg/kg	Yes	[redacted]	U[redacted]-1019	4.2.3.5.2-3
	Rat, Crl:CD® (SD) Sprague -Dawley	Inhalation	GD6-GD20 LD2-LD21	Olo: 0, 59, 297, 3665 µg/kg	Yes	[redacted]	U[redacted]-1971	4.2.3.5.3-1

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

1. 毒性試験：一覧表（続き） Test Article: Tiotropium + Olodaterol

Type of Study	Species, Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Test Articles Doses (mg/kg[a])	GLP Compliance	Testing Facility	Doc. Number	Location in CTD
Local Tolerance								
	Rabbit, Chbb:NZW	Dermal	Single application	Olo: 0.5 g	Yes	BI	U[redacted]-1116	4.2.3.6-1
	Rabbit, Chbb:NZW	Eye	Single application	Olo: 2 mg, 10 mg per eye	Yes	BI	U[redacted]-2189	4.2.3.6-2
	Rabbit, Chbb:NZW	Intravenous/ intramuscular	Single application	Olo: 0.5 mL of 0.004, 0.010 mg/mL soution	Yes	BI	U[redacted]-2144	4.2.3.6-3
	Rabbit, Chbb:NZW	Inraarterial	Single application	Olo: 0.5 mL of 0.004, 0.010 mg/mL soution	Yes	BI	U[redacted]-2164	4.2.3.6-4
	Rat, Crl:WI(Han)	Paravenous	Single application	Olo: 0.2 mL of 0.004, 0.010 mg/mL soution	Yes	BI	U[redacted]-2178	4.2.3.6-5
Other Toxicity studies								
Studies in Juvenile Animals								
	Dog, Beagle	Inhalation	3 weeks	Olo: 0, 21.9, 294, 674 µg/kg	No	[redacted]	U[redacted]-1442	4.2.3.7.7-1
	Dog, Beagle	Inhalation	13 weeks	Olo: 0, 120, 324, 1046 µg/kg	Yes	[redacted]	U[redacted]-1257	4.2.3.7.7-2
Combination drugs								
	Rat, Crl:WI(Han)	Inhalation	4 weeks	Tio+Olo+開発コードE*: 0+0+0, 1.0+1.0+30+1.0, 3.1+3.0+89, 9.9+9.8+280 µg/kg	Yes	BI	U[redacted]-1530	4.2.3.7.7-3
	Dog, Beagle	Inhalation	4 weeks	Tio+Olo+開発コードE*: 0+0+0, 2.1+2.0+59, 5.1+5.1+150, 16+16+460 µg/kg	Yes	BI	U[redacted]-2354	4.2.3.7.7-4

*：新薬承認情報提供時に置き換えた

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

1. 毒性試験：一覧表（続き） Test Article: Tiotropium + Olodaterol

Type of Study	Species, Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Test Articles Doses (mg/kg[a])	GLP Compliance	Testing Facility	Doc. Number	Location in CTD
Other Toxicity studies (-continued)								
Impurities and Excipients								
標準物質Q*，分解生成物I*，分解生成物P*	*S. typhimurium* Ames Test	*In vitro*		10-5000 µg/plate	Yes	BI	U[redacted]-0074	4.2.3.7.6-1
標準物質Q*	Mice, NMRI Micronucleus	Intravenous	Twice at an interval of 24 h	0, 100, 300, 1000	Yes	BI	U[redacted]-1478	4.2.3.7.6-2
標準物質Q*，分解生成物O*，分解生成物I*，分解生成物P*	Rats, Chbb:THOM	Inhalative (liquid aerosol)	4 weeks	20 µg/kg Tio spiked with 分解生成物J*，分解生成物L*，分解生成物M*，分解生成物N*	Yes	BI	U[redacted]-1104	4.2.3.7.6-3
標準物質Q*，分解生成物O*，分解生成物I*，分解生成物P*	Rats, Chbb:THOM	Inhalative (liquid aerosol)	4 weeks	20 µg/kg Tio spiked with 分解生成物J*，分解生成物L*，分解生成物M*，分解生成物N*	Yes	BI	U[redacted]-1565	4.2.3.7.6-4
標準物質Q*，分解生成物O*，分解生成物I*，分解生成物P*	Rats, Chbb:THOM	Inhalative (liquid aerosol)	13 weeks	25 µg/kg Tio spiked with 分解生成物J*，分解生成物L*，分解生成物M*，分解生成物N*	Yes	[redacted]	U[redacted]-1175	4.2.3.7.6-5
分解生成物H*，分解生成物I*，分解生成物P*	Rats, Wistar Han IGS	Inhalative (liquid aerosol)	13 weeks	分解生成物J*，分解生成物M*，分解生成物N* 0+0+0, 0.9+1.3+1.3 µg/kg	Yes	[redacted]	U[redacted]-2102	4.2.3.7.6-6
BAC and EDTA in the vehicle formulation	Rats, Chbb:THOM	Inhalation	2 weeks	BAC[redacted]% Na-EDTA[redacted]%	Yes	BI	U[redacted]-2224	4.2.3.7.6-7
BAC and EDTA in the vehicle formulation	Dogs, Beagle	Inhalation	2 weeks	BAC[redacted]% Na-EDTA[redacted]%	Yes	BI	U[redacted]-2076	4.2.3.7.6-8
BAC and EDTA in the vehicle formulation	Rats, Wistar Han IGS	Inhalation	13 weeks	BAC[redacted]% Na-EDTA[redacted]%	Yes	[redacted]	U[redacted]-1186	4.2.3.7.6-9
BAC in the vehicle formulation	Rats, Chbb:THOM	Inhalation	24 months	BAC[redacted]%	Yes	[redacted]	U[redacted]-2727	4.2.3.7.6-10
BAC and EDTA in the vehicle formulation	Dogs, Beagle	Inhalation	13 weeks	BAC[redacted]% Na-EDTA[redacted]%	Yes	BI	U[redacted]-2570	4.2.3.7.6-11

*：新薬承認情報提供時に置き換えた

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

1. 毒性試験：一覧表（続き） Test Article: Tiotropium + Olodaterol

Type of Study	Species and Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Test Articles Doses (mg/kg[a])	GLP Compliance	Testing Facility	Doc. Number	Location in CTD
Analytical methods								
Development of methodologies for the analysis					Yes	[redacted]	U[redacted]-2430	4.2.3.7.7-5
Development of methodologies for the analysis					Yes	[redacted]	U[redacted]-1524	4.2.3.7.7-6
Development of methodologies for the formulation and analysis					Yes	[redacted]	U[redacted]-2165	4.2.3.7.7-7
Development of methodologies for the analysis					Yes	[redacted]	U[redacted]-1347	4.2.3.7.7-8
Development of methodologies for the analysis					Yes	[redacted]	U[redacted]-1397	4.2.3.7.7-9

a: Unless otherwise specified. Doses are expressed as active moieties. Doses for inhalation studies are expressed as achieved doses. For Repeat Dose Toxicity, the systemic NOAEL (No Observed Adverse Effect Level) is underlined.

BI: Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co. KG

[redacted] UK

[redacted] UK

GD: Gestation Day, LD: Lactation Day

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

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

Test Article: Tiotropium + Olodaterol

Type of Study	Test System	Method of Administration	Dose of Tiotropium [a] (µg/kg)	Dose of Olodaterol [a] (µg/kg)	GLP	Doc. Number	Location in CTD
Olo: Single-dose toxicity	Mouse	Inhalation	NA	50 200 800 3200	Yes	U[redacted]-1975	4.2.3.2-2
Olo: Repeat dose toxicity, 13 weeks	Mouse	Inhalation	NA	50 200 800 3200	Yes	U[redacted]-1341	4.2.3.2-1
Olo: Carcinogenicity, 104 weeks	Mouse	Inhalation	NA	25 75 250	Yes	U[redacted]-1065	4.2.3.4.1-1
Olo: Repeat-dose toxicity, 2 weeks	Rat	Inhalation	NA	0.5 5 50 500	No	U[redacted]-2143	4.2.3.2-3
Olo: Repeat-dose toxicity, 2 weeks	Rat	Intravenous	NA	5 25 100	Yes	U[redacted]-1375	4.2.3.2-9
Olo: Repeat-dose toxicity, 2 weeks	Rat	Oral, gavage	NA	500 5000 50000	Yes	U[redacted]-2334	4.2.3.2-10
Olo: Repeat-dose toxicity, 4 weeks	Rat	Inhalation	NA	75 250 1250	Yes	U[redacted]-2133	4.2.3.2-4
Tio+Olo: Repeat-dose Toxicity, 4 weeks	Rat	Inhalation	0 75 500 2000	0 75 500 2000	Yes	U[redacted]-1893	4.2.3.2-7

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

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）

Test Article: Tiotropium + Olodaterol

Type of Study	Test System	Method of Administration	Dose of Tiotropium [a] (µg/kg)	Dose of Olodaterol [a] (µg/kg)	GLP	Doc. Number	Location in CTD
Tio+Olo: Repeat-dose Toxicity, 4 weeks	Rat	Inhalation	0 12.5 333 150 4000	0 75 2000 75 2000	Yes	U[redacted]-1892	4.2.3.2-8
Tio+Olo: Repeat-dose Toxicity, 4 weeks (in combination with 開発コードE* at 0, 29, 87, 290 µg/kg [a])	Rat	Inhalation	0 1 3 10	0 1 3 10	Yes	U[redacted]-1530	4.2.3.7.7-3
Olo: Repeat-dose toxicity, 13 weeks	Rat	Inhalation	NA	50 200 800 2400	Yes	U[redacted]-1342	4.2.3.2-5
Olo: Repeat-dose toxicity, 26 weeks	Rat	Inhalation	NA	50 200 4000	Yes	U[redacted]-1691	4.2.3.2-6
Olo: Carcinogenicity, 104 weeks	Rat	Inhalation	NA	25 75 250	Yes	U[redacted]-2661	4.2.3.4.1-2
Olo: Fertility, early embryonic development	Rat	Inhalation	NA	50 200 3000	Yes	U[redacted]-2297	4.2.3.5.1-1
Olo: Embryo-fetal development	Rat	Inhalation	NA	69 229 1143	Yes	U[redacted]-2534	4.2.3.5.2-1
Olo: Mechanism (erythropoiesis)	Rat	Intravenous	NA	10000 40000	No	U[redacted]-1845	4.2.3.3.2-2

*：新薬承認情報提供時に置き換えた

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

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）

Test Article: Tiotropium + Olodaterol

Type of Study	Test System	Method of Administration	Dose of Tiotropium [a] (µg/kg)	Dose of Olodaterol [a] (µg/kg)	GLP	Doc. Number	Location in CTD
Olo: Embryo-fetal development	Rabbit	Inhalation	NA	835 1800 3921 1737 3706	No	U[redacted]-2535	4.2.3.5.2-2
Olo: Embryo-fetal development	Rabbit	Inhalation	NA	274 914 2741	Yes	U[redacted]-1019	4.2.3.5.2-3
Olo: Exploratory toxicity study	Dog	Intravenous	NA	3 9 27 81	No	U[redacted]-1625	4.2.3.2-20
Olo: Escalating dose toxicity	Dog	Oral, gavage	NA	500 1000 5000	No	U[redacted]-1139	4.2.3.2-22
Olo: Repeat-dose toxicity, 2 weeks	Dog	Intravenous	NA	3.3 9.8 29.5	Yes	U[redacted]-1051	4.2.3.2-21
Olo: Repeat-dose toxicity, 2 weeks	Dog	Inhalation	NA	1 10 30 100	No	U[redacted]-2134	4.2.3.2-11
Olo: Repeat-dose toxicity, 2 weeks	Dog	Oral, gavage	NA	5 16 50 160 500	Yes	U[redacted]-2169	4.2.3.2-23

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

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） Test Article: Tiotropium + Olodaterol

Type of Study	Test System	Method of Administration	Dose of Tiotropium [a] (µg/kg)	Dose of Olodaterol [a] (µg/kg)	GLP	Doc. Number	Location in CTD
Olo: Repeat-dose toxicity, 4 weeks	Dog	Inhalation	NA	2 15 150	Yes	U[redacted]-2146	4.2.3.2-12
Olo: Repeat-dose toxicity, 13 weeks	Dog	Inhalation	NA	5 15 150	Yes	U[redacted]-1317	4.2.3.2-13
Olo: Repeat-dose toxicity, 52 weeks	Dog	Inhalation	NA	15 60 300	Yes	U[redacted]-1740	4.2.3.2-14
Tio+Olo: Escalating dose Toxicity	Dog	Inhalation	5 15 100 200 0.833 2.50 16.7 33.3 10 30 200 400	5 15 100 200 5 15 100 200 5 15 100 200	No	n00177290	4.2.3.2-15
Tio+Olo: Repeat-dose Toxicity, 4 weeks	Dog	Inhalation	0 5 15 150	0 5 15 150	Yes	U[redacted]-1894	4.2.3.2-16
Tio+Olo: Repeat-dose Toxicity, 4 weeks	Dog	Inhalation	0 2.5 25 30 300	0 15 150 15 150	Yes	U[redacted]-1895	4.2.3.2-17

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

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）

Test Article: Tiotropium + Olodaterol

Type of Study	Test System	Method of Administration	Dose of Tiotropium [a] (µg/kg)	Dose of Olodaterol [a] (µg/kg)	GLP	Doc. Number	Location in CTD
Tio+Olo: Repeat-dose Toxicity, 4 weeks (in combination with 開発コードE* at 0, 58, 150, 440 µg/kg [a])	Dog	Inhalation	0 2 5 15	0 2 5 15	Yes	U[redacted]-2354	4.2.3.7.7-4
Tio+Olo: Repeat-dose Toxicity, 13 weeks	Dog	Inhalation	0 15 60 300 0 300	0 15 60 300 300 0	Yes	U[redacted]-2249	4.2.3.2-18
Tio+Olo: Repeat-dose Toxicity, 13 weeks	Dog	Inhalation	0 37.5 300 150 0 300	0 15 120 300 300 0	Yes	U[redacted]-1388	4.2.3.2-19
Olo: Preliminary feasibility study	Juvenile dog	Inhalation	NA	15 100/200/300 [b] 600	No	U[redacted]-1442	4.2.3.7.7-1
Olo: Repeat-dose toxicity, 13 weeks	Juvenile dog	Iinhalation	NA	100 300 1000	Yes	U[redacted]-1257	4.2.3.7.7-2

a: target dose, referring to active moiety.
b: escalating doses (100, 200 and 300 µg/kg) in the first 3 days. From Day 3 onwards: 300 µg/kg/day.

*：新薬承認情報提供時に置き換えた

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

3. トキシコキネティクス：トキシコキネティクス試験成績の一覧 Test Article: Olodaterol

3.1 オロダテロール投与試験におけるトキシコキネティクス

Overview of exposure to olodaterol in toxicity studies after dosing of olodaterol

Study type	Species/ Strain	Route	Dosing duration	Daily dose Olodaterol (µg/kg)[a]	$C_{max,ss}$ (pmol/L) M	$C_{max,ss}$ (pmol/L) F	$AUC_{0-24,ss}$ (pmol·h/L) M	$AUC_{0-24,ss}$ (pmol·h/L) F	GLP	Doc. No./ Location in CTD
Single-dose toxicity	Mouse/ CD-1	Inhalation	1 day	50	8170	5810	28200	20700	Yes	U[redacted]-1975/ 4.2.3.2-2
				200	21800	22700	65000	45100		
				800	140000	155000	266000	229000		
				3200	493000	861000	1440000	994000		
Repeat-dose toxicity	Mouse/ CD-1	Inhalation	13 weeks	50	5110	4320	12100	15400	Yes	U[redacted]-1341/ 4.2.3.2-1
				200	15500	17600	35000	49700		
				800	92200	91200	150000	125000		
				3200	254000	284000	413000	699000		
Carcinogenicity	Mouse/ CD-1	Inhalation	104 weeks	25	2410	3020	5750	5680	Yes	U[redacted]-1065/ 4.2.3.4.1-1
				75	4610	6650	15400	14300		
				250	19300	28400	61200	42800		
Repeat-dose toxicity	Rat/ Wister	Inhalation	2 weeks	0.5	81.7	83.5	NC	NC	No	U[redacted]-2143/ 4.2.3.2-3
				5	163	221	918	685		
				50	3920	3160	11900	10800		
				500	29500	50700	100000	123000		
Repeat-dose toxicity	Rat/ Wister	Intravenous	2 weeks	5	1430	3180	2460	2870	Yes	U[redacted]-1375/ 4.2.3.2-9
				25	17300	20800	13400	17300		
				100	61300	38400	50700	45700		
Repeat-dose toxicity	Rat/ Wister	Oral	2 weeks	500	918	1140	9160	7690	Yes	U[redacted]-2334/ 4.2.3.2-10
				5000	16200	67400	101000	157000		
				50000	1050000	1060000	5150000	4240000		
Repeat-dose toxicity	Rat/ Wister	Inhalation	4 weeks	75	2490	2420	6790	7310	Yes	U[redacted]-2133/ 4.2.3.2-4
				250	13300	7520	23700	21600		
				1250	65700	100000	141000	156000		

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

3.1 オロダテロール投与試験におけるトキシコキネティクス（続き）

Test Article: Olodaterol

Study type	Species/ Strain	Route	Dosing duration	Daily dose Olodaterol (µg/kg)[a]	$C_{max,ss}$ (pmol/L) M	$C_{max,ss}$ (pmol/L) F	$AUC_{0-24,ss}$ (pmol·h/L) M	$AUC_{0-24,ss}$ (pmol·h/L) F	GLP	Doc. No./ Location in CTD
Rrepeat-dose toxicity	Rat/ Wister	Inhalation	13 weeks	50	1970	3130	7820	9470	Yes	U[redacted]-1342/ 4.2.3.2-5
				200	16400	19200	34800	40000		
				800	87700	98800	191000	188000		
				2400	249000	310000	533000	495000		
Repeat-dose toxicity	Rat/ Wister	Inhalation	26 weeks	50	3450	3310	9010	7880	Yes	U[redacted]-1691/ 4.2.3.2-6
				200	13500	12000	43000	32400		
				4000	341000	270000	878000	668000		
Carcinogenicity	Rat/ Wister	Inhalation	104 weeks	25	465	564	2890	2410	Yes	U[redacted]-2661/ 4.2.3.4.1-2
				75	2150	2830	8720	8510		
				250	8810	15100	31000	26600		

Study type	Species/ Strain	Route	Dosing duration	Daily dose Olodaterol (µg/kg)[a]	$C_{0.583,ss}$ (pmol/L) M, 62 d	$C_{0.583,ss}$ (pmol/L) F, 12 d	$C_{max,ss}$ (pmol/L) M	$AUC_{0-24,ss}$ (pmol•h/L) M	GLP	Doc. No./ Location in CTD
Fertility, early embryonic development	Rat/ SD	Inhalation	M: 26 & 62 days F: 12 days	50	1860	1720	NA	NA	Yes	U[redacted]-2297/ 4.2.3.5.1-1
				200	8310	5800	NA	NA		
				3000	208000	191000	NA	NA		

Study type	Species/ Strain	Route	Dosing duration	Daily dose Olodaterol (µg/kg)[a]	$C_{1,ss}$ (pmol/L) M	$C_{1,ss}$ (pmol/L) F	$C_{max,ss}$ (pmol/L) F	$AUC_{0-24,ss}$ (pmol•h/L) F	GLP	Doc. No./ Location in CTD
Embryo-fetal toxicity	Rat; SD females	Inhalation	12 days, GD 6-17	69	NA	3390	NA	NA	Yes	U[redacted]-2534/ 4.2.3.5.2-1
				229	NA	7200	NA	NA		
				TK:229	NA	10900	14400	101000		
				1143	NA	37800	NA	NA		

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

3.1 オロダテロール投与試験におけるトキシコキネティクス（続き）

Test Article: Olodaterol

Study type	Species/ Strain	Route	Dosing duration	Daily dose Olodaterol (µg/kg)[a]	C_{24} (pmol/L) M	C_{24} (pmol/L) F	$C_{max,ss}$ (pmol/L) M	AUC_{0-24} (pmol•h/L) M	GLP	Doc. No./ Location in CTD
Mechanism: erythropoiesis	Rat; Wistar males	Intravenous, slow bolus	1 day	10000 40000	15700 21600	NA NA	3490000 18700000	8770000 33600000	No	U[redacted]-1845/ 4.2.3.3.2-2

Study type	Species/ Strain	Route	Dosing duration	Daily dose Olodaterol (µg/kg)[a]	$C_{t,ss}$ (pmol/L) M	$C_{t,ss}$ (pmol/L) F	$C_{max,ss}$ (pmol/L) F	$AUC_{0-24,ss}$ (pmol•h/L) F	GLP	Doc. No./ Location in CTD
Embryo-fetal toxicity	Rabbit/ NZW, females	Inhalation	5 days	274 [b] 914 [b] 2741 [b]	NA NA NA	NA NA NA	8170 30400 161000	39700 182000 959000	Yes	U[redacted]-1019/ 4.2.3.5.2-3

Study type	Species/ Strain	Route	Dosing duration	Daily dose Olodaterol (µg/kg)[a]	Inhalation duration (h)	$C_{t,ss}$ [c] (pmol/L) F, 1d	$C_{t,ss}$ [c] (pmol/L) F, 5d	$C_{t,ss}$ [c] (pmol/L) F, 14d	GLP	Doc. No./ Location in CTD
Embryo-fetal toxicity	Rabbit/ NZW, females	Inhalation	14 days, GD 6-19	835 1800 3921 1737 [d] 3706 [d]	0.5 1 2 1 2	117000 288000 365000 419000 [d] 242000 [d]	29200 92100 126000 179000 [d] 84800 [d]	23400 141000 101000 136000 [d] 85500 [d]	Yes	U[redacted]-2535/ 4.2.3.5.2-2

Study type	Species/ Strain	Route	Dosing duration	Daily dose Olodaterol (µg/kg)[a]	$C_{max,ss}$ (pmol/L) M	$C_{max,ss}$ (pmol/L) F	$AUC_{0-24,ss}$ (pmol·h/L) M	$AUC_{0-24,ss}$ (pmol·h/L) F	GLP	Doc. No./ Location in CTD
Escalating- dose study	Dog/ Beagle	Intravenous	Escalating dose, total 12 days	3 (day1) 9 (day12) 27 (day 19) 81 (day 27)	26700 74700 193000 691000	26900 88300 256000 641000	4900 13600 38400 133000	5450 16000 46800 137000	No	U[redacted]-1625/ 4.2.3.2-20

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

3.1 オロダテロール投与試験におけるトキシコキネティクス（続き）

Test Article: Olodaterol

Study type	Species/ Strain	Route	Dosing duration	Daily dose Olodaterol (µg/kg)[a]	C_1 (pmol/L) M	C_1 (pmol/L) F	C_{24} (pmol/L) M	C_{24} (pmol/L) F	GLP	Doc. No./ Location in CTD
Escalating- dose study	Dog/ Beagle	Oral	Escalating dose, total 8 days	5000 (day 1) 500 (day 9) 1000 (day 13)	128000 7590 67000	214000 34300 50600	no sample 784 2900	no sample 1550 3590	No	U[redacted]-1139/ 4.2.3.2-22

Study type	Species/ Strain	Route	Dosing duration	Daily dose Olodaterol (µg/kg)[a]	$C_{max,ss}$ (pmol/L) M	$C_{max,ss}$ (pmol/L) F	$AUC_{0-24,ss}$ (pmol·h/L) M	$AUC_{0-24,ss}$ (pmol·h/L) F	GLP	Doc. No./ Location in CTD
Repeat-dose toxicity	Dog/ Beagle	Inhalation	2 weeks	1	NC	26.9	NC	12.3	No	U[redacted]-2134/ 4.2.3.2-11
				10	97.6	271	435	2060		
				30	283	745	1440	4230		
				100	3870	4310	13000	30400		
Repeat-dose toxicity	Dog/ Beagle	Intravenous	2 weeks	3.3	22000	21700	5120	5010	Yes	U[redacted]-1051/ 4.2.3.2-21
				9.8	81900	68500	15600	15500		
				29.5	141000	140000	40400	43900		
Repeat-dose toxicity	Dog/ Beagle	Oral	2 weeks	5	131	129	954	1130	Yes	U[redacted]-2169/ 4.2.3.2-23
				16	312	443	2390	3480		
				50	1130	1890	8580	9100		
				160	5910	6750	37200	31700		
				500	54300	68300	165000	254000		
Repeat-dose toxicity	Dog/ Beagle	Inhalation	4 weeks	2	NA	NA	NA	NA	Yes	U[redacted]-2146/ 4.2.3.2-12
				15	967	860	4270	4320		
				150	6880	6950	27800	35200		
Repeat-dose toxicity	Dog/ Beagle	Inhalation	13 weeks	5	195	67.9	616	689	Yes	U[redacted]-1317/ 4.2.3.2-13
				15	143	258	1540	2080		
				150	2780	3060	18500	18600		

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

3.1 オロダテロール投与試験におけるトキシコキネティクス（続き）

Test Article: Olodaterol

Study type	Species/ Strain	Route	Dosing duration	Daily dose Olodaterol (µg/kg)[a]	$C_{max,ss}$ (pmol/L) M	$C_{max,ss}$ (pmol/L) F	$AUC_{0-24,ss}$ (pmol·h/L) M	$AUC_{0-24,ss}$ (pmol·h/L) F	GLP	Doc. No./ Location in CTD
Repeat-dose toxicity	Dog/ Beagle	Inhalation	52 weeks	15	381	423	2160	3560	Yes	U[redacted]-1740/ 4.2.3.2-14
				60	1620	1490	7970	9910		
				300	8990	11500	46000	50200		
Repeat-dose toxicity	Dog/ Beagle	Inhalation	3 weeks	15	541	729	3770	7730	No	U[redacted]-1442/ 4.2.3.7.7-1
				300 [e]	5010	9180	26800	45400		
				600	25600	19800	97800	82400		
Repeat-dose toxicity	Dog/ Beagle	Inhalation	13 weeks	100	1430	1420	6310	5940	Yes	U[redacted]-1257/ 4.2.3.7.7-2
				300	6470	5290	24100	24700		
				1000	33200	31700	82000	73900		

The toxicokinetic parameters refer to the last sampling day and are given as arithmetic means rounded to 3 significant digits.
$AUC_{0-24,ss}$: AUC within 0 to 24h at steady state
M: male, F: female
GD: Gestation day
NA: not applicable
NC: not calculated
a: target dose, referring to active entity
b: pregnant animals
c: $C_{t,ss}$ = C(end of inhalation); duration of inhalation for each dose is given in column "inhalation duration (h)"
d: mated animals
e: escalating dose in the first 3 days (100/200/300 µg/kg BI 1744 BS); 300 µg/kg from Day 3 onwards

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

3.2 チオトロピウム+オロダテロール投与試験におけるトキシコキネティクス Test Article: Tiotropium + Olodaterol

Overview of exposure to tiotropium in toxicity studies after repeated dosing of Tio+Olo

Study type	Species/ Strain	Route	Dosing duration	Daily dose Tiotropium (µg/kg)[a]	Daily dose Olodaterol (µg/kg)[a]	$C_{max,ss}$ (pmol/L) M	$C_{max,ss}$ (pmol/L) F	$AUC_{0-24,ss}$ (pmol·h/L) M	$AUC_{0-24,ss}$ (pmol·h/L) F	GLP	Doc. No./ Location in CTD
Repeat-dose toxicity	Rat	Inhalation	4 weeks	0	0	-	-	-	-	Yes	U[redacted]-1892/ 4.2.3.2-8
				12.5	75	646	1,040	1,550	2,490		
				333	2000	54,300	83,800	50,400	64,900		
				150	75	5,000	19,300	11,700	21,300		
				4000	2000	543,000	649,000	407,000	475,000		
Repeat-dose toxicity	Rat	Inhalation	4 weeks	0	0	-	-	-	-	Yes	U[redacted]-1893/ 4.2.3.2-7
				75	75	12,700	21,800	29,700	17,400		
				500	500	78,500	115,000	76,300	115,000		
				2000	2000	217,000	374,000	204,000	271,000		
Repeat-dose toxicity with 開発コードE* [c]	Rat	Inhalation	4 weeks	0	0	-	-	-	-	Yes	U[redacted]-1530/ 4.2.3.7.7-3
				1	1	73.4	34.0	65.5	65.5		
				3	3	233	83.3	622	622		
				10	10	709	610	1460	1460		
Escalating-dose toxicity	Dog/ Beagle	Inhalation	3 days b	5	5	956	808	319	585	No	n00177290/ 4.2.3.2-15
				15	15	2,100	2,300	3,440	2,890		
				100	100	11,100	14,800	22,400	24,400		
				200	200	63,900	41,100	83,700	50,300		
				0.833	5	63.7	115	51.2	90.5		
				2.50	15	167	399	453	726		
				16.7	100	762	4,290	5,640	6,710		
				33.3	200	1,560	26,700	3,440	20,600		
				10	5	753	1,560	1,480	2,020		
				30	15	3,530	4,790	5,810	7,360		
				200	100	49,200	41,500	60,400	60,900		
				400	200	50,500	109,000	232,000	112,000		

*：新薬承認情報提供時に置き換えた

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

3.2 チオトロピウム+オロダテロール投与試験におけるトキシコキネティクス（続き） Test Article: Tiotropium + Olodaterol

Study type	Species/ Strain	Route	Dosing duration	Daily dose Tiotropium (µg/kg)[a]	Daily dose Olodaterol (µg/kg)[a]	Cmax,ss (pmol/L) M	Cmax,ss (pmol/L) F	AUC0-24,ss (pmol·h/L) M	AUC0-24,ss (pmol·h/L) F	GLP	Doc. No./ Location in CTD
Repeat-dose toxicity	Dog/ Beagle	Inhalation	4 weeks	0	0	-	-	-	-	Yes	U[redacted]-1894/ 4.2.3.2-16
				5	5	1,070	1,300	2,040	2,780		
				15	15	2,580	3,880	5,590	6,730		
				150	150	47,300	54,100	44,300	69,100		
Repeat-dose toxicity	Dog/ Beagle	Inhalation	4 weeks	0	0	-	-	-	-	Yes	U[redacted]-1895/ 4.2.3.2-17
				2.5	15	552	874	609	1,040		
				25	150	3,600	5,160	5,940	7,060		
				30	15	10,600	8,610	13,500	11,300		
				300	150	58,200	60,700	80,300	86,100		
Repeat-dose toxicity with 開発コードE* [d]	Dog/ Beagle	Inhalation	4 weeks	0	0	-	-	-	-	Yes	U[redacted]-2354/ 4.2.3.7.7-4
				2	2	88.9	83.3	94.6	74.7		
				5	5	575	281	896	337		
				15	15	1050	888	2140	1850		
Repeat-dose toxicity	Dog/ Beagle	Inhalation	13 weeks	0	0	-	-	-	-	Yes	U[redacted]-2249/ 4.2.3.2-18
				15	15	1,500	2,910	2,040	4,290		
				60	60	6,140	7,970	9,310	9,920		
				300	300	45,800	78,300	51,000	69,200		
				0	300	NA	NA	NA	NA		
				300	0	16,700	25,700	19,800	47,600		
Repeat-dose toxicity	Dog/ Beagle	Inhalation	13 weeks	0	0	-	-	-	-	Yes	U[redacted]-1388/ 4.2.3.2-19
				37.5	15	6,730	3,010	7,560	4,900		
				300	120	28,400	28,500	37,800	32,700		
				150	300	28,300	18,400	27,600	24,700		
				0	300	NA	NA	NA	NA		
				300	0	45,700	41,600	51,000	54,100		

NA: not applicable -: could not be quantified/calculated
a: target dose, referring to active entity
b: per dose level
c: coadministration of 0, 29, 87, 290 µg/kg開発コードE* (target dose)
d: coadministration of 0, 58, 150, 440 µg/kg開発コードE* (target dose)

*：新薬承認情報提供時に置き換えた

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

3.3 チオトロピウム+オロダテロール投与試験におけるトキシコキネティクス Test Article: Tiotropium + Olodaterol

Overview of <u>exposure to olodaterol</u> in toxicity studies after repeated dosing of Tio+Olo

Study type	Species/ Strain	Route	Dosing duration	Daily dose Tiotropium (µg/kg)[a]	Daily dose Olodaterol (µg/kg)[a]	$C_{max,ss}$ (pmol/L) M	$C_{max,ss}$ (pmol/L) F	$AUC_{0-24,ss}$ (pmol·h/L) M	$AUC_{0-24,ss}$ (pmol·h/L) F	GLP	Doc. No./ Location in CTD
Repeat-dose toxicity	Rat	Inhalation	4 weeks	0	0	-	-	-	-	Yes	U[redacted]-1892/ 4.2.3.2-8
				12.5	75	7,450	7,730	19,000	19,200		
				333	2000	156,000	229,000	342,000	419,000		
				150	75	4,410	9,700	12,900	22,300		
				4000	2000	148,000	147,000	249,000	274,000		
Repeat-dose toxicity	Rat	Inhalation	4 weeks	0	0	-	-	-	-	Yes	U[redacted]-1893/ 4.2.3.2-7
				75	75	14,800	20,800	44,600	34,900		
				500	500	69,800	83,200	138,000	173,000		
				2000	2000	155,000	225,000	280,000	321,000		
Repeat-dose toxicity with 開発コードE* [c]	Rat	Inhalation	4 weeks	0	0	-	-	-	-	Yes	U[redacted]-1530/ 4.2.3.7.7-3
				1	1	46.0	62.7	54.7	211		
				3	3	151	239	861	1220		
				10	10	295	609	1130	3830		
Escalating-dose toxicity	Dog/ Beagle	Inhalation	3 days [b]	5	5	210	99.5	709	629	No	n00177290/ 4.2.3.2-15
				15	15	362	354	2,450	2,650		
				100	100	2,270	2,670	14,300	14,900		
				200	200	16,800	13,400	75,600	52,300		
				0.833	5	157	192	795	1,330		
				2.50	15	337	679	2,050	3,790		
				16.7	100	1,380	7,420	8,910	25,800		
				33.3	200	3,010	48,800	21,100	82,800		
				10	5	72.6	115	651	633		
				30	15	286	434	2,070	2,610		
				200	100	7,580	6,140	24,700	27,600		
				400	200	5,440	15,900	68,100	54,500		

*：新薬承認情報提供時に置き換えた

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

3.3 チオトロピウム+オロダテロール投与試験におけるトキシコキネティクス（続き） Test Article: Tiotropium + Olodaterol

Study type	Species/ Strain	Route	Dosing duration	Daily dose Tiotropium (µg/kg)[a]	Daily dose Olodaterol (µg/kg)[a]	$C_{max,ss}$ (pmol/L) M	$C_{max,ss}$ (pmol/L) F	$AUC_{0-24,ss}$ (pmol·h/L) M	$AUC_{0-24,ss}$ (pmol·h/L) F	GLP	Doc. No./ Location in CTD
Repeat-dose toxicity	Dog/ Beagle	Inhalation	4 weeks	0	0	-	-	-	-	Yes	U[redacted]-1894/ 4.2.3.2-16
				5	5	190	503	2,560	3,800		
				15	15	747	1,310	5,690	7,670		
				150	150	10,600	16,100	48,800	52,100		
Repeat-dose toxicity	Dog/ Beagle	Inhalation	4 weeks	0	0	-	-	-	-	Yes	U[redacted]-1895/ 4.2.3.2-17
				2.5	15	1,020	1,460	4,120	6,520		
				25	150	9,770	9,940	36,500	48,000		
				30	15	1,300	1,030	6,850	6,950		
				300	150	6,120	8,170	45,200	32,900		
Repeat-dose toxicity with 開発コードE* [d]	Dog/ Beagle	Inhalation	4 weeks	0	0	-	-	-	-	Yes	U[redacted]-2354/ 4.2.3.7.7-4
				2	2	27.6	39.4	25.6	34.1		
				5	5	98.9	56.4	404	550		
				15	15	259	223	1590	1680		
Repeat-dose toxicity	Dog/ Beagle	Inhalation	13 weeks	0	0	-	-	-	-	Yes	U[redacted]-2249/ 4.2.3.2-18
				15	15	231	409	1,850	2,910		
				60	60	1,550	1,540	8,140	7,370		
				300	300	9,540	15,500	43,400	51,000		
				0	300	7,300	7,520	30,600	40,600		
				300	0	NA	NA	NA	NA		
Repeat-dose toxicity	Dog/ Beagle	Inhalation	13 weeks	0	0	-	-	-	-	Yes	U[redacted]-1388/ 4.2.3.2-19
				37.5	15	474	293	2,410	1,890		
				300	120	1,850	2,830	12,300	12,900		
				150	300	12,100	12,600	42,500	48,800		
				0	300	9,110	12,000	38,300	46,500		
				300	0	NA	NA	NA	NA		

NA: not applicable -: could not be quantified/calculated

a: target dose, referring to active entity

b: per dose level

c: coadministration of 0, 29, 87, 290 µg/kg 開発コードE* (target dose)

d: coadministration of 0, 58, 150, 440 µg/kg 開発コードE* (target dose)

*：新薬承認情報提供時に置き換えた

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

4. 毒性試験：使用ロット Test Article: Tiotropium + Olodaterol

4.1 オロダテロール塩酸塩の使用ロット

Drug substance: Olodaterol monohydrochloride

Batch No.	Purity (%)	Specified Impurities (%)				Doc. Number	Type of Study
PROPOSED SPECIFICATION	(100 % - specified impurities)	不純物F* ≤[redacted]%	不純物A* ≤[redacted]%	不純物B* ≤[redacted]%	不純物C* ≤[redacted]%		
Olodaterol							
8460120	99.16	0.31	0.12	0.41	NA	U[redacted]1101	Acute inhalation toxicity mouse
						U[redacted]1113	Acute intravenous toxicity mouse
						U[redacted]1118	Acute oral toxicity mouse
						U[redacted]1100	Acute inhalation toxicity rat
						U[redacted]1112	Acute intravenous toxicity rat
						U[redacted]1065	Acute oral toxicity rat
						U[redacted]2133	4 week inhalation toxicity rat
						U[redacted]2146	4 week inhalation toxicity dog
						U[redacted]1317	13 week inhalation toxicity dog
						U[redacted]1625	Escalating dose intravenous dog
						U[redacted]1051	2 weeks intravenous toxicity dog
						U[redacted]1046	Genotoxicity Ames test
						U[redacted]2188	Genotoxicity mouse lymphoma assay
						U[redacted]2534	Reprotoxicity embryo-fetal development rat
						U[redacted]2535	Reprotoxicity embryo-fetal development rabbit
						U[redacted]1116	Local dermal tolerance rabbit
						U[redacted]2189	Local ocular irritaion rabbit
						U[redacted]1019	Reprotoxicity embryo-fetal development rabbit
3052140	98.65	0.61	0.11	0.63	NA	U[redacted]1139	Escalating dose oral dog
						U[redacted]2169	2 weeks oal toxicity dog
						U[redacted]2297	Reprotoxicity fertility and early embryonic rat
						U[redacted]1341	13 week inhalation toxicity mouse
						U[redacted]1342	13 weeks inhalation toxicity rat
						U[redacted]1975	13 weeks inhalation toxicity mouse

*：新薬承認情報提供時に置き換えた

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

4.1 オロダテロール塩酸塩の使用ロット（続き）

Test Article: Tiotropium + Olodaterol

Drug substance: Olodaterol monohydrochloride

Batch No.	Purity (%)	Specified Impurities (%)				Doc. Number	Type of Study
PROPOSED SPECIFICATION	(100 % - specified impurities)	不純物F* ≤ [redacted]%	不純物A* ≤ [redacted]%	不純物B* ≤ [redacted]%	不純物C* ≤ [redacted]%		
Olodaterol							
8460030	98.90	0.49	0.17	0.44	NA	U [redacted] 2143	2 weeks dose range finding rat
						U [redacted] 2134	2 weeks dose range finding dog
5061001	99.33	0.34	0.13	0.20	NA	U [redacted] 1691	26 weeks inhalation toxicity rat
						U [redacted] 1740	52 weeks inhalation toxicity dog
3052091	99.12	0.63	0.09	0.16	NA	U [redacted] 1375	2 weeks intravenous toxicity rat
						U [redacted] 2334	2 weeks oral toxicity rat
						U [redacted] 2144	Local tolerance intravenous and intramuscular rabbit
						U [redacted] 2164	Local tolerance intra-arterial rabbit
						U [redacted] 2178	Local tolerance paravenous rabbit
						U [redacted] 2297	Reprotoxicity fertility and early embryonic rat
5061021	99.49	0.28	0.09	0.14	NA	U [redacted] 1971	Reprotoxicity pre- and postnatal development rat
						U [redacted] 2661	Carcinogenicity rat
						U [redacted] 1065	Carcinogenicity mouse
						U [redacted] 1442	Preliminary feasibility juvenile dog
						U [redacted] 1257	13 weeks inhalation juvenile dog
4	99.64	0.3	≤ 0.05	≤ 0.05	0.06	U [redacted] 1834	Genotoxicity bone marrow micronucleus
						U [redacted] 1845	Mechanistic investigation erythropoiesis rat

*：新薬承認情報提供時に置き換えた

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

4.1 オロダテロール塩酸塩の使用ロット（続き）

Test Article: Tiotropium + Olodaterol

Drug substance: Olodaterol monohydrochloride

Batch No.	Purity (%)	Specified Impurities (%)[a]							Doc. Number	Type of Study
PROPOSED SPECIFICATION	(Assay)	不純物A*	不純物G* (6.0 min)	不純物G* (6.4 min)	不純物B*	Any unspecif-ied impurity	Sum of impurity-ies	不純物F*		
Olodaterol										
8460261	99.9[b]	≤ 0.05	≤ 0.05	≤ 0.05	0.12	≤ 0.05	0.12	0.41	U[redacted]-1184	Acute inhalation toxicity mouse
									U[redacted]-1201	Acute inhalation toxicity mouse
									U[redacted]-1197	Acute inhalation toxicity mouse
									U[redacted]-1182	Acute inhalation toxicity rat
									U[redacted]-1199	Acute inhalation toxicity rat
									U[redacted]-1185	Acute inhalation toxicity rat
									U[redacted]-1893	4-week inhalation toxicity study in rats
									U[redacted]-1892	4-week inhalation toxicity study in rats
									n00177290	Escalating dose study in dogs
									U[redacted]-1894	4-week inhalation toxicity study in dogs
									U[redacted]-1895	4-week inhalation toxicity study in dogs
06147	99.9[b] 99.8[c] 100.0[d]	0.06	≤ 0.05	≤ 0.05	≤ 0.05	≤ 0.05	0.06	0.4	U[redacted]-2354	4-week inhalation toxicity study in dogs including 開発コードE*
									U[redacted]-1530	4-week inhalation toxicity study in rats including 開発コードE*
									U[redacted]-2249	13-week inhalation toxicity study in dogs
									U[redacted]-1388	13-week inhalation toxicity study in dogs

*：新薬承認情報提供時に置き換えた

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

4.2 チオトロピウム臭化物水和物の使用ロット

Test Article: Tiotropium + Olodaterol

Drug substance: Tiotropium bromide monohydrate

Batch No.	Purity (%)	Specified Impurities (%)										Doc. Number	Type of Study
PROPOSED SPECIFICATION	(Assay)	不純物K* < [redacted]%	不純物S* < [redacted]%	不純物T* < [redacted]%	分解生成物H* < [redacted]%	分解生成物O* < [redacted]%	不純物U* < [redacted]%	Every unspecified impurity < [redacted]%	Total of all impurities < [redacted]%	分解生成物I* < [redacted]%	分解生成物P* < [redacted]%		
Tiotropium													
1012809	100.2 [b] 100.2 [e]	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	U[redacted]1184 U[redacted]1201 U[redacted]1197 U[redacted]1182 U[redacted]1199 U[redacted]1185 U[redacted]1893 U[redacted]1892 n00177290 U[redacted]-1894 U[redacted]-1895	Acute i h. toxicity mouse Acute i h. toxicity mouse Acute i h. toxicity mouse Acute i h. toxicity rat Acute i h. toxicity rat Acute i h. toxicity rat 4-week i h. toxicity in rats 4-week i h. toxicity in rats Escalating dose study in dogs 4-week i h.toxicity study in dogs 4-week i h.study in dogs
1026724	99.8 [b] 99.7 [e]	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	U[redacted]-2354 U[redacted]-1530	4-week i h.toxicity study in dogs including 開発コードE* 4-week i h.toxicity study in rats including 開発コードE*
1029167	99.9 [b] 100.3 [e]	< 0.05	NA	NA	< 0.05	< 0.05	NA	< 0.05	< 0.05	< 0.1	< 0.1	U[redacted]-2249 U[redacted]-1388	13-week i.h.toxicity in dogs 13-week i.h.toxicity in dogs

NA: not applicable
a: at time of release
b: by Titration ($AgNO_3$), tel quell
c: by Titration ($HClO_4$), tel quel
d: by Titration ($HClO_4$), on dry basis (recalculation)
e: by HPLC

*：新薬承認情報提供時に置き換えた

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

5. 単回投与毒性試験 Test Article: Olodaterol

5.1 オロダテロールのマウス単回吸入投与毒性試験

Report Title: BI 1744 CL: Acute toxicity - Acute Toxic Class Method - in mice by inhalation

Location in CTD: 4.2.3.1-1

Species/ Strain	Method of Administration (Vehicle/ Formulation)	Achieved Dose (Olo, mg/kg free base)	Gender and No. per Group	Observed Maximum Non-Lethal Dose (Olo, mg/kg free base)	Approximate Lethal Dose (Olo, mg/kg free base)	Noteworthy Findings	Doc. No.
Mouse Crl:NMRI	Inhalation, nose only, 240 min exposure time (BAC/Na-EDTA solution)	M: 47.7 F: 51.7 both sexes: 49.7	M: 5 F: 5	M: 47.7 F: 51.7 both sexes: 49.7	M: >47.7 F: >51.7 both sexes: >49.7	Day 1 to 4: decreased locomotor activity, ataxia, tremor, closed eyes, abdominal breathing, piloerection.	U[redacted]-1101

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

5.2 チオトロピウム+オロダテロールのマウス単回吸入投与毒性試験 Test Article: Tiotropium+Olodaterol

Report Title: BI 1744 CL and tiotropium bromide (Ba 679 BR): Acute toxicity – Acute Toxic Class Method – in mice by inhalation

Location in CTD: 4.2.3.1-2

Species/ Strain	Method of Administration (Vehicle/ Formulation)	Achieved Dose (Tio+Olo, mg/kg free moiety)	Gender and No. per Group	Observed Maximum Non-Lethal Dose (Tio+Olo, mg/kg free moiety)	Approximate Lethal Dose (Tio+Olo, mg/kg free moiety)	Noteworthy Findings	Doc. No.
Mouse Crl:NMRI	Inhalation, nose only, 240 min exposure time (BAC/Na-EDTA solution)	M: 33.8 + 35.5 F: 35.8 + 37.6 both sexes: 34.8 + 36.6	M: 5 F: 5	M: <33.8 + <35.5 F: 35.8 + 37.6	M: <33.8 + < 35.5 F: >35.8 + >37.6	Mortality: 2 M Clinical findings: closed eyes, decreased locomotor activity, abdominal breathing/hunched posture and rough fur, mydriasis and pupillary rigidity	U[redacted]-1184

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

5.3 チオトロピウム+オロダテロールのマウス単回吸入投与毒性試験 Test Article: Tiotropium+Olodaterol

Report Title: BI 1744 CL and tiotropium bromide (Ba 679 BR) (1:2): Acute toxicity – Acute Toxic Class Method – in mice by inhalation

Location in CTD: 4.2.3.1-3

Species/ Strain	Method of Administration (Vehicle/ Formulation)	Achieved Dose (Tio+Olo, mg/kg free moiety)	Gender and No. per Group	Observed Maximum Non-Lethal Dose (Tio+Olo, mg/kg free moiety)	Approximate Lethal Dose (Tio+Olo, mg/kg free moiety)	Noteworthy Findings	Study No. / Doc. No.
Mouse Crl:NMRI	Inhalation, nose only, 240 min exposure time (BAC/Na-EDTA solution)	M: 40.1 + 21.4 F: 43.7 + 23.3 both sexes: 41.9 + 22.3	M: 5 F: 5	M: <40.1 + <21.4 F: <43.7 + <23.3 both sexes: <41.9 + <22.3	M: <40.1 + <21.4 F: <43.7 + <23.3 both sexes: <41.9 + <22.3	Mortality: 1M, 1F Clinical findings: mydriasis and pupillary rigidity, closed eyes, grooming movements, rough coat, dyspnoea, sedation, and ataxia	U[redacted]-1201

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

5.4 チオトロピウム+オロダテロールのマウス単回吸入投与毒性試験 Test Article: Tiotropium+Olodaterol

Report Title: BI 1744 CL + tiotropium bromide (Ba 679 BR) (6:1): Acute toxicity – Acute Toxic Class Method – in mice by inhalation

Location in CTD: 4.2.3.1-4

Species/ Strain	Method of Administration (Vehicle/ Formulation)	Achieved Dose (Tio+Olo, mg/kg free moiety)	Gender and No. per Group	Observed Maximum Non-Lethal Dose (Tio+Olo, mg/kg free moiety)	Approximate Lethal Dose (Tio+Olo, mg/kg free moiety)	Noteworthy Findings	Doc. No.
Mouse Crl:NMRI	Inhalation, nose only, 240 min exposure time (BAC/Na-EDTA solution)	M: 9.9 + 63.3 4.4 + 28.2 2.4 + 15.7 F: 10.7 + 68.7 4.7 + 30.2 2.6 + 17.2 both sexes: 10.3 + 66.0 4.5 + 29.2 2.5 + 16.4	M: 5 F: 5	M: 2.4 + 15.7 F: 4.7 + 30.2	M: 2.4 + 15.7 - 4.4 + 28.2 F: 4.7 + 30.2 - 10.7 + 68.7	Mortality: 1M and 3 F of the High-Dose group died in the first 4 days after exposure. The remaining mice were killed in a moribund state on Day 4. In the Mid-Dose group 4 male mice died in the first days after exposure. In the Low-Dose group no mortality was observed Clinical findings: mydriasis and pupillary rigidity, closed eyes, sedation, rough coat, dyspnoea, ataxia, peripheral hyperaemia, hyperthermia and kyphosis. Necropsy findings: dilatation of the stomach and intestines in most of the spontaneously died or moribund killed mice. In 3 mice of the High-Dose group the liver was pink-yellow marbled.	U[redacted]-1197

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

5.5 オロダテロールのマウス単回静脈内投与毒性試験

Test Article: Olodaterol

Report Title: BI 1744 CL: Single intravenous dose toxicity study in mice

Location in CTD: 4.2.3.1-5

Species/ Strain	Method of Administration (Vehicle/ Formulation)	Dose (Olo, mg/kg free base)	Gender and No. per Group	Observed Maximum Non-Lethal Dose (Olo, mg/kg free base)	Approximate Lethal Dose (Olo, mg/kg free base)	Noteworthy Findings	Doc. No.
Mouse Crl:NMRI	Intravenous, bolus (0.9% NaCl, pH 4.8)	10 20 40	M: 3 F: 3	both sexes: 20	both sexes: 20 - 40	40 mg/kg: 2M and 1F died 10 and 20 mg/kg: reduced motor activity, ventral recumbency, increased breathing frequency at Day 1 Necropsy findings of the premature deaths: discoloration in various organs	U[redacted]-1113

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

5.6 オロダテロールのマウス単回経口吸入投与毒性試験

Test Article: Olodaterol

Report Title: BI 1744 CL: Single oral (gavage) dose toxicity study in mice

Location in CTD: 4.2.3.1-6

Species/ Strain	Method of Administration (Vehicle/ Formulation)	Dose (Olo, mg/kg free base)	Gender and No. per Group	Observed Maximum Non-Lethal Dose (Olo, mg/kg free base)	Approximate Lethal Dose (Olo, mg/kg free base)	Noteworthy Findings	Doc. No.
Mouse Crl:NMRI	Oral, gavage (0.5% hydroxyl-ethylcellulose Natrosol® 250 HX)	100 316 1000 2000[a]	M: 3 F: 3	both sexes: 1000	M: >1000 F: 1000 – 2000	2000 mg/kg: 2F died 100, 316 and 1000 mg/kg, Day 1: decreased motor activity with an increased breathing frequency. 2000 mg/kg: decreased motor activity with an increased breathing frequency, poor condition (closed eyes on Day 2, piloerection from Day 2 to Day 5). Necropsy findings of the female survivor: enlarged adrenals.	U[redacted]-1118

a: females only

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

5.7 オロダテロールのラット単回吸入投与毒性試験 Test Article: Olodaterol

Report Title: BI 1744 CL: Acute toxicity - Acute Toxic Class Method - in rats by inhalation

Location in CTD: 4.2.3.1-7

Species/ Strain	Method of Administration (Vehicle/ Formulation)	Achieved Dose (Olo, mg/kg free base)	Gender and No. per Group	Observed Maximum Non-Lethal Dose (Olo, mg/kg free base)	Approximate Lethal Dose (Olo, mg/kg free base)	Noteworthy Findings	Doc. No.
Rat CrlGlxBrlHan:WI	Inhalation nose only 240 min exposure time (BAC/Na-EDTA solution)	M: 22.8 F: 26.6 both sexes: 24.7	M: 5 F: 5	M: 22.8 F: 26.6 both sexes: 24.7	M: >22.8 F: >26.6 both sexes: >24.7	Day 1: decreased locomotor activity, closed eyes, abdominal breathing, repetitive nose grooming and increased chewing.	U[redacted]-1100

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

5.8 チオトロピウム+オロダテロールのラット単回吸入投与毒性試験 Test Article: Tiotropium+Olodaterol

Report Title: BI 1744 CL and tiotropium bromide (Ba 679 BR): Acute toxicity – Acute Toxic Class Method – in rats by inhalation

Location in CTD: 4.2.3.1-8

Species/ Strain	Method of Administration (Vehicle/ Formulation)	Achieved Dose (Tio+Olo, mg/kg free moiety)	Gender and No. per Group	Observed Maximum Non-Lethal Dose (Tio+Olo, mg/kg free moiety)	Approximate Lethal Dose (Tio+Olo, mg/kg free moiety)	Noteworthy Findings	Doc. No.
Rat, Crl:WI(Han)	Inhalation, nose only, 240 min exposure time (BAC/Na-EDTA solution)	M: 16.7 + 17.5 F: 19.1 + 20.1 both sexes: 17.9 + 18.8	M: 5 F: 5	M: 16.7 + 17.5 F: 19.1 + 20.1 both sexes: 17.9 + 18.8	M: >16.7 + >17.5 F: >19.1 + >20.1 both sexes: >17.9 + >18.8	mydriasis and papillary rigidity, decreased locomotor activity, abdominal breathing, repetitive nose grooming, pale or red coloured skin, reddish encrustation at nose and mouth, hunched posture and rough coat	U[redacted]-1182

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

5.9 チオトロピウム+オロダテロールのラット単回吸入投与毒性試験 Test Article: Tiotropium+Olodaterol

Report Title: BI 1744 CL + tiotropium bromide (Ba 679 BR) (1:2): Acute toxicity – Acute Toxic Class Method – in rats by inhalation

Location in CTD: 4.2.3.1-9

Species/ Strain	Method of Administration (Vehicle/ Formulation)	Achieved Dose (Tio+Olo, mg/kg free moiety)	Gender and No. per Group	Observed Maximum Non-Lethal Dose (Tio+Olo, mg/kg free moiety)	Approximate Lethal Dose (Tio+Olo, mg/kg free moiety)	Noteworthy Findings	Doc. No.
Rat, Crl:WI(Han)	Inhalation, nose only, 240 min exposure time (BAC/Na-EDTA solution)	M: 19.7 + 10.5 F: 22.7 + 12.1 both sexes: 21.2 + 11.3	M: 5 F: 5	M: 19.7 + 10.5 F: 22.7 + 12.1 both sexes: 21.2 + 11.3	M: >19.7 + >10.5 F: >22.7 + >12.1 both sexes: >21.2 + >11.3	mydriasis and pupillary rigidity, disturbance of bedding, sedation, increased mastication, reduced locomotion, increased grooming movements, dyspnoea, rough coat	U[redacted]-1199

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

5.10 チオトロピウム+オロダテロールのラット単回吸入投与毒性試験 Test Article: Tiotropium+Olodaterol

Report Title: BI 1744 CL + tiotropium bromide (Ba 679 BR) (6:1): Acute toxicity – Acute Toxic Class Method – in rats by inhalation

Location in CTD: 4.2.3.1-10

Species/ Strain	Method of Administration (Vehicle/ Formulation)	Achieved Dose (Tio+Olo, mg/kg free moiety)	Gender and No. per Group	Observed Maximum Non-Lethal Dose (Tio+Olo, mg/kg free moiety)	Approximate Lethal Dose (Tio+Olo, mg/kg free moiety)	Noteworthy Findings	Doc. No.
Rat, Crl:WI(Han)	Inhalation, nose only, 240 min exposure time (BAC/Na-EDTA solution)	M: 4.8 + 30.8 F: 5.5 + 35.5 both sexes: 5.2 + 33.2	M: 5 F: 5	M: 4.8 + 30.8 F: 5.5 + 35.5 both sexes: 5.2 + 33.2	M: >4.8 + >30.8 F: >5.5 + >35.5 both sexes: >5.2 + >33.2	dry mucosa, mydriasis, pupillary rigidity, rough coat, disturbance of bedding, increased mastication, sedation, reduced locomotion, increased grooming movements, dyspnea	U[redacted]-1185

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

5.11 オロダテロールのラット単回静脈内投与毒性試験

Test Article: Olodaterol

Report Title: BI 1744 CL: Single intravenous dose toxicity study in rats

Location in CTD: 4.2.3.1-11

Species/ Strain	Method of Administration (Vehicle/ Formulation)	Dose (Olo, mg/kg free base)	Gender and No. per Group	Observed Maximum Non-Lethal Dose (Olo, mg/kg free base)	Approximate Lethal Dose (Olo, mg/kg free base)	Noteworthy Findings	Doc. No.
Rat CrlGlxBrlHan:WI	Intravenous, bolus (0.9% NaCl, pH 4.8)	10 20 40 80[a]	M: 3 F: 3	40	M: >40 F: 40 – 80	80 mg/kg: 3/3 F died 10 and 20 mg/kg, Day 1: reduced motor activity, ventral recumbency, increased breathing rate 40 mg/kg: reduced motor activity, ventral recumbency, increased breathing rate, piloerection Necropsy findings of the premature deaths: stasis of the lungs, liver and kidneys	U[redacted]-1112

a: females only

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

5.12 オロダテロールのラット単回経口投与毒性試験

Test Article: Olodaterol

Report Title: BI 1744 CL: Single oral (gavage) dose toxicity study in rats

Location in CTD: 4.2.3.1-12

Species/ Strain	Method of Administration (Vehicle/ Formulation)	Dose (Olo, mg/kg free base)	Gender and No. per Group	Observed Maximum Non-Lethal Dose (Olo, mg/kg free base)	Approximate Lethal Dose (Olo, mg/kg free base)	Noteworthy Findings	Doc. No.
Rat CrlGlxBrlHan: WI	Oral, gavage (0.5% hydroxyl-ethylcellulose Natrosol® 250 HX)	100 316 1000	M: 3 F: 3	M: 1000 F: 316	M: >1000 F: 316 - 1000	1000 mg/kg: 2/3F died 100 and 316 mg/kg, Day 1: increased motor activity (15 min post-dose), then decreased motor activity with short phases of sedation, combined with an increased breathing frequency. 1000 mg/kg, Day 1: increased motor activity, then decreased motor activity until Day 3, increased breathing rate and occasional recumbency, piloerection on Days 1-7. Macroscopy of the premature deaths: stasis in the heart, liver and kidneys, dark red discoloration of the lungs	U[redacted]-1065

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

6. 反復投与毒性試験：重要な試験以外の試験 Test Article: Olodaterol

6.1 オロダテロールのラット吸入投与用量設定試験

Report Title: BI 1744CL: 2 week inhalation dose range finding study in rats

Species/Strain:	Rat/Crl:WI (GLx/BRL/Han) IGS BR	**Duration of Dosing:**	14 days	**Doc. No.:**	U[redacted]-2143
Initial Age:	6-7 weeks	**Duration of Postdose:**	NA	**Location in CTD:**	4.2.3.2-3
Date of First Dose:	[redacted]	**Method of Administration:**	Inhalation, nose only 9 min exposure time per day	**GLP Compliance:**	No
		Vehicle/Formulation:	BAC/Na-EDTA solution		

Special Features: Integrated micronucleus test
No Observed Adverse Effect Level: NA

Daily Achieved Dose (Olo, µg/kg free base)		**0 Vehicle Control**		**0.422**		**4.26**		**40.1**		**538**	
Number of Animals (main study + TK)		**M: 5+6**	**F: 5+6**	**M: 5+6**	**F: 5+6**	**M: 5+6**	**F: 5+6**	**M: 5+6**	**F: 5+6**	**M: 5+6**	**F: 5+6**
Toxicokinetics											
AUC_{0-24} (pmol·h/L)	**Day 1**	NC	NC	NC	NC	614	1410	7850	8790	195000	197000
	Day 14	NC	NC	NC	NC	918	685	11900	10800	100000	123000
Noteworthy Findings											
Died or Sacrificed Moribund:		0	0	2[b]	0	0	0	0	0	0	0
Body Weight (%[a]) :	**Week 2**	242g	164g	+1	+5	+2	+7*	+7	+12***	+9	+13***
Food Consumption (%[a]) :											
	Week 1	19.5g	14.0g	+1	+3	+6**	+5	+14***	+9**	+14***	+12***
	Week 2	19.6g	14.0g	+0	+4	+3	+7*	+11***	+14***	+17***	+19***
Clinical Observations:		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ophthalmology:		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

6.1 オロダテロールのラット吸入投与用量設定試験（続き）

Doc. No.: U[redacted]-2143 (Continued)

Daily Achieved Dose (Olo, µg/kg free base)	**0 Vehicle Control**		**0.422**		**4.26**		**40.1**		**538**	
Number of Animals (main study + TK)	**M: 5+6**	**F: 5+6**	**M: 5+6**	**F: 5+6**	**M: 5+6**	**F: 5+6**	**M: 5+6**	**F: 5+6**	**M: 5+6**	**F: 5+6**
Haematology:	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Blood Chemistry:	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Urinalyses:	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Organ Weights:	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gross Pathology:	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Histopathology:										
Nasal cavity:										
respiratory epithelial disorganisation	1	4	4	1*	4	1*	2	0**	2	2
goblet cell hyperplasia	1	3	3	0*	2	1	2	1	1	0*
Larynx:										
squamous metaplasia	0	1	0	0	0	0	0	0	3	4
cartilage necrosis (U-shaped cartilage)	0	0	0	0	0	0	0	0	2	4*
Additional Examinations:										
Micronucleus test	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

NC: not calculated - : no noteworthy findings *: p<0.05 **: p<0.01 ***: p<0.001

a : for controls, group means are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown. Statistical significance is based on actual data.

b: one died during blood sampling, and another was killed due to damaged eye during blood sampling.

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

6.2 オロダテロールのイヌ吸入投与用量設定試験

Test Article: Olodaterol

Report Title: BI 1744CL: 2 week inhalation dose range finding study in dogs

Species/Strain:	Dog/Beagle	**Duration of Dosing:**	14 days	**Doc. No.:**	U[redacted]-2134
Initial Age:	6-7 months	**Duration of Postdose:**	NA	**Location in CTD:**	4.2.3.2-11
Date of First Dose:	[redacted]	**Method of Administration:**	Inhalation, face mask with oropharyngeal tube 4 min exposure time per day	**GLP Compliance:**	No
		Vehicle/Formulation:	BAC/Na-EDTA solution		
Special Features:	None				
No Observed Adverse Effect Level:	9.5 µg /kg/day, Olo (free base)				

Daily Achieved Dose (Olo, µg/kg free base)		**0 Vehicle Control**		**1.3**		**9.5**		**32**		**116**	
Number of Animals		**M: 2**	**F: 1**	**M: 2**	**F: 2**	**M: 2**	**F: 2**	**M: 2**	**F: 2**	**M: 2**	**F: 2**
Toxicokinetics											
AUC_{0-24} (pmol·h/L]	**Day 1**	NC	NC	9.77	37.2	421	2340	1290	2990	8500	18200
	Day 13	NC	NC	NC	12.3	435	2060	1440	4230	13000	30400
Noteworthy Findings											
Died or Sacrificed Moribund:		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Body Weight (%[a]) :	**Week 2**	7.0kg	7.2kg	+6	-3	+19	+17	+17	+3	+19	+6
Food Consumption (%[a]) :	**Week 2**	276g	182g	-14	+29	-15	+34	+16	+79	+18	+35
Clinical Observations:											
Increased heart rate/force [b]		-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
Ophthalmology:		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cardiovascular investigations:											
Heart Rate		-	-	Mainly in 32 and 116 µg/kg/day group animals, heart rate and heart force were increased. As the study progressed, clinical signs became less prominent.							
Electrocardiogram		-	-	In some animals, a slight increase in heart rate associated with a minimal decrease in PR- and QT-interval. When QT was corrected for HR (QTc), there were no differences with respect to controls.							
Blood pressure		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

6.2 オロダテロールのイヌ吸入投与用量設定試験（続き） Doc. No.: U[redacted]-2134 (Continued)

Daily Achieved Dose (Olo, µg/kg free base)	**0 Vehicle Control**		**1.3**		**9.5**		**32**		**116**	
Number of Animals	**M: 2**	**F: 1**	**M: 2**	**F: 2**	**M: 2**	**F: 2**	**M: 2**	**F: 2**	**M: 2**	**F: 2**
Haematology:	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Blood Chemistry:	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Urinalyses:	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Organ Weights:	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gross Pathology:	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Histopathology:										
Liver: glycogen vacuolisation	0	0	0	0	0	0	2	2	2	2

NC: not calculated

a: for controls, group means are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown.

b: Increased heart force/rate during dosing/up to ca 3-4h after dosing with marked accommodation from Day 4 -:no noteworthy findings +: finding noted

No statistical analyses performed.

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

6.3 チオトロピウム+オロダテロールのイヌ吸入投与用量設定試験 Test Article: Tiotropium+Olodaterol

Report Title: BI 1744 CL and tiotropium bromide (Ba 679 BR): Exploratory escalating dose toxicity study in Beagle dogs by inhalation

Species/Strain:	Dog, Beagle, Marshall	**Duration of Dosing:**	4 weeks 3 days per week, 4-day period without treatment	**Doc. No.:**	n00177290
Initial Age:	10-11 months	**Duration of Postdose:**	-	**Location in CTD:**	4.2.3.2-15
Date of First Dose:	[redacted]	**Method of Administration:**	Inhalation, face mask with oropharyngeal tube 10 min exposure time per day	**GLP Compliance:**	No
Special Feature:	None	**Vehicle/Formulation:**	BAC/Na-EDTA solution		
Number of Animals	2/group/sex				

	Week 1		Week 2		Week 3		Week 4	
Number of Animals	**M:2**	**F:2**	**M:2**	**F:2**	**M:2**	**F:2**	**M:2**	**F:2**
Daily Achieved Dose (Tio+Olo, µg /kg free moiety)	Week 1:		Week 2:		Week 3:		Week 4:	
Group 1	0 + 0		0 + 0		0 + 0		0 + 0	
Group 2	5.3 + 5.9		16 + 17		98 + 102		207 + 224	
Group 3	0.8 + 5.2		2.0 + 12		12 + 78		31 + 194	
Group 4	7.4 + 4.1		33 + 17		166 + 90		380 + 185	
Toxicokinetics: AUC_{0-24} (pmol·h/L):								
Tiotropium Groups 2/3/4	452/70.8/1750		3160/590/6590		23400/6350/60700		67000/12000/172000	
Olodaterol Groups 2/3/4	669/1060/642		2550/2920/2340		14600/20200/26100		64000/51900/61300	
Noteworthy Findings								
Died or Sacrificed Moribund:	-		-		-		-	
Body Weight:	-		-		-		-	
Clinical Observations (treated groups):	-		-		dry mucosa of nose and mouth, mydiasis with or without pupillary rigidity, increased palpable heart rate			
Electrocardiography (treated groups):								
Heart rate	-		↑		↑, severe		↑, severe	
ECG morphology	-		-		-		-	

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

6.3 チオトロピウム+オロダテロールのイヌ吸入投与用量設定試験（続き） Doc. No.: n00177290 (Continued)

	Week 1		Week 2		Week 3		Week 4	
Number of Animals	**M:2**	**F:2**	**M:2**	**F:2**	**M:2**	**F:2**	**M:2**	**F:2**
Daily Achieved Dose (Tio+Olo, µg /kg free moiety)	Week 1:		Week 2:		Week 3:		Week 4:	
Group 1	0 + 0		0 + 0		0 + 0		0 + 0	
Group 2	5.3 + 5.9		16 + 17		98 + 102		207 + 224	
Group 3	0.8 + 5.2		2.0 + 12		12 + 78		31 + 194	
Group 4	7.4 + 4.1		33 + 17		166 + 90		380 + 185	
Hematology (treated groups):								
Platelet Count	Groups 2M, 2F, 3F ↑		Groups 2M, 3F ↑		Group 2M ↑		Groups 2M,3M,4M, 4F ↑	
Serum Chemistry (treated groups):								
ALT	Groups 3M, 4M, 4F ↑		Groups 3M, 4M, 3F, 4F↑		Groups 3M, 4M, 3F ↑		Groups 2M, 3M, 4M, 3F ↑	
ALP	Group 4M ↑		Group 4M ↑		Group 3M, 4M , 3F↑		Group 3M, 4M ↑	
GLDH	Group 3F, 4F ↑		Group 3F, 4F ↑		Group 3F ↑		Group 3F ↑	
CK	Group 2M, 3M, 4M ↑		Group 3M, 4M ↑		Group 3M, 4M ↑		Group 3M ↑	
Triglycerides	Groups 2M, 3M, 4M, 2F, 3F ↑		Groups 3M, 4M, 2F, 3F ↑		Groups 3M, 3F ↑		Group 3M ↑	
Glucose	Groups 3M, 4M, 2F, 3F, 4F ↓		Groups 2M, 3M, 4M, 3F, 4F ↓		Groups 2M, 3M, 2F, 3F, 4F ↓		Groups 2M, 3M, 4M, 2F, 3F, 4F ↓	
Potassium	Groups2M, 4M, 2F, 3F, 4F ↑		Groups 2M, 4M, 2F, 3F, 4F ↑		Groups 3F, 4F ↑		Groups 2M, 3M, 4M, 2F, 3F, 4F ↑	
Organ Weights (treated groups):	The animals of Group 2 to 4 tended to have a mild increase in liver weight.							
Gross Pathology (treated groups):	Gross pathology revealed lesions on palate due to pharmacologically induced dry mucosa and mechanical irritation of the oropharyngeal tube.							
Histopathology (treated groups):	Histopathological examinations confirmed the gross lesions of the palate and revealed sporadic changes in the epithelium of the trachea as well as slight increased cytoplasmatic glycogen storage of the hepatocytes. In the heart minimal to slight fibrosis and mineralization of the papillary muscle and a focal parietal edema were seen.							

-: no noteworthy findings
↑: increase, ↓: decrease

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

6.4 オロダテロールのイヌ静脈内投与用量設定試験

Test Article: Olodaterol

Report Title: BI 1744: Exploratory toxicity study in the beagle dog after intravenous injection

Location in CTD: 4.2.3.2-20

Species/ Strain	Method of Administration (Vehicle/Formulation)	Duration of Dosing (days)	Doses (Olo, µg/kg, free base)	Gender and No. per Group	NOAEL (Olo, µg/kg, free base)	Noteworthy Findings	Doc. No.
Dog Beagle	Intravenous, slow bolus (2 min) (physiological saline (pH 3-4))	Escalating dose Day 1-4 Day 5-7 Day 12-13/14 Day 19-20/21 Day 27	3 9 9 and 27 27 and 81 81	M: 2 F: 2	Not applicable	Increase in heart rate (and strength of heart beat) ca. 1 h post dose ≥ 9 µg/kg: soft feces, emesis, salivation and dry noses It was concluded that a daily intravenous dose of 27 µg/kg BI 1744 BS would be suitable for the subsequent 2-week intravenous (slow bolus) toxicity study of BI 1744 CL.	U[redacted]-1625

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

6.5 オロダテロールのイヌ経口投与用量設定試験

Test Article: Olodaterol

Report Title: BI 1744 CL: Escalating dose toxicity study in the beagle dog after oral administration Letter Report (non-GLP)

Location in CTD: 4.2.3.2-22

Species/ Strain	Method of Administration (Vehicle/Formulation)	Duration of Dosing (days)	Doses (Olo, µg/kg, free base)	Gender and No. per Group	NOAEL (Olo, µg/kg, free base)	Noteworthy Findings	Doc. No.
Dog/ Chbb Beagle	Oral (Demineralised water adjusted to ca. pH 4)	1 3 4	5.0 0.5 1.0	M: 2 F: 2	Not applicable	5 mg/kg: Subdued; reddening of skin and mucosa (slight to severe) of the oral cavity; slight to severe swelling of ears, head and/or orbital region; slight to severe dryness of nose and/or mucosa; increased heart rate (>200bpm); discoloured lacrimal discharge 0.5 - 1.0 mg/kg: Increased heart rate (less pronounced than at 5 mg/kg); reddening of mucosa and skin (slight to severe); dryness of nose and mucosa (slight to severe).	U[redacted]-1139

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

7. 反復投与毒性試験：重要な試験 Test Article: Olodaterol

7.1 オロダテロールのマウス反復吸入投与毒性試験

Report Title: BI 1744CL: Single Dose Inhalation Toxicokinetic Study in Mice

Species/Strain:	Mouse/CD-1	**Duration of Dosing:**	1 day	**Doc. No.:**	U[redacted]-1975
Initial Age:	8-10 Weeks	**Duration of Postdose:**	NA	**Location in CTD:**	4.2.3.2-2
Date of First Dose:	[redacted]	**Method of Administration:**	Inhalation, nose only 35 min exposure time per day	**GLP Compliance:**	Yes
		Vehicle/Formulation:	BAC/Na-EDTA solution		
Special Features:	None	**No Observed Adverse-Effect Level:**	NA		

Brief conclusion: In conclusion, after a single snout inhalation administration of olodaterol to mice, inhalation doses of 69, 196, 930 and 3033 µg BI 1744 BS/kg were achieved. Toxicokinetic investigations revealed that the variability of the olodaterol plasma concentrations was moderate. The exposure to olodaterol was moderate (69 µg/kg) to high (3033 µg/kg) and AUC_{0-24}-data increased almost proportionally with dose. The olodaterol plasma concentrations in males and females were in the same order of magnitude.

Daily Achieved Dose (Olo, µg/kg free base)	**Air Control 0**		**Vehicle Control 0**		**Low Dose 69**		**Intermediate Dose I 196**		**Intermediate Dose II 930**		**High Dose 3033**	
Number of Animals	**M: 10**	**F: 10**	**M: 10**	**F: 10**	**M: 10**	**F: 10**	**M: 10**	**F: 10**	**M: 10**	**F: 10**	**M: 10**	**F: 10**
Toxicokinetics: (2/animals/sex/group/timepoint)												
AUC_{0-24} (pmol h/L)												
Day 1	NA	NA	NA	NA	28200	20700	65000	45100	266000	229000	1440000	994000
C_{max} (obs) (pmol/L)												
Day 1	NA	NA	NA	NA	8170	5810	21800	22700	140000	155000	493000	861000
Body Weight (%[a])	36.4 g	27.8 g	-1	-1	5	0	3	-1	4	-3	1	-3

NA: not applicable

a: on the morning prior to exposure. For Air Control, group means are shown. For Vehicle Control and treated groups, percent differences from Air Control are shown.

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

7.2 オロダテロールのマウス反復吸入投与毒性試験

Test Article: Olodaterol

Report Title: BI 1744CL: 13-week inhalation MTD study in mice

Species/Strain:	Mouse/CD-1	**Duration of Dosing:**	13 weeks	**Doc. No.:**	U[redacted]-1341
Initial Age:	8-9 Weeks	**Duration of Postdose:**	NA	**Location in CTD:**	4.2.3.2-1
Date of First Dose:	[redacted]	**Method of Administration:**	Inhalation, nose only 35 min exposure time per day	**GLP Compliance:**	Yes
		Vehicle/Formulation:	BAC/Na-EDTA solution		

Special Features: None

No Observed Adverse Effect Level: 63µg/kg/day, Olo (free base)

Daily Achieved Dose (Olo, µg/kg free base)		**Air Control** 0		**Vehicle Control** 0		**Low Dose** 63		**Intermediate Dose I** 211		**Intermediate Dose II** 900		**High Dose** 3258	
Number of Animals (main study + TK)		**M: 15+20**	**M: 15+20**	**F: 15+20**	**M: 15+20**	**F: 15+20**	**M: 15+20**	**F: 15+20**	**M: 15+20**	**F: 15+20**	**M: 15+20**	**F: 15+20**	**M: 15+20**
Toxicokinetics													
AUC_{0-24} (pmol·h/L)	**Day 1**	NC	NC	NC	NC	69900	54300	187000	177000	590000	496000	1250000	1410000
	Day 87	NC	NC	NC	NC	12100	15400	35000	49700	150000	125000	413000	699000
Noteworthy Findings													
Died or Sacrificed Moribund:		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Body Weight (%[a]):	**Week 13**	36g	31g	38g	32g	+3	+3	+8**	+6	+5	+3	+3	+6
Food Consumption (%[a]):	**Week 13**	5.1g	4.5g	5.3g	4.7g	+2	+0	+8	+11	+9	+17*	+4	+21**
Clinical Observations:													
Excess salivation[b]		+	+	+	+	++	++	++	++	++	++	++	++
Increased muscle mass[c]		-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

7.2 オロダテロールのマウス反復吸入投与毒性試験（続き）

Doc. No.: U[redacted]-1341 (Continued)

Daily Achieved Dose (Olo, µg/kg free base)	0 Air Control		0 Vehicle Control		63		211		900		3258	
Number of Animals (main study + TK)	M: 15+20	F: 15+20	M: 15+20	F: 15+20	M: 15+20	F: 15+20	M: 15+20	F: 15+20	M: 15+20	F: 15+20	M: 15+20	F: 15+20
Haematology[d]:	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Blood Chemistry (%[a]):												
Triglyceride (mmol/L)	1.55	1.08	1.91	2.46***	-17	-37**	-41***	-57***	-28**	-39**	-45***	-66***
Potassium (mmol/L)	3.7	3.9	4.1	3.8	+17**	+34***	+20***	+18**	+7	+5	+12*	+21***
Organ Weights (%[a]):												
Lung												
absolute weight (g)	0.19	0.18	0.20	0.19	+15**	+21***	+20***	+26***	+35***	+21***	+10**	+16***
% body weight	0.560	0.656	0.539	0.638	+15***	+16***	+16***	+18***	+32***	+13**	+15***	+14***
% brain weight	40.484	36.594	40.621	38.288	+16**	+21***	+22***	+22***	+42***	+23***	+18***	+17**
Spleen												
absolute weight (g)	0.075	0.082	0.077	0.092	+14	+10	+18*	+26***	+25**	+21**	+16	+17*
% body weight	0.2208	0.2920	0.2107	0.2939	+14	+12	+11	+26***	+18	+19*	+15	+20**
% brain weight	15.827	16.287	15.944	17.861	+15	+16*	+18*	+30***	+25**	+28***	+19*	+22**
Heart												
absolute weight (g)	0.21	0.16	0.20	0.15	+5	+20**	+10	+27***	+10	+20**	+5	+20***
% body weight	0.606	0.588	0.557	0.496	+4	+18**	+5	+25***	+3	+15*	+3	+20***
% brain weight	43.219	32.578	42.155	29.962	+5	+22***	+9	+29***	+9	+24***	+5	+23***
Ovaries												
absolute weight (g)		0.0228		0.0274		-16		+8		+42		+68*
% body weight		0.0821		0.0915		-17		+3		+37		+63
% brain weight		4.5493		5.5553		-14		+6		+45*		+39*
Uterus												
absolute weight (g)		0.20		0.25		+28*		+16		+20		+28*
% body weight		0.725		0.805		+29*		+16		+19		+30*
% brain weight		39.551		50.265		+29*		+16		+24		+26

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

7.2 オロダテロールのマウス反復吸入投与毒性試験（続き） Doc. No.: U[redacted]-1341 (Continued)

Daily Achieved Dose (Olo, µg/kg free base)	0 Air Control		0 Vehicle Control		63		211		900		3258	
Number of Animals (main study + TK)	M: 15+20	F: 15+20	M: 15+20	F: 15+20	M: 15+20	F: 15+20	M: 15+20	F: 15+20	M: 15+20	F: 15+20	M: 15+20	F: 15+20
Gross Pathology:												
Thickened uterus		0		0		0		0		0		8
Histopathology:												
Larynx:												
transitional cell hyperplasia	0	0	12	5	13	13	11	14	9	10	0	0
squamous metaplasia	0	0	0	0	0	0	4	0	6	5	15	15
Ovary:												
many corpora lutea[d]		3		2		0		0		0		8
Uterus:												
cystic glands[d]		2		1		0		0		0		10
myometrial hypertrophy[d]		0		0		0		0		0		15

NC: not calculated

a: group means are shown for the air and vehicle control groups, and percent differences from the vehicle control group for the treated groups. Statistical significance is based on actual data. Statistical differences are from the air control group for the vehicle control group, and from the vehicle control group for the treated groups.

*: $p<0.05$, **: $p<0.01$, ***: $p<0.001$

b: += isolated, ++= occasional

c: -= no noteworthy findings, += mild

d: number of animals affected

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

7.3 オロダテロールのラット反復吸入投与毒性試験

Test Article: Olodaterol

Report Title: BI 1744CL: 4 week inhalation toxicity study in rats with 4 week recovery

Species/Strain:	Rat/HsdBrl Han:WIST	**Duration of Dosing:**	4 weeks	**Doc. No. :**	U[redacted]-2133
Initial Age:	7-8 weeks	**Duration of Postdose:**	4 weeks	**Location in CTD:**	4.2.3.2-4
Date of First Dose:	[redacted]	**Method of Administration:**	Inhalation, nose only 35 min exposure time per day	**GLP Compliance:**	Yes
		Vehicle/Formulation:	BAC/Na-EDTA solution		

Special Features: Integrated micronucleus test
No Observed Adverse Effect Level: 260 µg/kg/day, Olo (free base)

Daily Achieved Dose (Olo, µg/kg free base)		**0 Vehicle Control**		**78**		**260**		**1360**	
Number of Animals (main study + recovery + TK)		**M: 10+8+12**	**F: 10+8+12**	**M: 10+0+12**	**F: 10+0+12**	**M: 10+0+12**	**F: 10+0+12**	**M: 10+8+12**	**F: 10+8+12**
Toxicokinetics									
AUC_{0-24} (pmol·h/L)	**Day 1**	NC	NC	8420	5740	32100	21600	186000	172000
	Day 7	NC	NC	7520	5280	28100	23000	182000	182000
	Day 28	NC	NC	6790	7310	23700	21600	141000	156000
Noteworthy Findings									
Died or Sacrificed Moribund:		0	0	0	0	1[b]	0	0	0
Body Weight (%[a]):	**Week 4**	291g	192g	+4	+6	+4	+8*	+8**	+10**
	Recovery Week 4	331g	216g					+8	+3
Food Consumption (%[a]):	**Week 4**	21.0g	15.1g	+8	+9*	+7	+9*	+14**	+14**
	Recovery Week 4	21.2g	14.9g					+9	+5
Respiratory Measurements (%[a]):									
Tidal Volume (mL):	**Week 4**	1.248	0.865	+15	+35	+64	+64	+37	+79
	Recovery Week 4	1.656	1.312					-8	-5

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

7.3 オロダテロールのラット反復吸入投与毒性試験（続き） Doc. No. U[redacted]-2133 (Continued)

Daily Achieved Dose (Olo, µg/kg free base)		0 Vehicle Control		78		260		1360	
Number of Animals (main study + recovery + TK)		M: 10+8+12	F: 10+8+12	M: 10+0+12	F: 10+0+12	M: 10+0+12	F: 10+0+12	M: 10+8+12	F: 10+8+12
Blood Chemistry (%[a]):									
AST (IU/L)	**Week 4**	80	71	+10*	+4	+18***	+13*	+16***	+13*
	Recovery Week 4	78	69					+1	-1
ALT (IU/L)	**Week 4**	58	41	+2	+12	+14	+15*	+7	+27***
	Recovery Week 4	48	40					+2	-3
Glucose (mmol/L)	**Week 4**	6.38	6.93	-12***	-12**	-13***	-25***	-17***	-20***
	Recovery Week 4	7.68	7.57					-2	-1
Organ Weights (%[a]):									
Heart									
absolute	**Week 4**	0.97	0.76	+11	+13*	+16**	+16**	+19**	+14**
	Recovery Week 4	1.08	0.81					+11	+6
% body weight	**Week 4**	0.327	0.396	+9*	+7	+15***	+6	+13***	+2
	Recovery Week 4	0.326	0.379					+3	+1
% brain weight	**Week 4**	50.2	43.2	+14*	+14**	+21***	+13**	+21***	+13**
	Recovery Week 4	56.0	46.3					+11	+4
Thymus									
absolute	**Week 4**	0.482	0.364	-22**	+5	-29***	+4	-21**	+5
	Recovery Week 4	0.396	0.358					-1	+8
% body weight	**Week 4**	0.1620	0.1899	-24***	-2	-30***	-4	-25***	-7
	Recovery Week 4	0.1184	0.1679					-7	+3
% brain weight	**Week 4**	24.9859	20.5934	-20**	+5	-27**	+3	-19*	+4
	Recovery Week 4	20.3806	20.5386					-1	+5

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

7.3 オロダテロールのラット反復吸入投与毒性試験（続き） Doc. No. U[redacted]-2133 (Continued)

Daily Achieved Dose (Olo, µg/kg free base)		0 Vehicle Control		78		260		1360	
Number of Animals (main study + recovery + TK)		M: 10+8+12	F: 10+8+12	M: 10+0+12	F: 10+0+12	M: 10+0+12	F: 10+0+12	M: 10+8+12	F: 10+8+12
Histopathology	**Week 4**								
Lungs:	**alveolar macrophage accumulation**	1	2	2	5	3	5	5	6
Nasal cavity:	**increased goblet cells**	3	1	4	2	4	3	3	2
Larynx:	**squamous metaplasia**	0	2	0	1	2	2	4	3
	cartilage necrosis	1	1	0	0	2	1	2	5
Histopathology	**Recovery Week 4**								
Lungs:	**alveolar macrophage accumulation**	1	1					0	3
Nasal cavity:	**increased goblet cells**	3	1					2	2
Larynx:	**squamous metaplasia**	0	0					0	1
	cartilage necrosis	2	1					3	4
Additional Examinations:									
Micronucleus test		-	-	-	-	-	-	-	-

NC: not calculated *: p<0.05 **: p<0.01 ***: p<0.001

- : no noteworthy findings

a: for controls, group means are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown. Statistical significance is based on actual data.

b: accidental death unrelated to treatment.

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

7.4 オロダテロールのラット反復吸入投与毒性試験

Test Article: Olodaterol

Report Title: BI 1744CL: 13 week inhalation MTD study in rats with a 4-week recovery period

Species/Strain:	Rat/Crl:WI(Han)	**Duration of Dosing:**	13 weeks	**Report No.:**	U[redacted]-1342
Initial Age:	6-7 weeks	**Duration of Postdose:**	4 weeks	**Location in CTD:**	4.2.3.2-5
Date of First Dose:	[redacted]	**Method of Administration:**	Inhalation, nose only 35 min exposure time per day	**GLP Compliance:**	Yes
		Vehicle/Formulation:	BAC/Na-EDTA solution		

Special Features: None
No Observed Adverse Effect Level: 239 µg/kg/day, Olo (free base)

Daily Achieved Dose (Olo, µg/kg free base)	**0 Air Control**		**0 Vehicle Control**		**62**		**239**		**971**		**2833**	
Number of Animals (main study + TK)	**M: 10+8[a]**	**F: 10+8[a]**	**M: 10+8[a]**	**F: 10+8[a]**	**M: 10+8**	**F: 10+8**	**M: 10+8**	**F: 10+8**	**M: 10+8**	**F: 10+8**	**M: 10+8[a]**	**F: 10+8[a]**
Toxicokinetics												
AUC_{0-24} (pmol·h/L)												
Day 1	NC	NC	NC	NC	7220	6720	58100	33700	201000	161000	712000	535000
Day 91	NC	NC	NC	NC	7820	9470	34800	40000	191000	188000	533000	495000
Noteworthy Findings												
Died or Sacrificed Moribund:	0	0	0	0	0	0	1[b]	0	0	0	0	0
Body Weight (%[c]): Week 13	372g	242g	381g	251g	+4	+0	+1	+1	+3	+7*	-1	+3
Recovery Week 4	400g	249g	419g	268g							-7	-4
Food Consumption (%[c]):												
Week 13	20.7g	15.9g	21.4g	17.0g	+5	+3	+3	+5	+10*	+6	+5	+8
Recovery Week 4	21.7g	16.0g	22.4g	17.8g							-2	-9
Clinical Observations:												
Salivation	-	-	-	-	+/-	-	+/-	+/-	+	+	++	++
Ophthalmology:	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

7.4 オロダテロールのラット反復吸入投与毒性試験（続き） Doc. No.: U[redacted]-1342 (Continued)

Daily Achieved Dose (Olo, µg/kg free base)		0 Air Control		0 Vehicle Control		62		239		971		2833	
Number of Animals (main study + TK)		M: 10+8[a]	F: 10+8[a]	M: 10+8[a]	F: 10+8[a]	M: 10+8	F: 10+8	M: 10+8[a]	F: 10+8[a]	M: 10+8[a]	F: 10+8[a]	M: 10+8	F: 10+8
Haematology (%[c]):													
Total WBC (10^9/L)	**Week 7**	4.74	3.32	4.42	3.06	+50***	+49**	+35**	+71***	+52***	+62***	+51***	+72***
	Week 13	4.18	3.11	4.43	3.20	+33**	+20	+18	+60***	+39***	+35**	+36***	+51***
	Recovery Week 4	5.25	2.95	4.61	2.88							-12	+19
Neutrophils (10^9/L)	**Week 7**	0.73	0.43	0.71	0.43	+99***	+74**	+83***	+116***	+94***	+95***	+108***	+88**
	Week 13	0.68	0.61	0.74	0.47	+77**	+32	+69**	+57***	+91***	+47**	+99***	+51**
	Recovery Week 4	1.22	0.55	1.11	0.61							-14	+0
Lymphocytes (10^9/L)	**Week 7**	3.79	2.74	3.49	2.51	+40**	+42**	+24*	+61***	+43**	+54***	+37**	+68***
	Week 13	3.35	2.31	3.52	2.55	+23*	+16	+6	+61***	+28**	+32*	+21*	+51***
	Recovery Week 4	3.81	2.27	3.27	2.15							-10	+25
Monocytes (10^9/L)	**Week 7**	0.06	0.04	0.06	0.03	+100***	+167***	+83***	+200***	+83***	+200***	+133***	+167***
	Week 13	0.05	0.08	0.06	0.06	+67*	+67*	+67**	+83***	+67**	+83***	+117***	+67**
	Recovery Week 4	0.09	0.05	0.10	0.05							-30	+20
Eosinophils (10^9/L)	**Week 7**	0.12	0.07	0.11	0.06	+64***	+67**	+55***	+83**	+73***	+67*	+82***	+67**
	Week 13	0.08	0.08	0.08	0.08	+38*	+13	+25	+38	+50**	+25	+50**	+50
	Recovery Week 4	0.10	0.07	0.12	0.06							-25	+17
Large unclassified cells (10^9/L)	**Week 7**	0.02	0.01	0.02	0.01	+100**	+200***	+50	+100**	+100**	+100**	+100**	+100**
	Week 13	0.01	0.02	0.02	0.02	+50	+50*	+0	+50**	+50	+50***	+0	+50**
	Recovery Week 4	0.02	0.01	0.02	0.01							-50	+0

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

7.4 オロダテロールのラット反復吸入投与毒性試験（続き） Doc. No.: U[redacted]-1342 (Continued)

Daily Achieved Dose (Olo, µg/kg free base)		0 Air Control		0 Vehicle Control		62		239		971		2833	
Number of Animals (main study + TK)		M: 10+8[a]	F: 10+8[a]	M: 10+8[a]	F: 10+8[a]	M: 10+8	F: 10+8	M: 10+8	F: 10+8	M: 10+8	F: 10+8	M: 10+8[a]	F: 10+8[a]
Blood Chemistry (%[c]):													
Calcium (mmol/L)	Week 7	2.90	2.94	2.90	2.90	+5***	+6***	+5***	+6***	+4***	+5***	+5***	+3**
	Week 13	2.83	2.93	2.82	2.92	+4*	+2	+4**	+3**	+4**	+3*	+5***	+2*
	Recovery Week 4	2.79	2.81	2.77	2.87							+0	-2
Glucose (mmol/L)	Week 7	7.16	5.21	6.91	5.66	-12*	-11	-16**	-6	-11*	-6	-15**	-13
	Week 13	6.41	5.11	6.90*	5.77*	-24***	-25***	-22***	-29***	-24***	-30***	-24***	-25***
	Recovery Week 4	6.76	6.97	6.98	6.73							-18	-10
Triglyceride (mmol/L)	Week 7	1.40	1.17	1.45	1.13	+6	+22	+12	+35*	-1	+6	-6	-15
	Week 13	1.49	1.40	1.63	1.32	-17	-23	-18	-23	-28**	-31*	-31**	-42**
	Recovery Week 4	1.38	1.00	1.65	1.48							-12	-30
Creatinine (µmol/L)	Week 7	56	59	55	61	+7**	+0	+7*	-2	+5*	+2	+11***	-2
	Week 13	39	43	40	45	+5	-9	+3	-7	+8*	-4	+8*	+0
	Recovery Week 4	41	39	41	42*							+2	+5
Potassium (mmo/L)	Week 7	4.7	4.5	4.8	4.4	+4*	+7**	+4*	+7**	+0	+9***	+4*	+9***
	Week 13	4.8	4.6	4.8	4.5	+2	+2	-2	+4	+0	+4	+0	+4
	Recovery Week 4	4.8	4.3	4.9	4.3							+0	+7*
AST (U/L)	Week 7	66	73	72	69	+0	+16**	+18**	+9	+13*	+4	+21***	+19**
	Week 13	69	72	81	73	-5	+27	+21	-4	+2	+1	+12*	+5
	Recovery Week 4	72	63	104	70							-36	-6

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

7.4 オロダテロールのラット反復吸入投与毒性試験（続き） Doc. No.: U[redacted]-1342 (Continued)

Daily Achieved Dose (Olo, µg/kg free base)		0 Air Control		0 Vehicle Control		62		239		971		2833	
Number of Animals (main study + TK)		M: 10+8[a]	F: 10+8[a]	M: 10+8[a]	F: 10+8[a]	M: 10+8	F: 10+8	M: 10+8[a]	F: 10+8[a]	M: 10+8[a]	F: 10+8[a]	M: 10+8	F: 10+8
Urinalyses (%[c]):													
Specific Gravity	**Week 7**	1.054	1.041	1.049	1.047	+0	-1	+0	-1*	-1*	-2**	-2***	-2***
	Week 13	1.047	1.031	1.047	1.034	+0	+1	+1	+0	+0	+0	+0	+0
	Recovery Week 4	1.051	1.053	1.047	1.047							-1	-1
Volume (mL)	**Week 7**	1.1	1.2	0.8	1.2	+100**	-17	+50*	-8	+175***	+42	+250***	+67*
	Week 13	1.8	2.1	2.0	2.5	+20	-12	-5	-8	+15	+4	+30	+12
	Recovery Week 4	1.7	1.3	1.6	1.6							+38	+19
Potassium (mmol/L)	**Week 7**	240.38	131.44	218.73	167.32	-29*	-33**	-29*	-41***	-34*	-38**	-47***	-35**
	Week 13	154.03	110.6	172.84	109.6	-4	+1	-10	+8	+13	+19	+1	+11
	Recovery Week 4	150.39	156.73	150.88	147.08							-18	-9
Organ Weights(%[c]):													
Heart													
absolute (g)	**Week 13**	1.20	0.83	1.20	0.84	+8	+11*	+3	+14**	+8	+14**	-1	+10
	Recovery Week 4	1.32	0.87	1.18	0.94							+6	-2
% body weight	**Week 13**	0.317	0.342	0.312	0.345	+4	+8	+3	+8	+6	+3	-1	+4
	Recovery Week 4	0.336	0.351	0.282	0.350							+13***	+1
% brain weight	**Week 13**	58.518	43.740	59.647	44.701	+9	+14**	+8	+16***	+9	+15**	+1	+11*
	Recovery Week 4	63.925	45.942	58.837	48.075							+6	+3

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

7.4 オロダテロールのラット反復吸入投与毒性試験（続き） Doc. No.: U[redacted]-1342 (Continued)

Daily Achieved Dose (Olo, µg/kg free base)		0 Air Control		0 Vehicle Control		62		239		971		2833	
Number of Animals (main study + TK)		M: 10+8[a]	F: 10+8[a]	M: 10+8[a]	F: 10+8[a]	M: 10+8	F: 10+8	M: 10+8[a]	F: 10+8[a]	M: 10+8[a]	F: 10+8[a]	M: 10+8	F: 10+8
Organ Weights(%[c]):													
Spleen													
absolute (g)	**Week 13**	0.66	0.52	0.66	0.51	+2	+6	+2	+12*	-2	+22***	-6	+8
	Recovery Week 4	0.66	0.49	0.60	0.53							+12	-2
% body weight	**Week 13**	0.176	0.216	0.176	0.208	-3	+3	-1	+8	-6	+11	-8	+3
	Recovery Week 4	0.168	0.198	0.144	0.198							+18	+2
% brain weight	**Week 13**	32.306	27.555	33.185	27.004	+2	+10	+5	+15*	-2	+23***	-5	+10
	Recovery Week 4	32.142	25.917	29.993	27.105							+10	+3
Epididymides													
absolute (g)	**Week 13**	1.1915		1.2308		-7		-10		-9		-11	
	Recovery Week 4	1.2163		1.2832								-6	
% body weight	**Week 13**	0.31638		0.32484		-10		-11**		-12**		-12**	
	Recovery Week 4	0.30079		0.30526								+1	
% brain weight	**Week 13**	58.16204		61.53054		-6		-7		-9		-9	
	Recovery Week 4	59.000		63.77445								-6	
Kidney													
absolute (g)	**Week 13**	2.24	1.58	2.23	1.61	-2	-4	-5	-1	-1	+1	-7	-3
	Recovery Week 4	2.49	1.67	2.39	1.75							-10*	-7
% body weight	**Week 13**	0.595	0.652	0.587	0.659	-5	-6*	-6*	-6*	-4	-8**	-8**	-7*
	Recovery Week 4	0.629	0.673	0.569*	0.655							-4	-4
% brain weight	**Week 13**	109.475	83.384	111.262	85.579	-1	0	-2	+1	-1	+2	-5	-1
	Recovery Week 4	121.057	88.177	118.726	89.796							-10	-3

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

7.4 オロダテロールのラット反復吸入投与毒性試験（続き） Doc. No.: U[redacted]-1342 (Continued)

Daily Achieved Dose (Olo, µg/kg free base)	0 Air Control		0 Vehicle Control		62		239		971		2833	
Number of Animals (main study + TK)	**M: 10+8[a]**	**F: 10+8[a]**	**M: 10+8[a]**	**F: 10+8[a]**	**M: 10+8**	**F: 10+8**	**M: 10+8[a]**	**F: 10+8[a]**	**M: 10+8[a]**	**F: 10+8[a]**	**M: 10+8**	**F: 10+8**
Histopathology: Week 13												
Larynx:												
squamous metaplasia	0	0	3	3	2	3	2	6*	3	7**	5*	9***
necrosis of U-shaped cartilage	0	0	1	3	1	1	4	4	2	6*	3	8***
Histopathology: Recovery Week 4												
Larynx:												
squamous metaplasia	0	0	3	2							2	3
necrosis of U-shaped cartilage	0	0	2	3							3	5*

NC: not calculated -: no noteworthy findings

a: Animals for toxicokinetics evaluation are used for recovery evaluation. b: accidental death

c: Group means are shown for the air and vehicle control groups, and percent differences from the vehicle control group for the treated groups. Statistical significance is based on actual data. Statistical differences are from the air control group for the vehicle control group, and from the vehicle control group for the treated groups.

* - $p<0.05$ **: $p<0.01$ ***: $p<0.01$

+/-: very isolated, +: isolated, ++: occasional

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

7.5 オロダテロールのラット反復吸入投与毒性試験

Test Article: Olodaterol

Report Title: 26-week inhalation toxicity study in rats with a 4-week recovery period

Species/Strain:	Rat/ Crl:WI(Han)	**Duration of Dosing:**	26 weeks	**Report No.:**	U[redacted]-1691
Initial Age:	10 weeks	**Duration of Postdose:**	4 weeks	**Location in CTD:**	4.2.3.2-6
Date of First Dose:	[redacted]	**Method of Administration:**	Inhalation, nose only 35 min exposure time per day	**GLP Compliance:**	Yes
		Vehicle/Formulation:	BAC/Na-EDTA solution		

Special Features: None
No Observed Adverse-Effect Level: 200 µg/kg/day, Olo (free base)

Daily Achieved Dose (Olo, µg/kg free base)		**0 Vehicle Control**		**49**		**200**		**3400**	
Number of Animals (main study + recovery + TK)		**M: 20+10+5**	**F: 20+10+5**	**M: 20+0+5**	**F: 20+0+5**	**M: 20+0+5**	**F: 20+0+5**	**M: 20+10+5**	**F: 20+10+5**
Toxicokinetics									
AUC_{0-24} (pmol·h/L)	**Day 1**	NC	NC	13400	11000	54600	44900	881000	785000
	Day 177	NC	NC	9010	7880	43000	32400	878000	668000
Noteworthy Findings									
Died or Sacrificed Moribund:		0	0	0	0	0	0	0	0
Body Weight (%[a]):	**Week 26**	373g	218g	+3	+8*	+6*	+10*	-1	+11*
	Recovery Week 4	405g	222g					-1	+12*
Food Consumption (%[a]):	**Week 26**	18.4g	13.1g	+8*	+16*	+14*	+20*	+17*	+22*
	Recovery Week 4	21.3g	10.4g					+8*	+41*
Clinical Observations:		-	-	-	-	-	-	-	-
Ophthalmology:									
Exophthalmos	**Week 26**	0	0	19	18	20	20	20	20
	Recovery Week 4	0	0					10	10

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

7.5 オロダテロールのラット反復吸入投与毒性試験（続き）

Doc. No.: U[redacted]-1691 (Continued)

Daily Achieved Dose (Olo, µg/kg free base)			0 Vehicle Control		49		200		3400	
Number of Animals (main study + recovery + TK)			M: 20+10+5	F: 20+10+5	M: 20+0+5	F: 20+0+5	M: 20+0+5	F: 20+0+5	M: 20+10+5	F: 20+10+5
Haematology:			-	-	-	-	-	-	-	-
Blood Chemistry(%[a]):										
AST (U/L)	Week 13		68.1	71.8	+14*	+2	+24*	+10*	+27*	+7
	Week 26		58.3	68.2	+48	+27*	+42	+13*	+106*	+23*
	Recovery Week 4		77.9	74.0					-11	-4
ALT (U/L)	Week 13		47.9	47.1	+17*	+14*	+16*	+19*	+21*	+16*
	Week 26		43.8	43.1	+24*	+23*	+21*	+23*	+50*	+30*
	Recovery Week 4		62.0	42.7					-8	+25*
ALP (U/L)	Week 13		102	62.2	+16*	+18	+23*	+9	+17*	+26*
	Week 26		91.2	51.7	+14*	+21*	+26*	+26*	+25*	+41*
	Recovery Week 4		100	46.0					+5	+36
Urinalyses:			-	-	-	-	-	-	-	-
Organ Weights (%[a]):										
Heart	absolute	Week 26	1.0319	0.7588	+16***	+12***	+16***	+8*	+16***	+15***
		Recovery Week 4	1.0667	0.7285					+10*	+16**
	% body weight	Week 26	0.2953	0.3717	+15***	+6*	+12***	+1	+19***	+8**
		Recovery Week 4	0.2775	0.3519					+12***	+3
	% brain weight	Week 26	51.57	40.37	+16***	+13***	+16***	+8*	+18***	+17***
		Recovery Week 4	52.02	38.02					+10*	+17**
Gross Pathology:										
Uterus: dilatation		Week 26		1		0		0		4
		Recovery Week 4		0						0
Ovary: discoloration		Week 26		0		0		0		2
		Recovery Week 4		0						0
Skeletal muscle: enlargement		Week 26	0	0	19	11	20	12	19	16
		Recovery Week 4	0	0					9	0
White adipose tissue: reduced in size										
		Week 26	0	0	1	0	2	0	15	2
		Recovery Week 4	0	0					0	0

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

7.5 オロダテロールのラット反復吸入投与毒性試験（続き）

Daily Achieved Dose (Olo, µg/kg free base)	0 Vehicle Control		49		200		3400	
Number of Animals (main study + recovery + TK)	M: 20+10+5	F: 20+10+5	M: 20+0+5	F: 20+0+5	M: 20+0+5	F: 20+0+5	M: 20+10+5	F: 20+10+5
Histopathology: Week 26								
Eye:								
corneal epithelial atrophy, +	2	0	10	3	14	13	12	7
corneal epithelial atrophy, ++	0	0	0	0	0	0	5	4
Nasal cavity, ventral part:								
level I, epithelial atrophy	2	0	2	0	0	0	16	13
level I, metaplasia, squamous	0	0	0	0	0	0	2	5
level II, epithelial atrophy	0	0	0	0	0	0	2	3
level III, epithelial atrophy, ++	0	0	0	0	0	0	0	2
level III, focal inflammation	0	0	0	0	0	0	5	1
Larynx:								
degeneration, U-shpd. cartilage	1	0	0	3	3	8	16	17
regeneration, U-shpd. cartilage	0	0	0	0	3	3	7	7
level I, metaplasia, squamous	0	0	0	0	4	8	7	12
level I, metapl/hyperpl, squamous	0	0	0	0	0	0	11	7
level II, metaplasia, squamous	0	0	0	0	1	1	5	9
level II, metapl/hyperpl, squamous	0	0	0	0	0	0	12	7
level III, metaplasia, squamous	0	0	0	0	0	2	4	3
level III, metapl/hyperpl, squamous	0	0	0	0	0	0	0	2
Trachea, bifurcation, carina:								
epithelial atrophy	2	4	3	3	3	2	6	7
metaplasia, squamous	0	0	0	0	0	0	5	1
Lungs:								
foam cell accumulation, +	4	6	6	8	5	9	8	10
foam cell accumulation, ++	0	0	1	0	0	2	4	4
Ovary, corpus luteum:								
cysts		1		3		2		10
hemorrhage+		2		0		0		5
hemorrhage++		0		0		1		2

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

7.5 オロダテロールのラット反復吸入投与毒性試験（続き）

Doc. No.: U[redacted]-1691 (Continued)

Daily Achieved Dose (Olo, µg/kg free base)	0 Vehicle Control		49		200		3400	
Number of Animals (main study + recovery + TK)	M: 20+10+5	F: 20+10+5	M: 20+0+5	F: 20+0+5	M: 20+0+5	F: 20+0+5	M: 20+10+5	F: 20+10+5
Histopathology: Week 26								
Skeletal muscles:								
hypertrophy, +	0	0	6	9	3	5	2	4
hypertrophy, ++	0	0	10	2	14	15	13	12
hypertrophy, +++	0	0	0	0	2	0	4	0
fibre necrosis, single/sporadic	5	5	13	6	10	10	11	9
fibre necrosis, disseminated	0	0	0	0	1	0	3	3
White adipose tissue, renal pelvis:								
reduced in size, +	0	0	10	9	4	6	0	2
reduced in size, ++	0	0	1	2	9	9	5	10
reduced in size, +++	0	0	0	0	1	0	15	8

Liver: Incidence of PAS-positive liver cells in non-fasted animals (TK group)					
- number of animals examined		5M & 5F	5M & 4F	5M & 5F	5M & 4F
centrilobular region	**- negative**	0	0	0	2
	- minimal	1	0	4	2
	- slight	5	7	6	5
	- moderate	4	2	0	0
intermediolobular region	**- negative**	0	0	0	1
	- minimal	0	2	3	4
	- slight	4	4	7	4
	- moderate	6	3	0	0
peripherolobular region	**- negative**	0	2	3	6
	- minimal	0	1	4	1
	- slight	6	4	3	2
	- moderate	4	2	0	0

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

7.5 オロダテロールのラット反復吸入投与毒性試験（続き） Doc. No.: U[redacted]-1691 (Continued)

Daily Achieved Dose (Olo, µg/kg free base)	0 Vehicle Control		49		200		3400	
Number of Animals (main study + recovery +TK)	M: 20+10+5	F: 20+10+5	M: 20+0+5	F: 20+0+5	M: 20+0+5	F: 20+0+5	M: 20+10+5	F: 20+10+5
Histopathology: Recovery Week 4								
Larynx:								
degeneration, U-shpd. cartilage	0	0					9	9
regeneration, U-shpd. cartilage	0	0					5	1
level I, metaplasia, squamous	0	0					7	7
level II, metaplasia, squamous	0	0					7	8
level II, metapl/hyperpl, squamous	0	0					0	1
level III, metaplasia, squamous	0	0					2	0
Trachea, bifurcation, carina:								
epithelial atrophy	2	5					3	2
Lungs:								
foam cell accumulation, +	4	2					5	5
Ovary, corpus luteum:								
cysts		0						2
haemorrhage, +		0						1
Skeletal muscles:								
hypertrophy, +	0	0					4	1
hypertrophy, ++	0	0					1	0
fibre necrosis, single/sporadic	1	4					1	2
White adipose tissue, renal pelvis:								
reduced in size, +	0	0					2	2
reduced in size, ++	0	0					0	1

NC: not calculated

a: group means are shown for the control group, and percent differences from the control group for the treated groups. Statistical significance is based on actual data. *: $p<0.05$

+: minimal ++:slight +++: moderate

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

7.6 チオトロピウム+オロダテロールのラット反復吸入投与毒性試験

Test Article: Tiotropium+Olodaterol

Report Title: BI 1744 CL and BA 679 BR (1:1 Combination): 4-Week Inhalation Toxicity Study in Rats Including Safety Pharmacology (Nervous and Respiratory Systems) with a 4-Week Recovery Period

Species/Strain:	Rat, Crl:WI(Han)	**Duration of Dosing:**	At least 4 Weeks	**Doc. No.:**	U[redacted]-1893
Initial Age (at start of dosing):	*ca* 9 Weeks	**Duration of Postdose:**	4 Weeks	**Location in CTD:**	4.2.3.2-7
Date of First Dose:	[redacted]	**Method of Administration:**	Inhalation, nose only 35 min exposure time per day	**GLP Compliance:**	Yes

Vehicle/Formulation: BAC/Na-EDTA solution
Special Features: Integrated safety pharmacology (nervous and respiratory systems) and micronucleus test
No Observed Adverse Effect Level: 85.2 + 78.6 µg/kg/day, Tio+Olo (free moiety)

Daily Achieved Dose (Tio+Olo, µg/kg free moiety)		**0** **Group 1** **Vehicle Control**		**85.2 + 78.6** **Group 2** **Low Dose**		**577 + 555** **Group 3** **Intermediate Dose**		**2266 + 2174** **Group 4** **High Dose**	
Number of Animals		**M:16**	**F:16**	**M:10**	**F:10**	**M:10**	**F:10**	**M:16**	**F:16**
Toxicokinetics: (6 animals/sex/group)									
Tiotropium AUC_{0-24} (pmol·h/L)	**Day 1**	NC	NC	16500	10600	267000	164000	1050000	805000
	Day 28	NC	NC	29700	17400	76300	115000	204000	271000
Olodaterol AUC_{0-24} (pmol·h/L)	**Day 1**	NC	NC	18800	16800	229000	185000	1100000	869000
	Day 28	NC	NC	44600	34900	138000	173000	280000	321000
Noteworthy Findings									
Died or Sacrificed Moribund		0	0	0	0	1[#]	0	2[##]	0
Body Weight (%[a]) (all Main Study and Recovery animals)	**Day 28**	328 g/animal/day	226 g/animal/day	-1	0	-7	-3	-6	0
Food Consumption (%[a]) (all Main Study and Recovery animals)	**Week 4**	21.3 g/animal/day	15.7 g/animal/day	-11	-8	-17	-7	-8	-5
Clinical Observations:									
Mydriasis		-	-	+	+	++	++	+++	+++
Ophthalmoscopy		-	-	-	-	-	-	-	-

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

7.6 チオトロピウム+オロダテロールのラット反復吸入投与毒性試験（続き） Doc. No.: U[redacted]-1893 (Continued)

Daily Achieved Dose (Tio+Olo, µg /kg free moiety)	0 Group 1 Vehicle Control		85.2 + 78.6 Group 2 Low Dose		577 + 555 Group 3 Intermediate Dose		2266 + 2174 Group 4 High Dose	
Number of Animals	**M:16**	**F:16**	**M:10**	**F:10**	**M:10**	**F:10**	**M:16**	**F:16**
Haematology [b] (10 animals /sex/group) -Week 4								
Total White Blood Cell (10^9/L)	5.83	4.56	+13	+44**	+27**	+45**	+39***	+41**
Neutrophil (10^9/L)	0.84	0.78	+42*	+54**	+57**	+37	+107***	+40*
Lymphocyte (10^9/L)	4.73	3.58	+8	+41*	+22*	+46**	+27**	+41*
Monocyte (10^9/L)	0.10	0.07	+20	+86 **	+10	+86**	+60**	+100***
Prothrombin time (sec)	14	15	+14*	+7***	+21***	+7**	+14*	+13***
Activated partial thromboplastin time (sec)	20	20	0	-5	-5*	-5	-10*	-5
Clinical Chemistry[b] (10 animals /sex/group) -Week 4								
Triglyceride (mmol/L)	1.69	1.57	-21	-34**	-28	-28*	-30	-40***
Glucose (mmol/L)	6.87	7.66	-2	-18***	-2	-13**	+4	-15***
Urinalysis[b] (10 animals /sex/group) -Week 4								
Specific Gravity	1.046	1.031	-3***	-1	-2***	-1	-2***	-1
Urinary Volume (mL)	2.2	2	+91**	+90**	+73**	+55	+45	+50
Urinary Sodium (mmol/L)	174.1	92.9	-44***	-1	-49***	+9	-37**	+14
Urinary Potassium (mmol/L)	169.73	100.04	-46***	-19	-45***	+4	-37***	-20
Urinary Chloride (mmol/L)	212.4	87.5	-53**	-5	-57***	+19	-53***	-8
Organ Weights a (10 animals/sex/group)								
Lung absolute weight	1.52 g	1.33 g	39***	23*	36***	20	24*	30**
% body weight	0.463	0.594	40***	22*	46***	22*	32**	32**
% brain weight	77.502	72.940	45***	24*	42***	22	28**	31**
Kidneys absolute weight	2.17 g	1.49 g	-11**	-8*	-18***	-9**	-11*	-9*
% body weight	0.661	0.664	-9**	-8*	-13***	-8*	-5	-6
% brain weight	110.669	81.552	-7	-7*	-15***	-9*	-8	-8*
Salivary Glands absolute weight	0.4878 g	0.3785 g	-19***	-17***	-25***	-18***	-12**	-18***
% body weight	0.14854	0.16951	-18***	-17***	-20***	-17***	-6	-16***
% brain weight	24.85233	20.76321	-16***	-16***	-21***	-17***	-9*	-17***
Thymus absolute weight	0.393 g	0.337 g	-23**	-14	-30**	-18*	-28**	-30**
% body weight	0.1195	0.1497	-22**	-14	-24**	-17*	-24**	-29***
% brain weight	20.0016	18.4391	-20*	-13	-26**	-18	-26**	-29**

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

7.6 チオトロピウム+オロダテロールのラット反復吸入投与毒性試験（続き） Doc. No.: U[redacted]-1893 (Continued)

Daily Achieved Dose (Tio+Olo, µg /kg free moiety)	0 Group 1 Vehicle Control		85.2 + 78.6 Group 2 Low Dose		577 + 555 Group 3 Intermediate Dose		2266 + 2174 Group 4 High Dose	
Number of Animals	M:16	F:16	M:10	F:10	M:10	F:10	M:16	F:16
Gross Pathology[c]								
Number of animals examined	10	10	10	10	9	10	9	10
Dark lungs (including dark foci)	0	1	5	4	4	2	1	3
Reddened lungs	0	0	0	0	0	1	0	0
Froth filled trachea	0	0	7	5	6	2	3	3
Gross Pathology[c]								
Number of animals examined	10	10	10	10	9	10	9	10
Nasal Cavity								
Atrophy, dorsal meatus, Level I (minimal to mild)	0	0	0	0	0	0	5*	0
Atrophy, dorsal meatus, Level II (minimal to mild)	0	0	0	0	0	0	2	0
Squamous metaplasia, ventral meatus, Level I (minimal to mild)	0	0	0	0	1	3	7***	10***
Larynx								
Necrosis, U-shaped cartilage (minimal to mild)	6	6	5	6	5	8	7	6
Squamous metaplasia, base of epiglottis (minimal to moderate)	5	8	9	9	7	10	8	6
Squamous metaplasia, arytenoids cartilage, (minimal to moderate)	0	0	0	0	0	2	3	3
Lung								
Congestion (minimal to mild)	2	4	10***	9	5	8	9***	7
Micronucleus Phase	-	-	-	-	-	-	-	-

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

7.6 チオトロピウム+オロダテロールのラット反復吸入投与毒性試験（続き） Doc. No.: U[redacted]-1893 (Continued)

Daily Achieved Dose (Tio+Olo, µg /kg free moiety)	**0 Group 1 Vehicle Control**		**2266 + 2174 Group 4 High Dose**	
Postdose Evaluation Number of Animals	**M:6**	**F:6**	**M:6**	**F:6**
Haematology [b]				
- Total White Blood Cell (10^9/L)	5.65	4.36	6.90*	4.19
Clinical Chemistry[b]				
- Triglyceride (mmol/L)	1.52	1.63	1.64	1.08**
Urinalysis[b]				
– Specific Gravity	1.047	1.041	1.032*	1.040
– Urinary Volume (mL)	2.1	1.2	3.3*	1.7
– Urinary Sodium (mmol/L)	125.3	74.5	88.4*	105.3
Histopathology[c]				
Number of animals examined	6	6	5	6
Larynx				
Necrosis, U-shaped cartilage (minimal to mild)	0	0	4*	6**
Squamous metaplasia, base of epiglottis (minimal)	1	0	3	4
Lung				
Congestion (minimal to mild)	1	5	4	1

NC: not calculated -: no noteworthy findings
+: mild, ++: moderate, +++: marked *: $p<0.05$, **: $p<0.01$, ***: $p<0.001$
#: one animal most probably died of asphyxiation due to food material retained in the larynx and upper oesophagus
##: one animal died of pulmonary abscess and associated pleuritis; another animal most probably died of asphyxiation due to food material retained in the larynx and upper oesophagus
a: for controls, group means are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown. Statistical significance is based on actual data.
b: statistical significance is based on actual data.
c: statistical significance is based on incidence data.
There were no noteworthy findings unless otherwise stated.

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

7.7 チオトロピウム+オロダテロールのラット反復吸入投与毒性試験

Test Article: Tiotropium+Olodaterol

Report Title: BI 1744 CL and BA 679 BR (6:1 and 1:2 Combination): 4-Week Inhalation Toxicity Study in Rats Including Safety Pharmacology (Nervous and Respiratory Systems) with a 4-Week Recovery Period

Species/ Strain:	Rat, Crl:WI(Han)	**Duration of Dosing:**	At least 4 weeks	**Doc. No.:**	U[redacted]-1892
Initial Age (at start of dosing):	*ca* 9 Weeks	**Duration of Postdose:**	4 Weeks	**Location in CTD:**	4.2.3.2-8
Date of First Dose:	[redacted]	**Method of Administration:**	Inhalation, nose only 35 min exposure time per day	**GLP Compliance:**	Yes

Vehicle/Formulation: BAC/Na-EDTA solution

Special Features: Integrated safety pharmacology (nervous and respiratory systems) and micronucleus test

No Observed Adverse Effect Level:
13 + 75 µg/kg/day, Tio+Olo (free moiety) at 1:6 combination
143 + 73 µg/kg/day, Tio+Olo (free moiety) at 2:1 combination

Daily Achieved Dose (Tio+Olo, µg/kg free moiety)	**0** **Group 1** **Vehicle Control**		**13 + 75** **Group 2** **Low Dose I** **(1:6 Combination)**		**393 + 2032** **Group 3** **High Dose I** **(1:6 Combination)**		**14 + 73** **Group 4** **Low Dose II** **(2:1 Combination)**		**3263 + 1747** **Group 5** **High Dose II** **(2:1 Combination)**	
Number of Animals	**M:16**	**F:16**	**M:10**	**F:10**	**M:16**	**F:16**	**M:10**	**F:10**	**M:16**	**F:16**
Toxicokinetics (6 animals/sex/group)										
Day 1 Tiotropium AUC_{0-24} (pmol·h/L)	NC	NC	1560	2270	148000	130000	15700	14600	1110000	1090000
Day 1 Olodaterol AUC_{0-24} (pmol·h/L)	NC	NC	10800	10900	617000	525000	7880	12100	495000	547000
Day 28 Tiotropium AUC_{0-24} (pmol·h/L)	NC	NC	1550	2490	50400	64900	11700	21300	407000	475000
Day 28 Olodaterol AUC_{0-24} (pmol·h/L)	NC	NC	19000	19200	342000	419000	12900	22300	249000	274000
Noteworthy Findings										
Died or Sacrificed Moribund	0	0	0	0	2[#]	0	0	0	2[#]	2[#]
Body Weight (%[a, b])										
Week 1	280 g	203 g	-1	+5	-7 **	+2	-3	+2	-10***	-3
Week 4	323 g	216 g	-2	+7*	-5	+6**	-4	+4	-6	+1
Recovery Week 4	365 g	229 g			0	+3			+3	+7
Food Consumption (%[a, b])										
Week 1	21.5 g/rat/day	15.7 g/rat/day	-11***	-4	-36***	-27***	-26***	-19***	-45***	-39***
Week 4	20.9 g/rat/day	14.5 g/rat/day	-2	+17**	-3	+12**	-6	+9	0	+9*
Recovery Week 4	22.4 g/rat/day	16.4 g/rat/day			+10	+2			+5	+9

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

7.7 チオトロピウム+オロダテロールのラット反復吸入投与毒性試験（続き） Doc. No.: U[redacted]-1892 (Continued)

Daily Achieved Dose (Tio+Olo, µg/kg free moiety)	0 Group 1 Vehicle Control		13 + 75 Group 2 Low Dose I (1:6 Combination)		393 + 2032 Group 3 High Dose I (1:6 Combination)		143 + 73 Group 4 Low Dose II (2:1 Combination)		3263 + 1747 Group 5 High Dose II (2:1 Combination)	
Number of Animals	**M:16**	**F:16**	**M:10**	**F:10**	**M:16**	**F:16**	**M:10**	**F:10**	**M:16**	**F:16**
Clinical Observations:										
Mydriasis	-	-	+	+	+	+	++	+	++	+
Ophthalmoscopy:										
Roughened corneal surface	-	-	-	-	-	+/-	-	-	-	+/-
Haematology [b] (10 animals/sex/group) -Week 4										
White Blood Cell Count (10^9/L)	4.58	4.10	+61***	+51***	+64***	+51***	+56***	+61***	+93***	+40***
Haematocrit (L/L)	0.42	0.398	0	+3*	+4*	0	+1	+2	+3*	+5**
Haemoglobin (g/dL)	15.8	15.0	-1	+2	0	-1	-2	+1	+1	+4**
Mean Cell Haemoglobin Concentration (g/dL)	37.6	37.7	-1	-1	-3***	-1	-3***	-1	-3**	-1
Reticulocyte (%)	2.20	2.30	+9	+4	+32***	+22	+18**	+0	+18**	+4
Clinical Chemistry [b] (10 animals/sex/group) -Week 4										
Glucose (mmol/L)	7.50	7.10	-15***	-16***	-14***	-12**	-12**	-9*	-12**	-14***
Calcium (mmol/L)	2.80	2.86	+3**	+5*	+4***	+2*	+3**	+5**	0	+1
Phosphate (mmol/L)	1.51	1.39	+23**	+32***	+37***	+22***	+36***	+35***	+44***	+39***
Triglyceride (mmol/L)	1.68	1.44	-24	-17	-23	-9	-24	-2	-18	-37**
Urinalysis [b] (10 animals/sex/group) -Week 4										
Urine Volume (mL)	3.2	2.3	-3	+43	0	+70**	+22	+130***	-3	+126***
Urine Specific Gravity	1.033	1.039	+3	-1***	0	-2***	0	-2***	0	-2***
Urinary Sodium (mmol/L)	163.5	151.1	-14	-24**	-34**	-36***	-38***	-49***	-54***	-57***
Urinary Chloride (mmol/L)	193	163.5	-6	-21*	-27	-43***	-37*	-49***	-52**	-67***
Urinary Potassium(mmol/L)	130.55	172.87	+14	-29*	-1	-43***	-8	-49***	-7	-65***

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

7.7 チオトロピウム+オロダテロールのラット反復吸入投与毒性試験（続き） Doc. No.: U[redacted]-1892 (Continued)

Daily Achieved Dose (Tio+Olo, µg/kg free moiety)	0 Group 1 Vehicle Control		13 + 75 Group 2 Low Dose I (1:6 Combination)		393 + 2032 Group 3 High Dose I (1:6 Combination)		143 + 73 Group 4 Low Dose II (2:1 Combination)		3263 + 1747 Group 5 High Dose II (2:1 Combination)	
Number of Animals	**M:16**	**F:16**	**M:10**	**F:10**	**M:16**	**F:16**	**M:10**	**F:10**	**M:16**	**F:16**
Organ Weights[c] (10 animals/sex/group)										
Lung										
absolute weight	1.39 g	1.14 g	+28**	+35**	+17	+40***	+51***	+64***	+34**	+46**
relative weight (% body weight)	0.432	0.535	+32**	+27**	+25*	+29**	+64***	+60***	+46***	+44***
relative weight (% brain weight)	70.952	62.626	+33***	+34**	+24**	+46***	+52***	+64***	+41***	+50***
Salivary Glands										
absolute weight	0.5214 g	0.3444 g	-18***	-3	-22***	-1	-21***	-1	-23***	-2
relative weight (% body weight)	0.16174	0.16197	-16***	-10	-16***	-10	-18***	-5	-16***	-4
relative weight (% brain weight)	26.64386	18.98204	-15***	-4	-17***	+2	-20***	-2	-19***	+1
Gross Pathology[d] (10 animals/sex/group)										
Lung										
Dark lungs (including dark foci)	0	0	1	2	2	5	2	5	5	1
Reddened lungs	0	0	3	4	3	2	2	2	1	1
Trachea										
Froth filled trachea	0	0	2	2	0	1	5	4	5	2
Histopathology[e] (10 animals/sex/group)										
Nasal cavity										
Squamous metaplasia ventral meatus (minimal to mild)	0	0	0	0	8***	10***	0	0	8***	9***
Rhinitis ventral meatu (minimal)	0	0	0	0	0	1	0	0	1	2
Larynx										
Necrosis of the U-shaped cartilage, level I (minimal to mild)	5	7	7	8	8	9	8	8	7	9
Squamous metaplasia base of epiglottis (minimal to mild)	5	7	9	9	8	8	9	10	8*	9
Squamous metaplasia, arytenoids cartilage (minimal to moderate)	0	0	0	1	4*	5*	1	0	5**	8***
Lung										
Congestion/haemorrhage (minimal to mild)	5	0	8	6*	9*	6*	7	8***	6	4*
Alveolar foamy macrophage accumulation, scattered/widespread (minimal to moderate)	0	0	0	1	0	0	0	0	3	1

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

7.7 チオトロピウム+オロダテロールのラット反復吸入投与毒性試験（続き） Doc. No.: U[redacted]-1892 (Continued)

Post Dose Evaluation

Daily Achieved Dose (Tio+Olo, µg/kg free moiety)	**0 Group 1 Vehicle Control**		**393 + 2032 Group 3 High Dose I (1:6 Combination)**		**3263 + 1747 Group 5 High Dose II (2:1 Combination)**	
Number of Animals	**M:6**	**F:6**	**M:6**	**F:6**	**M:6**	**F:6**
Body Weight (%[g])	365 g/animal/day	229 g/animal/day	0	+3	+3	+7
Food Consumption (%[g])	22.4 g/animal/day	16.4 g/animal/day	+10	+2	+5	+9
Clinical Chemistry [b] (6 animals/sex/group)						
Triglyceride (mmol/L)	1.69	1.75	1.51	1.87	1.43	1.05*
Urinalysis [b] (6 animals/sex/group)						
Urine Specific Gravity	1.057	1.036	1.040*	1.037	1.038*	1.034
Urine Volume (mL)	1.8	1.7	2.1	2.4*	2.6	2.0
Histopathology[e] (6 animals/sex/group)						
Larynx						
Necrosis of the U-shaped cartilage (minimal to mild)	2	5	2	5	4	3
Squamous metaplasia Base of epiglottis (minimal to mild)	0	0	0	5*	2	2
Squamous metaplasia arytenoid cartilage (minimal)	0	0	0	1	1	0

NA: Not applicable, NC: not calculated - : No noteworthy findings, +/-: isolated occasions, +: mild, ++: moderate.

*: $p<0.05$, **: $p<0.01$ and ***: $p<0.001$

#: animals most probably died of asphyxiation due to food material retained in the larynx and upper oesophagus with the exception of 1 female animal in group 5 (accidental death)

a: For controls, group means are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown.

b: statistical significance is based on actual data.

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

d: based on incidence data.

e: statistical significance is based on incidence data.

f: at end of the recovery period. For controls, group means are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown.

There were no noteworthy findings unless otherwise stated.

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

7.8 オロダテロールのラット反復静脈内投与毒性試験

Test Article: Olodaterol

Report Title: BI 1744 CL : Toxicity study by intravenous (slow bolus) administration to Han Wistar rats for 2 weeks

Species/Strain:	Rat/HsdBrlHan:WIST	**Duration of Dosing:**	2 weeks	**Report No.:**	U[redacted]-1375
Initial Age:	9.5 to 10.5 weeks	**Duration of Postdose:**	NA	**Location in CTD:**	4.2.3.2-9
Date of First Dose:	[redacted]	**Method of Administration:**	Intravenous, 5 minute bolus	**GLP Compliance:**	Yes
Special Features:	None	**Vehicle/Formulation:**	Physiological saline		
No Observed Adverse-Effect Level:	25 µg/kg/day, Olo (free base)				

Daily Dose (Olo, µg/kg free base)		**0 Vehicle Control**		**5**		**25**		**100**	
Number of Animals (main study + TK)		**M: 10+4**	**F: 10+4**	**M: 10+8**	**F: 10+8**	**M: 10+8**	**F: 10+8**	**M: 10+8**	**F: 10+8**
Toxicokinetics									
AUC_{0-24} (pmol·h/L)	**Day 1**	NC	NC	5010	3320	24400	30000	85800	75000
	Day 15	NC	NC	2460	2870	13400	17300	50700	45700
Noteworthy Findings									
Died or Sacrificed Moribund:		-	-	-	-	-	-	-	-
Clinical observations:		-	-	-	-	-	-	-	-
Bodyweight (g):	**Day 15**	7	0	+17**	+5	+4	+7	-5**	-1
	Days 0-15	28	7	45**	+17*	+37	+21*	+36	+15*
Food Consumption (%[a]) :	**Week 1**	153g	111 g	+3	+3	-3	-5	-1	-11
Haematology (%[a]):	**Week 2**								
Haematocrit (l/L)		0.450	0.401	-3*	+4**	-3*	+2	-6**	-1
Haemoglobin concentration (g/dL)		15.9	14.1	-4*	+4*	-4*	+1	-7**	-1
Red blood cell (10^{12}/L)		7.91	7.15	-3	+4	-3	+0	-8**	-2
Reticulocyte (%)		3.69	4.69	+26**	-1	+29**	+15	+44**	+42**
Mean cell volume (fl)		56.9	56.0	+0	+0	+0	+2	+2	+1

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

7.8 オロダテロールのラット反復静脈内投与毒性試験（続き）

Doc. No.: U[redacted]-1375 (Continued)

Daily Dose (Olo, µg/kg free base)	0 Vehicle Control		5		25		100	
Number of Animals (main study + TK)	M: 10+4	F: 10+4	M: 10+8	F: 10+8	M: 10+8	F: 10+8	M: 10+8	F: 10+8
Blood Chemistry (%[a]): Week 2								
Glucose (mmol/L)	6.13	7.01	-28**	-36**	-38**	-37**	-39**	-46**
Cholesterol (mmol/L)	1.65	1.72	+17*	+1	+30**	+5	+31**	-9
Triglycerides (mmol/L)	0.75	0.46	-9	-24**	+4	-37**	-11	-24**
ALP (U/L)	101	41	+9	+15	+22**	+10	+38**	+10
AST (U/L)	67	58	-1	+16	+7	+16	+9*	+19*
LAP (U/L)	41	30	+10*	+13*	+12*	+20**	+10*	+17**
Urea (mmol/L)	6.32	7.99	+15	+12	+15	+9	+26**	+15
Urinalysis (%[a]):								
Volume (mL)	4.1	2.0	+68**	+150**	+59**	+170**	+10	+95**
Specific gravity (g/L)	1035	1043	-1*	-2**	-1*	-1**	-0*	-1**
Protein (g/L)	1.01	0.09	-30**	-33	-39**	-44	-26**	-78*
Potassium (mmol/L)	192.3	196.2	-16*	-30**	-24*	-27**	-11*	-17**
Chloride (mmol/L)	89.2	100.2	+26**	+1	+29**	+9	+36**	+19
Sodium (mmol/L)	112.8	123.1	+0	-15	+8	-10	+21*	+5
Organ Weights (%[a]):								
Heart: absolute	0.929g	0.751g	+10	+5	+3	+9	+17**	+7
% body weight	0.3325	0.3697	+5	+2	+1	+5	+11**	+5
% brain weight	0.4770	0.4156	+11	+5	+5	+8	+21**	+7
Epididymis: absolute	0.831g		-2		-6		-8*	
% body weight	0.2973		-5		-8*		-12**	
% brain weigh	0.4267		-1		-4		-5	

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

7.8 オロダテロールのラット反復静脈内投与毒性試験（続き） Doc. No.: U[redacted]-1375 (Continued)

Daily Dose (Olo, µg/kg free base)		0 Vehicle Control		5		25		100	
Number of Animals (main study + TK)		M: 10+4	F: 10+4	M: 10+8	F: 10+8	M: 10+8	F: 10+8	M: 10+8	F: 10+8
Organ Weights (%[a]):									
Seminal vesicles:	**absolute**	0.926g		-7		-20*		-17*	
	% body weight	0.3322		-10		-21*		-21*	
	% brain weight	0.4753		-6		-19		-14	
Testes:	**absolute**	3.35g		-7		-5		-7*	
	% body weight	1.197		-10*		-7*		-11**	
	% brain weight	1.719		-6		-3		-4	
Ovaries:	**absolute**		0.084g		+11		+0		+21*
	% body weight		0.0413		+8		-3		+18*
	% brain weight		0.0465		+10		-1		+21*
Uterus:	**absolute**		0.643g		-19		-9		-29
	% body weight		0.3193		-23		-14		-31
	% brain weight		0.3574		-19		-11		-30
Histopathology:									
Uterus:									
luminal dilatation			6		3		3		1
Uterine cervix:									
epithelial keratinisation			8		5		6		3
superficial epithelial mucification			6		3		4		1
Vagina:									
epithelial keratinisation			8		4		6		2*
superficial epithelial mucification			5		3		4		0*
Heart:									
myocardial degeneration		0	0	0	0	0	0	1	0

NC: not calculated -: no noteworthy findings *: $p<0.05$ **: $p<0.01$

a: Group means are shown for the control group, and percent differences from the control group for the treated groups. Statistical significance is based on actual data.

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

7.9 オロダテロールのラット反復経口投与毒性試験

Test Article: Olodaterol

Report Title: BI 1744CL: 2 week oral toxicity study in rats

Species/Strain:	Rat/Crl:WI (Han)	**Duration of Dosing:**	2 weeks	**Doc. No.:**	U[redacted]-2334
Initial Age:	8-9 weeks	**Duration of Postdose:**	NA	**Location in CTD:**	4.2.3.2-10
Date of First Dose:	[redacted]	**Method of Administration:**	Oral, gavage	**GLP Compliance:**	Yes
		Vehicle/Formulation:	0.5% Hydroxyethyl Cellulose Natrosol 250 HX		

Special Features: None
No Observed Adverse Effect Level: 50 mg/kg/day, Olo (free base)

Daily Dose		**0**		**0.5**		**5**		**50**	
(Olo, µg/kg free base)		**Vehicle Control**							
Number of Animals		**M:**	**F:**	**M:**	**F:**	**M:**	**F:**	**M:**	**F:**
(main study + TK)		**10+9**	**10+9**	**10+9**	**10+9**	**10+9**	**10+9**	**10+9**	**10+9**
Toxicokinetics									
AUC_{0-24} (pmol·h/L)	**Day 1**	NC	NC	8520	7150	53000	75300	442000	3210000
	Day 14	NC	NC	9160	7690	101000	157000	5150000	4240000
Noteworthy Findings									
Died or Sacrificed Moribund:		0	0	0	0	0	0	0	0
Body Weight (%[a]) :	**Week 2**	305 g	214 g	+2	+4	+7**	+8***	+2	+7***
Food Consumption (%[a]) :	**Week 2**	25.1 g	17.2 g	+0	+6	+2	+13*	+0	+17**
Clinical Observations:									
Salivation		0	0	0	0	10	10	10	10
Ophthalmology:		-	-	-	-	-	-	-	-
Haematology (%[a]):	**Week 2**								
Reticulocyte (%)		2.9	3.0	+14	+3	+14*	+13	+31***	+33**
Neutrophil ($\times 10^9$/L)		0.88	0.63	+28	+27	+64**	+22	+57*	+19

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

7.9 オロダテロールのラット反復経口投与毒性試験（続き）

Daily Dose		0		0.5		5		50	
(Olo, µg/kg free base)		Vehicle Control							
Number of Animals		M:	F:	M:	F:	M:	F:	M:	F:
(main study + TK)		10+9	10+9	10+9	10+9	10+9	10+9	10+9	10+9
Blood Chemistry (%[a]):	Week 2								
Glucose (mmol/L)		9.59	9.91	-14	-19***	-8	-26***	-9	-38***
GLDH (U/L)		4.5	7.1	+9	-27	+0	+0	+18**	+246*
AST (U/L)		67	60	+6	+10	+6	+20	+3	+35**
ALT (U/L)		57	52	+12	+17	+5	+10	+21**	+19
LDH (U/L)		153	97	-10	+10	+13*	+14	-39***	+54***
Urinalysis:		-	-	-	-	-	-	-	-
Organ Weights (%[a]):									
Lung:	absolute	1.41g	1.26g	+27**	+2	+23*	+13	+23*	+17
	% body weight	0.464	0.613	+24**	-4	+15	+2	+22*	+9
	% brain weight	74.728	70.175	+25*	+0	+22*	+14	+24*	+18*
Heart :	absolute	1.05g	0.76g	+9*	+12*	+11**	+17***	+11**	+21***
	% body weight	0.345	0.370	+6*	+6	+4	+6*	+10***	+12***
	% brain weight	55.429	42.528	+7	+10*	+10*	+18***	+12**	+20***
Epididymides:	absolute	0.9238g		-12**		-9*		-15***	
	% body weight	0.30473		-13***		-15***		-15***	
	% brain weight	49.005		-13**		-11**		-14***	
Uterus:	absolute		0.75g		-27*		-24*		-25*
	% body weight		0.372		-32**		-33**		-34**
	% brain weight		41.722		-28**		-23*		-24*
Gross Pathology:		-	-	-	-	-	-	-	-
Histopathology:									
Liver:	increased mitosis	0	0	3	0	7**	0	5*	0
Testis:	Sertoli-cell vacuolation	0		0		0		3	
	spermatid retention	0		4		7**		9***	

NC: not calculated -: no noteworthy findings

*: p<0.05 **: p<0.01 ***: p<0.001

a: group means are shown for the control group, and percent differences from the control group for the treated groups. Statistical significance is based on actual data.

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

7.10 オロダテロールのイヌ反復吸入投与毒性試験

Test Article: Olodaterol

Report Title: BI 1744CL: 4 week inhalation toxicity study in dogs with 4 week recovery

Species/Strain:	Dog/Beagle	**Duration of Dosing:**	4 Weeks	**Doc. No.:**	U[redacted]-2146
Initial Age:	7-8 months	**Duration of Postdose:**	4 Weeks	**Location in CTD:**	4.2.3.2-12
Date of First Dose:	[redacted]	**Method of Administration:**	Inhalation, face mask with oropharyngeal tube 11 min exposure time per day	**GLP Compliance:**	Yes
		Vehicle/Formulation:	BAC/Na-EDTA solution		

Special Features: None
No Observed Adverse Effect Level: 13.7 µg/kg/day, Olo (free base)

Daily Achieved Dose (Olo, µg/kg free base)			**0 Vehicle Control**		**2.2**		**13.7**		**127**	
Number of Animals (main study + recovery)			**M: 3+2**	**F: 3+2**	**M: 3+0**	**F: 3+0**	**M: 3+0**	**F: 3+0**	**M: 3+2**	**F: 3+2**
Toxicokinetics										
AUC_{0-24} (pmol·h/L)	**Day 1**		NC	NC	205	414	2300	3260	22300	33100
	Day 28		NC	NC	NA[b]	NA[b]	4270	4320	27800	35200
Noteworthy Findings										
Died or Sacrificed Moribund:			0	0	0	0	0	0	0	0
Body Weight (%[a]):	**Week 4**		8.2 kg	6.5 kg	+7	+8	+13	+18	+17**	+12
	Recovery Week 4		9.9 kg	7.7 kg					+3	-3
Food Consumption (%[a]):	**Week 4**		326 g/dog/day	262 g/dog/day	+16	+7	+15	+24	+19	+18
	Recovery Week 4		393 g/dog/day	371 g/dog/day					-6	-20
Cardiovascular investigations (%[a]):										
Heart Rate (bpm):	**Day 2**	**(+15 min)**	96	101	+21	-2	+64	+42	+81	+81
		(+1h)	102	90	+24	+41	+64	+72	+60	+100
	Day 27	**(+15 min)**	96	97	-10	+2	+1	+2	+13	+11
		(+1h)	100	110	+12	-7	-3	+4	+14	+11

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

7.10 オロダテロールのイヌ反復吸入投与毒性試験（続き） Doc. No.: U[redacted]-2146 (Continued)

Daily Achieved Dose (Olo, µg/kg free base)			**0 Vehicle Control**		**2.2**		**13.7**		**127**	
Number of Animals (main study + recovery)			**M: 3+2**	**F: 3+2**	**M: 3+0**	**F: 3+0**	**M: 3+0**	**F: 3+0**	**M: 3+2**	**F: 3+2**
Cardiovascular investigations (%[a]):										
PR (sec):	**Day 2**	**(+15 min)**	0.09	0.10	0	-10	-22	-20	-22	-20
	Day 27	**(+15 min)**	0.09	0.10	+11	-10	-11	-10	-11	-10
QT (sec):	**Day 2**	**(+15 min)**	0.20	0.20	-5	0	-10	-5	-15	-15
	Day 27	**(+15 min)**	0.19	0.20	+5	0	+5	0	+5	-5
QTcF (sec):	**Day 2**	**(+15 min)**	0.24	0.23	-4	+4	+4	+9	0	+4
	Day 27	**(+15 min)**	0.23	0.23	-4	0	0	+4	+4	0
Hematology			-	-	-	-	-	-	-	-
Clinical chemistry (%[a])										
Potassium	**Week 4**		4.1	4.1	+10*	+5*	+15**	+12***	+12**	+7**
	Recovery Week 4		4.0	3.8					+5	+8
Phosphate	**Week 4**		1.69	1.55	+15	+4	+41**	+17	+20*	+8
	Recovery Week 4		1.47	1.29					+6	+10
Histopathology:										
Liver: periportal glycogen	**Week 4**		0	0	0	0	0	1	0	3
	Recovery Week 4		0	0					0	0

NA: not applicable NC: not calculated -: no noteworthy findings

a: for controls, group means are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown. Statistical significance is based on actual data.

*: $p<0.05$ **: $p<0.01$ ***: $p<0.001$

b: ex vivo contamination

Food consumption/Heart rate data not analysed statistically

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

7.11 オロダテロールのイヌ反復吸入投与毒性試験

Test Article: Olodaterol

Report Title: BI 1744CL: 13-week inhalation toxicity study in beagle dogs with a 6-week recovery period

Species/Strain:	Dog/Beagle	**Duration of Dosing:**	13 weeks	**Doc. No.:**	U[redacted]-1317
Initial Age:	8-9 months	**Duration of Postdose:**	6 weeks	**Location in CTD**	4.2.3.2-13
Date of First Dose:	[redacted]	**Method of Administration:**	Inhalation, face mask with oropharyngeal tube 10 min exposure time per day	**GLP Compliance:**	Yes
		Vehicle/Formulation:	BAC/Na-EDTA solution		

Special Features: None

No Observed Adverse Effect Level: 160 µg/kg/day, Olo (free base), Local: 330 µg/kg/day, Olo (free base)

Daily Achieved Dose (Olo, µg/kg free base)	**0**		**0**		**4.9**		**15**		**160**	
	Air Control		**Vehicle Control**							
Number of Animals (main study + recovery)	**M: 4+0**	**F: 4+0**	**M: 4+2**	**F: 4+2**	**M: 4+0**	**F: 4+0**	**M: 4+0**	**F: 4+0**	**M: 4+2**	**F: 4+2**
Toxicokinetics										
AUC_{0-24h} (pmol·h/L) Day 1	NC	NC	NC	NC	822	844	2320	2410	30300	24900
Day 86	NC	NC	NC	NC	616	689	1540	2080	18500	18600
Noteworthy Findings										
Died or Sacrificed Moribund	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Body Weight (%[a]): Week 13	7.81 kg	5.90 kg	8.11 kg	6.58 kg	+3	+3	+10	+1	+4	+4
Recovery Week 6			8.33 kg	7.35 kg					-12	-9
Food Consumption:	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Clinical Observations:										
Increased heart rate and more palpable heart beat immediately post dose	-	-	-	-	very few animals on very few days		very few animals on few days		many animals on several days	
Ophthalmology:	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cardiovascular investigations:										
Heart Rate (%[a])										
Day 2 (immediately post dose)	93 bpm	113 bpm	85 bpm	123 bpm	+29	+1	+82	+4	+94	+45
Recovery Week 5			125 bpm	125 bpm					-4	-4

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

7.11 オロダテロールのイヌ吸入反復投与毒性試験（続き）

Doc. No.: U[redacted]-1317 (Continued)

Daily Achieved Dose (Olo, µg/kg free base)		0 Air Control		0 Vehicle Control		4.9		15		160	
Number of Animals (main study + recovery)		M: 4+0	F: 4+0	M: 4+2	F: 4+2	M: 4+0	F: 4+0	M: 4+0	F: 4+0	M: 4+2	F: 4+2
Haematology:		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Blood Chemistry (%[a]):											
AST (U/L)	Week 1	38	42*	32	31	-2	+1	-7	-1	-16	+14
	Week 13	42	40	37	32	+15	+14	+2	+13	-1	+50***
	Recovery Week 6			35	37					-14	+11
ALT (U/L)	Week 1	32	32	34	31	+12	-1	-7	-9	+2	+32*
	Week 13	35	34	37	31	+23	-1	+4	+22	+17	+45**
	Recovery Week 6			37	37					-5	-7
CK (U/L)	Week 1	182	237	187	172	+16	-3	-13	+16	-12	+5
	Week 13	169	197	156	147	+61	+51	+68	+73	+63	+203***[c]
	Recovery Week 6			154	125					-2	+62
Urea (mmol/L)	Week 1	5.0	5.1	4.9	5.5	-19*	-17	-8	-29*	-12	-6
	Week 13	5.7	5.5	5.5	6.2	-3	-7	+17	+11	+25**	+14
	Recovery Week 6			4.2	4.9					+15	+18
Creatinine (µmol/L)	Week 1	51	46	55	48	+1	+4	+4	-1	-9	-6
	Week 13	60	55	58	54	+19	+21*	+32**	+22*	+35**	+39***
	Recovery Week 6			63	64					-12	+8
Urinalysis:		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gross Pathology:		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Organ Weights:		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Heart:	absolute	61.25 g	50.15 g	68.85 g	51.03 g	-9	-1	-4	+1	-6	+7
	% body weight	0.7773	0.8345	0.8565	0.7988	-14*	-8	-14*	-4	-14*	0
	% brain weigh	83.4	75.0	93.4	71.8	-6	+1	-9	+5	-12	+11
Lungs:	absolute	63.88 g	47.33 g	66.8 g	49.48 g	-12*	+4	-1	-2	-10*	-8
	% body weight	0.8088	0.7859	0.8355	0.7741	-17*	-3	-12*	-7	-17*	-14
	% brain weigh	86.94	70.05	90.43	69.5	-8	+7	-5	+1	-15*	-4

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

7.11 オロダテロールのイヌ反復吸入投与毒性試験（続き）

Doc. No.: U[redacted]-1317 (Continued)

Daily Achieved Dose (Olo, µg/kg free base)	0 Air Control		0 Vehicle Control		4.9		15		160	
Number of Animals (main study + recovery)	M: 4+0	F: 4+0	M: 4+2	F: 4+2	M: 4+0	F: 4+0	M: 4+0	F: 4+0	M: 4+2	F: 4+2
Histopathology: Week 13										
Liver:										
centrilobular, glycogen depletion	0	0	0	0	0	0	0	0	4	2
periportal, increased glycogen storage	0	0	0	0	0	0	2	4	4	4
Trachea:										
inflammatory infiltration	1	1	2	2	0	1	3	1	2	2
reduced number of goblet cells	1	0	2	0	1	0	0	2	0	1
atrophy of respiratory epithelium	1	1	0	2	2	0	2	2	2	1
non-keratinising squamous metaplasia	0	0	1	1	0	1	0	0	0	1
Histopathology: Recovery Week 6										
Trachea:										
inflammatory infiltration			1	1					2	1
reduced number of goblet cells			0	1					0	0
non-keratinising squamous metaplasia			1	0					1	0

NC: not calculated -: no noteworthy findings

a: group means are shown for the air and vehicle control groups, and percent differences from the vehicle control group for the treated groups. Statistical significance is based on actual data. Statistical differences are from for the vehicle control group for the air control and the treated groups.

*: $p<0.05$ **: $p<0.01$ ***: $p<0.001$

b: group means are shown for all groups for the comparison with both respective controls and pretrial values

c: increase mainly due to individual animal

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

7.12 オロダテロールのイヌ反復吸入投与毒性試験

Test Article: Olodaterol

Report Title: BI 1744CL: 52-week inhalation toxicity study in beagle dogs with a 6-week recovery period

Species/Strain:	Dog/Beagle	**Duration of Dosing:**	52 weeks	**Doc. No.:**	U[redacted]-1740
Initial Age:	9 months	**Duration of Postdose:**	6 weeks	**Location in CTD:**	4.2.3.2-14
Date of First Dose:	[redacted]	**Method of Administration:**	Inhalation, face mask with oropharyngeal tube 10 min exposure time per day	**GLP Compliance:**	Yes
		Vehicle/Formulation:	BAC/Na-EDTA solution		

Special Features: None
No Observed Adverse Effect Level: 15 µg//kg/day, Olo (free base)

Daily Achieved Dose (Olo, µg/kg free base)		**0 Vehicle Control**		**15**		**60**		**330**	
Number of Animals (main study + recovery)		**M: 4+2**	**F: 4+2**	**M: 4+0**	**F: 4+0**	**M: 4+0**	**F: 4+0**	**M: 4+2**	**F: 4+2**
Toxicokinetics									
AUC_{0-24} (pmol·h/L)	**Day 1**	NC	NC	1160	1930	7750	8500	50200	59900
	Day 358	NC	NC	2160	3560	7970	9910	46000	50200
Noteworthy Findings									
Died or Sacrificed Moribund:		0	0	0	0	0	0	0	0
Body Weight (%[a]):	**Week 52**	8.84 kg	7.76 kg	+10	-3	+16	+14	+7	+11
	Recovery Week 6	9.38 kg	6.93 kg					-4	+13
Food Consumption (%[a]):	**Day 136**	341.02 g/dog/day	253.12 g/dog/day	+2	+10	+2	+18*	+1	+17*
Clinical Observations:									
Rapid heart rate and increased heart force		-	-	+	+	++	++	+++	+++
Dry mouth mucosa		+	+	++	++	++	++	++	++
Ophthalmology:		-	-	-	-	-	-	-	-
Cardiovascular investigations (% [a]):									
Heart Rate (bpm)	**Day 2 (immediately post dose)**	106	99	+24	+44*	+54**	+67**	+55**	+92**
	Recovery Week 6	112	101					-1	-5
Ventricular premature complexes/Ventricular tachycardia[b]									
	Day 2 (predose or immediately post dose)	0	0	0	0	0	1	0	2

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

7.12 オロダテロールのイヌ反復吸入投与毒性試験（続き）

Doc. No.: U[redacted]-1740 (Continued)

Daily Achieved Dose (Olo, µg/kg free base)			0 Vehicle Control		15		60		330	
Number of Animals (main study + recovery)			M: 4+2	F: 4+2	M: 4+0	F: 4+0	M: 4+0	F: 4+0	M: 4+2	F: 4+2
Cardiovascular investigations (%[a]):										
QT (sec)	Day 2	immediately post dose	203	192	-12*	-6	-11*	-5	-17**	-16**
	Recovery Week 6		196	193					-7	-6
QTcF (sec)	Day 2	immediately post dose	242	220	-7	+7	+3	+16**	-2	+9*
	Recovery Week 6		241	228					-8	-5
Systolic blood pressure (mmHg)	Week 12	predose	134	119	-1	+12	+6	+6	-7	+36**
		immediately post dose	119	117	+8	+15	-3	-3	+8	+31
	Week 26	predose	125	129	+6	+10	-5	+7	+3	+22
		immediately post dose	118	132	+42**	+14	+3	+7	+13	+19
Diastolic blood pressure (mmHg)	Week 12	predose	80	82	-4	-7	-23	-15	-20	+9
		immediately post dose	85	79	-8	-9	-29	-8	-18	+18
	Week 26	predose	86	82	-17	-2	-33**	-11	-3	+33*
		immediately post dose	75	86	+59*	+6	+8	+12	+4	+21
Haematology:			-	-	-	-	-	-	-	-
Blood Chemistry (%):										
CK (U/L [a])	Week 52		203.75	177.4	+14	+49	+18	+39	+57	+43
	Recovery Week 6		299.45	297.25					-33	-47
CK-MB (µg/L)[c]	Day 4		1.5	1.3	1.4	1.7	1.2	1.5	2.1	2.1
	Recovery Week 6		1.9	2.2					1.9	1.8
cTnI (µg/L)[c]	Day 4		0.00	0.00	0.00	0.00	0.05	0.21	0.27	2.49
	Recovery Week 6		0.00	0.08					0.01	0.01
Creatinine (µmol/L[a])	Week 52		59.6	54.8	+21	+21	+20	+51***	+14	+28**
	Recovery Week 6		68.9	61.4					+4	+0
Urinalyses:			-	-	-	-	-	-	-	-
Organ Weights (%[a]):										
Prostate:	absolute	Week 52	6.49 g		-13		-23		-28*	
		Recovery Week 6	9.19 g						-58	
	% body weight	Week 52	0.076		-23		-36*		-35*	
		Recovery Week 6	0.102						-58	

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

7.12 オロダテロールのイヌ反復吸入投与毒性試験（続き）

Doc. No.: U[redacted]-1740 (Continued)

Daily Achieved Dose (Olo, µg/kg free base)	0 Vehicle Control		15		60		330	
Number of Animals (main study + recovery)	M: 4+2	F: 4+2	M: 4+0	F: 4+0	M: 4+0	F: 4+0	M: 4+2	F: 4+2
Gross Pathology: Week 52								
Heart:								
white discoloration of the left papillary muscles	0	0	0	0	0	0	2	2
Gross Pathology: Recovery Week 6								
Heart:								
white discoloration of the left papillary muscles	0	0					0	0
Histopathology: Week 52								
Heart:								
fibrosis/fibroplasia	0	0	0	0	1	1	3	3
Liver:								
centrilobular, glycogen depletion	1	0	1	0	2	2	4	1
periportal, increased glycogen storage	1	0	1	0	2	2	4	1
Prostate:								
glandular atrophy	2		1		3		3	
Histopathology: Recovery Week 6								
Heart:								
fibrosis/fibroplasia	0	0					0	2
Prostate:								
glandular atrophy	0						2	

NC: not calculated

- : no noteworthy findings +: mild ++: moderate +++: marked

*: $p<0.05$ **: $p<0.01$ ***: $p<0.001$

a: for controls, group means are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown.

b: number of affected animals

c: no statistical evaluation performed, data evaluated on individual animal basis using cut-off values.

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

7.13 チオトロピウム+オロダテロールのイヌ反復吸入投与毒性試験

Test Article: Tiotropium+Olodaterol

Report Title: BI 1744 CL and Ba 679 BR (1:1 Combination): 4-Week Inhalation Toxicity Study in Dogs With a 4-Week Recovery Period

Species/Strain:	Dog, Beagle	**Duration of Dosing:**	4 Weeks	**Doc. No.**	U[redacted]-1894
Initial Age (at start of dosing):	*ca* 7-8 Months	**Duration of Postdose:**	4 Weeks	**Location in CTD:**	4.2.3.2-16
Date of First Dose:	[redacted]	**Method of Administration:**	Inhalation, face mask with oropharyngeal tube 10 min exposure time per day	**GLP Compliance:**	Yes
Vehicle/Formulation:	BAC/Na-EDTA solution				
Special Features:	None				
No Observed Adverse Effect Level:	16.8+16.1 µg/kg/day, Tio+Olo (free moiety)				

Daily Achieved Dose		**0**		**6.07 + 5.71**		**16.8 + 16.1**		**157 + 152**	
(Tio+Olo, µg /kg free moiety)		**Vehicle Control**		**Low Dose**		**Intermediate Dose**		**High Dose**	
Number of Animals		**M:5**	**F:5**	**M:3**	**F:3**	**M:3**	**F:3**	**M:5**	**F:5**
Toxicokinetics:									
Tiotropium AUC_{0-24} (pmol·h/L)	Day 1	NC	NC	491	746	2220	2390	15900	32000
	Day 28	NC	NC	2040	2780	5590	6730	44300	69100
Olodaterol AUC_{0-24} (pmol·h/L)	Day 1	NC	NC	503	1080	2570	3740	21200	33200
	Day 28	NC	NC	2560	3800	5690	7670	48800	52100
Noteworthy Findings									
Died or Sacrificed Moribund		0	0	0	0	0	0	0	0
Body Weight (%[a])		8.2 kg	7.2 kg	+7	+3	+2	-6	-1	-6
Food Consumption (%[a])		511 g	539 g	+24	-6	-7	-3	-5	+8
Clinical Observations:									
Dry mucosa of nose		-	-	+	+	++	++	+++	+++
Dry mucosa of oral cavity		-	-	+/-	-	++	++	+++	+++
Rapid heart rate		-	-	-	-	+	+	++	++
Mydriasis		-	-	-	-	++	++	+++	+++

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

7.13 チオトロピウム+オロダテロールのイヌ反復吸入投与毒性試験（続き） Doc. No.: U[redacted]-1894 (Continued)

Daily Achieved Dose		**0**		**6.07 + 5.71**		**16.8 + 16.1**		**157 + 152**	
(Tio+Olo, µg /kg free moiety)		**Vehicle Control**		**Low Dose**		**Intermediate Dose**		**High Dose**	
Number of Animals		**M:5**	**F:5**	**M:3**	**F:3**	**M:3**	**F:3**	**M:5**	**F:5**
Ophthalmoscopy									
Reddened eyes		-	-	-	-	-	+/-	++	+
Mucoid/Mucopurulent discharge		-	-	-	+/-	+	+	++	+
Electrocardiography									
Heart rate (bpm)									
Day 2	Predose	94	117	+14	-14	+27*	+6	+84***	+59***
	Immediately post dose	95	100	-1	+29*	+37**	+42**	+121 ***	+106 ***
	+4h post dose	112	119	0	+13*	+46***	+36***	+79***	+63***
Day 27	Predose	89	110	+47**	+20	+46**	+18	+64***	+30**
	Immediately post dose	92	103	+11	+21*	+48**	+18	+74***	+63***
	+4h post dose	117	113	+21	+29***	+28*	+26**	+32**	+37***
Haematology[b]	Week 4								
Reticulocytes (%)		0.9	1.3	-44	-46**	-22	-46***	+11	-46***
Haematocrit (L/L)		0.475	0.474	-13	-10	-3	-11*	-8	-14 **
Clinical Chemistry[b]	Week 4								
Alkaline phosphatase (iu//L)		95	117	-1	-12	-23	-37*	-45	-34*
Phosphate (mmol/L)		1.70	1.55	+9	+24	+25**	+41*	+34***	+29*
Potassium (mmol/L)		4.4	4.2	-2	+10*	+7*	+14***	+11***	+10**
Albumin (g/L)		35	35	-11*	0	-9	-6	-14**	-9**
Urea (mmol/L)		3.9	3.0	-5	+33	0	+53*	+13	+60**
Urinalysis[b]	Week 4								
Specific gravity		1.025	1.024	+3*	+3**	+3*	+3**	+2*	+3**
Volume (mL)		250.0	272.6	-37	-53***	-60*	-61***	-55**	-51***
Sodium (mmol/L)		27.8	27.4	+110*	+130	+407***	+355*	+529***	+415**
Potassium (mmol/L)		111.12	108.64	+45	+64*	+69	+75**	+59	+77**

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

7.13 チオトロピウム+オロダテロールのイヌ反復吸入投与毒性試験（続き） Doc. No.: U[redacted]-1894 (Continued)

Daily Achieved Dose		**0**		**6.07 + 5.71**		**16.8 + 16.1**		**157 + 152**	
(Tio+Olo, µg /kg free moiety)		**Vehicle Control**		**Low Dose**		**Intermediate Dose**		**High Dose**	
Number of Animals		**M:5**	**F:5**	**M:3**	**F:3**	**M:3**	**F:3**	**M:5**	**F:5**
Organ Weights	**(%[c])**								
Thymus	absolute	6.62 g	4.05 g	-3	8	-47*	-18	-74**	-54*
	% body weight	0.080	0.055	-8	9	-45	-13	-74**	-47
	% brain weight	8.589	5.319	1	20	-45	-5	-72**	-48
Gross Pathology		-	-	-	-	-	-	-	-
Histopathology[d]									
Liver									
Glycogen, reduced, centrilobular (mild to marked)		0	0	3	2	3	3	3	3
Glycogen, reduced, periportal (minimal to mild)		3	3	1	2	0	1	0	0
Eyes									
Conjunctivitis , unilateral (minimal)		0	0	0	0	0	0	1	0
Fibrosis, corneal, unilateral (minimal)		0	0	0	0	0	0	1	0
Keratitis, focal, bilateral (minimal)		0	0	0	0	0	0	1	0
Vascularisation, corneal, unilateral (minimal)		0	0	0	0	0	0	1	0
Larynx									
Exudate, inflammatory (minimal)		0	0	0	0	1	0	1	0
Inflammatory cell infiltration, submucosal, focal (minimal to mild)		0	1	1	0	2	1	2	0
Laryngitis, focal (minimal to mild)		0	1	1	0	2	2	2	0
Nasal cavity									
Increased submucosal inflammatory cell infiltration (mild)		0	0	1	0	1	0	0	2

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

7.13 チオトロピウム+オロダテロールのイヌ反復吸入投与毒性試験（続き） Doc. No.: U[redacted]-1894 (Continued)

Daily Achieved Dose	**0**		**6.07 + 5.71**	**16.8 + 16.1**	**157 + 152**	
(Tio+Olo, µg /kg free moiety)	**Vehicle Control**		**Low Dose**	**Intermediate Dose**	**High Dose**	
Number of Animals	**M:2**	**F:2**			**M:2**	**F:2**
Post Dose Evaluation						
Body Weight (%[c])	8.1 kg	7.0 kg			+5	+13*
Food consumption (%[c])	599 g	502 g			-9	+28*

NC: not calculated

-: no noteworthy findings +/-: isolated occasion, +: mild, ++: moderate, +++: marked

*: $p<0.05$ **: $p<0.01$ ***: $p<0.001$

a: at end of dosing period. For controls, group means are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown.

b: statistical significance is based on actual data.

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

d: statistical significance is based on incidence data.

e: at end of post dose period. For controls, group means are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown.

There were no noteworthy findings unless otherwise stated.

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

7.14 チオトロピウム+オロダテロールのイヌ反復吸入投与毒性試験 Test Article: Tiotropium+Olodaterol

Report Title: BI 1744 CL and Ba 679 BR (6:1 Combination and 1:2 Combination) 4-Week Inhalation Toxicity Study in Dogs with a 4-Week Recovery Period

Species/Strain:	Dog, Beagle	**Duration of Dosing:**	4 Weeks	**Doc. No.**	U[redacted]-1895
Initial Age (at start of dosing):	*ca* 10-11 months	**Duration of Postdose:**	4 Weeks	**Location in CTD:**	4.2.3.2-17
Date of First Dose:	[redacted]	**Method of Administration:**	Inhalation, face mask with oropharyngeal tube 10 min exposure time per day	**GLP Compliance:**	Yes
Vehicle/Formulation:	BAC/Na-EDTA solution				
Special Features:	None				
No Observed Adverse Effect Level:	2.66 + 16.4 and 28.8 + 16.5 µg/kg/day for 1:6 and 2:1 combination of Tio+Olo (free moiety)				

Daily Achieved Dose (Tio+Olo, µg /kg free moiety)	**0 Group 1 Vehicle Control**		**2.66 + 16.4 Group 2 1:6, Low Dose I**		**19.8 + 124 Group 3 1:6, High Dose I**		**28.8 + 16.5 Group 4 2:1, Low Dose II**		**385 + 191 Group 5 2:1, High Dose II**	
Number of Animals	**M:5**	**F:5**	**M:3**	**F:3**	**M:5**	**F:5**	**M:5**	**F:5**	**M:3**	**F:3**
Toxicokinetics										
Day 1 Tiotropium AUC_{0-24} (pmol·h/L)	NC	NC	415	729	3250	4060	8240	16000	79900	68500
Day 1 Olodaterol AUC_{0-24} (pmol·h/L)	NC	NC	3980	5140	22300	25600	5660	7470	33000	36500
Day 28 Tiotropium AUC_{0-24} (pmol.h·L)	NC	NC	609	1040	5940	7060	13500	11300	80300	86100
Day 28 Olodaterol AUC_{0-24} (pmol·h/L)	NC	NC	4120	6520	36500	48000	6850	6950	45200	32900
Noteworthy Findings										
Died or Sacrificed Moribund	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Body Weight (%[a])	7.5 kg	7.5 kg	+3	+3	+3	-9	+1	-7	-7	0
Food Consumption (%[a])	590 g	528 g	+9	+19	-5	+3	-8	+6	-8	0
Clinical Observations:										
Mydriasis	-	-	-	-	+/-	+	+	++	+++	+++
Rapid heart (1-2 h)	-	-	+/-	+/-	+++	+++	+++	+++	++	++
Rapid heart (1-2 h) with carotid pulse	-	-	-	-	+	+	+/-	+/-	+/-	+/-
Dry nose mucosa	-	-	+/-	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Dry oral cavity	-	-	-	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Reddened eyes with/without mucoid discharge	+/-	-	-	-	+	+/-	-	+	++	++
Reddening of the soft palate	-	-	-	-	+	+/-	-	+/-	-	-

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

7.14 チオトロピウム+オロダテロールのイヌ反復吸入投与毒性試験（続き） Doc. No.: U[redacted]-1895 (Continued)

Daily Achieved Dose (Tio+Olo, µg /kg free moiety)		0 Group 1 Vehicle Control		2.66 + 16.4 Group 2 1:6, Low Dose I		19.8 + 124 Group 3 1:6, High Dose I		28.8 + 16.5 Group 4 2:1, Low Dose II		385 + 191 Group 5 2:1, High Dose II	
Number of Animals		**M:5**	**F:5**	**M:3**	**F:3**	**M:5**	**F:5**	**M:5**	**F:5**	**M:3**	**F:3**
Ophthalmoscopy											
Mild reddening of the conjunctivae with/without mucoid discharge		-	-	-	-	+	-	-	+	+	+/-
Electrocardiography (%[b])											
Heart rate (bpm)											
Day 2	**Predose**	87	90	+29	+14	+69***	+61***	+52**	+61***	+106***	+104***
	Immediately Post Dose	87	96	+31	+20	+98***	+75***	+83***	+92***	+125***	+110***
	4 h Post Dose	107	108	+22	+21	+68***	+68***	+60***	+69***	+79***	+78***
Day 27	**Predose**	107	98	+7	+38**	+15	+31**	+13	+37***	+15	+39**
	Immediately Post Dose	90	99	+31	+12	+64***	+72***	+46**	+58**	+68***	+67**
	4 h Post Dose	108	122	+16	+9	+46***	+22*	+36***	+20*	+44***	+32**
Q-TcF (sec)											
Day 2	**Predose**	0.23	0.23	0	-4	+9	+9**	0	+4*	+4	+9**
Q-TcV (sec)											
Day 2	**4 h Post Dose**	0.24	0.23	+4	0	-8*	0	0	0	-8	+4
Clinical Chemistry (%[b])											
Urea (mmol/L)		4.2	3.9	+14	+38*	+33*	+64***	+40*	+31*	+83***	+59***
Potassium (mmol/L)		4.0	4.2	+8**	+5	+10***	+7	+15***	+10	+13***	+7
Phosphate (mmol/L)		1.62	1.66	+7	+7	+3	+13	+22*	+12	+40**	+22
Urinalysis (%[b])											
Urinary Sodium (mmol/L)		33.6	22.0	+93	+223*	+227*	+510***	+243**	+400***	+544***	+410***
Urinary Potassium (mmol/L)		198.62	148.38	+6	+72*	0	+51	+7	+32	+36	+121**
Urinary volume (mL)		124.3	269.0	+34	-53*	+36	-39	+1	-61*	-44	-84**
Specific gravity		1.047	1.028	0	+2*	0	+1	0	+2*	+2**	+6***

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

7.14 チオトロピウム+オロダテロールのイヌ反復吸入投与毒性試験（続き）

Doc. No.: U[redacted]-1895 (Continued)

Daily Achieved Dose (Tio+Olo, µg /kg free moiety)	0 Group 1 Vehicle Control		2.66 + 16.4 Group 2 1:6, Low Dose I		19.8 + 124 Group 3 1:6, High Dose I		28.8 + 16.5 Group 4 2:1, Low Dose II		385 + 191 Group 5 2:1, High Dose II	
Number of Animals	M:5	F:5	M:3	F:3	M:5	F:5	M:5	F:5	M:3	F:3
Organ Weights (%[b])										
Lung										
absolute weight	64.14 g	84.13 g	+19**	-16	+14*	-11	+11	-22	+28***	-11
relative weight (% body weight)	0.850	1.093	+18	-15	+11	+6	+10	-6	+43**	+1
relative weight (% brain weight)	87.049	119.836	+25*	-10	+29**	-10	+24*	-23	+26**	-11
Thymus										
absolute weight	4.71 g	6.21 g	-52	-25	+3	-67*	+25	-66*	-79*	-68*
relative weight (% body weight)	0.060	0.079	-53	-25	+3	-59*	+23	-59*	-75	-63**
relative weight (% brain weight)	6.330	8.794	-50	-20	+18	-66*	+42	-66*	-79**	-68*
Gross Pathology	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Histopathology[c]										
Liver										
Glycogen, altered distribution, periportal (minimal to marked)	0	0	2	1	3	3	3	1	3	3
Glycogen, altered distribution, centrilobular (minimal to moderate)	3	3	0	1	0	0	0	0	0	0
Thymus										
Involution (minimal to moderate)	2	2	3	2	3	3	2	3	3	3
Eyes										
Bilateral keratitis (minimal)	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Heart										
Myocardial fibrosis, papillary muscle (minimal to mild)	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2
Larynx										
Neutrophil infiltration, diffuse (minimal to moderate)	0	0	1	0	0	0	0	0	3	0

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

7.14 チオトロピウム+オロダテロールのイヌ反復吸入投与毒性試験（続き） Doc. No.: U[redacted]-1895 (Continued)

Daily Achieved Dose (Tio+Olo, µg /kg free moiety)	0 Group 1 Vehicle Control		19.8 + 124 Group 3 1:6, High Dose I		28.8 + 16.5 Group 4 2:1, Low Dose II	
Post Dose Evaluation Number of Animals	M:2	F:2	M:2	F:2	M:2	F:2
Body Weight (%)[d]	7.9 kg	7.3 kg	-3	-1	-3	+18
Clinical Observations:						
Dry nose mucosa	-	-	+/-	+/-	+/-	+/-
Reddened eyes	-	-	+/-	-	-	-
Organ Weights (%[b])						
Thymus						
absolute weight	5.25 g	2.34 g	-45	-31	-37	+76
relative weight (% body weight)	0.068	0.046	-44	-50	-35	+11
relative weight (% brain weight)	7.270	3.150	-39	-24	-34	+85
Histopathology[c]						
Liver						
Glycogen, altered distribution, centrilobular (minimal to moderate)	2	2	1	1	1	1

NC: not calculated
-: no noteworthy findings +/-: isolated occasions +: mild ++: moderate +++: marked.
*: $p<0.05$ **: $p<0.01$ ***: $p<0.001$
bpm: Beats per minute
QTcF: QTc by Fridericia's correction QTcV: QTc by Van de Water's correction
a: at end of dosing period. For controls, group means are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown.
b: for controls, group means are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown. Statistical significance is based on actual data (not on the percent differences).
c: based on incidence data, no noteworthy findings unless otherwise stated.
d: at end of the recovery period. For controls, group means are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown.
There were no noteworthy findings unless otherwise stated.

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

7.15 チオトロピウム+オロダテロールのイヌ反復吸入投与毒性試験

Test Article: Tiotropium+Olodaterol

Report Title: BI 1744 CL/tiotropium bromide (Ba 679 BR): 13-week inhalation toxicity study in Beagle dogs with a 6-week recovery period

Species/Strain:	Dog, Beagle, Marshall	**Duration of Dosing:**	13 weeks	**Doc. No.:**	U[redacted]-2249
Initial Age:	Approx. 7 months	**Duration of Postdose:**	6 weeks	**Location in CTD:**	4.2.3.2-18
Date of First Dose:	[redacted]	**Method of Administration:**	Inhalation, face mask with oropharyngeal tube 10 min exposure time per day	**GLP Compliance:**	Yes
		Vehicle/Formulation:	BAC/Na-EDTA solution		

Special Features: None
No Observed Adverse-Effect Level: 14 + 16 µg/kg, Tio+Olo (free moiety), Local: 290 + 310 µg/kg, Tio+Olo (free moiety)

Daily Achieved Dose (Tio+Olo, µg /kg free moiety)	**Vehicle-Control 0.0 + 0.0**		**14 + 16**		**57 + 62**		**290 + 310**		**0 + 290**		**310 + 0**	
Number of Animals	**M:6**	**F:6**	**M:4**	**F:4**	**M:4**	**F:4**	**M:6**	**F:6**	**M:6**	**F:6**	**M:6**	**F:6**
Toxicokinetics:												
AUC_{0-24} (pmol·h/L)[a]												
Tiotropium	NC	NC	2040	4290	9310	9920	51000	69200	-	-	19800	47600
Olodaterol	NC	NC	1850	2910	8140	7370	43400	51000	30600	40600	-	-
Noteworthy Findings												
Died or Sacrificed Moribund	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Rel. Body Weight (%[b])	119.5	118.6	+4	+2	-9*	-4	-1	-8*	+4	+3	-7	-7*
Food Consumption	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Clinical Observations												
Increased heart force	-	-	+	+	+	+	++	++	++	++	++	++
Rapid heart rate	-	-	+	+	++	++	+++	+++	++	++	+++	+++
Dry mouth mucosa	+	+	++	++	++	++	+++	+++	+	+	+++	+++
Dry nose	-	-	+	+	++	++	+++	+++	+	+	+++	+++
Mydriasis	-	-	+	+	++	++	+++	+++	-	-	+++	+++
Dry eyes, swollen eyelids, reddened conjunctivae	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

7.15 チオトロピウム+オロダテロールのイヌ反復吸入投与毒性試験（続き）

Doc. No.: U[redacted]-2249 (Continued)

Daily Achieved Dose (Tio+Olo, µg /kg free moiety)		Vehicle-Control 0.0 + 0.0		14 + 16		57 + 62		290 + 310		0 + 290		310 + 0	
Number of Animals		M:6	F:6	M:4	F:4	M:4	F:4	M:6	F:6	M:6	F:6	M:6	F:6
Ophthalmology		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cardiovascular investigations (%[c])													
Heart rate (bpm)													
Day 22	predose	132		+4		0		+14		-8		+17	
	immediately post dose	130		+18*		+38*		+51*		+5*		+42*	
Day 85	predose	131		+16		+18		+27		-5		+21	
	immediately post dose	133		+2		+31*		+39*		-2		+28*	
PR-interval (msec)													
Day 22	predose	89.8		-2		-6		-11		0		-5	
	immediately post dose	89.6		-10*		-20*		-23*		-4		-10*	
Day 85	predose	90.8		-8		-13		-14		0		-9	
	immediately post dose	91.0		-7		-18*		-20*		-7*		-10	
QT-interval (msec)													
Day 22	predose	180.8		0		1		-4		+2		-2	
	immediately post dose	188.0		-5		-6*		-13*		-2*		-5*	
Day 85	predose	173.9		-7		-8		-6		+1		-4	
	immediately post dose	184.8		-5		-9		-11*		+1		-8*	
QTcF-interval (msec)													
Day 22	predose	233.7		+1		-1		0		0		+3	
	immediately post dose	241.3		-1		+5		+1		0		+5	
Day 85	predose	224.3		-2		-3		+2		0		+3	
	immediately post dose	237.8		-4		0		0		+2		0	

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

7.15 チオトロピウム+オロダテロールのイヌ反復吸入投与毒性試験（続き）

Doc. No.: U[redacted]-2249 (Continued)

Daily Achieved Dose (Tio+Olo, µg /kg free moiety)	Vehicle-Control 0.0 + 0.0		14 + 16		57 + 62		290 + 310		0 + 290		310 + 0	
Number of Animals	M:6	F:6	M:4	F:4	M:4	F:4	M:6	F:6	M:6	F:6	M:6	F:6
Haematology	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Clinical Chemistry (%[d])												
CK (U/L)	174	138	+21	+17	-10	+7	+29	+7	+39*	+61*	-23	-15
CK-MB (µg/L)[e]	1.7	1.4	-6	+7	-24	-7	-18	+36	+53	+50	-18	-14
cTnI (µg/L)[e]	0.01	0.01	+100	0	+3700	+6500	+24700	+8400	+12900	+2300	+500	+500
urea nitrogen (mmol/L)	5.07	5.08	+33*	+42*	+30*	+56*	+42*	+70*	+37*	+44*	+43*	+32*
creatinine (µmol/L)	54.9	55.4	+21*	+26*	+27*	+30*	+29*	+27*	+51*	+41*	+3	-7
glucose (mmol/L)	5.10	5.24	-9	-35***	-30*	-29***	-13	-21**	-16*	-24**	+4	+2
albumin (g/L)	36.5	37.7	-2	+4	-9	-4	-5	-4	0	-2	0	-3
Urinalysis[d]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Organ Weights	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gross Pathology[f]												
Heart												
Papillary muscle: discoloration, focal, white	0	0	0	0	0	0	3	1	1	0	0	0
Histopathology[f]												
Heart												
Fibrosis/fibroplasias, focal	0	0	0	0	0	3	3	1	2	0	0	0
Liver												
Periportal region: increased storage of glycogen	0	1	0	1	0	4	1	4	0	2	0	0
Centrilubular region: depletion of glycogen	0	0	0	0	2	0	2	3	1	1	0	0

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

7.15 チオトロピウム+オロダテロールのイヌ反復吸入投与毒性試験（続き） Doc. No.: U[redacted]-2249 (Continued)

Daily Achieved Dose (Tio+Olo, µg /kg free moiety)	**Vehicle-Control 0.0 + 0.0**		**14 + 16**		**57 + 62**		**290 + 310**		**0 + 290**		**310 + 0**	
Postdose Evaluation:												
Number Evaluated	**M:2**	**F:2**					**M:2**	**F:2**	**M:2**	**F:2**	**M:2**	**F:2**
Cardiovascular investigations	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Haematology	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Clinical Chemistry	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Urinalysis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Organ Weights	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gross Pathology	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Histopathology[f]												
Heart												
Fibrosis/fibroplasias, focal	0	0					1	1	1	0	0	0

NC: not calculated

-: no noteworthy findings, +/-: isolated occasions. +: mild, ++: moderate, +++: marked.

a: mean on Day 86

b: relative to Day -1; for controls, group means are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown. Statistical significance is based on actual data *: $p<0.05$.

c: for controls, group male+female means are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown. Statistical significance is based on actual data, *: $p<0.05$ vs control with respective pre-dose value as baseline

d: at end of dosing period. For controls, group means are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown. Statistical significance is based on actual data; t-test with pooled variances (two sided) * - $p<0.05$.

e: Day 3, no statistical evaluation performed, data evaluated on individual animal basis using cut-off values

f: number of affected animals

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

7.16 チオトロピウム+オロダテロールのイヌ反復吸入投与毒性試験 Test Article: Tiotropium+Olodaterol

Report Title: BI 1744 CL / tiotropium bromide (Ba 679 BR) (1:2.5 and 2:1 combination): 13-week inhalation toxicity study in Beagle dogs with a 6-week recovery period

Species/Strain:	Dog/ Marshall:BEAGLE	**Duration of Dosing:**	13 weeks	**Doc. No.:**	U[redacted]-1388
Initial Age:	6 to 8 months	**Duration of Postdose:**	6 weeks	**Location in CTD:**	4.2.3.2-19
Date of First Dose:	[redacted]	**Method of Administration:**	Inhalation, face mask with oropharyngeal tube 10 min exposure time per day	**GLP Compliance:**	Yes
		Vehicle/Formulation:	BAC/Na-EDTA solution		

Special Features: None
No Observed Adverse-Effect Level: 36 + 16 µg/kg, Tio+Olo (2.5:1), free moiety

Group	**Vehicle-Control**		**Low-Dose 2.5:1**		**High-Dose 2.5:1**		**High-Dose 1:2**		**Mono Olo**		**Mono Tio**	
Daily Achieved Dose (Tio+Olo, µg /kg free moiety)	**0.0 + 0.0**		**36 + 16**		**300 + 130**		**140 + 300**		**0 + 300**		**300 + 0**	
Number of Animals	**M:6**	**F:6**	**M:4**	**F:4**	**M:6**	**F:6**	**M:6**	**F:6**	**M:6**	**F:6**	**M:4**	**F:4**
Toxicokinetics: AUC_{0-24} Day 86												
Tiotropium **(pmol·h/L)**	NC	NC	7560	4900	37800	32700	27600	24700			51000	54100
Olodaterol **(pmol·h/L)**	NC	NC	2410	1890	12300	12900	42500	48800	38300	46500		
Noteworthy Findings												
Died or Sacrificed Moribund	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Rel. Body Weight (%[a,b])	130.06%	126.58%	-5	+1	-10	-13*	-5	-10*	-1	+12*	-11	-18*
Food Consumption (%[b]) Day 7	695.75 g/day	553.21 g/day	-4	+3	-43***	-24**	-4	-11	0	-8	-14*	-20*
Clinical Observations												
Rapid heart rate	-	-	+	+	++	++	++	++	+	+	+	+
Increased heart force	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Dry mouth mucosa	+	+	++	++	+++	+++	+++	+++	+	+	++	++
Dry nose	-	-	++	++	+++	+++	+++	+++	+	+	+++	+++
Mydriasis	-	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-	+	+
Pupillary rigidity	-	-	++	++	+++	+++	+++	+++	-	-	+++	+++

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

7.16 チオトロピウム+オロダテロールのイヌ反復吸入投与毒性試験（続き）

Doc. No.: U[redacted]-1388 (Continued)

Group	Vehicle-Control		Low-Dose 2.5:1		High-Dose 2.5:1		High-Dose 1:2		Mono Olo		Mono Tio	
Daily Achieved Dose (Tio+Olo, µg/kg free moiety)	0.0 + 0.0		36 + 16		300 + 130		140 + 300		0 + 300		300 + 0	
Number of Animals	M:6	F:6	M:4	F:4	M:6	F:6	M:6	F:6	M:6	F:6	M:4	F:4
Ophthalmology	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cardiovascular investigations												
Heart rate (%[b,c])	132.6		+11		+39		+53		+5		+32	
Haematology	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Clinical Chemistry (%[b])												
cTnI (µg/L)[d]	0.01	0.01	-100	0	+10600	+5200	+23600	+3400	+3200	+14800	+100	+100
Creatinine (µmol/L)[e]	46.6	57.0	+7	+2	+3	-9	+9	-15*	+3	-22*	+6	-16
CK (U/L)[e]	263	318	+9	-31	+329	-18	-10	-44*	-2	-33*	-1	-14
Urinalysis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Organ Weights	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gross Pathology [f]												
Heart, left ventricle, papillary muscle												
focal white discoloration	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Histopathology [f]												
Heart												
left ventricle, papillary muscle												
focal myocardial fibrosis	0	0	0	0	0	1	2	2	2	2	0	0
single cell necrosis	0	0	0	0	0	0	2	0	2	0	0	0
Liver,												
hepatocytes, glycogen storage												
centrolobular depletion	0	0	0	0	3	4	4	4	4	4	0	0
peripher. lobular increased	0	0	1	3	4	4	4	4	4	4	0	0
Lacrimal gland,												
excretory ducts dilatation	0	1	3	2	4	4	4	2	1	1	4	3

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

7.16 チオトロピウム+オロダテロールのイヌ反復吸入投与毒性試験（続き） Doc. No.: U[redacted]-1388 (Continued)

Group	Vehicle-Control		Low-Dose 2.5:1	High-Dose 2.5:1		High-Dose 1:2		Mono Olo		Mono Tio
Daily Achieved Dose (Tio+Olo, µg/kg free moiety)	0.0 + 0.0		36 + 16	300 + 130		140 + 300		0 + 300		300 + 0
Postdose Evaluation: Number of Animals	M:2	F:2		M:2	F:2	M:2	F:2	M:2	F:2	
Body Weight	-	-		-	-	-	-	-	-	
Food Consumption	-	-		-	-	-	-	-	-	
Clinical Observations	-	-		-	-	-	-	-	-	
Ophthalmology	-	-		-	-	-	-	-	-	
Cardiovascular investigations	-	-		-	-	-	-	-	-	
Haematology	-	-		-	-	-	-	-	-	
Clinical Chemistry	-	-		-	-	-	-	-	-	
Urinalysis	-	-		-	-	-	-	-	-	
Organ Weights	-	-		-	-	-	-	-	-	
Gross Pathology	-	-		-	-	-	-	-	-	
Histopathology [f]										
Heart, left ventricle, papillary muscle										
Focal myocardial fibrosis	0	0		1	0	2	0	2	0	

NC: not calculated

-: no noteworthy findings. +: mild, ++: moderate, +++: marked

a: mean on Day 86

b: relative to Day -1; t-test with pooled variances (two sided) *: $p<0.05$.

c: Day 22, immediately after exposure, mean male + female

d: Day 3

e: Day 4

f: number of affected animals

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

7.17 オロダテロールのイヌ反復静脈内投与毒性試験

Test Article: Olodaterol

Report Title: BI 1744CL: 2-week intravenous toxicity study in beagle dogs

Species/Strain:	Dog/Beagle	**Duration of Dosing:**	2 weeks	**Doc. No.:**	U[redacted]-1051
Initial Age:	8-10 months	**Duration of Postdose:**	NA	**Location in CTD:**	4.2.3.2-21
Date of First Dose:	[redacted]	**Method of Administration:**	Intravenous 2 min injection	**GLP Compliance:**	Yes
		Vehicle/Formulation:	0.9% NaCl		
Special Features:	None				
No Observed Adverse Effect Level:	3.3 µg/kg/day, Olo (free base)				

Daily Dose (Olo, µg/kg free base)		**0 Vehicle Control**		**3.3**		**9.8**		**29.5**	
Number of Animals		**M: 3**	**F: 3**	**M: 3**	**F: 3**	**M: 3**	**F: 3**	**M: 3**	**F: 3**
Toxicokinetics									
AUC_{0-24} (pmol·h/L)	**Day 1**	NC	NC	4520	5580	14500	15600	45700	53100
	Day 11	NC	NC	5120	5010	15600	15500	40400	43900
Noteworthy Findings									
Died or Sacrificed Moribund:		0	0	0	0	0	0	0	0
Body Weight (%[a]):	**Week 2**	13.67kg	11.60kg	-5	+3	-9	+7	+1	+8
Food Consumption:		-	-	-	-	-	-	-	-
Clinical Observations:		-	-	From Day 1 on, a slight to moderate reddening of ear skin and muzzle mucosa in all substance treated animals, which diminished or disappeared in all groups towards the end of the study.					
Cardiovascular investigations:									
Heart Rate (%[a])									
Day 1, immediately post dose		118 bpm	113 bpm	+105	+108	+85	+106	+108	+67
Polymorphic ventricular extra systoles[b]									
Day 1, 24h post dose		0	0	0	1	0	2	0	2
Systolic blood pressure(%[c])									
Day 1, immediately post dose		130.7		-31***		-29***		-42***	
Day 11, immediately post dose		125.0		-13***		-11***		-3***	
Diastolic blood pressure(%[c])									
Day 1, immediately post dose		70.2		-29***		-33***		-49***	
Day 11, immediately post dose		61.3		-9***		-17***		+4***	

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

7.17 オロダテロールのイヌ反復静脈内投与毒性試験（続き） Doc. No.: U[redacted]-1051 (Continued)

Daily Dose (Olo, µg/kg free base)	0 Vehicle Control		3.3		9.8		29.5	
Number of Animals	**M: 3**	**F: 3**	**M: 3**	**F: 3**	**M: 3**	**F: 3**	**M: 3**	**F: 3**
Haematology:	-	-	-	-	-	-	-	-
Blood Chemistry (%)[a]:								
Albumin (g/L) Week 2	37.18	38.95	+3	-3	-5	-7	-7	-10
Urinalyses:	-	-	-	-	-	-	-	-
Organ Weights:	-	-	-	-	-	-	-	-
Gross Pathology:								
Histopathology:								
Heart:								
fibrosis	0	0	0	0	0	3	0	2
mineralization	0	0	0	0	1	0	2	1
Liver:								
centrilobular hepatocyte glycogen depletion	0	0	2	3	2	3	3	3
periportal hepatocyte rarefaction	0	0	2	3	3	3	3	3

NC: not calculated -: no noteworthy findings

a: for controls, group means are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown.

b: number of affected animals

c: for controls, group male+female means are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown. Statistical significance is based on actual data, versus values before administration, ***: $p<0.001$

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

7.18 オロダテロールのイヌ反復経口投与毒性試験

Test Article: Olodaterol

Report Title: BI 1744CL: 2-week oral (gavage) toxicity study in beagle dogs

Species/Strain:	Dog/Beagle	**Duration of Dosing:**	14 days	**Doc. No.:**	U[redacted]-2169
Initial Age:	8-12 months / 11-16 months[a]	**Duration of Postdose:**	NA	**Location in CTD:**	4.2.3.2-23
Date of First Dose:	[redacted][a]	**Method of Administration:**	Oral, gavage	**Study No.:**	06B040 06B040A
Special Features:	None	**Vehicle/Formulation:**	demineralised water	**GLP Compliance:**	Yes
No Observed Adverse Effect Level:	5.0 µg/kg/day, Olo (free base)				

Daily Dose (Olo, µg/kg free base)		**0 Vehicle Control**		**0 Vehicle Control**		**5**		**16**		**50**		**160**		**500**	
Group No.		**1**		**5**		**6**		**7**		**2**		**3**		**4**	
Study No.		**06B040**		**06B040A**		**06B040A**		**06B040A**		**06B040**		**06B040**		**06B040**	
Number of Animals		**M: 3**	**F: 3**	**M: 3**	**F: 3**	**M: 3**	**F: 3**	**M: 3**	**F: 3**	**M: 3**	**F: 3**	**M: 3**	**F: 3**	**M: 3**	**F: 3**
Toxicokinetics															
AUC_{0-24} (pmol·h/L)	**Day 1**	NC	NC	NC	NC	885	885	2010	2500	8240	11200	40100	31800	125000	123000
	Day 13	NC	NC	NC	NC	954	1130	2390	3480	8580	9100	37200	31700	165000	254000
Noteworthy Findings															
Died or Sacrificed Moribund:		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Body Weight (%[b]):		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Food Consumption:		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Clinical Observations:															
Reddening of skin and mucosa		-	-	-	-	-	-	-	-	3	3	3	3	3	3
Swelling of lips, ears and orbital area		-	-	-	-	-	-	-	-	2	3	2	2	2	3
Increase of heart rate		-	-	-	-	-	-	-	-	3	3	3	3	3	3

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

7.18 オロダテロールのイヌ反復経口投与毒性試験（続き）

Doc. No.: U[redacted]-2169 (Continued)

Daily Dose (Olo, µg/kg free base)	0 Vehicle Control		0 Vehicle Control		5		16		50		160		500	
Group No.	1		5		6		7		2		3		4	
Study No.	06B040		06B040A		06B040A		06B040A		06B040		06B040		06B040	
Number of Animals	M: 3	F: 3	M: 3	F: 3	M: 3	F: 3	M: 3	F: 3	M: 3	F: 3	M: 3	F: 3	M: 3	F: 3
Cardiovascular investigations (%[b]):														
Heart Rate (bpm)														
Day 1, 1h post dose	132	128							+59	+85	+83	+90	+73	+73
Day 10, 1h post dose	114	128							+4	+5	+11	-4	+3	-14
Systolic blood pressure (mmHg)														
Day 1, 1h post dose	140	125							-37	-27	-43	-22	-49	-63
Day 10, 1h post dose	110	110							-5	-10	+2	-10	-8	-10
Diastolic blood pressure (mmHg)														
Day 1, 1h post dose	80	79							-20	-34	-25	-11	-42	-56
Day 10, 1h post dose	78	80							-24	-7	-1	-7	-8	-15
QT (sec)														
Day 1, 1h post dose	183	185							-4	-11	-10	-10	-3	-4
Day 10, 1h post dose	183	184							+3	+2	+1	+5	+5	+7
QTcF (sec)														
Day 1, 1h post dose	236	238							+12	+9	+11	+11	+18	+16
Day 10, 1h post dose	226	236							+5	+4	+4	+4	+5	+1

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

7.18 オロダテロールのイヌ反復経口投与毒性試験（続き）

Doc. No.: U[redacted]-2169 (Continued)

Daily Dose (Olo, µg/kg free base)	0 Vehicle Control		0 Vehicle Control		5		16		50		160		500	
Group No.	1		5		6		7		2		3		4	
Study No.	06B040		06B040A		06B040A		06B040A		06B040		06B040		06B040	
Number of Animals	M: 3	F: 3	M: 3	F: 3	M: 3	F: 3	M: 3	F: 3	M: 3	F: 3	M: 3	F: 3	M: 3	F: 3
Blood Chemistry (%[b]):														
ALP (U/L) Day 3	67.4	67.5	71.7	109.3	+20	-28	-1	-25	+94	+48	+222	+152	+201	+191
Day 13	68.5	70.4	70.4	109.9	+10	-34	-13	-30	+20	-12	+67	+26	+41	+33
Urinalyses:	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Organ Weights:	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gross Pathology:	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Histopathology:														
Heart:														
left ventricle, papillary myocardium: focal subacute fibrosing necrosis	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	2	3
septal or right ventricular myocardium: focal, resorptive fibrosing necrosis	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
Kidney:														
cytoplasmic basophilia	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	3	3
Liver:														
centrilobular hepatocyte glycogen depletion	0	0	0	0	0	3	3	3	3	3	3	3	3	3
periportal hepatocyte increased glycogen	0	0	0	0	0	3	1	3	3	2	3	2	3	3

NC: not calculated - : no noteworthy findings

a : the first part of the study (06B040) / the second part of the study (06B040A)

b: for controls, group means are shown. For treated groups, percent differences from respective controls are shown.
Because of small group size, no statistical comparisons are performed.

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

8. IN VITRO 遺伝毒性

Test Article: Olodaterol

8.1 オロダテロールの Ames 試験

Report Title: BI 1744 CL: Mutagenicity study using the *S. typhimurium*/mammalian microsome assay (Ames test)

Test for Induction of: Reverse mutation in bacterial cells
Strains: *Salmonella typhimurium*
Metabolizing System: Aroclor-induced rat liver S9, 10%
Vehicles: Test Article: Distilled water Positive Controls: Distilled water and DMSO
Treatment: Standard plate test (Incubation: 48 h, TA 102: 72h)
Cytotoxic Effects: Strain-dependent, at ≥300 µg/plate without activation and ≥5000 µg/plate with activation
Genotoxic Effects: None

No. of Independent Assays: 1 of 2
No. of Replicate Cultures: 3
No. of Cells Analyzed/Culture: 100 Mio

Doc. No.: U[redacted]-1046
Location in CTD: 4.2.3.3.1-1
GLP Compliance: Yes
Date of Treatment: [redacted]

Metabolic Activation	Test Article	Concentration (µg/plate)	Assay 1 Revertant Colony Counts (Mean)				
			TA 1535	TA 1537	TA 98	TA 100	TA 102
Without Activation	Distilled water	100 µL/plate	10	9	31	121	318
	Olodaterol (free base)	100	10	4	32	119	302
		300	8	8	30	127	292
		1000	6	10	35	114	259
		3000	8	3 T	13 T	45 T	126 T
		5000	8 T	1 T	5 T	3 T	20 T
	Sodium azide	5	578	-	-	751	-
	9-Aminiacridine	50	-	75	-	-	-
	2-Nitrofluorene	10	-	-	751	-	-
	Mitomycin C	0.5	-	-	-	-	850
With Activation	Distilled water	100 µL/plate	15	9	37	121	279
	Olodaterol (free base)	100	12	11	39	132	320
		300	15	11	32	128	304
		1000	15	10	38	124	271
		3000	10	2 T	27 T	93 T	230
		5000	9 T	4 T	10 T	52 T	164 T
	2-Aminoathracene	4	190	134	902	1148	-
		10	-	-	-	-	710

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

8.1 オロダテロールの Ames 試験（続き）

Doc. No.: U[redacted]-1046 (Continued)

Test for Induction of: Reverse mutation in bacterial cells
Strains: *Salmonella typhimurium*
Metabolizing System: Aroclor-induced rat liver S9, 10%
Vehicles: Test Article: Distilled water Positive Controls: Distilled water and DMSO
Treatment: Preincubation for 20 min (Incubation: 48 h, TA 102: 72 h)
Cytotoxic Effects: Strain-dependent bacteriotoxicity at concentrations ≥300 µg/plate
Genotoxic Effects: None

No. of Independent Assays: 2 of 2
No. of Replicate Cultures: 3
No. of Cells Analyzed/Culture: 100 Mio

Doc. No.: U[redacted]-1046
Location in CTD: 4.2.3.3.1-1
GLP Compliance: Yes
Date of Treatment: [redacted]

Metabolic Activation	Test Article	Concentration (µg/plate)	Assay 2 Revertant Colony Counts (Mean)				
			TA 1535	TA 1537	TA 98	TA 100	TA 102
Without Activation	**Distilled water**	**100 µL/plate**	12	14	44	106	400
	Olodaterol (free base)	**100**	14	13	35	109	385
		300	10	14	43	99	328 T
		1000	11	1 T	17 T	70 T	192 T
		3000	7 T	0 T	7 T	11 T	60 T
		5000	7 PT	0 PT	6 PT	23 PT	31 PT
	Sodium azide	**5**	792	-	-	1103	-
	9-Aminiacridine	**5** [a]	-	19 [a]	-	-	-
	2-Nitrofluorene	**10**	-	-	710	-	-
	Mitomycin C	**0.5**	-	-	-	-	1492
With Activation	**Distilled water**	**100 µL/plate**	18	16	51	116	446
	Olodaterol (free base)	**100**	16	23	51	126	483
		300	15	14	56	115	509
		1000	16 P	13 P	53 P	96 P	374 PT
		3000	8 PT	6 PT	26 PT	77 PT	248 PT
		5000	6 PT	3 PT	11 PT	58 PT	89 PT
	2-Aminoathracene	**4**	157	96	888	635	-
		10	-	-	-	-	989

P: precipitation T: bacteriotoxicity - : not done
a: technical error, concentration should have been 50 µg/plate

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

8.2 オロダテロールのマウスリンフォーマ試験

Test Article: Olodaterol

Report Title: BI 1744 CL: Mutagenicity study using the mouse lymphoma (L5178Y) assay

Test for Induction of:	Gene and chromosomal mutations in mammalian cells	**No. of Independent Assays:**	1	**Report No.**	U[redacted]-2188
Strains:	Mouse lymphoma cells L5178Y *tk*$^{+/-}$	**No. of Replicate Cultures:**	2[a]	**Location in Module**	4.2.3.3.1-2
Metabolizing System:	Without S9	**No. of Cells Analyzed/Culture:**	2000 cells/well four 96 well plates	**GLP Compliance:**	Yes

Vehicles: Test Article: Demineralized water Positive Control: DMSO **Date of Treatment:** [redacted]
Treatment: 4 hours
Cytotoxic Effects: Cytotoxicity at concentrations ≥200 µg/mL
Genotoxic Effects: No induction of gene and chromosomal mutations

Test Article	Concentration (µg/mL)		Survival PE0%	RS%	Viability PE2%	Growth RTG%	Mutant frequencies/10^6 cells small clones	large clones	Total
Demineralized water		Mean	130	100	125	100	40	76	125
Olodaterol	**(Olo, free base)**								
	25	Mean	125	96	116	81	43	85	136
	50	Mean	127	98	130	83	39	92	143
	100	Mean	130	100	131	91	40	79	127
	125	Mean	123	94	143	77	44	79	138
	150	Mean	96	74	140	63	39	75	123
	200	Mean	46	35	129	31	51	80	145
4-Nitroquinoline-*N*-oxide	**0.1**		94	72	84	54	342	315	955

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

8.2 オロダテロールのマウスリンフォーマ試験（続き）

Doc. No.: U04-2188 (Continued)

Test for Induction of: Gene and chromosomal mutations in mammalian cells
No. of Independent Assays: 1
Doc. No.: U[redacted]-2188
Strains: Mouse lymphoma cells L5178Y $tk^{+/-}$
No. of Replicate Cultures: 2[a]
Location in CTD 4.2.3.3.1-2
Metabolizing System: Without S9
No. of Cells Analyzed/Culture: 2000 cells/well four 96 well plates
GLP Compliance: Yes
Vehicles: Test Article: Demineralized water Positive Control: DMSO
Date of Treatment: [redacted]
Treatment: 24 hours
Cytotoxic Effects: Cytotoxicity at concentrations ≥100 µg/mL
Genotoxic Effects: No induction of gene and chromosomal mutations

Test Article	Concentration (µg/mL)		Survival PE0%	Survival RS%	Viability PE2%	Growth RTG%	Mutant frequencies/10^6 cells small clones	Mutant frequencies/10^6 cells large clones	Mutant frequencies/10^6 cells Total
Demineralized water		Mean	83	100	124	100	32	100	139
Olodaterol	**(Olo, free base)**								
	10	Mean	92	111	127	108	33	87	125
	25	Mean	93	113	125	91	41	102	154
	50	Mean	103	125	135	103	33	85	126
	75	Mean	66	81	140	98	45	62	116
	100[b]	Mean	27	32	91	14	45	70	122
	125	Mean	1	1	-	-	-	-	-
4-Nitroquinoline-*N*-oxide	**0.1**		49	59	103	64	282	390	1042

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

8.2 オロダテロールのマウスリンフォーマ試験（続き）

Doc. No.: U[redacted]-2188 (Continued)

Test for Induction of: Gene and chromosomal mutations in mammalian cells
Strains: Mouse lymphoma cells L5178Y *tk*$^{+/-}$
Metabolizing System: Aroclor-induced rat liver S9
No. of Independent Assays: 1
No. of Replicate Cultures: 2[a]
No. of Cells Analyzed/Culture: 2000 cells/well four 96 well plates
Doc No.: U[redacted]-2188
Location in CTD 4.2.3.3.1-2
GLP Compliance: Yes
Vehicles: Test Article: Demineralized water Positive Control: DMSO
Date of Treatment: [redacted]
Treatment: 4 hours
Cytotoxic Effects: Cytotoxicity at the concentration of ≥200 µg/mL
Genotoxic Effects: No induction of gene and chromosomal mutations

Test Article	Concentration (µg/mL)		Survival PE0%	Survival RS%	Viability PE2%	Growth RTG%	Mutant frequencies/10^6 cells small clones	large clones	Total
Demineralized water		Mean	127	100	128	100	30	91	128
Olodaterol	**(Olo, free base)**								
25	**25**	Mean	118	93	128	94	36	89	133
50	**50**	Mean	115	90	130	92	32	87	126
100	**100**	Mean	88	70	141	74	43	89	145
150	**150**	Mean	64	51	131	49	39	72	119
200	**200**	Mean	33	26	143	18	43	63	113
250	**250**	Mean	6	4	-	-	-	-	-
Benzo[*a*]pyrene	**2**		48	38	103	35	303	387	1412

a: only one culture was used for the positive control
b) selection of only one culture
PE0: plating efficiency from day 0 samples; RS: relative survival; PE2: plating efficiency from day 2 samples; RTG: relative total growth
-: not done

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

9. IN VIVO 遺伝毒性 Test Article: Olodaterol

9.1 オロダテロールの小核試験

Report Title: BI 1744 CL: Inhalation mutagenicity study using micronucleus analysis of rat bone marrow integrated in 4 week inhalation toxicity study in rats with 4 week recovery

Test for Induction of: Bone marrow micronuclei **Treatment Schedule:** 28 days **Doc. No.:** U[redacted]-2133
Species/Strain: Male rats: HsdBrIHan:WIST **Sampling Time:** 24 h after final dosing **Location in CTD** 4.2.3.2-4

Age: 7-8 Weeks (123 - 239 g at administration) **Cells Evaluated:** Polychromatic erythrocytes **GLP Compliance:** Yes
Method of Administration: Test Article: Inhalation Positive Control: Oral **Date of first Dose:** [redacted]
Vehicle/Formulation: Test Article: BAC/Na-EDTA solution; Positive Control: Aqueous solution
No. of Cells Analyzed/Animal: 2000
Special Features: Evaluation of 1000 cells for ratio PCE/NCE; 2000 PCEs for evaluation of MNE
Toxic/Cytotoxic Effects: No indication of bone marrow toxicity
Genotoxic Effects: No induction of bone marrow micronuclei
Evidence of Exposure: Toxicokinetics

Test Substance	Daily Achieved Dose (Olo, µg/kg free base)	Sampling Time (h)	No. of Animals	Mean MNE% Male/Female	Mean PCE/NCE ratio Male/Female
Vehicle solution	**0**	24	5 M+5 F	0.08 / 0.07	0.86 / 0.73
Olodaterol	**78**	24	5 M+5 F	0.11 / 0.07	0.79 / 0.87
	260	24	5 M+5 F	0.09 / 0.07	0.81 / 0.82
	1360	24	5 M+5 F	0.04 / 0.09	0.87 / 0.89
Cyclophosphamide	**50 mg/kg/day**	24	5 M+5 F	1.45 / 1.38	0.43 / 0.48

Historical control range: 0.01 – 0.12% for MNE
PCE: polychromatic erythrocytes NCE: normochromatic erythrocytes MNE: micronucleated polychromatic erythrocytes

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

9.2 チオトロピウム+オロダテロールの小核試験 Test Article: Tiotropium+Olodaterol

Report Title: BI 1744 CL and BA 679 BR (1:1 Combination): Inhalation mutagenicity study using micronucleus analysis of rat bone marrow integrated in 4 week inhalation toxicity study in rats with 4 week recovery

Test for Induction of: Bone marrow micronuclei **Treatment Schedule:** At least 4 Weeks **Doc. No.:** U[redacted]-1893
Species/Strain: Rat, Crl:WI(Han) **Sampling Time:** 24 h after final dosing **Location in CTD** 4.2.3.2-7

Age: *ca* 9 Weeks **Cells Evaluated:** Polychromatic erythrocytes **GLP Compliance:** Yes
Method of Administration: Test Article: Inhalation Positive Control: Oral **Date of first Dose:** [redacted]
Vehicle/Formulation: Test Article: BAC/Na-EDTA solution; Positive Control: Aqueous solution
No. of Cells Analyzed/Animal: 2000
Special Features: Evaluation of 500 cells for ratio PCE/NCE; 2000 PCEs for evaluation of MNE
Toxic/Cytotoxic Effects: No indication of bone marrow toxicity
Genotoxic Effects: No induction of bone marrow micronuclei
Evidence of Exposure: Toxicokinetics

Test Substance Tio+Olo	Daily Achieved Dose (Tio+Olo, µg /kg free moiety)	Sampling Time (h)	No. of Animals	Mean MNE% Male/Female	Mean PCE/NCE ratio Male/Female
Vehicle solution	**0**	24	5 M+5 F	0.06 / 0.04	0.81 / 0.84
Tio+Olo	**85.2＋78.6**	24	5 M+5 F	0.03 / 0.04	0.88 / 0.92
	577＋555	24	5 M+5 F	0.04 / 0.03	0.93 / 0.83
	2266＋2174	24	5 M+5 F	0.02 / 0.05	0.85 / 0.88
Cyclophosphamide	**50 mg/kg/day**	24	5 M	1.24/ NA	0.43 / NA

NA: not applicable
Historical control range: 0.01 – 0.12% for MNE
PCE: polychromatic erythrocytes NCE: normochromatic erythrocytes MNE: micronucleated polychromatic erythrocytes

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

9.3 チオトロピウム+オロダテロールの小核試験 Test Article: Tiotropium+Olodaterol

Report Title: BI 1744 CL and BA 679 BR (6:1 and 1:2 Combination): Inhalation mutagenicity study using micronucleus analysis of rat bone marrow integrated in 4 week inhalation toxicity study in rats with 4 week recovery

Test for Induction of: Bone marrow micronuclei **Treatment Schedule:** At least 4 weeks **Doc. No.:** U[redacted]-1892
Species/Strain: Rat, Crl:WI(Han) **Sampling Time:** 24 h after final dosing **Location in CTD** 4.2.3.2-8

Age: *ca* 9 Weeks **Cells Evaluated:** Polychromatic erythrocytes **GLP Compliance:** Yes
Method of Administration: Test Article: Inhalation Positive Control: Oral **Date of first Dose:** [redacted]
Vehicle/Formulation: Test Article: BAC/Na-EDTA solution; Positive Control: Aqueous solution
No. of Cells Analyzed/Animal: 2000
Special Features: Evaluation of 500 cells for ratio PCE/NCE; 2000 PCEs for evaluation of MNE
Toxic/Cytotoxic Effects: No indication of bone marrow toxicity
Genotoxic Effects: No induction of bone marrow micronuclei
Evidence of Exposure: Toxicokinetics

Test Substance Tio+Olo	Daily Achieved Dose (Tio+Olo, µg /kg free moiety)	Sampling Time (h)	No. of Animals	Mean MNE% Male/Female	Mean PCE/NCE ratio Male/Female
Vehicle solution	**0**	24	5 M+5 F	0.05 / 0.04	0.74 / 0.89
Tio+Olo	**13 +75**	24	5 M+5 F	0.05 / 0.05	0.84 / 0.90
	393 + 2032	24	5 M+5 F	0.04 / 0.10	0.80 / 0.78
	143 + 73	24	5 M+5 F	0.05 / 0.07	0.75 / 0.80
	3263 + 1747	24	5 M+5 F	0.07 / 0.04	0.77 / 0.79
Cyclophosphamide	**50 mg/kg/day**	24	5 M	1.43 / NA	0.44 / NA

NA: not applicable
Historical control range: 0.01 – 0.12% for MNE
PCE: polychromatic erythrocytes NCE: normochromatic erythrocytes MNE: micronucleated polychromatic erythrocytes

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

9.4 オロダテロールの小核試験

Test Article: Olodaterol

Report Title: Intravenous mutagenicity study using micronucleus analysis of rat bone marrow

Test for Induction of: Bone marrow micronuclei
Species/Strain: Male Wistar rats Crl:Wi (Han)
Age: 8-10 Weeks (253-283 g at administration)
Cells Evaluated: Polychromatic erythrocytes
No. of Cells Analyzed/Animal: 4000
Treatment Schedule: Once
Sampling Time: 24 h and 48 h
Method of Administration: Intravenous
Vehicle/Formulation: Physiological saline
Doc. No.: U[redacted]-1834
Location in Module 4.2.3.3.2-1
GLP Compliance: Yes
Date of Dosing: [redacted]

Special Features: Evaluation of 800 cells for ratio PCE/NCE; 4000 PCEs for evaluation of MNE

Toxic/Cytotoxic Effects: Severe recumbency and deep respiratory lasted <5 h at 1 mg/kg and >5 h at 10 and 40 mg/kg; Slight increase in PCEs at 10 mg/kg and statistical significant increase at 40 mg/kg (24 and 48 h)

Genotoxic Effects: Slight, dose-independent though statistically significant increase of micronucleated polychromatic erythrocytes at 10 and 40 mg/kg BI 1744 CL (i.v.). However, the slight increase in micronuclei formation was considered to be due to exaggerated pharmacological action of BI 1744 CL and that BI 1744 CL itself is not genotoxic in view of the negative *in vitro* genotoxicity battery, the signs of erythropoiesis and the knowledge that i.v. administration up to sublethal doses causes severe tachycardia and pronounced hypotension that is inducing erythropoiesis.

Evidence of Exposure: Intravenous administration and clinical signs

Test Substance	Dose (Olo, mg/kg free base)	Sampling Time (h)	No. of Animals	Mean PCE%	Mean MNE%
Physiological saline	**0**	24	5 M	25.0	0.10
Olodaterol	**1**	24	5 M	24.8	0.16
	10	24	5 M	29.5	0.28*
	40	24	5 M	34.6*	0.27*
	40	48	5 M	34.6*	0.22*
Cyclophosphamide	**20**	24	2 M	13.9*	0.68*

Fisher-Pitman permutation test: * significantly different from the negative vehicle control ($p \leq 0.05$)
Historical control range: 18.3 - 43.5% for PCE, 0.07 – 0.20% for MNE
PCE: polychromatic erythrocytes NCE: normochromatic erythrocytes MNE: micronucleated polychromatic erythrocytes

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

9.5 オロダテロールの造血亢進作用機序解明試験

Test Article: Olodaterol

Report Title: BI 1744 CL: Mechanistic investigation of erythropoiesis in male rats after intravenous administration

Location in Module 4.2.3.3.2-2

Species/ Strain	Method of Application	Dose (Olo, mg/kg free base)	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	Doc. No.
Rats Crl:WI(Han)	Intravenous single injection (sterile isotonic saline, pH 4.8 buffered with citric acid/NaOH)	0, 40	10 males	The study clearly shows that erythropoiesis is induced when 40 mg/kg BI 1744 BS is administered intravenously. The evidence for induced erythropoiesis is based on a substantial increase in plasma erythropoietin, an increase in the relative number of proliferating erythroid precursor cells and an enhanced maturation of erythroid precursor cells in bone marrow, with a concomitant increase in peripheral blood early reticulocytes as well as splenic extramedullary hematopoiesis.	U[redacted]-1845

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

10. がん原性試験 Test Article: Olodaterol

10.1 オロダテロールのマウスがん原性試験

Report Title: 24 Month Inhalation Carcinogenicity Study in Mice

Species/Strain:	Mouse/Crl:CD-1(ICR)	**Duration of Dosing:**	104 weeks	**Doc.No.:**	U[redacted]-1065
Initial Age:	6-8 weeks	**Method of Administration:**	Inhalation	**Location in CTD:**	4.2.3.4.1-1
Date of First Dose:	[redacted]	**Vehicle/Formulation:**	BAC/EDTA solution	**GLP Compliance:**	Yes
Basis for High-Dose Selection:	Toxicology endpoint – from ICH guideline S1C				
Special Features:	40 min exposure time per day				

Daily Achieved Dose (Olo, µg/kg free base)		**Air Control 0**		**Vehicle Control 0**		**26.1**		**76.9**		**255**	
Number of Animals (main study +TK)		**M: 60+20**	**F: 60+20**	**M: 60+20**	**F: 60+20**	**M: 60+36**	**F: 60+36**	**M: 60+36**	**F: 60+36**	**M: 60+36**	**F: 60+36**
Toxicokinetics											
$AUC_{0\text{-}24,ss}$ (pmol·h/L)	**Day359**	NC	NC	NC	NC	5750	5680	15400	14300	61200	42800
$C_{max,ss}$ (pmol/L)	**Day359**	NQ	NQ	NQ	NQ	2410	3020	4610	6650	19300	28400
Noteworthy Findings:											
Died or Sacrificed Moribund (main study):		19	32	27	30	23	32	27	45[b]	22	36
Terminal Sacrifice:		41	28	33	30	37	28	33	15[b]	38	24
Survival in Week 104 (%):		68	47	55	50	62	47	55	25[b]	63	40
Body Weight (%[a]) :	**Week 4**	33.6g	27.2g	33.4g	27.6g	+4**	+4**	+7***	+2	+9***	+5***
	Week 53	39.3g	33.7g	38.8g	33.8g	+5**	+4*	+5***	+8***	+11***	+5*
	Week 104	39.2g	33.4g	39.3g	34.8g	-1	+3	0	NA[b]	+5	+3
Food Consumption (%[a]):	**Week 4**	5.8g	5.2g	5.6g	5.0g	+7***	0	+9***	+4	+13***	+10**
	Week 53	5.7g*	5.0g	5.9g	5.2g	-8***	-10	-7***	-4	-3	-6
	Week 104	4.6g	4.3g	4.6g	4.4g	+24***	+9	+17***	NA[b]	+17***	+20***
Clinical Observations:											
Increased muscle mass		0	0	0	0	13	2	31	9	34	6
Ophthalmology:		-	-	-	-	NA	NA	NA	NA	-	-

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

10.1 オロダテロールのマウスがん原性試験（続き）

Doc. No.: U[redacted]-1065 (Continued)

Daily Achieved Dose (Olo, µg/kg free base)	Air Control 0		Vehicle Control 0		26.1		76.9		255	
Number of Animals (main study +TK)	M: 60+20	F: 60+20	M: 60+20	F: 60+20	M: 60+36	F: 60+36	M: 60+36	F: 60+36	M: 60+36	F: 60+36
Haematology[c] (Week 103-104):										
White blood cell count (10^9/L)	5.57	4.43	5.77	4.84	4.66	4.70	4.74	4.69	4.88*	3.09
Neutrophils (10^9/L)	1.85	1.34	2.49	1.75	1.47*	1.47	1.89	1.52	1.28***	1.31
Lymphocytes (10^9/L)	3.25	2.72	2.78	2.67	2.73	2.85	2.44	2.83	3.10	1.50
Monocytes (10^9/L)	0.24	0.14	0.22	0.19	0.21	0.16	0.16	0.14	0.17	0.11
Clinical Chemistry[c] (Week 103-104):	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Organ weights[a] (Week 104):										
Lung (absolute)	0.38g	0.31g	0.40g	0.32g	+5	+6	+13	-16[b]	+15	+13
(% body weight)	0.010%	0.009%	0.010%	0.010%	+10	0	+20	-20[b]	+20	0
Necropsy (Week 104):										
Heart, pale focus	4	1	2	1	8	1	10	1[b]	12	2
Skeletal muscle, abnormal shape	0	0	0	0	3	0	2	1[b]	5	1
Skeletal muscle, enlarged	0	0	0	0	0	0	2	0	2	0
Histopathology:										
Non-neoplastic findings[c]										
Adrenal gland:	(60)	(59)	(60)	(60)	(60)	(60)	(58)	(60)	(60)	(60)
cortical cell hyperplasia	7	1	4	1	8	0	4	0	4	0
medullary cell hyperplasia	0	1	0	0	2	1	1	0	0	1
subcapsular cell hyperplasia	23	53	27	54	21	51	27	54	35	53
Caecum:	(57)	(60)	(55)	(57)	(59)	(58)	(59)	(59)	(58)	(59)
lymphoid hyperplasia	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
Colon:	(60)	(60)	(59)	(60)	(59)	(58)	(58)	(60)	(60)	(60)
mucosal hyperplasia	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

10.1 オロダテロールのマウスがん原性試験（続き） Doc. No.: U[redacted]-1065 (Continued)

Daily Achieved Dose (Olo, µg/kg free base)	Air Control 0		Vehicle Control 0		26.1		76.9		255	
Number of Animals (main study +TK)	M: 60+20	F: 60+20	M: 60+20	F: 60+20	M: 60+36	F: 60+36	M: 60+36	F: 60+36	M: 60+36	F: 60+36
Histopathology:										
Non-neoplastic findings[c]										
Epididymis:	(60)		(60)		(60)		(60)		(60)	
hyperplasia	1		0		0		0		1	
interstitial cell hyperplasia	0		1		0		0		0	
Exorbital lacrimal gland:	(60)	(58)	(59)	(56)	(60)	(55)	(59)	(60)	(53)	(60)
lymphocytic infiltration	3*	8	10	8	9	10	7	13	13	17*
Eye:	(59)	(60)	(58)	(55)	(58)	(58)	(57)	(58)	(59)	(57)
keratitis	3	0	0	0	6*	0	4	1	5	3
Femur:	(60)	(59)	(60)	(60)	(60)	(60)	(60)	(60)	(59)	(60)
synovial lining cell hyperplasia	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0
Gall bladder :	(57)	(58)	(53)	(54)	(54)	(57)	(56)	(58)	(58)	(55)
papillary hyperplasia	17	10	16	14	10	2***	7*	3**	8*	10
Harderian gland	(60)	(60)	(60)	(60)	(60)	(60)	(60)	(60)	(60)	(59)
hyperplasia	0	1	0	1	0	1	1	2	2	1
acinar cell necrosis	3	1	3	0	6	0	4	1	7	0
histiocytic infiltration	8	7	11	4	11	5	7	0	13	3
Heart:	(60)	(60)	(60)	(60)	(60)	(60)	(60)	(60)	(60)	(60)
epicardial fibrosis	3	1	1	1	7	3	5	4	12**	3
myocardial fibrosis	31	9	28	6	43**	11	38	17*	45**	26***
myocardial vacuolation	27	5	16	5	33**	7	34**	15*	36***	15*
myocardial hypertrophy	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0
ventricular dilation	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0
atrial thrombosis	0	0	0	0	3	0	6*	0	3	0
Jejunum:	(58)	(60)	(57)	(56)	(58)	(59)	(59)	(59)	(59)	(57)
hyperplasia	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

10.1 オロダテロールのマウスがん原性試験（続き）

Doc. No.: U[redacted]-1065 (Continued)

Daily Achieved Dose (Olo, µg/kg free base)	Air Control 0		Vehicle Control 0		26.1		76.9		255	
Number of Animals (main study +TK)	M: 60+20	F: 60+20	M: 60+20	F: 60+20	M: 60+36	F: 60+36	M: 60+36	F: 60+36	M: 60+36	F: 60+36
Histopathology:										
Non-neoplastic findings[c]										
Kidney:	(60)	(59)	(59)	(60)	(60)	(60)	(60)	(60)	(60)	(59)
peritoneal hyperplasia	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
Larynx:	(60)	(60)	(60)	(60)	(60)	(60)	(60)	(60)	(60)	(60)
U-shape cartilage necrosis	0***	0*	14	7	9	3	14	3	11	12
squamous metaplasia	0	0**	2	9	9	4	7	12	25***	20*
Liver:	(60)	(60)	(60)	(60)	(60)	(60)	(60)	(60)	(60)	(60)
bile duct hyperplasia	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
centrilobular inflammation	0	2	0	0	0	3	0	7*	0	1
Lung:	(60)	(60)	(60)	(59)	(60)	(60)	(60)	(59)	(60)	(60)
bronchiolo-alveolar hyperplasia	1	2	0	6	1	2	4	0*	1	3
alveolar foamy macrophage	1	0	0	3	0	12*	1	10	1	12*
lymphoid hyperplasia	4	4	2	4	0	7	3	6	1	7
Lymph node, bronchial:	(48)	(44)	(51)	(51)	(42)	(47)	(48)	(47)	(44)	(46)
lymphoid hyperplasia	0	0	0	2	0	1	2	4	2	4
Lymph node, mandibular	(56)	(57)	(60)	(60)	(60)	(59)	(55)	(59)	(59)	(58)
lymphoid hyperplasia	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0
lymphoid follicular hyperplasia	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0
Lymph node, mesenteric	(60)	(59)	(60)	(59)	(57)	(56)	(60)	(60)	(59)	(60)
lymphoid hyperplasia	2	0	0	1	1	0	0	2	0	1
angiomatous hyperplasia	0	0	1	1	0	1	0	0	0	1
Mammary gland:	(8)	(60)	(7)	(59)	(6)	(60)	(9)	(59)	(7)	(60)
lobular hyperplasia	1	1	0	3	0	2	0	2	0	0
lymphoid hyperplasia	0	0	0	1	0	2	0	1	0	1

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

10.1 オロダテロールのマウスがん原性試験（続き）

Doc. No.: U[redacted]-1065 (Continued)

Daily Achieved Dose (Olo, µg/kg free base)	Air Control 0		Vehicle Control 0		26.1		76.9		255	
Number of Animals (main study +TK)	M: 60+20	F: 60+20	M: 60+20	F: 60+20	M: 60+36	F: 60+36	M: 60+36	F: 60+36	M: 60+36	F: 60+36
Histopathology:										
Non-neoplastic findings[c]										
Nasal cavity:	(60)	(60)	(60)	(59)	(60)	(60)	(60)	(60)	(60)	(60)
eosinophilic globules	12	25	10	15	15	33**	16	30**	17	26
exudate	7	4	2	1	7	4	7	5	11*	4
respiratory cell hyperplasia	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
squamous cell hyperplasia	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0
Ovary:		(60)		(59)		(60)		(60)		(60)
sex cord/stromal hyperplasia, focal		1		1		1		5		9*
tubulostromal hyperplasia		0		0		0		0		2
cystic/papillary hyperplasia		0		4		2		1		1
luteal hyperplasia, focal		4		3		3		3		7
peritoneal hyperplasia		0		0		1		0		0
cyst		48		40		51*		50		55**
Pancreas:	(60)	(60)	(59)	(60)	(60)	(60)	(59)	(60)	(60)	(60)
islet cell hyperplasia	5	3	4	10	3	6	5	6	2	2*
lymphoid hyperplasia	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0
Parathyroid gland:	(50)	(53)	(49)	(54)	(50)	(51)	(49)	(51)	(55)	(53)
hyperplasia	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
Pituitary gland :	(55)	(56)	(56)	(59)	(56)	(58)	(59)	(58)	(56)	(58)
hyperplasia	2	1	3	1	2	2	0	2	3	4
intermediate lobe hyperplasia	2	1	1	2	2	3	3	5	1	4
Preputial/Clitoral gland:	(58)	(50)	(57)	(51)	(56)	(53)	(58)	(54)	(60)	(54)
inflammation	16	5*	12	0	5	3	6	3	8	10**
Prostate:	(60)		(59)		(59)		(59)		(60)	
hyperplasia	0		1		0		0		0	

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

10.1 オロダテロールのマウスがん原性試験（続き）

Doc. No.: U[redacted]-1065 (Continued)

Daily Achieved Dose (Olo, µg/kg free base)	Air Control 0		Vehicle Control 0		26.1		76.9		255	
Number of Animals (main study +TK)	M: 60+20	F: 60+20	M: 60+20	F: 60+20	M: 60+36	F: 60+36	M: 60+36	F: 60+36	M: 60+36	F: 60+36
Histopathology:										
Non-neoplastic findings[c]										
Seminal vesicle:	(60)		(60)		(57)		(59)		(60)	
hyperplasia	1		1		0		0		0	
hyperplasia (coagulating gland)	0		0		0		1		0	
Skeletal muscle:	(60)	(60)	(60)	(60)	(60)	(60)	(60)	(60)	(60)	(60)
hypertrophy	0	0	0	0	1	0	2	0	2	0
Skin and Subcutis:	(60)	(60)	(60)	(60)	(60)	(60)	(60)	(60)	(60)	(60)
epidermal hyperplasia	1	1	0	0	2	0	2	1	2	0
fibrosis	17	7	14	7	17	6	26*	1	9	6
Spinal cord:	(60)	(60)	(60)	(60)	(60)	(60)	(60)	(60)	(60)	(60)
radiculoneuropathy	13	5*	12	15	5	11	5	11	13	9
compression	7	4	2	6	6	2	4	5	11*	9
Spleen:	(60)	(60)	(60)	(60)	(60)	(60)	(60)	(60)	(60)	(60)
increased haemopoiesis	13	24	11	17	14	33**	16	27	14	27
lymphoid hyperplasia	2	4	2	5	1	8	1	1	1	6
Sternum:	(60)	(60)	(60)	(60)	(60)	(60)	(60)	(60)	(60)	(60)
chondropathy	4	4	5	1	8	8*	3	3	7	4
Stomach:	(60)	(59)	(60)	(59)	(59)	(60)	(60)	(60)	(60)	(59)
glandular stomach hyperplasia	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0
pylorus hyperplasia	0	0	2	0	0	0	1	0	0	0
squamous cell hyperplasia	0	0	2	1	1	0	1	0	0	0
fundic hyperplasia	2	2	6	0	1	0	2	0	5	2
peritoneal lymphoid hyperplasia	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0
Tail:	(43)	(50)	(39)	(36)	(38)	(40)	(34)	(44)	(29)	(45)
amputation of tip	0**	9	7	4	4	3	5	9	2	4
Testis:	(60)		(60)		(60)		(60)		(60)	
interstitial cell hyperplasia	3		1		0		2		3	
rete testis hyperplasia	3		6		6		2		8	

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

10.1 オロダテロールのマウスがん原性試験（続き）

Doc. No.: U[redacted]-1065 (Continued)

Daily Achieved Dose (Olo, µg/kg free base)	Air Control 0		Vehicle Control 0		26.1		76.9		255	
Number of Animals (main study +TK)	M: 60+20	F: 60+20	M: 60+20	F: 60+20	M: 60+36	F: 60+36	M: 60+36	F: 60+36	M: 60+36	F: 60+36
Histopathology:										
Non-neoplastic findings[c]										
Thymus:	(52)	(57)	(57)	(58)	(47)	(57)	(54)	(56)	(50)	(54)
lymphoid hyperplasia	3	24	1	19	2	25	1	22	3	14
lymphoid follicular hyperplasia	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Thyroid gland:	(60)	(60)	(59)	(60)	(59)	(60)	(60)	(59)	(60)	(59)
hyperplasia	0	1	0	3	0	1	1	2	0	4
Urinary bladder:	(60)	(60)	(59)	(58)	(60)	(58)	(60)	(60)	(60)	(58)
transitional cell hyperplasia	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
Uterus:		(60)		(60)		(60)		(60)		(60)
granular cell hyperplasia		1		0		0		0		0
stromal hyperplasia		0		0		1		0		1
basal cell hyperplasia		0		0		0		0		1
squamous hyperplasia		1		1		0		0		0
cervical hyperplasia		4		1		0		0		0
cystic endometrial hyperplasia		37		27		29		27		39*
arteritis/periarteritis		4		11		4		2*		4
Vagina:		(59)		(58)		(58)		(58)		(57)
squamous cell hyperplasia		2		1		1		0		0
atrophy		5		11		2*		1**		0***
Vertebrae:	(11)	(23)	(18)	(23)	(13)	(17)	(10)	(19)	(10)	(18)
increased granulopoiesis	5	15*	10	6	8	6	6	6	4	6

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

10.1 オロダテロールのマウスがん原性試験（続き）

Doc. No.: U[redacted]-1065 (Continued)

Daily Achieved Dose (Olo, µg/kg free base)	Air Control 0		Vehicle Control 0		26.1		76.9		255	
Number of Animals (main study +TK)	M: 60+20	F: 60+20	M: 60+20	F: 60+20	M: 60+36	F: 60+36	M: 60+36	F: 60+36	M: 60+36	F: 60+36
Histopathology:										
Neoplastic findings[d]										
Abdominal cavity:	(1)	(1)	(0)	(1)	(0)	(2)	(0)	(1)	(0)	(1)
angioliopma [B]	0	0		0		0		1		0
Adrenal gland:	(60)	(59)	(60)	(60)	(60)	(60)	(58)	(60)	(60)	(60)
phaeochromocytoma [B]	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0
subcapsular cell tumor [B]	2	1	2	1	3	0	1	0	3	0
phaeochromocytoma [M]	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
Bone:	(0)	(2)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(1)	(1)	(1)
osteosarcoma [M]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Brain:	(60)	(60)	(60)	(60)	(60)	(60)	(60)	(60)	(60)	(60)
astrocytoma [M]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Oligodendroglioma [M]	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
Caecum:	(57)	(60)	(55)	(57)	(59)	(58)	(59)	(59)	(58)	(59)
leiomyoma [B]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
adenocarcinoma, metastasising [M]	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0
Eye:	(59)	(60)	(58)	(55)	(58)	(58)	(57)	(58)	(59)	(57)
rhabdomyosarcoma, metastasising [M]	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Femur:	(60)	(59)	(60)	(60)	(60)	(60)	(60)	(60)	(59)	(60)
mast cell tumour [B]	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Haemopoietic system:	(6)	(10)	(11)	(14)	(11)	(14)	(6)	(14)	(9)	(13)
lymphoma [M]	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
lymphoma, lymphocytic [M]	2	3	3	4	1	4	0	2	2	2
lymphoma, plasmacytic [M]	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
lymphoma, follicular centre cell [M]	3	4	4	8	6	8	5	7	7	11

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

10.1 オロダテロールのマウスがん原性試験（続き）

Doc. No.: U[redacted]-1065 (Continued)

Daily Achieved Dose (Olo, µg/kg free base)	Air Control 0		Vehicle Control 0		26.1		76.9		255	
Number of Animals (main study +TK)	M: 60+20	F: 60+20	M: 60+20	F: 60+20	M: 60+36	F: 60+36	M: 60+36	F: 60+36	M: 60+36	F: 60+36
Histopathology:										
Neoplastic findings[d]										
Haemopoietic system:	(6)	(10)	(11)	(14)	(11)	(14)	(6)	(14)	(9)	(13)
leukemia, granulocytic [M]	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
histiocytic sarcoma [M]	0	3	1	2	1	2	0	5	0	0
mast cell tumour [M]	1	0	1	0	2	0	1	0	0	0
Harderian gland	(60)	(60)	(60)	(60)	(60)	(60)	(60)	(60)	(60)	(59)
adenoma [B]	2	7	4	9	3	5	2	3	3	4
adenocarcinoma, metastasising [M]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Kidney:	(60)	(60)	(60)	(60)	(60)	(60)	(60)	(60)	(60)	(60)
tubular cell adenoma [B]	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Liver:	(60)	(60)	(60)	(60)	(60)	(60)	(60)	(60)	(60)	(60)
hepatocellular adenoma [B]	6	2	6	0	3	0	8	3	6	1
hepatocellular carcinoma [M]	4	0	1	0	1	0	3	0	3	0
haemangiosarcoma [M]	0	0	0	0	1	0	1	0	1	1
Lung:	(60)	(60)	(60)	(59)	(60)	(60)	(60)	(59)	(60)	(60)
bronchilolo-alvelolar adenoma [B]	15	3	11	6	7	9	18	12*	14	8
fibroma [B]	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
bronchiolo-alveolar carcinoma [M]	3	3	1	1	2	3	4	2	2	2
Lymph node (mesenteric):	(60)	(59)	(60)	(59)	(57)	(56)	(60)	(60)	(59)	(60)
haemangioma [B]	0	2	0	1	0	0	1	0	0	1
Mammary gland:	(8)	(60)	(7)	(59)	(6)	(60)	(9)	(59)	(7)	(60)
adenoma [B]	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
adenomcaricinoma [M]	0	5	0	1	0	0	0	1	0	0
adenoacanthoma [M]	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

10.1 オロダテロールのマウスがん原性試験（続き）

Doc. No.: U[redacted]-1065 (Continued)

Daily Achieved Dose (Olo, µg/kg free base)	Air Control 0		Vehicle Control 0		26.1		76.9		255	
Number of Animals (main study +TK)	M: 60+20	F: 60+20	M: 60+20	F: 60+20	M: 60+36	F: 60+36	M: 60+36	F: 60+36	M: 60+36	F: 60+36
Histopathology:										
Neoplastic findings[d]										
Nasal cavity:	(60)	(60)	(60)	(59)	(60)	(60)	(60)	(60)	(60)	(60)
papilloma, oral [B]	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
schwannoma [B]	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Nerve:		(1)								
schwannoma [M]		1								
Ovary:		(60)		(59)		(60)		(60)		(60)
sex cord/stromal tumour, mixed [B]		0		1		1		3		3
granulosa cell tumour [B]		0		3		1		1		3
luteoma [B]		3		2		0		0		1
tubulostromal adenoma [B]		1		1		0		0		1
cystadenoma [B]		1		2		1		0		1
Oviduct:		(60)		(60)		(60)		(60)		(60)
leiomyosarcoma [M]		0		0		0		0		1
Pituitary gland:	(55)	(56)	(56)	(59)	(56)	(58)	(59)	(58)	(56)	(58)
adenoma, anterior lobe [B]	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0
adenoma, intermediate lobe [B]	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
carcinoma, intermediate lobe [M]	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
Rib:	(60)	(60)	(60)	(60)	(60)	(60)	(60)	(60)	(60)	(60)
sarcoma (not otherwise specified) [M]	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
Seminal vesicle:	(60)		(60)		(57)		(59)		(60)	
adenocarcinoma [M], coagulating gland	1		0		0		0		0	
Skeletal muscle:	(60)	(60)	(60)	(60)	(60)	(60)	(60)	(60)	(60)	(60)
fibrosarcoma [M]	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
rhabdomyosarcoma [M]	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

10.1 オロダテロールのマウスがん原性試験（続き）

Doc. No.: U[redacted]-1065 (Continued)

Daily Achieved Dose (Olo, µg/kg free base)	Air Control 0		Vehicle Control 0		26.1		76.9		255	
Number of Animals (main study +TK)	M: 60+20	F: 60+20	M: 60+20	F: 60+20	M: 60+36	F: 60+36	M: 60+36	F: 60+36	M: 60+36	F: 60+36
Histopathology:										
Neoplastic findings[d]										
Skin and subcutis:	(60)	(60)	(60)	(60)	(60)	(60)	(60)	(60)	(60)	(60)
keratoacanthoma [B]	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1
papilloma [B]	1	0	0	0	0	0	2	1	0	0
sebaceous cell adenoma [B] , eyelid	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
fibroma [B]	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0
squamous-cell carcinoma [M]	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0
basosquamous carcinoma [M]	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0
pleomorphic sarcoma [M]	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
sarcoma (not otherwise specified) [M]	0	1	1	1	0	1	1	2	0	0
fibrosarcoma [M]	0	0	2	0	0	0	2	0	0	0
malignant fibrous histiocytoma [M]	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
liposarcoma [M]	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
rhabdomyosarcoma [M]	1	0	3	0	3	0	0	1	2	1
schwannoma [M]	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
Spinal cord:	(60)	(60)	(60)	(60)	(60)	(60)	(60)	(60)	(60)	(60)
meningeal sarcoma [M]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Spleen:	(60)	(60)	(60)	(60)	(60)	(60)	(60)	(60)	(60)	(60)
haemangioma [B]	0	0	0	0	0	1	2	0	1	0
haemoangiosarcoma [M]	1	0	1	0	0	0	2	0	1	1
stromal sarcoma [M]	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
Stomach:	(60)	(59)	(60)	(59)	(59)	(60)	(60)	(60)	(60)	(59)
papilloma [B]	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0
carcinoma [M]	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

10.1 オロダテロールのマウスがん原性試験（続き）

Doc. No.: U[redacted]-1065 (Continued)

Daily Achieved Dose (Olo, µg/kg free base)	Air Control 0		Vehicle Control 0		26.1		76.9		255	
Number of Animals (main study +TK)	M: 60+20	F: 60+20	M: 60+20	F: 60+20	M: 60+36	F: 60+36	M: 60+36	F: 60+36	M: 60+36	F: 60+36
Histopathology:										
Neoplastic findings[d]										
Testis:	(60)		(60)		(60)		(60)		(60)	
seminoma [B]	0		0		0		1		0	
interstitial cell adenoma [B]	5		2		7		4		6	
Thyroid gland:	(60)	(60)	(59)	(60)	(59)	(60)	(60)	(59)	(60)	(59)
follicular cell adenoma [B]	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0
follicular cell carcinoma [M]	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
Urinary bladder:	(60)	(60)	(59)	(58)	(60)	(59)	(60)	(60)	(60)	(58)
mesenchymal proliferative lesion [B]	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
Uterus:		(60)		(60)		(60)		(60)		(60)
deciduoma [B]		1		0		0		0		0
fibroma [B]		0		0		1		0		0
granular cell tumour [B]		0		1		0		1		1
haemangioma [B]		0		1		1		1		0
leiomyoma [B]		5		9		18		19		22[#]
mast cell tumor [B]		0		0		0		0		1
polyp [B]		7		4		8		8		12
adenocarcioma, metastasising [M]		0		0		0		0		1
adenocarcinoma [M]		0		0		2		1		1
haemoangiosarcoma [M]		1		1		0		0		1
histiocytic sarcoma [M]		2		1		1		0		1
leiomyosarcoma [M]		1		2		5		10[#]		4
endometrial stromal sarcoma [M]		5		3		3		3		2

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

10.1 オロダテロールのマウスがん原性試験（続き） Doc. No.: U[redacted]-1065 (Continued)

Daily Achieved Dose (Olo, µg/kg free base)	**Air Control 0**		**Vehicle Control 0**		**26.1**		**76.9**		**255**	
Number of Animals (main study +TK)	**M: 60+20**	**F: 60+20**	**M: 60+20**	**F: 60+20**	**M: 60+36**	**F: 60+36**	**M: 60+36**	**F: 60+36**	**M: 60+36**	**F: 60+36**
Histopathology: Neoplastic findings[d]										
Vertebrae:	(11)	(23)	(18)	(23)	(13)	(17)	(10)	(19)	(10)	(18)
mast cell tumour [B]	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
osteosarcoma [M]	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0

NA: not applicable NQ: not quantifiable NC: not calculated
-: no noteworthy findings *: $p<0.05$ **: $p<0.01$ ***: $p<0.001$
[B]: benign tumour [M]: malignant tumour
Figures in brackets represent the number of animals examined microscopically
a: group means are shown for the air and vehicle control groups, and percent differences from the vehicle control group for the treated groups. Statistical significance is based on actual data from the vehicle control group.
b: terminated in Week 103 and the data are from Week 103 due to surviving animals dropping to 25%.
c: statistical significance is from the vehicle control group.
d: #: pairwise difference, $p<0.01$

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

10.2 オロダテロールのラットがん原性試験

Test Article: Olodaterol

Report Title: 24 Month Inhalation Carcinogenicity Study in rats Test Article: Olodaterol

Species/Strain:	Rat/Crl:WI(Han)	**Duration of Dosing:**	104 weeks	**Report No.:**	U[redacted]-2661
Initial Age:	6-7 weeks	**Method of Administration:**	Inhalation	**Location in CTD:**	4.2.3.4.1-2
Date of First Dose:	[redacted]	**Vehicle/Formulation:**	BAC/EDTA solution	**GLP Compliance:**	Yes
Basis for High-Dose Selection:	Toxicology endpoint – from ICH guideline S1C				
Special Features:	35 min exposure time per day				

Daily Achieved Dose (Olo, µg/kg free base)		**Air Control 0**		**Vehicle Control 0**		**25.8**		**75.9**		**270**	
Number of Animals (main study +TK)		**M: 55+10**	**F: 55+10**	**M: 55+10**	**F: 55+10**	**M: 55+10**	**F: 55+10**	**M: 55+10**	**F: 55+10**	**M: 55+10**	**F: 55+10**
Toxicokinetics											
AUC_{0-24} [pmol·h/L]	**Day1**	NC	NC	NC	NC	4630	4760	14800	15800	62100	62700
	Day 178	NC	NC	NC	NC	5970	6230	19200	20000	71700	72500
	Day 360	NC	NC	NC	NC	4620	4550	16300	15000	55100	65700
	Day 726	NC	NC	NC	NC	2890	2410	8720	8510	31000	26600
Cmax (pmol/L)	**Day1**	NQ	NQ	NQ	NQ	1190	895	5920	6110	30300	30900
	Day 178	NQ	NQ	NQ	NQ	1380	1560	6970	6630	31200	45000
	Day 360	NQ	NQ	NQ	NQ	1710	1020	4440	4830	20800	32400
	Day 726	NQ	NQ	NQ	NQ	465	564	2150	2830	8810	15100
Noteworthy Findings:											
Died or Sacrificed Moribund (main study):		11	20	7	9	21	16	12	21	15	21
Terminal Sacrifice:		44	35	48	46	34	39	43	34	40	34
Survival in Week 104 (%):		80	64	87	84	62	73	78	62	73	62
Body Weight (%[a]) :	**Week 4**	261g	180g	265g	175 g	+3	+9***	+2	+9***	+2	+13***
	Week 53	509g	279g	514 g	270 g	-4*	+3	-4	+6**	-7**	+8***
	Week 104	544g	324g	561 g	328 g	-9**	-2	-3	-2	-10**	-3

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

10.2 オロダテロールのラットがん原性試験（続き）

Doc. No.: U[redacted]-2661 (Continued)

Daily Achieved Dose (Olo, µg/kg free base)	Air Control 0		Vehicle Control 0		25.8		75.9		270	
Number of Animals (main study +TK)	M: 55+10	F: 55+10	M: 55+10	F: 55+10	M: 55+10	F: 55+10	M: 55+10	F: 55+10	M: 55+10	F: 55+10
Food Consumption (%[a]): Week 4	20.8g	14.7g	20.8 g	14.6 g	+5*	+12***	+7**	+14***	+8**	+18***
Week 53	19.6g	14.8g	19.5 g	15.0 g	+13***	+5	+16***	+9**	+12***	+13***
Week 104	20.2g	15.7g	20.1 g	16.1 g	-4	+2	-1	0	-1	+7*
Clinical Observations:										
Increased muscle mass	0	0	0	0	6	2	39	6	41	21
Ophthalmology:	-	-	-	-	NA	NA	NA	NA	-	-
Haematology[b] (Week 103-104):										
Red blood cell count (10^{12}/L)	8.62	7.72	8.71	7.82	8.38**	7.43**	8.45*	7.32***	8.39**	7.46**
Haematocrit (L/L)	0.442	0.401	0.436	0.410	0.422	0.379***	0.422	0.386*	0.424	0.381**
Haemoglobin (g/dL)	15.6	14.2	15.5	14.6	14.9**	13.6***	14.8*	13.8***	14.9**	13.6***
White blood cell count (10^9/L)	4.84	3.33	4.54	3.28	4.53	3.24	5.70**	4.70	5.26*	3.87**
Reticulocytes (%)	1.8	2.3	1.8	2.2	1.9	2.5	2.5**	2.2	2.1**	2.2
Clinical Chemistry[b] (Week 103-104):										
Glucose (mmol/L)	7.21	5.56	7.40	6.20	5.52***	5.20**	5.85***	4.62***	6.00***	4.86***
Total protein (g/L)	73	77*	74	75	75	79**	77**	82***	76*	80***
Creatinine (µmol/L)	38	39	38	39	41**	43*	42**	42	43***	43
Globulin (g/L)	30	27	31	26	31	27	31	30**	33*	31***
Albumin globulin ratio	1.5	1.9	1.4	1.9	1.4	1.9	1.5	1.7*	1.3*	1.6**
Urinalyses (Week 103-104):	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Organ weights[a] (Week 104):										
Lung (absolute)	2.04g	1.67g	2.03g	1.62g	+15	+14	+16	+15	+10	+14
(% body weight)	0.381%	0.532%	0.368%	0.499%	+30	+17	+23	+18	+25	+19
Necropsy (Week 104):										
Skeletal muscle, abnormal shape	0	0	0	0	0	0	2	0	3	1
Skeletal muscle, enlarged	0	0	0	0	2	0	18	1	26	6

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

10.2 オロダテロールのラットがん原性試験（続き）

Doc. No.: U[redacted]-2661 (Continued)

Daily Achieved Dose (Olo, µg/kg free base)	Air Control 0		Vehicle Control 0		25.8		75.9		270	
Number of Animals (main study +TK)	M: 55+10	F: 55+10	M: 55+10	F: 55+10	M: 55+10	F: 55+10	M: 55+10	F: 55+10	M: 55+10	F: 55+10
Histopathology :										
Non-neoplastic findings[b]										
Adrenal gland:	(55)	(55)	(55)	(55)	(55)	(55)	(55)	(55)	(54)	(55)
cortical cell hyperplasia	8*	5	1	6	7	1	7	5	3	3
medullary hyperplasia	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
subcapsular cell hyperplasia	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
mesothelial hyperplasia	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
Brain:	(55)	(55)	(55)	(55)	(55)	(55)	(55)	(55)	(55)	(55)
granular cell hyperplasia	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
Bone marrow, femur:	(54)	(53)	(55)	(55)	(55)	(55)	(55)	(54)	(55)	(52)
increased haemopoiesis	2	2	2	2	3	5	4	4	1	5
Bone marrow, rib:	(55)	(55)	(55)	(55)	(55)	(55)	(55)	(55)	(55)	(54)
increased haemopoiesis	3	2	1	0	2	2	5	2	1	3
Bone marrow, sternum:	(55)	(55)	(55)	(55)	(55)	(55)	(55)	(55)	(55)	(54)
increased haemopoiesis	3	2	3	2	3	4	5	5	2	5
Bone marrow, vertebrae:	(2)	(2)	(1)	(1)	(6)	(1)	(1)	(3)	(2)	(5)
increased haemopoiesis	0	1	0	1	3	1	1	2	0	5
Caecum:	(53)	(51)	(55)	(55)	(54)	(54)	(55)	(55)	(53)	(50)
hyperplasia	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0
Ear:		(1)		(1)	(1)	(1)	(3)			
epithelial hyperplasia, ear canal		0		0	0	0	1			
Epididymis:	(54)		(55)		(55)		(55)		(55)	
mesothelial hyperplasia	2		0		1		0		0	
Exorbital lacrimal gland:	(55)	(55)	(55)	(55)	(55)	(55)	(55)	(55)	(55)	(55)
Harderian gland alteration	16	1	25	1	10**	1	14*	1	4***	0
Harderian gland:	(55)	(55)	(55)	(55)	(55)	(55)	(55)	(55)	(55)	(55)
hyperplasia	2	0	0	0	0	0	1	0	0	0

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

10.2 オロダテロールのラットがん原性試験（続き）

Doc. No.: U[redacted]-2661 (Continued)

Daily Achieved Dose (Olo, µg/kg free base)	Air Control 0		Vehicle Control 0		25.8		75.9		270	
Number of Animals (main study +TK)	M: 55+10	F: 55+10	M: 55+10	F: 55+10	M: 55+10	F: 55+10	M: 55+10	F: 55+10	M: 55+10	F: 55+10
Histopathology:										
Non-neoplastic findings[b]										
Heart:	(55)	(55)	(55)	(55)	(54)	(55)	(55)	(55)	(55)	(55)
endocardial hyperplasia	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0
Kidney:	(55)	(55)	(55)	(55)	(55)	(55)	(55)	(55)	(55)	(55)
transitional cell hyperplasia (focal)	0	0	0	2	0	3	0	1	0	2
transitional cell hyperplasia (diffuse)	7	2	5	3	3	4	1	1	4	0
Larynx:	(55)	(55)	(55)	(55)	(55)	(55)	(55)	(55)	(55)	(54)
squamous metaplasia	0	0*	5	7	6	14	3	13	7	16*
squamous cell hyperplasia	1	2	0	2	0	4	1	2	0	1
Liver:	(55)	(55)	(55)	(55)	(55)	(55)	(55)	(55)	(55)	(55)
bile duct hyperplasia	0	1	0	1	0	0	0	2	0	0
Lung:	(55)	(55)	(55)	(55)	(55)	(55)	(55)	(55)	(55)	(55)
Type II pneumocyte proliferation	2	0	3	1	0	0	0	0	0	0
goblet cell hyperplasia	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
alveolar macrophage accumulation	24	25	30	29	24	32	22	33	19	30
Lymph node, axillary:	(2)	(6)	(2)	(4)	(4)	(3)	(2)	(2)	(2)	(1)
lymphoid hyperplasia	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
Mammary gland:	(51)	(54)	(45)	(55)	(46)	(55)	(45)	(55)	(51)	(55)
atypical hyperplasia	0	0	0	5	0	1	0	3	0	1
lobular hyperplasia	0	17	1	18	1	9	0	11	0	12
Ovary:	(55)	(55)	(55)	(55)	(55)	(55)	(55)	(55)	(55)	(55)
smooth muscle hyperplasia, mesovarium		0		0		0		3		3
tubulostromal hyperplasia		1		6		8		12		5
cystic/papillary hyperplasia		7		5		11		8		4
sex cord/stromal hyperplasia		1		2		0		2		4
stromal hyperplasia		2		2		2		0		1
cyst		2		4		13*		12		22***

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

10.2 オロダテロールのラットがん原性試験（続き）

Doc. No.: U[redacted]-2661 (Continued)

Daily Achieved Dose (Olo, µg/kg free base)	Air Control 0		Vehicle Control 0		25.8		75.9		270	
Number of Animals (main study +TK)	M: 55+10	F: 55+10	M: 55+10	F: 55+10	M: 55+10	F: 55+10	M: 55+10	F: 55+10	M: 55+10	F: 55+10
Histopathology:										
Non-neoplastic findings[b]										
Pancreas:	(55)	(55)	(54)	(55)	(55)	(55)	(55)	(54)	(55)	(55)
islet cell hyperplasia	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
Parathyroid gland:	(52)	(47)	(53)	(52)	(49)	(50)	(55)	(49)	(52)	(49)
hyperplasia (focal)	5	0	3	0	0	0	3	0	2	1
hyperplasia (diffuse)	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Pituitary gland:	(53)	(55)	(54)	(55)	(55)	(55)	(55)	(55)	(55)	(55)
anterior lobe hyperplasia	9	15	13	13	7	14	9	14	7	14
intermediate lobe hyperplasia	0	0	1	4	0	2	1	2	0	1
Prostate:	(55)	(55)	(55)	(55)	(55)	(55)	(55)	(55)	(55)	(55)
atypical hyperplasia	5	-	7	-	5	-	5	-	7	-
Seminal vesicle:	(54)	(55)	(55)	(55)	(55)	(55)	(55)	(55)	(54)	(55)
hyperplasia	2	-	1	-	0	-	0	-	0	-
Skin and subcutis:	(55)	(54)	(55)	(55)	(55)	(55)	(55)	(55)	(55)	(55)
squamous cell hyperplasia	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0
sebaceous cell hyperplasia	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
Spleen:	(55)	(55)	(55)	(55)	(55)	(55)	(55)	(55)	(55)	(55)
stromal hyperplasia/hypertrophy	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
Stomach:	(55)	(55)	(55)	(55)	(55)	(55)	(55)	(55)	(55)	(55)
basal cell hyperplasia, limiting ridge	1	0	1	1	0	1	3	1	0	1
squamous cell hyperplasia	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0
Testis	(54)		(55)		(55)		(55)		(55)	
interstitial cell hyperplasia (focal)	1		2		0		1		0	
interstitial cell hyperplasia (diffuse)	0		0		0		1		0	
Rete testis hyperplasia	0		0		0		1		0	
mesothelial hyperplasia	1		0		0		0		1	

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

10.2 オロダテロールのラットがん原性試験（続き）

Doc. No.: U[redacted]-2661 (Continued)

Daily Achieved Dose (Olo, µg/kg free base)	Air Control 0		Vehicle Control 0		25.8		75.9		270	
Number of Animals (main study +TK)	M: 55+10	F: 55+10	M: 55+10	F: 55+10	M: 55+10	F: 55+10	M: 55+10	F: 55+10	M: 55+10	F: 55+10
Histopathology:										
Non-neoplastic findings[b]										
Thymus:	(55)	(55)	(55)	(55)	(53)	(54)	(53)	(50)	(51)	(54)
epithelial tubular hyperplasia	2	10	4	13	6	16	4	16	6	13
lymphoid hyperplasia	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Thyroid gland:	(54)	(55)	(55)	(55)	(55)	(55)	(55)	(55)	(55)	(53)
C-cell hyperplasia (focal)	6	3	8	6	10	9	9	9	9	8
C-cell hyperplasia (diffuse)	2	3	6	2	7	4	8	3	3	4
follicular cell hyperplasia, cystic	1	0	5	1	2	0	1	1	5	0
Tongue:	(55)	(55)	(55)	(55)	(55)	(55)	(55)	(55)	(55)	(54)
squamous cell hyperplasia	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
Urinary bladder:	(53)	(54)	(55)	(55)	(55)	(55)	(55)	(54)	(55)	(55)
transitional cell hyperplasia (focal)	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
transitional cell hyperplasia (diffuse)	0	0	1	1	2	0	1	0	1	0
lymphoid hyperplasia	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Uterus:		(55)		(55)		(55)		(55)		(55)
cystic endometrial hyperplasia		4		7		6		1		7
squamous cell hyperplasia, cervix		6		3		2		3		5
Zymbal's gland:	(43)	(41)	(40)	(48)	(41)	(41)	(36)	(46)	(44)	(41)
duct cell hyperplasia	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

10.2 オロダテロールのラットがん原性試験（続き）

Doc. No.: U[redacted]-2661 (Continued)

Daily Achieved Dose (Olo, µg/kg free base)	Air Control 0		Vehicle Control 0		25.8		75.9		270	
Number of Animals (main study +TK)	M: 55+10	F: 55+10	M: 55+10	F: 55+10	M: 55+10	F: 55+10	M: 55+10	F: 55+10	M: 55+10	F: 55+10
Histopathology:										
Neoplastic findings[c]										
Adrenal gland:	(55)	(55)	(55)	(55)	(55)	(55)	(55)	(55)	(54)	(55)
cortical adenoma [B]	0	0	1	1	0	0	2	0	1	0
phaeochromocytoma [B]	0	1	1	1	1	1	0	1	2	1
cortical carcinoma [M]	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0
phaeochromocytoma [M]	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0
Brain:	(55)	(55)	(55)	(55)	(55)	(55)	(55)	(55)	(55)	(55)
astrocytoma [B]	0	0	0	0	0	2	0	0	1	0
granular cell tumor [B]	2	0	2	0	1	0	0	0	1	0
astrocytoma [M]	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0
glioma [M]	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
Caecum	(53)	(51)	(55)	(55)	(54)	(54)	(55)	(55)	(53)	(50)
Stromal sarcoma [M]	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
Cranium	(0)	(0)	(1)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)
schwannoma [M]			1							
Duodenum	(54)	(54)	(55)	(55)	(55)	(55)	(55)	(55)	(54)	(53)
Leiomyoma [B]	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Ear	(0)	(1)	(0)	(1)	(1)	(1)	(3)	(0)	(0)	(0)
Sebaceous cell adenoma, ear canal [B]		0		0	1	0	0			
Epididymis	(54)		(55)		(55)		(55)		(55)	
schwannoma [M]	0		1		0		0		0	
Femur	(54)	(53)	(55)	(55)	(55)	(55)	(55)	(54)	(55)	(52)
osteoma [B]	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
Femur	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(1)	(2)	(1)	(0)
synovial sarcoma [M]	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

10.2 オロダテロールのラットがん原性試験（続き）

Doc. No.: U[redacted]-2661 (Continued)

Daily Achieved Dose (Olo, µg/kg free base)	Air Control 0		Vehicle Control 0		25.8		75.9		270	
Number of Animals (main study +TK)	M: 55+10	F: 55+10	M: 55+10	F: 55+10	M: 55+10	F: 55+10	M: 55+10	F: 55+10	M: 55+10	F: 55+10
Histopathology:										
Neoplastic findings[c]										
Haemopoietic system:	(1)	(1)	(1)	(1)	(1)	(0)	(1)	(1)	(1)	(1)
lymphoma, lymphoblastic [M]	1	1	0	0	1		1	0	1	1
lymphoma [M]	0	0	0	1	0		0	0	0	0
histiocytic sarcoma [M]	0	0	1	0	0		0	0	0	0
leukemia [M]	0	0	0	0	0		0	1	0	0
Harderian gland	(55)	(55)	(55)	(55)	(55)	(55)	(55)	(55)	(55)	(55)
adenocarcinoma [M]	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Heart	(55)	(55)	(55)	(55)	(54)	(55)	(55)	(55)	(55)	(55)
schwannoma [B]	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Kidney	(55)	(55)	(55)	(55)	(55)	(55)	(55)	(55)	(55)	(55)
lipoma [B]	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0
liposarcoma [M]	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0
Liver	(55)	(55)	(55)	(55)	(55)	(55)	(55)	(55)	(55)	(55)
hepatocellular adenoma [B]	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
hepatocellular carcinoma [M]	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0
Lung	(55)	(55)	(55)	(55)	(55)	(55)	(55)	(55)	(55)	(55)
bronchiolo-alveolar adenoma [B]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Lymph node, mesenteric:	(55)	(55)	(55)	(54)	(54)	(55)	(55)	(54)	(55)	(55)
haemangioma [B]	2	1	4	1	1	0	2	0	0	1
haemangiosarcoma [M]	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Mammary gland:	(51)	(54)	(45)	(55)	(46)	(55)	(45)	(55)	(51)	(55)
fibroadenoma [B]	0	8	0	6	0	6	0	5	0	7
adenoma [B]	0	0	1	2	0	0	0	1	0	1
adenocarcinoma [M]	0	1	0	3	0	1	0	2	0	1
mixed malignant tumour [M]	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
Oral cavity	(0)	(1)	(0)	(0)	(0)	(0)	(1)	(1)	(3)	(1)
squamous-cell carcinoma [M]		0					0	0	1	1

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

10.2 オロダテロールのラットがん原性試験（続き）

Doc. No.: U[redacted]-2661 (Continued)

Daily Achieved Dose (Olo, µg/kg free base)	Air Control 0		Vehicle Control 0		25.8		75.9		270	
Number of Animals (main study +TK)	M: 55+10	F: 55+10	M: 55+10	F: 55+10	M: 55+10	F: 55+10	M: 55+10	F: 55+10	M: 55+10	F: 55+10
Histopathology:										
Neoplastic findings[c]										
Ovary:		(55)		(55)		(55)		(55)		(55)
leiomyoma, mesovarium [B]		0		0		1		0		4[†]
cystadenoma [B]		0		0		0		2		0
thecal cell tumour		0		1		1		0		0
granulosa/thecal cell tumour [B]		0		0		1		0		0
sex cord/stromal tumour [B]		1		0		0		0		1
tubulostromal adenoma [B]		0		0		0		0		1
granulosa cell tumour, metastasising [M]		0		0		0		0		1
Pancreas (endocrine)	(55)	(55)	(54)	(55)	(55)	(55)	(55)	(54)	(55)	(55)
islet cell adenoma [B]	1	0	0	0	0	0	2	0	0	0
islet cell carcinoma [M]	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Parathyroid gland	(52)	(47)	(53)	(52)	(49)	(50)	(55)	(49)	(52)	(49)
adenoma [B]	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0
Pituitary gland:	(53)	(55)	(54)	(55)	(55)	(55)	(55)	(55)	(55)	(55)
adenoma, anterior lobe [B]	16	26	15	38	25[#]	27	16	29	18	33
adenoma, intermediate lobe [B]	0	0	1	1	1	1	0	0	2	1
ganglioneuroma [B]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Salivary gland (parotid)	(55)	(53)	(54)	(55)	(53)	(55)	(54)	(52)	(55)	(52)
adenoma [B]	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Salivary gland (submaxillary)	(55)	(55)	(55)	(55)	(55)	(55)	(55)	(55)	(55)	(54)
schwannoma [M]	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

10.2 オロダテロールのラットがん原性試験（続き）

Doc. No.: U[redacted]-2661 (Continued)

Daily Achieved Dose (Olo, µg/kg free base)	Air Control 0		Vehicle Control 0		25.8		75.9		270	
Number of Animals (main study +TK)	M: 55+10	F: 55+10	M: 55+10	F: 55+10	M: 55+10	F: 55+10	M: 55+10	F: 55+10	M: 55+10	F: 55+10
Histopathology:										
Neoplastic findings[c]										
Skin and Subcutis:	(55)	(54)	(55)	(55)	(55)	(55)	(55)	(55)	(55)	(55)
keratoacanthoma[B]	3	0	5	1	3	0	5	0	2	0
squamous-cell papilloma [B]	1	0	2	0	0	0	1	0	0	0
fibroma [B]	3	0	3	1	1	0	3	0	0	0
lipoma [B]	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
basal cell carcinoma [M]	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
neural crest tumour [M]	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
fibrosarcoma [M]	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0
Spinal cord	(55)	(53)	(55)	(55)	(55)	(55)	(55)	(55)	(55)	(55)
astrocytoma [M]	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Spleen	(55)	(55)	(55)	(55)	(55)	(55)	(55)	(55)	(55)	(55)
haemangioma [B]	0	0	2	0	0	0	1	0	0	0
haemangiosarcoma [M]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Stomach	(55)	(55)	(55)	(55)	(55)	(55)	(55)	(55)	(55)	(55)
schwannoma [B]	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
adenocarcinoma [M]	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Testis	(54)		(55)		(55)		(55)		(55)	
interstitial cell adenoma [B]	3		1		0		2		1	
mesothelioma [B]	0		0		1		0		0	
mesothelioma [M]	1		1		0		3		3	
Thymus	(55)	(55)	(55)	(55)	(53)	(54)	(53)	(50)	(51)	(54)
thymoma [B]	0	6	0	5	2	2	0	0	0	3
Thyroid gland:	(54)	(55)	(55)	(55)	(55)	(55)	(55)	(55)	(55)	(53)
follicular cell adenoma [B]	0	3	4	1	2	0	1	0	3	1
C-cell adenoma [B]	3	4	6	6	7	6	9	4	3	2
follicular cell carcinoma [M]	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
C-cell carcinoma [M]	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

10.2 オロダテロールのラットがん原性試験（続き） Doc. No.: U[redacted]-2661 (Continued)

Daily Achieved Dose (Olo, µg/kg free base)	Air Control 0		Vehicle Control 0		25.8		75.9		270	
Number of Animals (main study +TK)	M: 55+10	F: 55+10	M: 55+10	F: 55+10	M: 55+10	F: 55+10	M: 55+10	F: 55+10	M: 55+10	F: 55+10
Histopathology:										
Neoplastic findings[c]										
Uterus:		(55)		(55)		(55)		(55)		(55)
endometrial adenoma [B]		1		1		2		0		0
polyp, glandular [B]		1		0		0		0		0
polyp, stromal [B]		24		32		24		22		22
leiomyoma [B]		0		0		1		0		0
adenocarcinoma [M]		4		4		5		7		7
adenosquamous carcinoma, metastisising [M]		1		0		0		0		0
endometrial carcinoma [M]		0		0		0		0		1
schwannoma [M]		0		0		0		1		0
endometrial stromal sarcoma [M]		0		0		0		1		0
Vertebrae	(2)	(2)	(1)	(1)	(6)	(1)	(1)	(3)	(2)	(5)
osteoma [B]	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
Zymbal's gland	(43)	(41)	(40)	(48)	(41)	(41)	(36)	(46)	(44)	(41)
carcinoma [M]	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0

NA: not applicable NQ: not quantifiable NC: not calculated

-: no noteworthy findings *: $p<0.05$ **: $p<0.01$ ***: $p<0.001$

[B]: benign tumour [M]: malignant tumour

a: group means are shown for the air and vehicle control groups, and percent differences from the vehicle control group for the treated groups. Statistical significance is based on actual data from the vehicle control group.

b: statistical significance is from the vehicle control group.

c: #: pairwise difference, $p<0.05$, Trend, $p<0.025$ †: pairwise difference, $p<0.01$

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

11. 生殖発生毒性試験：重要な試験以外の試験

Test Article: Olodaterol

Report Title: BI 1744 CL: Pilot and preliminary embryo-fetal study in the rabbit by inhalation administration

Location in Module: 4.2.3.5.2-2

Species/ Strain	Method of Administration	Dosing Period	Daily Achieved Dose (Olo, mg/kg free base)	No. per Group	Noteworthy Findings	Doc. No.
Rabbit, New Zealand White	**Snout-only inhalation**					U[redacted]-2535
Unmated phase	**30 minutes** **60 minutes** **120 minutes**	**14 days**	**0.835** **1.80** **3.92**	**3** **3** **3**	A reduction in food was noted on the first day of exposure. No further treatment-related effects were noted	
Mated phase	**60 minutes** **120 minutes**	**14 days (Day 6 to 19 of gestation)**	**1.74** **3.71**	**3** **3**	A reduction in food was noted on the first day of exposure. There was no adverse effect on embryo-fetal survival or growth. Toxicokinetic investigation revealed that exposure to BI 1744 BS was high in non-pregnant and pregnant rabbits, and there was a decrease in BI 1744 BS plasma concentrations between Days 1 and 5 of dosing. The dose normalised plasma concentrations were similar in non-pregnant and pregnant rabbits.	

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

12. 生殖発生毒性試験：受胎能および着床までの初期胚発生に関する試験 Test Article: Olodaterol

Report Title : BI 1744 CL: Study for Effects on Fertility and Early Embryonic Development to Implantation in Rats (Inhalation)

Design similar to ICH 4.1.1:	Yes	**Duration of Dosing:**	M: at least 9 weeks: 4 weeks premating, during mating	**Doc. No.:**	U[redacted]-2297
Species/Strain:	Rat Crl:CD®(SD)		F: 2 weeks premating, until pregnancy day 7 Day of Mating: Day 0 of gestation	**Location in Module:**	4.2.3.5.1-1
Initial Age:	male: 8-9 weeks female: 9-10 weeks				
Date of First Dose:	[redacted]	**Day of C-Section:**	Day 14/15/16 of gestation	**GLP Compliance:**	Yes
		Method of Administration:	Inhalation		
Special Features:	None	**Vehicle/Formulation:**	BAC/Na-EDTA solution		

No Observed Adverse-Effect Level: F_0 Males: 58 µg/kg/day
F_0 Females: 58 µg/kg/day
F_1 Litters: 3068 µg/kg/day

Daily Achieved Dose (Olo, µg/kg free base)		0 (Control)	58	193	3068
Males	**Toxicokinetics: $C_{0.583}$ (pmol/L)**				
	Day 26/Day 62 of Dosing	NQ	1130/1860	5630/8310	167000/208000
	No. Evaluated	24	24	24	24
	No. Died or Sacrificed Moribund	0	0	0	1
	Body Weight Gain (g, Days 0-21) [a]	102	+27%***	+31%***	+31%***
	Food Consumption (g, Day 28) [a]	28.4	+10%**	+11%***	+9%*
	Clinical Observations				
	salivation	1	8	22	24
	reddened skin at extremities	0	24	24	23
	subdued	0	0	0	10
	Necropsy observations	-	-	-	-
	Organ weight (absolute)				
	Epididymis (g) [a]	1.33	-10.7%***	-12.0%***	-14.5%***
	Testis (g) [a]	3.77	-3.71%	-4.51%*	-7.43%***
	Histology findings	-	-	-	-
	Mean No. Days Prior to Mating	3	3	3	2
	No. of Males that Mated	23	24	23	22

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

12 生殖発生毒性試験：受胎能および着床までの初期胚発生に関する試験（続き） Doc. No.: U[redacted]-2297 (Continued)

Daily Achieved Dose (Olo, µg/kg free base)		0 (Control)	58	193	3068
Females	**Toxicokinetics: $C_{0.583}$ pmol/L**				
	Day 12 of Dosing	652[b]	1720	5800	191000
	No. Evaluated	24	24	24	24
	No. Died or Sacrificed Moribund	0	0	0	1
	Body Weight Gain(g, Days 0-14) [a]	18	+78%***	+128%***	+139%***
	Pre mating Food Consumption (g, Day 14) [a]	16.5	+12%***	+12%***	+16%***
	Clinical Observations				
	Salivation	0	0	18	24
	Reddened skin at extremities	0	0	2	24
	Subdued	0	0	0	2
	Necropsy Observations	-	-	-	-
	Histology findings	-	-	-	-
	Mean No. Days Prior to Mating	3	3	3	2
	No. of Pregnant Females	23	24	23	23
	No. Aborted or with Total Resorption of Litter	1	0	1	1
	Mean No. Corpora Lutea	15.2	15.2	16.6	15.4
	Mean No. Implantations	15.2	15.0	16.5	14.8
	Mean % Preimplantation Loss	0	1	1	4
	Mean No. Live Implants	14.7	13.7	15.7	13.8
	Mean No. Resorptions	0.4	1.4*	0.9	1.0
	No. Dead Implants	10	33	20	22
	Mean % Postimplantation Loss	3	9	5	7

NQ: not quantifiable -: No noteworthy findings *: $p<0.05$ **: $p<0.01$ ***: $p<0.001$

[a]: for controls, group means are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown. Statistical significance is based on actual data.

[b]: ex-vivo contamination was indicated

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

13. 生殖発生毒性試験：胚・胎児発生に関する試験 Test Article: Olodaterol

13.1 オロダテロールのラット胚・胎児発生に関する試験

Report Title: Effects on Embryo-fetal Development in CD Rats by Inhalation Administration

Design similar to ICH 4.1.3:	Yes	**Duration of Dosing:**	12 days (GD6-17)	**Doc. No.:**	U[redacted]-2534
		Day of Mating:	GD 0	**Location in Module.**	4.2.3.5.2-1
Species/Strain:	Rat/Crl:CD® (SD) IGS BR	**Day of C-Section:**	GD 20	**GLP Compliance:**	Yes
Initial Age:	9-10 weeks	**Method of Administration:**	Inhalation		
Date of First Dose:	[redacted]	**Vehicle/Formulation:**	BAC/Na-EDTA solution		

No Observed Adverse-Effect Level:
F_0 Females: At least 1054 µg/kg/day
F_1 Litters: At least 1054 µg/kg/day

Daily Achieved Dose (Olo, µg/kg free base)		0 (Control)	64	222	1054
Dams/Does:	**Toxicokinetics: C_1 (pmol/L)**	1540 [b]	3390	7200 / 10900 (satellite)	37800
	C_{max} (pmol/L)	NA	NA	NA / 14400 (satellite)	NA
	AUC_{0-24} (pmol·h/L)	NA	NA	NA / 101000 (satellite)	NA
	No. Pregnant	21	21	22	22
	No. Died or Sacrificed Moribund	0	0	0	0
	No. Aborted or with Total Resorption of Litter	1	0	0	0
	Clinical Observations	-	-	-	-
	Necropsy Observations	-	-	-	-
	Body Weight gain Days 6-18, inclusive (%[a])	89 g	10*	15*	9*
	Food Consumption (g/rat/day) Days 6-17, inclusive (%[a])	27 g	6	6	3
	Mean No. Corpora Lutea	15.1	15.0	13.9	13.9
	Mean No. Implantations	13.5	13.3	12.5	13.0
	Mean % Preimplantation Loss	10.0	10.9	9.8	8.2

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

13.1 オロダテロールのラット胚・胎児発生に関する試験（続き） Doc. No.: U[redacted]-2534 (Continued)

Daily Achieved Dose (Olo, µg/kg free base)		0 (Control)	64	222	1054
Litters:	**No. Litters Evaluated**	21	21	22	22
	No. Live Fetuses	13.2	12.9	11.9	12.0
	Mean No. Resorptions	0.3	0.5	0.6	1.0$
	No. of Litters with Dead Fetuses	0	0	0	0
	Mean % Postimplantation Loss	2.3	3.4	5.3	8.9@@
	Mean Fetal Body Weight (male/female) (g)	3.79 / 3.58	3.94 / 3.73*	3.91 / 3.70*	3.99 / 3.70*
	Fetal Sex Ratios (% males)	53.2	52.0	45.1	46.6@
	Fetal Anomalies:				
	Gross External	-	-	-	-
	Major Fetal Anomalies (total affected fetuses % (litter incidence))				
	− **Complete situs inversus**	-	-	0.7 (1)	-
	− **Misshapen pituitary, misshapen thymus, thoracogastroschisis, testes overlying kidneys, adrenal overlying kidneys, malrotated hindlimb**	-	-	0.7 (1)	-
	− **Dilated ascending aorta/aortic arch, membranous ventricular septal defect**	-	0.7 (1)	-	-
	− **Medially thickened and kinked ribs, irregularly ossified ribs**	0.7 (1)	1.5 (2)	1.6 (2)	0.8 (1)
	− **Bent scapula**	-	-	1.6 (2)	-
	− **Umbilical hernia**	-	-	1.5 (2)	0.7 (1)
	− **Bent humerus**	-	-	0.8 (1)	-
	− **Short/thickened humerus**	-	-	1.6 (2)	-
	Minor Skeletal Anomalies/Variants (total affected fetuses % (litter incidence))				
	− **Incomplete ossification/unossified sternebrae**	76.1 (21)	69.2 (20)	87.9 (22)	91.3 (21)

NA: not applicable -: no noteworthy findings GD: gestation day

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

b: cross contamination was indicated

$: $p<0.05$ by Wilcoxon rank sum test

@: $p<0.05$, @@ : $p<0.01$ by Generalised linear mixed model

*: $p<0.05$ by Williams' test

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

13.2 オロダテロールのウサギ胚・胎児発生に関する試験

Test Article: Olodaterol

Report Title: BI 1744 CL Study of the Effects on Embryo-fetal Toxicity in the Rabbit by Inhalation Administration

Design similar to ICH 4.1.3:	Yes	**Duration of Dosing:**	14 days (GD6-19)	**Doc. No.:**	U[redacted]-1019
		Day of Mating:	GD0	**Location in Module:**	4.2.3.5.2-3
Species/Strain:	Rabbit, New Zealand White	**Day of C-Section:**	GD29	**GLP Compliance:**	Yes
Initial Age at start of treatment:	23-34 weeks	**Method of Administration:**	Inhalation		
Date of First Dose:	[redacted]	**Vehicle/Formulation:**	BAC/Na-EDTA solution		
No Observed Adverse-Effect Level:					
F_0 Females:	At least 2489 µg/kg/day				
F_1 Litters:	At least 974 µg/kg/day				

Daily Achieved Dose (Olo, µg/kg free base)			**0 (Control)**	**289**	**974**	**2489**
Dams/Does:	**Toxicokinetics: C_{max} (pmol/L)**		NA	8170	30400	161000
	AUC_{0-24} (pmol·h/L)		NA	39700	182000	959000
	No. Pregnant		17	22	17	21
	No. Died or Sacrificed Moribund		1	0	1	0
	No. Aborted or with Total Resorption of Litter		1	0	1	0
	Clinical Observations		-	-	-	-
	Necropsy Observations		-	-	-	-
	Body Weight gain	**Days 6-20 inclusive (kg)**	0.00	+0.13*	+0.09*	+0.09*
	Food Consumption	**Days 6-19 inclusive (%[a])**	80g/rabbit/day	+6	+4	-4
	Mean No. Corpora Lutea		9.7	9.0	10.2	9.7
	Mean No. Implantations		8.2	7.9	7.7	8.5
	Mean % Preimplantation Loss		15.5	14.1	24.3	14.4

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

13.2 オロダテロールのウサギ胚・胎児発生に関する試験（続き） Doc. No.: U[redacted]-1019 (Continued)

Daily Achieved Dose (Olo, µg/kg free base)		0 (Control)	289	974	2489
Litters:	No. Litters Evaluated	17	22	17	21
	No. Live Fetuses	7.0	6.9	6.3	7.1
	Mean No. Resorptions	1.2	1.0	1.4	1.4
	No. of Litters with Dead Fetuses	1	0	0	0
	Mean % Postimplantation Loss	14.6	13.1	18.5	14.7
	Mean Fetal Body Weight (male / female) (g)	44.2 / 43.8	43.9 / 42.4	43.7 / 44.3	40.4 / 41.1
	Fetal Sex Ratios (% males)	46.7	51.9	49.6	45.1
	Fetal Anomalies:				
	Gross External	-	-	-	-
	Major Fetal Anomalies (total affected fetuses % (litter incidence))				
	– Multiple abnormalities including acrania, cervico-thoracic vertebral and rib abnormalities, split sternum and gastoschisis	-	-	-	0.7 (1)
	– Multiple retinal folds	-	-	-	2.0 [b] (1)
	– Thickened ribs/distorted rib cage, short/bent scapula/humerus/ radius/ulna/femur/tibia/fibula and/or flexure combined with some fetuses with partially open eye or cleft palate	-	-	-	5.4 (1)
	– Multiple thoracolumbar vertebral/rib abnormalities/scoliosis, misshapen disorganised and fused sarcocaudal vertebrae, brachyury, additional bone arising from tibia, absent kidney	-	-	0.9 (1)	-
	– Cardiovascular abnormalities	0.7 (1)	-	-	2.0 (2)
	– Dorsoventral distortion of the sternum	-	-	-	0.7 (1)
	– Lumbar scoliosis	0.8 (1)	-	-	-
	– Absent gall bladder	0.8 (1)	-	-	-
	Minor Skeletal Anomalies/Variants (total affected fetuses % (litter incidence))				
	– Unossified areas/patchy ossification on the cranial bones/ribs/long bones	-	-	-	5.9 (1)

NA: not applicable
-: no noteworthy findings GD: gestation day *: $p<0.05$
a: for controls, group means are shown. For treated groups, % differences from controls are shown.
b: % calculated with respect to number of heads at detailed visceral examination

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

14. 生殖発生毒性試験：出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験 Test Article: Olodaterol

Report Title: Study for Effects on Pre and Postnatal Development, Including Maternal Function in Rats (Inhalation)

Design similar to ICH 4.1.2:	Yes	**Duration of Dosing:**	ca 2 weeks during pregnancy (GD6-20) ca 3 weeks during lactation (LD2-21)	**Doc. No.:**	U[redacted]-1971
		Day of Mating:	Day 0 of gestation (GD0)	**Location in Module:**	4.2.3.5.3-1
Species/Strain:	Rat/Crl:CD®(SD)	**Method of Administration:**	Inhalation	**GLP Compliance:**	Yes
Initial Age	ca 9 weeks on arrival	**Vehicle/Formulation:**	BAC/EDTA solution		
Date of First Dose:	[redacted]	**Litters Culled/Not Culled:**	Not culled		
Special Features:	NA				
No Observed Adverse-Effect Level:					
F_0 Females:	3665µg/kg/day				
F_1 Males and Females:	3665µg/kg/day				

Daily Achieved Dose (Olo, µg/kg free base)		0 (Control)	59	297	3665
F_0 Females:	**Toxicokinetics: AUC**	NA	NA	NA	NA
	No. Pregnant	21	22	23	23
	No. Died or Sacrificed Moribund	0	0	0	0
	No. Aborted or with Total Respiration of Litter	0	0	0	0
	Clinical Observations:				
	Subdued behaviour / Excessive behaviour	0 / 0	0 / 0	0 / 0	23 / 24
	Excessive salivation	6	22	24	24
	Eye(s) partially closed	0	0	0	24
	Necropsy Observations:	-	-	-	-
	Gestation Body Weight Day 20 (%[a])	349g	5*	7**	5*
	Lactation Body Weight Day 21 (%[a])	301g	8	9	10
	Gestation Food Consumption Day 6-20 (%[a])	364g/animal	2	3	1
	Lactation Food Consumption Day 0-14 (%[a])	651g/animal	5	8	3
	Mean Duration of Gestation (days)	21.6	22.0*	21.9*	21.9
	Abnormal Parturition	-	-	-	-

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

14 生殖発生毒性試験：出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験（続き） Doc. No.: U[redacted]-1971 (Continued)

Daily Achieved Dose (Olo, µg/kg free base)		0 (Control)	59	297	3665
F_1 Litters:	No. Litters Evaluated	21	22	23	23
(Preweaning)	Mean No. of Implantations	13.0	13.5	13.0	13.1
	Mean No. Pups/Litter	12.2	12.6	12.1	12.1
	Mean No. Liveborn Pups/Litter	12.2	12.4	12.0	11.9
	No. of Litters with Stillborn Pups	0	4	1	4
	Mean No. Live Pups Day 4	11.6	11.4	11.6	10.7
	Mean No. Live Pups Day 21	11.6	11.4	11.6	10.4
	No. of Total Litter Losses	0	3	0	5
	Mean Pup Body Weight Gain Day 1-21 (%)[b]	37.7g	-5	-1	-5
	Pup Sex Ratio (M:F)	1:1.07	1:1.04	1:0.90	1:0.88
	Mean days to eye opening (days)	15.2	14.0*	13.3***	13.4***
	Pup Clinical Signs	-	-	-	-
	Pup Necropsy Obs	-	-	-	-
	No. Evaluated Postweaning				
F_1 Males:	Per Litter	2	2	2	2
(Postweaning)	No. Died or Sacrificed Moribund	0	0	0	0
	Clinical Observations	-	-	-	-
	Necropsy Observations	-	-	-	-
	Body-Weight Change[c] (g) Week 3-10 Set 1	327 g	-5	-5	-10
	Food Consumption	NA	NA	NA	NA
	Preputial Separation (Set 1 and Set2) (days)	44.2	43.5	43.7	43.8
	Sensory Function	-	-	-	-
	Motor Activity	-	-	-	-
	Learning and Memory	-	-	-	-
	Mean No. Days Prior to Mating	3.1	3.0	2.2	2.6
	No. of Males that Mated	21	20	23	20
	No. of Fertile Males	21	20	21	19

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

14 生殖発生毒性試験：出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験（続き） Doc. No.: U[redacted]-1971 (Continued)

Daily Achieved Dose (Olo, µg/kg free base)		0 (Control)	59	297	3665
F_1 Females: (Postweaning)	No. Evaluated Postweaning Average per set	21	19	23	18
	No. Died or Sacrificed Moribund	0	0	0	1
	Clinical Observations	-	-	-	-
	Necropsy Observations	-	-	-	-
	Premating Body-Weight Change[c] (%)[a] Set 1	171 g	-1	1	4
	Gestation Body-Weight Change (%) (GD0-GD14)	77 g	-3	3	-1
	Mean Age of Vaginal Patency (days) (set 1 and set 2)	35.3	36.1	36.6	37.0
	Sensory Function	-	-	-	-
	Motor Activity	-	-	-	-
	Learning and Memory	-	-	-	-
	Mean No. Days Prior to Mating	3.1	3.0	2.2	2.6
	No. of Pregnant Females	21	20	21	19
	Mean No. Corpora Lutea	16.1	16.3	15.6	15.5
	Mean No. Implantations	15.8	16.0	15.5	15.3
	% Preimplantation Loss	2	2	1	1
F_2 Litters:	Mean No. Live Conceptuses/Litter	14.9	15.1	15.0	14.5
	Mean No. Dead Implants	0.9	1.0	0.5	0.8
	No. of Litter with Dead Conceptuses	13	13	6	12
	No. Dead Conceptuses	19	19	10	15

NA: not applicable GD: gestation day LD: lactation day
-: no noteworthy findings *: $p<0.05$ **: $p<0.01$
a: for controls, group means are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown. Statistical significance is based on actual data (not on the percent differences)
b: from birth to weaning. For controls, group means are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown.
c: from weaning to mating. For controls, group means are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown.

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

15. 新生児を用いた試験

Test Article: Tiotropium + Olodaterol

Not applicable

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

16. 局所忍容性試験

Test Article: Olodaterol

16.1 皮膚刺激性試験

Report Title: BI 1744 CL: Acute dermal irritation/corrosion study in rabbits

Location in CTD: 4.2.3.6-1

Species/ Strain	Method of Application	Dose (Olo, free base)	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	Doc. No.
Rabbit New Zealand White (Chbb:NZW)	on dermal skin (pasty mixture with demineralized water as vehicle)	0.5 g single application	3 females	no systemic side effects, no skin alterations	U[redacted]-1116

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

16.2 眼刺激性試験

Test Article: Olodaterol

Report Title: BI 1744 CL: Acute eye irritation/corrosion study in rabbits

Location in CTD: 4.2.3.6-2

Species/ Strain	Method of Application	Doses (Olo, free base)	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	Doc. No.
Rabbit New Zealand White	into the conjunctival sac of the left eye	ca 2 mg ca 10 mg per eye, single application	3 females 1 female	2 mg: mild irritating effect (injected blood vessels in the conjunctivae, swelling of the lids). Reversible within 48 h. 10 mg: moderate irritating effect (injected blood vessels in the conjunctivae, swelling of the lids), strong lacrimation and a diffuse, crimson color of the conjunctivae. Reversible within 72 h.	U[redacted]-2189

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

16.3 静脈内及び筋肉内投与刺激性試験

Test Article: Olodaterol

Report Title: BI 1744 CL: Single dose intravenous and intramuscular tolerance study in rabbits

Location in CTD: 4.2.3.6-3

Species/ Strain	Method of Application	Doses (Olo, free base)	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	Doc. No.
Rabbit New Zealand White (Chbb:NZW)	Intravenous and intramuscular injection	Vehicle (physiological saline) 0.010 mg/mL 0.004 mg/mL Single application at 0.5 mL	2 females	For the intravenous and intramuscular injection of the 0.01 and 0.004 mg/mL solutions, no reaction different to the one seen after the injection of the vehicle were detected macroscopically and histopathologically. Following intravenous injection, the 0.01 mg/mL solution caused histopathologically detectable signs of local intolerance.	U[redacted]-2144

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

16.4 動脈内投与刺激性試験

Test Article: Olodaterol

Report Title: BI 1744 CL: Single dose intra-arterial tolerance study in rabbits

Location in CTD: 4.2.3.6-4

Species/ Strain	Method of Application	Doses (Olo, free base)	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	Doc. No.
Rabbit New Zealand White (Chbb:NZW)	Intra-arterial injection	Vehicle (physiological saline) 0.010 mg /mL 0.004 mg /mL Single application at 0.5 mL	2 females	For both solutions, no different reaction at the site of the intra-arterial injection to the one observed after the injection of the vehicle were detected macroscopically and histopathologically. Intra-arterial administration of the 0.01 mg/mL solution was very painful for the rabbits.	U[redacted]-2164

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

16.5 傍静脈投与刺激性試験 Test Article: Olodaterol

Report Title: BI 1744 CL: Single dose paravenous tolerance study in rats

Location in CTD: 4.2.3.6-5

Species/ Strain	Method of Application	Doses (Olo, free base)	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	Doc. No.
Rat / Wistar Crl:WI(Han)	Paravenous injection	Vehicle (physiological saline) 0.010 mg/mL 0.004 mg/mL single application at 0.2 mL	2 females	Macroscopically and histopathologically, no difference between the reaction at the site of the paravenous injection of vehicle and the two olodaterol solutions were detected.	U[redacted]-2178

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

17. その他の毒性試験

Test Article: Olodaterol

17.1 オロダテロールの幼若イヌ反復吸入投与試験

Report Title: BI 1744 CL: Preliminary Inhalation Feasibility Study in Juvenile Beagle Dogs

Species/Strain:	Dog / Beagle	**Duration of Dosing:**	21-22 days	**Doc. No.:**	U[redacted]-1442
Initial Age (at start of dosing):	14-18 days old	**Duration of Postdose:**	NA	**Location in Module:**	4.2.3.7.7-1
Date of First Dose:	[redacted]	**Method of Administration:**	Inhalation	**GLP Compliance:**	no
		Vehicle/Formulation:	BAC/Na-EDTA solution		

Special Features: Inhalation exposure in juvenile dogs

No Observed Adverse Effect Level: NA

Daily Achieved Dose (Olo, µg/kg free base)		**0 Vehicle Control***		**21.9 Low Dose**		**294 High Dose**		**674 New High Dose***		**0 (Naïve Control)****	
Number of Animals		M:2	F:2	M:2	F:2	M:2	F:2	M:2	F:2	M:2	F:2
Toxicokinetics:											
$C_{max,ss}$ (pmol/L)	**Day 21**	NQ	NQ	541	729	5010	9180	25600	19800	NA	NA
$AUC_{0-24,ss}$ (pmol·h/L)	**Day 21**	NC	NC	3770	7730	26800	45400	97800	82400	NA	NA
Noteworthy Findings											
Died or Sacrificed Moribund		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Body Weight (%[a])		NA	NA	62.0	26.6	52.1	39.6	31.7	-7.1	1.42kg	1.69kg
Clinical Observations:											
Increased Heart Rate and Heart Force		-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
Respiratory Measurement											
Respiratory Minute Volume (L/min)											
-Week 1		NA	NA	0.926	1.140	0.952	1.140	0.805	0.774	NA	NA
-Week 2		NA	NA	2.009	1.852	2.211	2.045	1.625	1.415	NA	NA
-Week 3		NA	NA	2.175	2.825	2.610	3.180	1.570	2.035	NA	NA
Histopathology											
number of animals examined		NA	NA	2	2	2	2	2	2	2	2
Liver, Increased glycogen, periportal		NA	NA	1	1	0	1	1	0	0	0

NA: Not applicable NQ: not quantifiable NC: not calculated -: No noteworthy findings + : positive

*: Group 1 animals were assigned to Group 4 after 3 days of dosing **: Naïve Control received no any treatment throughout the study period

a: at end of dosing period. For Naïve Controls, group means are shown. For treated groups, percent differences from Naïve controls are shown.

There were no noteworthy findings unless otherwise stated

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

17.2 オロダテロールの幼若イヌ反復吸入投与試験

Test Article: Olodaterol

Report Title: BI 1744 CL: 13 Week Inhalation Toxicity Study in Juvenile Beagle Dogs with a 4 Week Recovery Period

Species/Strain:	Juvenile Beagle dogs	**Duration of Dosing:**	13 weeks	**Doc. No.:**	U[redacted]-1257
Initial Age:	15-19 days old	**Duration of Postdose:**	4 weeks	**Location in Module:**	4.2.3.7.7-2
Date of First Dose:	[redacted]	**Method of Administration:**	Inhalation	**GLP Compliance:**	Yes
		Vehicle/Formulation:	BAC/Na-EDTA solution		
Special Features:	Inhalation exposure in juvenile dogs				
No Observed Adverse-Effect Level:	324 µg BI 1744 BS/kg/day				

Daily Achieved Dose (Olo, µg/kg free base)	**0 Air Control**		**0 Vehicle Control**		**120**		**324**		**1046**	
Number of Animals	M:7	F:7	M:7	F:7	M:5	F:5	M:5	F:5	M:7	F:7
Toxicokinetics:										
C_{max} (pmol·h/L)										
Day 1[a]	NQ	NQ	NQ	NQ	663	626	1860	2770	9830	9070
Day 91	NQ	NQ	NQ	NQ	1430	1420	6470	5290	33200	31700
AUC_{0-24} (pmol·h/L)										
Day 1[a]	NC	NC	NC	NC	9600	10100	25100	34200	93000	95300
Day 91	NC	NC	NC	NC	6310	5940	24100	24700	82000	73900
Noteworthy Findings										
Died or Sacrificed Moribund	0	2	0	0	0	0	1	1[b]	0	0
Body Weight Gain, Day 1-91 (%[c])	6782 g	5521 g	7478 g	5861 g	+17*	+2	-5	+8	-18	-11
Food Consumption, Day 91 (%[c])	343 g	210 g	350 g	285 g	+14	+8	-12	-11	-5	-14
Clinical Observations:										
Increased heart rate and heart force	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
Clear nasal discharge and rattling noise from the nose	-	-	-	-	-/+	-	-/+	-/+	+	+

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

17.2 オロダテロールの幼若イヌ反復吸入投与試験（続き）

Doc. No.: U[redacted]-1257 (Continued)

Daily Achieved Dose (Olo, µg/kg free base)	0 Air Control		0 Vehicle Control		120		324		1046	
Number of Animals	M:7	F:7	M:7	F:7	M:5	F:5	M:5	F:5	M:7	F:7
Noteworthy Findings										
Haematology Week 13										
Mean cell haemoglobin (pg)[d]	22.4	22.2	22.5	22.0	-4	-3	-7**	-5**	-7**	-6***
Clinical Chemistry Week 13										
Albumin (g/L)[d]	34	32	34	33	0	-3	-6*	-3	-9**	-6
Calcium (mmol/L)[d]	3.03	3.03	3.08	2.88	+3	+7 *	+1	+7*	+1	+7**
Urinalysis Week 13										
Chloride (mmol/L)[d]	179.7	165.8	210.8	155.7	+1	-8	-28	+1	-42**	3+37
Absolute Organ Weights (%[c])										
Thymus	24.44 g	17.44 g	21.69 g	18.79 g	-11	-19	+1	-13	-35*	-22
Testes	2.81 g		3.13 g		+14		-14		-20*	
Relative Organ Weight (Covariance Analysis, %[c])										
Thymus	25.43%	19.79%	21.60%	17.29%	-24	-11	+6	-14	-29*	-8
Histopathology										
Animal examined	5	3	5	5	5	5	4	5	5	5
Liver										
Minimal to marked periportal hepatocellular vacuolation	0	0	0	0	4	5	4	5	5	5
Minimal to mild increased cellularity of the periportal areas	0	0	0	0	1	4	4	5	3	4

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

17.2 オロダテロールの幼若イヌ反復吸入投与試験（続き） Doc. No.: U[redacted]-1257 (Continued)

Daily Achieved Dose (Olo, µg/kg free base)	**0 Air Control**		**0 Vehicle Control**		**120**	**324**	**1046**	
Post Dose Evaluation								
Number of Animals	F:2	M:2	F:2	M:2			M:2	F:2
Noteworthy Findings								
Clinical Observations:								
Clear nasal discharge and rattling noise from the nose	-	-	-	-			-	-/+
Body Weight Gain, Recovery Day 1-28(%[e])	2319 g	2057 g	2781 g	2214 g			-10	-34
Food Consumption, Recovery Day 28 (%[e])	310 g	329 g	400 g	268 g			-25	-30

NQ: not quantifiable NC: not calculated
-: no noteworthy findings +: seen in most animals in the group -/+: seen in part of animals in the group
*: $p<0.05$ **: $p<0.01$ ***: $p<0.001$
a: based only on three data points
b: one Group 4 female died prematurely on Day 8 of dosing and replaced by a spare animal
c: at end of dosing period. For Air and Vehicle Controls, group means are shown. For treated groups, percent differences from Vehicle Control are shown.
d: statistical significance is based on actual data and comparison between Vehicle Control and other groups.
e: at end of recovery period. For Air and Vehicle Controls, group means are shown. For treated group, percent differences from Vehicle Control are shown. Not statistically analysed for the recovery group.
There were no noteworthy findings unless otherwise stated.

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

17.3 ラット併用反復吸入投与毒性試験 Test Article: Tiotropium+Olodaterol

Report Title: BI 1744 CL /開発コードE* / tiotropium bromide (1:29:1): 4-week inhalation toxicity study in rats with a 2-week recovery period

Species/Strain:	Rat/Crl:WI(Han)	**Duration of Dosing:**	4 weeks	**Doc. No.:**	U[redacted]-1530
Initial Age:	ca 12 to 13 weeks	**Duration of Postdose:**	2 weeks	**Location in CTD:**	4.2.3.7.7-3
Date of First Dose:	[redacted]	**Method of Administration:**	Inhalation	**GLP Compliance:**	Yes
Vehicle/Formulation:	90 % ethanol, v/v 0.1 % Buthylated hydroxytruene 0.1 N HCl ad to pH 3.1 - 4.8				
Special Features:		60 min exposure time per day			
No Observed Adverse-Effect Level:		1.0 + 1.0 + 30 µg/kg, Tio+Olo+開発コードE* (active moiety)			

Actual Aerosol Concentration (Tio+Olo+開発コードE*, µg/L free moiety)		**0 + 0 + 0 Vehicle Control**		**0.027 + 0.027 + 0.77**		**0.08 + 0.078 + 2.3**		**0.25 + 0.25 + 7.3**	
Daily Achieved Dose (Tio+Olo+開発コードE*, µg/kg free moiety)		**0 + 0 + 0 Vehicle-Control**		**1.0 + 1.0 + 30**		**3.1 + 3.0 + 89**		**9.9 + 9.8 + 280**	
Number of Animals		**M: 10**	**F: 10**	**M: 10**	**F: 10**	**M: 10**	**F: 10**	**M: 10**	**F: 10**
Toxicokinetics: (4 animals/sex/group)									
	$C_{max,ss}$ [a]								
Tiotropium	**(pmol/L)**	0.0	0.0	73.4	34.0	233	83.3	709	610
BI 1744	**(pmol/L)**	0.0	0.0	46.0	62.7	151	239	295	609
開発コードE*	**(nmol/L)**	0.0	0.0	1.51	1.40	3.36	2.37	13.8	10.4
CD 1857	**(nmol/L)**	0.0	0.0	1.26	1.35	2.68	2.67	9.58	8.09
	$AUC_{0-24,ss}$ [a]								
Tiotropium	**(pmol·h/L)**	NC	NC	73.4	65.5	703	622	2220	1460
BI 1744	**(pmol·h/L)**	NC	NC	54.7	211	861	1220	1130	3830
開発コードE*	**(nmol·h/L)**	NC	NC	1.51	1.40	3.36	2.37	15.9	15.3
CD 1857	**(nmol·h/L)**	NC	NC	1.26	1.35	4.82	4.67	29.3	26.4

*：新薬承認情報提供時に置き換えた

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

17.3 ラット併用反復吸入投与毒性試験 （続き） Doc. No.: U[redacted]-1530 (Continued)

Daily Achieved Dose	**0 + 0 + 0**		**1.0 + 1.0 + 30**		**3.1 + 3.0 + 89**		**9.9 + 9.8 + 280**	
(Tio+Olo+開発コードE*, µg/kg free moiety)	**Vehicle Control**							
Number of Animals (main study+recovery)	**M: 10+10**	**F: 10+10**	**M: 10**	**F: 10**	**M: 10**	**F: 10**	**M: 10+10**	**F: 10+10**
Noteworthy Findings								
Died or Sacrificed Moribund	0	0	0	0	0	0	0	0
Body Weight	Slight increase of body weight for all groups. No test item-related and toxicologically relevant findings							
Food Consumption	-							
Clinical Observations	Mydriasis in Mid-Dose and High-Dose							
Ophthalmology	-							
Haematology	-							
Clinical Chemistry	Plasma corticosterone increased in Low-Dose and decreased in High-Dose							
Urinalysis	-							
Immunology	Phenotypic changes in the spleen and the resulting spleen natural killer cell activity A reversible shift from mature to more immature developmental thymocyte stages in the High-Dose and a reduction in the number of cells in the thymus expressing the receptor for IL-2 in the Mid-Dose group as well as in the High-Dose							
Organ Weights	Decrease of absolute and relative organ weight of thymus, spleen, adrenals, and mesenteric lymph node in Mid-Dose (thymus only) and High-Dose							
Gross Pathology	Thymus atrophy in High-Dose							

*：新薬承認情報提供時に置き換えた

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

17.3 ラット併用反復吸入投与毒性試験 （続き）

Doc. No.: U[redacted]-1530 (Continued)

Daily Achieved Dose (Tio+Olo+開発コードE*, µg/kg free moiety)	0 + 0 + 0 Vehicle Control		1.0 + 1.0 + 30		3.1 + 3.0 + 89		9.9 + 9.8 + 280	
Number of Animals	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10
Histopathology								
Number of animals examined	10	10	10	10	10	10	10	10
Larynx								
squamous metaplasia, base of epiglottis	0	0	0	0	0	0	**1**	**1**
squamous meta-/hyperplasia, arytenoids	0	0	0	0	**1**	0	**2**	**4**
focal superficial epithelial degeneration	0	0	0	0	**3**	**4**	**4**	**2**
focal epithelial erosion	0	0	0	0	**2**	**1**	**2**	**1**
Lung								
foam cell accumulation, single/sporadic	3	0	1	1	**5**	**1**	**2**	**2**
foam cell accumulation, disseminated	0	0	0	0	**1**	**0**	**3**	**2**
Eyes								
atrophy of corneal epithelium, minimal	0	0	2	3	**4**	**6**	**3**	**3**
atrophy of corneal epithelium, slight	0	0	2	1	**1**	**3**	**3**	**5**
Spleen								
decreased haematopopiesis	0	0	0	0	0	0	**3**	**3**
lymphoid depletion	1	0	1	0	0	0	**3**	**4**
Thymus								
lymphoid depletion	0	0	0	0	**4**	**3**	**5**	**4**
Nasal associated lymphoid tissue								
lymphoid depletion	3	2	2	3	**6**	**4**	**9**	**3**
Mesenteric lymph node								
lymphoid depletion	0	0	0	0	0	0	**2**	**4**
Adrenal glands, cortex								
zona fasciculata reduced in size	0	0	0	0	0	0	**4**	**2**
Knee								
reduction of spongiosa at growth plate	0	0	0	0	**1**	0	**7**	**5**

*：新薬承認情報提供時に置き換えた

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

17.3 ラット併用反復吸入投与毒性試験 （続き） Doc. No.: U[redacted]-1530 (Continued)

Daily Achieved Dose (Tio+Olo+開発コードE*, µg/kg free moiety)	**0 + 0 + 0 Vehicle Control**		**1.0 + 1.0 + 30**	**3.1 + 3.0 + 89**	**10 + 10 + 290**	
Postdose Evaluation: Number of Animals	**M: 10**	**F: 10**			**M: 10**	**F: 10**
Noteworthy Findings						
Body Weight	-	-			-	-
Food Consumption (%)	-	-			-	-
Clinical Observations	-	-			-	-
Ophthalmology	-	-			-	-
Haematology	-	-			-	-
Clinical Chemistry	-	-			-	-
Immulonogy	Phenotypic changes in the spleen and the resulting spleen natural killer cell activity were not reversible					
Urinalysis	-	-			-	-
Organ Weights (%)	Absolute organ weight of mesenteric lymph node in High-Dose female remained lowered					
Gross Pathology	-	-			-	-
Histopathology	-	-			-	-

NC: not calculated -: No noteworthy findings
a: mean on Day 22

*：新薬承認情報提供時に置き換えた

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

17.4 イヌ併用反復吸入投与毒性試験 Test Article: Tiotropium+Olodaterol

Report Title: BI 1744 CL /開発コードE* XX / tiotropium bromide (Ba 679 BR) (1:29:1): 4-week inhalation toxicity study in Beagle dogs with a 2-week recovery period

Species/Strain:	Dog/ Marshall:BEAGLE	**Duration of Dosing:**	4 weeks	**Doc. No.:**	U[redacted]-2354
Initial Age:	6 to 7 months	**Duration of Postdose:**	2 weeks	**Location in CTD:**	4.2.3.7.7-4
Date of First Dose:	[redacted]	**Method of Administration:**	Inhalation	**GLP Compliance:**	Yes
		Vehicle/Formulation:	90 % ethanol, v/v 0.1 % Buthylated hydroxytruene 0.1 N HCl ad to pH 3.8 -4.0		

Special Features: 10 min exposure time per day
No Observed Adverse-Effect Level: 16 + 16 + 460 µg/kg (estimated achieved daily dose), tiotropium + BI 1744 BS /開発コードE* (High-Dose)

Actual Aerosol Concentration (Tio+Olo+開発コードE*, µg/L free moiety)		**0 + 0 + 0 Vehicle Control**		**0.30 + 0.30 + 8.7**		**0.76 + 0.76 + 22**		**2.2 + 2.2 + 63**	
Daily Achieved Dose (Tio+Olo+開発コードE*, µg/kg free moiety)		**0 + 0 + 0 Vehicle Control**		**2.1 + 2.0 + 59**		**5.1 + 5.1 + 150**		**16 + 16 + 460**	
Number of Animals		**M:5**	**F:5**	**M:3**	**F:3**	**M:3**	**F:3**	**M:5**	**F:5**
Toxicokinetics:	**C_{max} [a]**								
Tiotropium	**(pmol/L)**	0.0	0.0	88.9	83.3	575	281	1050	888
BI 1744	**(pmol/L)**	0.0	0.0	27.6	39.4	98.9	56.4	259	223
開発コードE*	**(nmol/L)**	0.0	0.0	3.60	3.00	11.0	10.0	24.2	30.2
CD 1857	**(nmol/L)**	0.0	0.0	1.13	1.07	4.34	3.59	7.87	8.02
	AUC_{0-24} [a]								
Tiotropium	**(pmol·h/L)**	NC	NC	94.6	74.7	896	337	2140	1850
BI 1744	**(pmol·h/L)**	NC	NC	25.6	34.1	404	550	1590	1680
開発コードE*	**(nmol·h/L)**	NC	NC	1.32	1.10	5.14	3.64	14.7	16.4
CD 1857	**(nmol·h/L)**	NC	NC	0.992	1.22	7.67	5.06	18.7	15.7

*：新薬承認情報提供時に置き換えた

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

17.4 イヌ併用反復吸入投与毒性試験 （続き）

Doc. No.: U[redacted]-2354 (Continued)

Daily Achieved Dose (Tio+Olo+開発コードE*, µg/kg free moiety)	0 + 0 + 0 Vehicle Control		2.1 + 2.0 + 59		5.1 + 5.1 + 150		16 + 16 + 460	
Number of Animals	**M:5**	**F:5**	**M:3**	**F:3**	**M:3**	**F:3**	**M:5**	**F:5**
Noteworthy Findings								
Died or Sacrificed Moribund	0	0	0	0	0	0	0	0
Rel. Body Weight (%)[b] Day 28	104	105	105	104	107	101	101	98*
Food Consumption Day 28	Restrictive feeding. No relevant effects							
Clinical Observations								
Salivation (during exposure)	++	++	++	++	++	++	++	++
Rapid heart rate / increased heart force	-	-	+	+	+	+	+	+
Dry mouth mucosa	+	+	+	+	++	++	++	++
Dry nose	-	-	-	-	+	+	++	++
Ophthalmology	No relevant effects							
Cardiovascular investigations								
Heart rate (bpm) [c]	115		114		131		152*	
Haematology	No relevant effects							
Clinical Chemistry[d] Day 23								
Cortisol (basal) (µg/dL)	1.94	1.44	2.14	1.87	1.85	1.71	1.09	1.31
Cortisol (after ACTH) (µg/dL)	10.89	15.30	11.41	12.38	10.18	11.11*	4.78*	6.64*

*：新薬承認情報提供時に置き換えた

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

17.4 イヌ併用反復吸入投与毒性試験 （続き）

Doc. No.: U[redacted]-2354 (Continued)

Daily Achieved Dose (Tio+Olo+開発コードE*, µg/kg free moiety)	0 + 0 + 0 Vehicle Control		2.1 + 2.0 + 59		5.1 + 5.1 + 150		16 + 16 + 460	
Number of Animals	**M:3**	**F:3**	**M:3**	**F:3**	**M:3**	**F:3**	**M:3**	**F:3**
Urinalysis	No relevant effects							
Organ Weights [e]								
Adrenals	887 mg	1121 mg	+23%	+2%	+2%	-3%	-11%	-31%
Prostate	2.70 g		-43%		-46%		-32%	
Gross Pathology	No relevant effects							
Histopathology [f]								
Adrenals								
Zona fasciculata, atrophy	0	0	0	0	0	0	3	3
Zona reticularis, atrophy	0	0	0	0	0	0	2	3
Prostate								
Reduced in size	0		3		3		3	

*：新薬承認情報提供時に置き換えた

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

17.4 イヌ併用反復吸入投与毒性試験 （続き）

Doc. No.: U[redacted]-2354 (Continued)

Daily Achieved Dose (Tio+Olo+開発コードE*, µg/kg free moiety)		0 + 0 + 0 Vehicle Control		2.1 + 2.0 + 59	5.1 + 5.1 + 150	16 + 16 + 460	
Postdose Evaluation: Number Evaluated		M: 2	F: 2			M: 2	F: 2
Noteworthy Findings							
Rel. Body Weight (%)[b]	Day 46	106.7	109.4			100.7	110.6
Food Consumption	Day 46	No relevant effects					
Clinical Observations		No relevant effects					
Ophthalmology		No relevant effects					
Cardiovascular investigations		No relevant effects					
Haematology		No relevant effects					
Clinical Chemistry[d]	Day 35						
Cortisol (basal) (µg/dL)		1.71	2.46			2.09	1.83
Cortisol (after ACTH) (µg/dL)		12.99	17.65			8.73	13.67
Urinalysis		No relevant effect					
Organ Weights [g]		No relevant effects					
Adrenals		1108 mg	1471 mg			-33%	-28%
Prostate		2.33 g				-20%	
Gross Pathology		No relevant effects					
Histopathology [e]							
Adrenals							
Zona fasciculata, atrophy		0	0			1	0
Zona reticularis, atrophy		0	0			0	0
Prostate							
Reduced in size		0				1	

NC: not calculated -: no noteworthy findings +: mild ++: moderate

*: p<0.05

*：新薬承認情報提供時に置き換えた

a: mean on Day 24

b: relative to Day -1; t-test with pooled variances (two sided)

c: Day 22, immediately after exposure, mean male + female; t-test vs. control (absolute values)

d: pair-wise comparisons vs. control

e: at end of dosing period

f: number of affected animals

g: at end of recovery period