スインプロイク錠 0.2 mg

第 2 部 (モジュール 2) : CTD の概要 (サマリー)

2.6 非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.6 毒性試験の概要文

塩野義製薬株式会社

目次

略号及び用語定義一覧表 4
2.6.6 毒性試験の概要文 6
2.6.6.1 まとめ 6
2.6.6.2 単回投与毒性試験 11
2.6.6.2.1 ラット単回経口投与毒性試験 11
2.6.6.2.2 イヌ単回経口投与毒性試験 11
2.6.6.3 反復投与毒性試験 13
2.6.6.3.1 ラット 1 ヵ月反復経口投与毒性試験 13
2.6.6.3.1.1 用量設定根拠 13
2.6.6.3.1.2 試験方法及び成績 13
2.6.6.3.2 ラット 1 ヵ月反復経口投与毒性試験 (追加) 15
2.6.6.3.3 ラット 6 ヵ月反復経口投与毒性試験 16
2.6.6.3.3.1 用量設定根拠 16
2.6.6.3.3.2 試験方法及び成績 16
2.6.6.3.4 イヌ 1 ヵ月反復経口投与毒性試験 18
2.6.6.3.4.1 用量設定根拠 18
2.6.6.3.4.2 試験方法及び成績 18
2.6.6.3.5 イヌ 3 ヵ月反復経口投与毒性試験 20
2.6.6.3.5.1 用量設定根拠 20
2.6.6.3.5.2 試験方法及び成績 20
2.6.6.3.6 イヌ 9 ヵ月反復経口投与毒性試験 22
2.6.6.3.6.1 用量設定根拠 22
2.6.6.3.6.2 試験方法及び成績 22
2.6.6.4 遺伝毒性試験 25
2.6.6.4.1 細菌を用いる復帰突然変異試験 25
2.6.6.4.2 ほ乳類の培養細胞を用いる染色体異常試験 25
2.6.6.4.3 げっ歯類骨髄細胞を用いる小核試験 26
2.6.6.5 がん原性試験 27
2.6.6.5.1 マウスがん原性試験 27
2.6.6.5.1.1 用量設定根拠 27
2.6.6.5.1.2 試験方法及び成績 28
2.6.6.5.2 ラットがん原性試験 30
2.6.6.5.2.1 用量設定根拠 30
2.6.6.5.2.2 試験方法及び成績 30
2.6.6.6 生殖発生毒性試験 32
2.6.6.6.1 ラット受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験 32
2.6.6.6.1.1 用量設定根拠 32

2.6.6.6.1.2 試験方法及び成績 32
2.6.6.6.2 ラット胚・胎児発生に関する試験 33
2.6.6.6.2.1 用量設定根拠 33
2.6.6.6.2.2 試験方法及び成績 33
2.6.6.6.3 ウサギ胚・胎児発生に関する試験 34
2.6.6.6.3.1 用量設定根拠 34
2.6.6.6.3.2 試験方法及び成績 35
2.6.6.6.4 ラット出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験 36
2.6.6.6.4.1 用量設定根拠 36
2.6.6.6.4.2 試験方法及び成績 36
2.6.6.7 局所刺激性試験 38
2.6.6.7.1 ウサギ皮膚刺激性試験 38
2.6.6.7.2 ウサギ眼粘膜刺激性試験 38
2.6.6.8 その他の毒性試験 39
2.6.6.8.1 ラット免疫毒性試験 39
2.6.6.8.2 雌ラット性周期及び血漿中性ホルモン濃度への影響に関する予備試験 39
2.6.6.8.3 ラット血漿中プロラクチン濃度への影響 40
2.6.6.8.4 不純物の細菌を用いる復帰突然変異試験 40
2.6.6.8.5 ヘアレスマウス皮膚光毒性試験 42
2.6.6.8.6 ラット薬物弁別試験 43
2.6.6.8.6.1 用量設定根拠 43
2.6.6.8.6.2 試験方法及び成績 44
2.6.6.8.7 サル自己投与試験 45
2.6.6.8.7.1 用量設定根拠 45
2.6.6.8.7.2 試験方法及び成績 45
2.6.6.8.8 ラット身体依存性試験 46
2.6.6.8.8.1 用量設定根拠 46
2.6.6.8.8.2 試験方法及び成績 47
2.6.6.8.9 退薬症候の発現リスクの検討 49
2.6.6.8.9.1 モルヒネ依存マウスにおけるナルデメジントシル酸塩，メチルナルトレキソン及びナロキソンで誘発される退薬症候 49
2.6.6.8.9.2 モルヒネ依存ラットにおけるナルデメジントシル酸塩及びナロキソンで誘発される退薬症候 49
2.6.6.9 考察及び結論 51
2.6.6.10 図表 60
2.6.6.11 参考文献 61

2.6.6 略号及び用語定義一覧表

略号	用語定義
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)
*不純物G	[redacted]
*不純物K	[redacted]
*不純物L	[redacted]
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)
$AUC_{0\text{-}24hr}$	時間 0 から 24 時間までの濃度－時間曲線下面積 (area under the concentration-time curve from 0 to 24 hours)
$AUC_{0\text{-}inf}$	無限大時間までの濃度－時間曲線下面積 (area under the concentration-time curve from 0 to infinity)
$AUC_{0\text{-}\tau}$	台形法により算出した投与間隔 τ における血漿中濃度–時間曲線下面積 (area under the concentration-time curve from 0 to the time point of the dosing interval)
*不純物F	[redacted]
*不純物C	[redacted]
CHL/IU	チャイニーズハムスター肺由来 (Chinese hamster lung)
C_{24hr}	投与 24 時間後の血漿中濃度 (plasma concentration at 24 hours post-dose)
C_{max}	最高血漿中濃度 (maximum plasma concentration)
DMSO	ジメチルスルホキシド (dimethyl sulfoxide)
*不純物B	[redacted]
ED_{50}	50%有効量 (50% effective dose)
FSH	卵胞刺激ホルモン (follicule stimulating hormone)
GGT	γ-グルタミルトランスフェラーゼ (gamma-glutamyl transferase)
GLP	Good Laboratory Practice
HCT	ヘマトクリット値 (hematocrit)
HGB	ヘモグロビン濃度 (hemoglobin concentration)
I.A.O.I.	急性眼粘膜刺激性指数 (index of acute ocular index)
*不純物A	[redacted]
LH	黄体形成ホルモン (luteinizing hormone)
MC	メチルセルロース (methylcellulose)
*不純物D	[redacted]
*不純物E	[redacted]
*不純物I	[redacted]

＊新薬承認情報提供時に置き換え

*不純物H	[redacted]
*不純物J	[redacted]
PT	プロトロンビン時間 (prothrombin time)
RBC	赤血球 (red blood cell)
S9 mix	代謝活性化系 (metabolic activation system)
TK	トキシコキネティクス (toxicokineitcs)
T_{max}	最高血漿中濃度到達時間 (time to maximum plasma concentration)
UV	紫外線 (ultraviolet)
ナルデメジン 3-G	ナルデメジン 3-*O*-β-D-グルクロナイド (naldemedine 3-*O*-β-D-glucuronide)
ナルデメジン 6-G	ナルデメジン 6-*O*-β-D-グルクロナイド (naldemedine 6-*O*-β-D-glucuronide)

＊新薬承認情報提供時に置き換え

2.6.6 毒性試験の概要文

2.6.6.1 まとめ

実施したナルデメジントシル酸塩の毒性試験のうち，重要な試験の一覧を表 2.6.6.1-1 に示す．毒性試験の概要文では，特に明記しない限り，試験は Good Laboratory Practice (GLP) 適用下で実施し，ナルデメジントシル酸塩の投与量はナルデメジン (フリー体) の量を示す．

表 2.6.6.1-1 重要なナルデメジントシル酸塩の毒性試験一覧

試験の種類及び期間	動物種等	投与 (処置) 経路	GLP 適用
単回投与毒性試験	ラット，イヌ	経口	適
反復投与毒性試験			
1 ヵ月	ラット，イヌ	経口	適
1 ヵ月 (追加)	ラット	経口	適
3 ヵ月	イヌ	経口	適
6 ヵ月	ラット	経口	適
9 ヵ月	イヌ	経口	適
遺伝毒性試験			
細菌を用いる復帰突然変異試験	ネズミチフス菌，大腸菌	*In vitro*	適
ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験	チャイニーズハムスター肺由来培養細胞	*In vitro*	適
げっ歯類を用いる小核試験	ラット	経口	適
がん原性試験			
104 週	マウス，ラット	経口	適
生殖発生毒性試験			
受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験	ラット	経口	適
胚・胎児発生に関する試験	ラット，ウサギ	経口	適
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	ラット	経口	適
局所刺激性試験			
皮膚刺激性試験	ウサギ	皮膚局所	非適
眼粘膜刺激性試験	ウサギ	眼局所	非適
その他の毒性試験			
免疫毒性試験	ラット	経口	適
性周期及び血漿中生殖ホルモン濃度への影響に関する予備試験	ラット	経口	非適
血漿中プロラクチン濃度への影響に関する単回経口投与試験	ラット	経口	非適
不純物の細菌を用いる復帰突然変異試験	ネズミチフス菌，大腸菌	経口	適/非適
皮膚光毒性試験	マウス	経口	適
薬物弁別試験	ラット	経口	適
自己投与試験	サル	静脈内	適
身体依存性試験	ラット	経口	適
退薬症候の発現リスクの検討	マウス，ラット	経口	非適

単回投与毒性試験

ラット単回経口投与毒性試験 (投与量：500 及び 2000 mg/kg) では，投与翌日に 500 mg/kg 投与群の雄及び 2000 mg/kg 投与群の雌雄で体重増加抑制が認められたが，観察期間を通して死亡又は顕著な毒性所見は認められず，概略の致死量は 2000 mg/kg を超える量と判断した．

イヌ単回経口投与毒性試験 (投与量：200 及び 1000 mg/kg) では，200 及び 1000 mg/kg 投与群の雌雄で，投与日又は投与翌日に，用量増加に伴った嘔吐/吐物の頻度増加，わずかな体重減少あるいはアルカリフォスファターゼ (ALP) 活性の上昇及び総ビリルビン値の増加が認められたが，14 日間の観察期間中にこれらの変化は軽減又は消失した．観察期間を通して死亡は認められず，概略の致死量は 1000 mg/kg を超える量と判断した．

反復投与毒性試験

ラット 1 ヵ月反復経口投与毒性試験 (投与量：30，100 及び 1000 mg/kg/日) では，ナルデメジントシル酸塩全投与群の雌雄で，摂餌量低下と一時的な体重減少又は体重増加抑制が認められた．ナルデメジントシル酸塩全投与群の雌では，性周期 (発情休止期) の延長が認められたが，ほとんどの動物で投与期間中に性周期が回復した．卵巣，子宮及び乳腺などの性ホルモンに関連する臓器に病理組織学的変化は認められなかった．上記所見は毒性学的意義が低い変化であることから，無毒性量は 1000 mg/kg/日と判断した．性周期の延長に関する無影響量を求めるために，雌ラットを用いた低用量での 1 ヵ月反復経口投与による追加試験 (投与量：0.3，1，3 及び 10 mg/kg/日) を実施した．その結果，全投与群で性周期異常が発現し，その頻度に明らかな用量相関性が認められず，無影響量は求められなかった．

ラット 6 ヵ月反復経口投与毒性試験 (投与量：10，100 及び 1000 mg/kg/日) では，1000 mg/kg/日投与群の雌雄で，持続的な体重の低値が認められた．この変化は 4 週間の休薬期間中に回復性を示した．無毒性量は 100 mg/kg/日と判断した．

イヌ 1 ヵ月反復経口投与毒性試験 (投与量：1，3，10 及び 50 mg/kg/日) では，50 mg/kg/日投与群の雌雄で，嘔吐/吐物の発現頻度増加，アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT) 及び ALP 活性の上昇並びに肝細胞の単細胞壊死が認められた．これらの変化は 4 週間の休薬期間中に回復性を示した．無毒性量は 10 mg/kg/日と判断した．

イヌ 3 ヵ月反復経口投与毒性試験 (投与量：1，5 及び 30 mg/kg/日) では，30 mg/kg/日投与群の雌雄で，嘔吐/吐物の発現頻度増加，ALT，γ-グルタミルトランスフェラーゼ (GGT) 及び ALP 活性のわずかな上昇並びに総コレステロール値のわずかな増加，軽度な肝細胞の単細胞壊死及び脂肪組織の萎縮が認められた．これらの変化は 4 週間の休薬期間中に回復性を示した．無毒性量は 5 mg/kg/日と判断した．

イヌ 9 ヵ月反復経口投与毒性試験 (投与量：1，4 及び 20 mg/kg/日) では，20 mg/kg/日投与群の雌雄で，ALT，GGT 及び ALP 活性の軽度上昇，総コレステロール値及びリン脂質の軽度増加並びに軽度の肝細胞の単細胞壊死が認められた．これらの変化は 4 週間の休薬期間中に回復性を示した．無毒性量は 4 mg/kg/日と判断した．

遺伝毒性試験

細菌を用いる復帰突然変異試験，チャイニーズハムスター培養細胞を用いた染色体異常試験及びラット骨髄細胞を用いた *in vivo* 小核試験において，ナルデメジントシル酸塩の遺伝毒性は認められなかった．

がん原性試験

マウス及びラットにナルデメジントシル酸塩を 104 週間反復経口投与したがん原性試験 (投与量：10，30 及び 100 mg/kg) では，ナルデメジントシル酸塩投与に起因する腫瘍性病変及び非腫瘍性病変の増加は認められず，がん原性は認められなかった．

生殖発生毒性試験

ラット受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験 (投与量：1，10，100 及び 1000 mg/kg/日) では，10 mg/kg/日以上の投与群の雄及び 1000 mg/kg/日投与群の雌で，体重及び摂餌量の低値が認められた．また，雌における性周期異常は，1 mg/kg/日投与群ではみられなかったが，10 mg/kg/日以上の投与群でみられ，交配前又は交配期間中に回復した．交配所要日数，雌雄の交尾能及び受胎能，並びに初期胚の発生に，ナルデメジントシル酸塩投与による影響は認められなかった．無毒性量は，雄及び雌の親動物の一般毒性に関してそれぞれ 1 及び 100 mg/kg/日，雄及び雌の親動物の生殖能に関してそれぞれ 1000 及び 1 mg/kg/日，胚の発生毒性に関して 1000 mg/kg/日と判断した．

ラット胚・胎児発生に関する試験 (投与量：10，100 及び 1000 mg/kg/日) では，ナルデメジントシル酸塩全投与群の母動物で，体重及び摂餌量の低下が認められた．母体の妊娠維持に投与の影響は認められなかった．胚・胎児の生存性，子宮内発育，生存胎児の外表，内臓及び骨格の形態に，ナルデメジントシル酸塩投与による影響は認められなかった．無毒性量は，母動物の一般毒性に関して 10 mg/kg/日未満，母動物の生殖能及び胚・胎児の発生に関して 1000 mg/kg/日と判断した．

ウサギ胚・胎児発生に関する試験 (投与量：25，100 及び 400 mg/kg/日) では，ナルデメジントシル酸塩全投与群の母動物で，体重及び摂餌量の低下が認められた．また，400 mg/kg/日投与群では，顕著な摂餌量の低下とそれに伴う体重減少並びに糞量の減少がみられ，2 例で流産及び 1 例で早産がみられた．さらに，この群では胎児体重及び胎盤重量の低値も認められた．胚・胎児の生存性，生存胎児の外表，内臓及び骨格の形態に，ナルデメジントシル酸塩投与の影響は認められなかった．無毒性量は，母動物の一般毒性に関して 25 mg/kg/日未満，母体の生殖能並びに胚・胎児の発生に関して 100 mg/kg/日と判断した．

ラット出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験 (投与量：1，30 及び 1000 mg/kg/日) では，1000 mg/kg/日投与群で，妊娠 22 日に 1 例の母動物の死亡がみられ，30 及び 1000 mg/kg/日投与群で，哺育初日から哺育 4 日までに全児死亡がそれぞれ 5 及び 3 例の母動物でみられた．また，30 mg/kg/日以上の投与群で，母動物の体重増加量抑制，摂餌量の低下及び哺育不良が認められた．F_1 出生児では，30 mg/kg/日以上の投与群で死産児数の増加と出生率及び生後 4 日生存率の低下が，1000 mg/kg/日投与群で離乳前の低体重及び耳介展開の遅れが認め

られた．出生児の離乳後の体重，次世代の反射・発育機能，感覚機能，オープンフィールドテスト，条件回避反応，性成熟，性周期，交尾能，受胎能，及び剖検所見並びに F_2 胚の生存性に，ナルデメジントシル酸塩投与の影響は認められなかった．無毒性量は，母動物の一般毒性及び生殖能並びに次世代の発生に関して 1 mg/kg/日と判断した．

局所刺激性試験

ウサギ皮膚刺激性試験では，皮膚刺激性を示さなかった．また，ウサギ眼粘膜刺激性試験では，軽度の刺激性を示したが，その作用は洗眼により減弱した．

その他の毒性試験

ラット免疫毒性試験 (投与量：30，100 及び 1000 mg/kg/日) では，T 細胞依存性抗体産生能にナルデメジントシル酸塩の影響は認められなかった．

反復投与毒性試験で認められた性周期異常の原因を精査するために，ナルデメジントシル酸塩 (投与量：1000 mg/kg/日) を雌ラットに投与して生殖ホルモン変動に及ぼす影響を調べた．ナルデメジントシル酸塩反復経口投与により，性周期異常，プロラクチン濃度の顕著な上昇及びプロゲステロン濃度の上昇が認められた．黄体形成ホルモン，卵胞刺激ホルモン及びエストラジオール濃度にナルデメジントシル酸塩投与の影響は認められなかった．また，ナルデメジントシル酸塩 (投与量：1，10，100 及び 1000 mg/kg) が雌雄ラット血漿中プロラクチン濃度に与える影響を調べた．ナルデメジントシル酸塩単回経口投与により，10 mg/kg 以上の雌で明らかな血漿中プロラクチン濃度の上昇が認められた．全投与群の雄及び 1 mg/kg 投与群の雌では，プロラクチンの変動は認められなかった．

ナルデメジントシル酸塩原薬の製造工程中で生じる可能性がある潜在的不純物の変異原性を評価する目的で，復帰突然変異誘発試験を実施した．*不純物
Dは，陽性であったが，その他の不純物である
*不純物K，*不純物G，
*不純物L，*不純物F，*不純物C，
*不純物B，*不純物A，
*不純物E，*不純物I，
*不純物H 及び *不純物J
は，陰性であった．以上の結果から，*不純物D は，ICH M7 ガイドライン [1] に従い，
製造工程において許容限度値以下で管理する対象とした．

ヘアレスマウス皮膚光毒性試験 (投与量：30 及び 300 mg/kg/日) で，ナルデメジントシル酸塩投与による光毒性は認められなかった．

ナルデメジントシル酸塩の依存性を評価する目的で，薬物弁別試験，自己投与試験及び身体

依存性試験を実施した．ナルデメジントシル酸塩は，ラットにおける 0.03，0.1 及び 0.3 mg/kg の経口投与でモルヒネ様弁別刺激効果を示さず，サルにおける 1，3 及び 10 μg/kg/注入の静脈内自己投与で強化効果を示さなかった．また，ナルデメジントシル酸塩は，ラットにおける 60 及び 200 mg/kg/日の 1 日 2 回 28 日間反復経口投与後 7 日間の休薬期間において退薬症候を発現させず，身体依存形成能を示さなかった．

モルヒネ依存マウス及びラットを用いた退薬症候の発現リスクの検討も実施した．モルヒネ依存マウスにおいて，ナルデメジントシル酸塩の単回経口投与により，1 及び 10 mg/kg で末梢性退薬症候の指標である下痢発現頻度 (下痢症状を発現する個体) の増加が認められたものの，10 mg/kg までの用量で中枢性退薬症候の指標である跳躍行動は認められなかった．モルヒネ依存ラットにおいて，ナルデメジントシル酸塩の単回経口投与により，末梢性退薬症候の指標である下痢スコアの増加及び体重減少が，それぞれ 1 mg/kg 以上及び 0.3 mg/kg 以上で認められた．一方，3 mg/kg までの用量で，中枢性退薬症候の指標である跳躍行動及び身震い行動の誘発は認められなかったが，3 mg/kg の用量で歯をカタカタ鳴らす行動が認められた．

2.6.6.2 単回投与毒性試験

2.6.6.2.1 ラット単回経口投与毒性試験

評価資料 4.2.3.1-01
概要表 2.6.7.5

Sprague-Dawley 系ラット (各群雌雄各 5 例) にナルデメジントシル酸塩を 0 (対照群), 500 及び 2000 mg/kg の用量で単回経口投与し，急性毒性を評価した．対照群には媒体 [0.5 w/v%メチルセルロース (MC) 水溶液] を投与した. また, ナルデメジンのトキシコキネティクス (TK) 評価のため，主群とは別のラット (各群雌雄各 4 例) に主群と同じ条件で投与した．試験では，一般状態，体重，肉眼検査及び TK を評価した．肉眼検査は，14 日間の観察期間の終了時に，すべての動物について実施した．投与後 0.5，1，2，4，8 及び 24 時間に採取した血漿試料を用い，血漿中ナルデメジン濃度を測定した．

観察期間中に死亡は発生しなかった．一般状態観察では，2000 mg/kg 投与群の全例で，投与日及び/又は翌日に被験物質様物を含んだ便が観察された．投与翌日に 500 mg/kg 投与群の雄と 2000 mg/kg 投与群の雌雄で，対照群と比較して体重増加抑制が認められたが，これらの動物の体重は，その後対照群と同等レベルに回復した．肉眼検査では，いずれの動物にも病変は認められなかった．血漿中ナルデメジンの曝露量 [最高濃度 (C_{max}) 及び時間 0 から 24 時間までの濃度－時間曲線下面積 ($AUC_{0\text{-}24hr}$)] は，500 及び 2000 mg/kg 投与群の間で，用量比以下で増大した (表 2.6.6.2-1)．TK パラメータに明らかな性差は認められなかった．

以上の結果から，ラット単回経口投与毒性試験での概略の致死量は 2000 mg/kg を超える量と判断した．

表 2.6.6.2-1 ラット単回経口投与毒性試験における TK パラメータ

測定物質	TK パラメータ	投与量 (mg/kg)			
		雄		雌	
		500	2000	500	2000
ナルデメジン	C_{max} (μg/mL)	25.33	38.50	26.83	33.78
	$AUC_{0\text{-}24hr}$ (μg·hr/mL)	86.19	193.44	104.26	201.47

数値は平均値を示す (n = 4).

2.6.6.2.2 イヌ単回経口投与毒性試験

評価資料 4.2.3.1-02
概要表 2.6.7.5

ビーグルイヌ (各群雌雄各 1 例) にナルデメジントシル酸塩を 0 (対照群), 200 及び 1000 mg/kg の用量で単回経口投与し，急性毒性を評価した．対照群には媒体 (0.5 w/v% MC 水溶液) を投与した．試験では，一般状態，体重，摂餌量，血液学的検査，血液化学的検査及び TK を評価した．投与後 0.25，0.5，1，2，4，7 及び 24 時間に採取した血漿試料を用い，血漿中ナルデメジン濃度を測定した．

観察期間中に死亡は発生しなかった．一般状態観察では，200 及び 1000 mg/kg 投与群の全例

で，嘔吐あるいは吐物，それに続く流涎が投与直後より認められ，1000 mg/kg 投与群の雄でより高頻度であった．これらの変化は，1000 mg/kg 投与群の雄で吐物が投与後 7 時間まで認められた以外は，投与後 2 時間以降観察されなかった．他の例に比べより強い嘔吐が発現した 1000 mg/kg 投与群の雄では，投与翌日にわずかな体重減少が認められた．投与翌日において，1000 mg/kg 投与群の雌雄で，被験物質様物を含んだ便が認められたが，それ以降は，ナルデメジントシル酸塩投与に起因した所見は認められなかった．血液化学的検査において，200 及び 1000 mg/kg 投与群の全例で，ALP 活性の用量依存的な上昇が投与翌日に認められ，一部の例では総ビリルビンの高値を伴っていたことから，肝胆道系への影響が示唆されたが，これらの変化は 14 日間の観察期間終了時に軽減又は消失した．摂餌量及び血液学的検査に，ナルデメジントシル酸塩に起因した変化は認められなかった．

血漿中ナルデメジンの曝露量 (C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24hr}$) は，200 から 1000 mg/kg まで，用量比以下で増大した (表 2.6.6.2-2)．TK パラメータに明らかな性差は認められなかった．

以上の結果から，イヌ単回経口投与毒性試験での概略の致死量は 1000 mg/kg を超える量と判断した．

表 2.6.6.2-2 イヌ単回経口投与毒性試験における TK パラメータ

測定物質	TK パラメータ	投与量 (mg/kg)			
		雄		雌	
		200	1000	200	1000
ナルデメジン	C_{max} (μg/mL)	40.70	62.30	52.20	73.70
	$AUC_{0\text{-}24hr}$ (μg·hr/mL)	194.37	244.18	248.33	663.11

数値は個別値 (n = 1) を示す．

2.6.6.3 反復投与毒性試験

2.6.6.3.1 ラット 1 ヵ月反復経口投与毒性試験

評価資料 4.2.3.2-01
参考資料 4.2.3.2-07
概要表 2.6.7.6，2.6.7.7.1

2.6.6.3.1.1 用量設定根拠

概要表 2.6.7.6 に示すように，Sprague-Dawley 系ラット (各群雌雄各 4 例) にナルデメジントシル酸塩を 0 (対照群)，8，40，200 及び 1000 mg/kg/日の用量で，1 日 1 回 2 週間反復経口投与し，毒性を評価した．対照群には媒体 (0.5 w/v% MC 水溶液) を投与した．本試験は GLP 非適用下で実施した．

投与開始から剖検日まで，死亡は発生しなかった．投与初期に，200 及び 1000 mg/kg/日投与群の雄で，摂餌量の減少を伴う軽度の体重減少が認められた．また，1000 mg/kg/日投与群の雄で，投与期間を通じて対照群と比較して軽度な体重の低値が認められた．ナルデメジントシル酸塩全投与群の雌では，投与初期に摂餌量の減少が認められたが，明らかな体重の変化は認められなかった．さらに，200 mg/kg/日投与群の雌 1 例及び 1000 mg/kg/日投与群の雌 3 例で，膣上皮の粘液分泌及び乳腺の発達が認められたが，卵巣に影響は認められなかった．

以上の結果から，体重及び生殖器への影響について，長期投与による変化を確認するため，高用量として 1000 mg/kg/日を設定した. また, 用量反応関係を確認するため, 100 及び 30 mg/kg/日を設定した．

2.6.6.3.1.2 試験方法及び成績

Sprague-Dawley 系ラット (各群雌雄各 10 例) にナルデメジントシル酸塩を 0 (対照群)，30，100 及び 1000 mg/kg/日の用量で，1 日 1 回 1 ヵ月間反復経口投与し，毒性を評価した．対照群には媒体 (0.5 w/v% MC 水溶液) を投与した．また，対照群及び 1000 mg/kg/日投与群には，1 ヵ月間の休薬による回復性試験群 (各群雌雄各 5 例) を設け，毒性の回復性を検討した．さらに，ナルデメジン及びその代謝物 [nor-ナルデメジン，ナルデメジン 3-*O*-β-D-グルクロナイド (ナルデメジン 3-G) 及びナルデメジン 6-*O*-β-D-グルクロナイド (ナルデメジン 6-G)] の TK 評価のため, 別のラットに (各群雌雄各 4 例) を主群と同じ条件で投与した. 試験では, 一般状態, 体重，摂餌量，眼科学的検査，尿検査，血液学及び血液化学的検査，器官重量，肉眼検査，病理組織学的検査並びに TK を評価した．また，投与 1 及び 30 日目の投与前 (投与 1 日目を除く) 並びに投与後 0.5，1，2，4，8 及び 24 時間に採取した血漿試料を用い，血漿中ナルデメジン及び上記代謝物濃度を測定した．

投与開始から剖検日まで，死亡及び切迫殺例は発生しなかった．ナルデメジントシル酸塩全投与群の雌雄で，投与 2 日目に軽度～重度の摂餌量低下が用量依存的に認められ，ナルデメジントシル酸塩全投与群の雄では，投与期間を通してわずかな摂餌量低下が継続した．雌では，投与 7 日目以降，摂餌量の明らかな変化は認められなかった．ナルデメジントシル酸塩全投与群の雌雄で，投与 2 日目に摂餌量の低下に伴い，わずかな体重減少 (対照群と比較し，30，100 及び 1000 mg/kg/日投与群の雄では，それぞれ −4%，−7%及び −11%，雌では，それぞれ −3%，

−5%及び −7%) が観察された．投与 4 日目以降，体重は増加に転じたが，投与期間を通じて，ナルデメジントシル酸塩全投与群の雄の平均体重は対照群よりも低値であった．雌の体重は，投与 7 日目以降，対照群と同程度であった．これらの結果から，体重変化は摂餌量の減少に伴う二次的な変化であると考えられる．ただし，投与 31 日目における 30，100 及び 1000 mg/kg/日投与群の雄の最終体重と対照群との差もわずかながら認められた (対照群と比較し，それぞれ −5%，−10%及び −9%) が，いずれの検査項目においても，体重変化の原因となるような変化は認められなかったことから，体重の減少は毒性学的な意義に乏しい所見と判断した．

ナルデメジントシル酸塩全投与群の雌で，性周期異常 (発情休止期の延長，最大で発情休止期が 18 日間継続) が認められた．しかしながら，ほとんどの例で性周期は投与期間中に回復し，病理組織学的検査で，卵巣，子宮及び乳腺などの機能的に性ホルモンが関連する諸器官に異常は認められなかった．この変化はナルデメジントシル酸塩による軽度の影響ではあるが，性ホルモンに関連する組織に病理組織学的変化を伴わなかったことから，毒性学的に意義のある変化ではないと判断した．

その他，1000 mg/kg/日投与群の雌雄で投与直前及び投与後に一時的な流涎，1000 mg/kg/日投与群の雄又は雌で血液化学的検査値及び腎臓の病理組織学的変化を伴わない尿検査値の変化 (尿量減少，比重や尿蛋白の増加)，1000 mg/kg/日投与群の雄及び/又は雌で病理組織学的変化を伴わない肝臓及び/又は下垂体重量の増加，又は肉眼検査での盲腸拡張，100 及び 1000 mg/kg/日投与群の雄で摂餌量低下の二次的な変化と考えられるトリグリセリド値の減少が認められたが，これらに毒性学的な意義はないと判断した．

眼科学的検査，血液学的検査及び病理組織学的検査で，ナルデメジントシル酸塩起因性の変化は認められなかった．

ナルデメジンの TK 解析では，血漿中 $AUC_{0\text{-}24hr}$ は 30 及び 1000 mg/kg/日投与群の間で，おおむね用量に比例して増大した．血漿中 C_{max} は 30 及び 100 mg/kg/日投与群間でのみ，用量に比例して増大し，100 及び 1000 mg/kg/日投与群の間では，用量比以下で増大した (表 2.6.6.3-1)．また，明らかな性差及び反復投与による影響は認められなかった．さらに，nor-ナルデメジン，ナルデメジン 3-G 及びナルデメジン 6-G も検出され，投与 30 日目の 1000 mg/kg/日投与群における血漿中 $AUC_{0\text{-}24hr}$ のナルデメジンに対する割合は，それぞれ 5%未満，20%～60%及び 1%未満であった．

本試験では，いくつかのナルデメジントシル酸塩に起因した変化が認められたものの，毒性学的意義のある変化は認められなかった．以上の結果から，ラット 1 ヵ月反復経口投与毒性試験における無毒性量は 1000 mg/kg/日であると判断した．

表 2.6.6.3-1　ラット 1 ヵ月反復経口投与毒性試験における TK パラメータ

測定物質	TK パラメータ	投与日	投与量 (mg/kg/日)					
			雄			雌		
			30	100	1000	30	100	1000
ナルデメジン	C_{max} (μg/mL)	1	3.17	10.78	32.03	3.73	12.85	28.20
		30	3.71	12.53	48.68	4.26	10.58	42.38
	$AUC_{0\text{-}24hr}$ (μg·hr/mL)	1	7.84	36.27	281.18	9.22	41.97	204.14
		30	11.32	61.79	524.43	10.60	36.44	286.63
Nor-ナルデメジン	C_{max} (μg/mL)	1	0.19	0.49	1.64	0.07	0.26	0.45
		30	0.25	0.63	1.27	0.09	0.18	0.44
	$AUC_{0\text{-}24hr}$ (μg·hr/mL)	1	0.51	1.85	12.40	0.10	0.69	2.62
		30	0.78	3.27	12.59	0.17	0.57	2.49
ナルデメジン 3-G	C_{max} (μg/mL)	1	0.37	1.16	6.01	0.30	0.91	3.78
		30	0.12	1.35	29.85	0.21	0.75	12.54
	$AUC_{0\text{-}24hr}$ (μg·hr/mL)	1	0.66	3.94	44.25	0.49	2.64	21.28
		30	0.29	6.49	281.79	0.37	2.13	70.64
ナルデメジン 6-G	C_{max} (μg/mL)	1	0.024	0.061	0.171	0.010	0.031	0.132
		30	0.018	0.061	0.569	0.011	0.021	0.289
	$AUC_{0\text{-}24hr}$ (μg·hr/mL)	1	0.027	0.149	1.077	0.009	0.058	0.721
		30	0.032	0.285	5.773	0.013	0.056	1.816

数値は平均値を示す (n = 3).

2.6.6.3.2 ラット 1 ヵ月反復経口投与毒性試験 (追加)

評価資料 4.2.3.2-02
概要表 2.6.7.7.2

ラット 1 ヵ月反復経口投与毒性試験 [2.6.6.3.1.2 項参照] で認められた性周期異常に関する無影響量を求めるため，Sprague-Dawley 系ラット (各群雌 10 例) にナルデメジントシル酸塩を 0 (対照群)，0.3，1，3 及び 10 mg/kg/日の用量で，1 日 1 回 1 ヵ月間反復経口投与し，性周期を評価した．対照群には媒体 (0.5 w/v% MC 水溶液) を投与した．また，ナルデメジン及びその代謝物 (nor-ナルデメジン，ナルデメジン 3-G 及びナルデメジン 6-G) の TK 評価のため，別のラット (各群雌 4 例) に性周期評価群と同じ条件で投与した．さらに，前述した 1 ヵ月反復経口投与毒性試験と同じ条件で，血漿中ナルデメジン及び上記代謝物濃度を測定した．

全群で性周期異常 (発情間期の延長，最大 18 日間) の発生が認められた．しかしながら，性周期異常の発現は，対照群，0.3，1，3 及び 10 mg/kg/日投与群で，それぞれ 1/10 例，3/10 例，1/10 例，4/10 例及び 3/10 例と低頻度であり，用量に相関した増加は認められなかった．

ナルデメジンの TK 解析では，0.3 mg/kg/日投与群では定量限界 (0.02 μg/mL) 未満であったが，血漿中曝露量 (C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24hr}$) は，投与 1 及び 30 日目の 1～10 mg/kg/日投与群の間で，用量にほぼ比例して増大 (表 2.6.6.3-2) した．また，10 mg/kg/日投与群において，nor-ナルデメジンが投与 30 日目に，ナルデメジン 3-G 及びナルデメジン 6-G が投与 1 及び 30 日目に，それぞれ検出された．

本追加試験において，ナルデメジントシル酸塩による性周期異常は，用量反応関係がなく，

投与期間中持続していなかったことから，弱い変化であると考えられるが，性周期異常についての無影響量を求めることはできなかった.

表 2.6.6.3-2 ラット 1 ヵ月反復経口投与毒性試験 (追加) における TK パラメータ

測定物質	TK パラメータ	投与日	投与量 (mg/kg/日)			
			雌			
			0.3	1	3	10
ナルデメジン	C_{max} (μg/mL)	1	N.C.	0.05	0.17	0.74
		30	N.C.	0.10	0.46	1.91
	$AUC_{0\text{-}24hr}$ (μg·hr/mL)	1	N.C.	0.10	0.54	2.28
		30	N.C.	0.20	0.87	3.04
Nor-ナルデメジン	C_{max} (μg/mL)	1	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.
		30	N.C.	N.C.	N.C.	0.03
	$AUC_{0\text{-}24hr}$ (μg·hr/mL)	1	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.
		30	N.C.	N.C.	N.C.	0.03
ナルデメジン 3-G	C_{max} (μg/mL)	1	N.C.	N.C.	N.C.	0.10
		30	N.C.	N.C.	N.C.	0.09
	$AUC_{0\text{-}24hr}$ (μg·hr/mL)	1	N.C.	N.C.	N.C.	0.25
		30	N.C.	N.C.	N.C.	0.08
ナルデメジン 6-G	C_{max} (μg/mL)	1	N.C.	N.C.	N.C.	0.004
		30	N.C.	N.C.	N.C.	0.006
	$AUC_{0\text{-}24hr}$ (μg·hr/mL)	1	N.C.	N.C.	N.C.	0.004
		30	N.C.	N.C.	N.C.	0.004

数値は平均値を示す (n = 4). N.C.：定量限界未満 (< 0.02 μg/mL) のため算出せず.

2.6.6.3.3 ラット 6 ヵ月反復経口投与毒性試験

評価資料 4.2.3.2-03
概要表 2.6.7.7.3

2.6.6.3.3.1 用量設定根拠

ラット 1 ヵ月反復経口投与毒性試験 [2.6.6.3.1.2 項参照] では，いずれの投与群においても毒性所見は認められなかったことから，6 ヵ月反復経口投与毒性試験では，高用量として，技術的限界量である 1000 mg/kg/日を設定した．また，用量反応関係を確認するため，100 及び 10 mg/kg/日を設定した.

2.6.6.3.3.2 試験方法及び成績

Sprague-Dawley 系ラット(各群雌雄各 12 例) にナルデメジントシル酸塩を 0 (対照群), 10, 100 及び 1000 mg/kg/日の用量で，1 日 1 回 6 ヵ月間反復経口投与し，毒性を評価した．対照群には媒体 (0.5 w/v% MC 水溶液) を投与した．また，対照群及び 1000 mg/kg/日投与群には，1 ヵ月間の休薬による回復性試験群 (各群雌雄各 6 例) を設け，毒性の回復性を検討した．さらに，ナルデメジンの TK 評価のため，別のラット (各群雌雄各 6 例) に主群と同じ条件で投与した．一般状態，体重，摂餌量，眼科学的検査，尿検査，血液学及び血液化学的検査，器官重量，肉眼検

査，病理組織学的検査並びに TK を評価した．また，投与 1，91 及び 182 日目の投与前 (投与 1 日目を除く) 並びに投与後 0.5，1，2，4，8 及び 24 時間に採取した血漿試料を用い，血漿中ナルデメジン濃度を測定した．

投与開始から剖検日まで死亡及び切迫殺例は発生しなかった．体重では，1000 mg/kg/日投与群の雄は投与 7 日目から，雌は 35 日目から，それぞれ投与終了まで，対照群と比較して低値を示した．投与終了時における体重は，1000 mg/kg/日群の雄及び雌で，対照群よりそれぞれ 11%及び 13%低い値を示した．

ナルデメジントシル酸塩全投与群の雌雄で，投与 7 日及び/又は 14 日目に摂餌量低下が認められた．体重の低値は投与期間終了まで認められたが，摂餌量低下は投与初期の限られた期間のみ観察された．

血液学的検査では，投与期間終了時に，100 及び 1000 mg/kg/日投与群の雄で，プロトロンビン時間 (PT) の延長が，1000 mg/kg/日投与群の雄で，活性化部分トロンボプラスチン時間 (APTT) のわずかな延長が認められるとともに，フィブリノゲン濃度が上昇した．また，1000 mg/kg/日投与群の雌で，赤血球数 (RBC)・ヘモグロビン濃度 (HGB)・ヘマトクリット値 (HCT) が低下した．しかしながら，これら血液学的検査値の変化は，その変化の程度がわずかで，施設背景データ値の範囲内であること，血液学的検査値又は病理組織学的検査においても明らかな変化はないことから，毒性学的に意義はないと判断した．

血液化学的検査では，投与期間終了時に，1000 mg/kg/日投与群の雌雄で，総コレステロール値が増加し，同群の雌で，アミラーゼ及びリン脂質の濃度が上昇した．しかしながら，膵臓及び肝臓等の関連臓器での病理組織学的変化を伴わないことから，これらの増加は，毒性学的に意義はないと判断した．

器官重量では，100 mg/kg/日投与群の雌及び 1000 mg/kg/日投与群の雌雄で，胸腺の絶対重量及び相対重量が減少した．しかしながら，病理組織学的変化を伴わないことから，毒性学的に意義はないと判断した．

投与期間中に，眼科学的検査，尿検査，肉眼検査及び病理組織学的検査で，ナルデメジントシル酸塩に起因する変化は認められなかった．

ナルデメジンの TK 解析では，血漿中曝露量 (C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24hr}$) は，投与 1，91 及び 182 日目の 10～1000 mg/kg/日投与群の間で，用量の増加に伴い増大したが，用量比以下の増大であった (表 2.6.6.3-3)．また，血漿中曝露量に明らかな性差は認められなかった (2 倍以内)．さらに，反復投与による影響として，投与 182 日目における血漿中ナルデメジンの曝露量は，投与 1 日目より高い傾向を示したが，投与 91 日目と同等であった．

休薬期間では，1000 mg/kg/日投与群の体重増加抑制は回復傾向がみられた．また，1000 mg/kg/日投与群の雌で，胸腺の絶対重量及び相対重量が減少傾向を示したが，病理組織学的変化を伴わないことから，毒性学的に意義はないと判断した．その他の毒性所見は，認められなかった．

本試験では，1000 mg/kg/日投与群の雌雄で，体重増加抑制が投与期間中に継続して認められ，休薬期間中に回復傾向を示した．以上の結果から，ラット 6 ヵ月反復経口投与毒性試験における無毒性量は 100 mg/kg/日であると判断した．

表 2.6.6.3-3 ラット 6 ヵ月反復経口投与毒性試験における TK パラメータ

測定物質	TK パラメータ	投与日	投与量 (mg/kg/日)					
			雄			雌		
			10	100	1000	10	100	1000
ナルデメジン	C_{max} (μg/mL)	1	0.761	8.33	25.3	0.988	10.1	22.7
		91	2.03	12.5	43.7	3.53	20.1	48.8
		182	1.93	10.2	31.0	2.71	18.7	47.8
	AUC_{0-24hr} (μg·hr/mL)	1	3.43	35.9	288	2.26	23.8	145
		91	6.56	95.9	561	6.91	58.4	513
		182	6.51	67.9	420	7.36	61.5	453

数値は平均値を示す (n = 4).

2.6.6.3.4 イヌ 1 ヵ月反復経口投与毒性試験

評価資料 4.2.3.2-04
参考資料 4.2.3.2-08
概要表 2.6.7.6，2.6.7.7.4

2.6.6.3.4.1 用量設定根拠

概要表 2.6.7.6 に示すように, ビーグルイヌ (各群雌雄各 1 例) にナルデメジントシル酸塩を 0 (対照群)，3，10 及び 100 mg/kg/日の用量で，1 日 1 回 2 週間反復経口投与し，毒性を評価した．対照群には媒体 (0.5 w/v% MC 水溶液) を投与した．本試験は GLP 非適用下で実施した．

投与開始から剖検日まで，死亡は発生しなかった．嘔吐又は吐物が，100 mg/kg/日投与群で認められ，肝毒性 (ALT 活性の上昇，肝細胞の単細胞壊死又は肝小葉中心静脈周囲における炎症性細胞浸潤) が，10 及び 100 mg/kg/日投与群で認められた．肝細胞の空胞化が，100 mg/kg/日群の雌雄及び 3 mg/kg/日群の雌に観察されたが，軽度であり用量相関性は認められなかった．

以上の結果から，肝毒性が予想される高用量として，50 mg/kg/日を設定した．また，用量反応関係を確認するため，10，3 及び 1 mg/kg/日を設定した．

2.6.6.3.4.2 試験方法及び成績

ビーグルイヌ (各群雌雄各 3 例) にナルデメジントシル酸塩を 0 (対照群)，1，3，10 及び 50 mg/kg/日の用量で, 1 日 1 回 1 ヵ月間反復経口投与し, 毒性を評価した. 対照群には媒体 (0.5 w/v% MC 水溶液) を投与した．また，対照群及び 50 mg/kg/日投与群には，1 ヵ月間の休薬による回復性試験群 (各群雌雄各 2 例) を設け，毒性の回復性を検討した．一般状態，体重，摂餌量，眼科学的検査，心電図，尿検査，血液学及び血液化学的検査，骨髄検査，器官重量，肉眼検査，病理組織学的検査並びに TK を評価した．また，投与 1，9 及び 30 日目の投与前 (投与 1 日目を除く) 並びに投与後 0.25，0.5，1，2，4，7 及び 24 時間に採取した血漿試料を用い，血漿中ナルデメジン及びその代謝物 (nor-ナルデメジン，ナルデメジン 3-G 及びナルデメジン 6-G) 濃度を測定した.

投与開始から剖検日まで，死亡及び切迫殺例は発生しなかった．一般状態観察では，低頻度の嘔吐又は吐物及び投与に対する条件反射と考えられる流涎が，50 mg/kg/日投与群のほぼ全例

で認められた．これらの変化は，多くの場合投与後約 2～3 時間以内に観察された．

その他に，肝毒性が 50 mg/kg/日投与群で認められた．投与 10 及び 28 日目の血液化学的検査では，50 mg/kg/日投与群で，対照群と比較して ALT 及び ALP 活性の上昇が認められ，一部の例ではアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST) 活性の上昇又は総コレステロール値の増加を伴っていた．病理組織学的検査では，50 mg/kg/日投与群の全例で肝細胞の単細胞壊死が認められ，2 例の雄では炎症性細胞浸潤を伴っていた．これらの変化は軽度であり，1 ヵ月の休薬期間中に回復傾向が確認された．ALT や ALP 活性の上昇又は総コレステロール値の増加は，3 及び 10 mg/kg/日投与群でも認められたが，病理組織学的変化を伴わないことから，毒性学的に意義はないと判断した．

血液学的検査では，50 mg/kg/日投与群の雌の少数例で，RBC/HGB/HCT 値のわずかな低下が認められ，肝臓又は脾臓のヘモジデリン沈着を伴っていたが，散発的であり，ナルデメジントシル酸塩投与との関係が明確でないことから，毒性学的に意義のない変化と判断した．

体重，摂餌量，眼科学的検査，心電図検査，尿検査，骨髄検査，器官重量及び肉眼検査に，ナルデメジントシル酸塩に起因した変化は認められなかった．

ナルデメジンの TK 解析では，血漿中曝露量 (C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24hr}$) は，1～3 mg/kg/日投与群の間では，用量にほぼ比例して増大し，3～50 mg/kg/日投与群の間では，用量比以上に増大した (表 2.6.6.3-4)．また，明らかな反復投与による影響及び性差は認められなかった．さらに，nor-ナルデメジン，ナルデメジン 3-G 及びナルデメジン 6-G も検出され，投与 30 日目の 50 mg/kg/日投与群における血漿中 $AUC_{0\text{-}24hr}$ の割合は，ナルデメジンに対してそれぞれ 5%未満，3%未満及び 1%未満であった．

以上の結果から，ナルデメジントシル酸塩の 50 mg/kg/日投与群で認められた嘔吐及び肝毒性を毒性変化と考え，イヌ 1 ヵ月反復経口投与毒性試験における無毒性量は 10 mg/kg/日であると判断した．

表 2.6.6.3-4 イヌ 1 ヵ月反復経口投与毒性試験における TK パラメータ

測定物質	TK パラメータ	投与日	投与量 (mg/kg/日)							
			雄				雌			
			1	3	10	50	1	3	10	50
ナルデメジン	C_{max} (μg/mL)	1	0.65	1.92	5.78	31.04	0.64	1.80	6.78	21.16
		9	0.64	2.44	7.18	19.80	0.71	1.90	5.57	20.72
		30	0.52	2.29	6.48	20.12	0.57	2.04	7.47	22.24
	$AUC_{0\text{-}24hr}$ (μg·hr/mL)	1	1.01	3.63	18.40	93.86	1.02	2.81	15.37	98.29
		9	1.04	4.58	24.51	121.57	1.07	3.28	14.41	103.86
		30	1.26	5.03	23.95	142.80	1.27	4.24	19.60	130.09
Nor-ナルデメジン	C_{max} (μg/mL)	1	N.C.	0.06	0.16	0.78	N.C.	0.06	0.34	0.64
		9	N.C.	0.06	0.16	0.49	N.C.	0.05	0.12	0.53
		30	N.C.	0.05	0.13	0.78	N.C.	0.05	0.11	0.54
	$AUC_{0\text{-}24hr}$ (μg·hr/mL)	1	N.C.	0.08	0.43	2.47	N.C.	0.06	0.64	2.59
		9	N.C.	0.10	0.46	2.74	N.C.	0.06	0.23	2.37
		30	N.C.	0.09	0.41	7.00	N.C.	0.08	0.30	2.89
ナルデメジン 3-G	C_{max} (μg/mL)	1	N.C.	N.C.	N.C.	0.16	N.C.	N.C.	0.02	0.12
		9	N.C.	N.C.	0.02	0.18	N.C.	N.C.	N.C.	0.11
		30	N.C.	N.C.	0.02	0.51	N.C.	N.C.	0.03	0.19
	$AUC_{0\text{-}24hr}$ (μg·hr/mL)	1	N.C.	N.C.	N.C.	0.37	N.C.	N.C.	0.01	0.31
		9	N.C.	N.C.	0.04	0.78	N.C.	N.C.	N.C.	0.42
		30	N.C.	N.C.	0.02	3.46	N.C.	N.C.	0.02	0.78
ナルデメジン 6-G	C_{max} (μg/mL)	1	N.C.	N.C.	0.005	0.061	N.C.	N.C.	0.009	0.044
		9	N.C.	N.C.	0.005	0.066	N.C.	N.C.	0.006	0.033
		30	N.C.	0.001	0.006	0.095	N.C.	0.002	0.023	0.053
	$AUC_{0\text{-}24hr}$ (μg·hr/mL)	1	N.C.	N.C.	0.010	0.258	N.C.	N.C.	0.014	0.198
		9	N.C.	N.C.	0.014	0.412	N.C.	N.C.	0.015	0.167
		30	N.C.	0.001	0.016	0.790	N.C.	0.002	0.057	0.318

数値は平均値を示す (n = 3). N.C.：定量限界未満 (< 0.02 μg/mL) のため算出せず.

2.6.6.3.5 イヌ 3 ヵ月反復経口投与毒性試験

評価資料 4.2.3.2-05
概要表 2.6.7.7.5

2.6.6.3.5.1 用量設定根拠

イヌ 1 ヵ月反復経口投与毒性試験 [2.6.6.3.4.2 項参照] では，50 mg/kg/日投与群の雌雄で，低頻度の嘔吐と ALT 及び ALP 活性の上昇並びに肝細胞の単細胞壊死といった軽度の肝毒性が認められたことから，3 ヵ月反復経口投与毒性試験では肝毒性が予想される高用量として，30 mg/kg/日を設定した．また，用量反応関係を確認するため，5 及び 1 mg/kg/日を設定した．

2.6.6.3.5.2 試験方法及び成績

ビーグルイヌ (各群雌雄各 4 例) にナルデメジントシル酸塩を 0 (対照群), 1, 5 及び 30 mg/kg/日の用量で, 1 日 1 回 3 ヵ月間反復経口投与し, 毒性を評価した. 対照群には媒体 (0.5 w/v% MC 水溶液) を投与した．また，対照群及び 30 mg/kg/日投与群には，1 ヵ月間の休薬による回復性

試験群 (各群雌雄各 3 例) を設け，毒性の回復性を検討した．一般状態，体重，摂餌量，眼科学的検査，心電図，尿検査，血液学及び血液化学的検査，骨髄検査，器官重量，肉眼検査，病理組織学的検査並びに TK を評価した．また，投与 1，28 及び 91 日目の投与前 (投与 1 日目を除く) 並びに投与後 0.25，0.5，1，2，4，7 及び 24 時間に採取した血漿試料を用い，血漿中ナルデメジン濃度を測定した．

投与開始から剖検日まで，死亡及び切迫殺例は発生しなかった．一般状態観察では，投与 37 日目からほぼ毎日，30 mg/kg/日投与群の雌雄で，投与直前又は投与直後から 1 時間までに流涎が観察された．さらに，雌 1 例で，一時的な体重減少及び摂餌量低下が認められ，投与 48 及び 49 日目に排便が認められなかった．投与期間中，5 mg/kg/日投与群の雄 1 例及び 30 mg/kg/日投与群の雌雄で，吐物の頻度が増加したが，その頻度はビーグルイヌで一般的に認められるものと同等であり，上述した雌 1 例を除き，体重や摂餌量に影響はなかった．したがって，5 mg/kg/日投与群におけるこれらの所見は，毒性学的意義はないと判断した．

血液学的検査では，30 mg/kg/日投与群の雌雄で，平均赤血球パラメータ (RBC，HGB 及び HCT 値) の統計学的に有意な減少が認められたが，減少の程度はわずかであり，各個体の変化は検査前値と比べて顕著なものではないことから，毒性学的意義はないと判断した．同様に，30 mg/kg/日投与群の雌雄で，統計学的に有意な網状赤血球数/比の減少が認められたが，胸骨骨髄のような造血の活発な組織において造血細胞濃度の減少はなく，肋骨中の顆粒球系/赤芽球系細胞比の変化もないことから，毒性学的意義はないと判断した．

血液化学的検査では，30 mg/kg/日投与群の雌雄で，対照群と比較していずれもわずかな変化であるが ALT，GGT 及び ALP 活性の上昇，総コレステロール値の増加，アミラーゼ値の低下が認められた．これらの変化は，投与 4 週目に初めて見られたが，投与 13 週目に明らかな増悪は認められなかった．また，同投与群の雌 1 例で，投与 13 週目に総ビリルビン値の上昇が認められた．

病理組織学的検査では，30 mg/kg/日投与群の雌雄各 1 例に軽度な肝細胞の単細胞壊死が認められ，同群の雌雄各 1 例で大腿骨骨髄に軽度あるいは中等度の脂肪組織の萎縮やゼラチン様物質の沈着が認められた．また，ナルデメジントシル酸塩の脂肪組織への影響として，心臓及び腎周囲の脂肪組織の軽度な萎縮が観察された．ゼラチン様物質は，脂肪組織の萎縮に関連する二次的変化と考えられる．さらに，30 mg/kg/日投与群の雄 3 例及び雌 1 例で，肝臓に軽度な髄外造血が観察された．

上述した 30 mg/kg/日投与群での変化は，1 ヵ月間の休薬期間中に，回復又は回復傾向を示した．

眼科学的検査，心電図検査，尿検査，肉眼検査，器官重量測定及び骨髄検査に，ナルデメジントシル酸塩に起因した変化は認められなかった．

ナルデメジンの TK 解析では，投与 1，28 及び 91 日目の血漿中 C_{max} は，用量にほぼ比例して増大し，血漿中 $AUC_{0\text{-}24hr}$ は，用量比以上に増大した (表 2.6.6.3-5)．反復投与による血漿中ナルデメジン濃度への影響は，反復投与により増大傾向が認められた 30 mg/kg/日投与群の血漿中 $AUC_{0\text{-}24hr}$ を除き，認められなかった．また，C_{max}，及び $AUC_{0\text{-}24hr}$ に顕著な性差は認められなかった．

本試験では，嘔吐並びに標的臓器毒性として軽度な肝細胞の単細胞壊死及び脂肪組織の萎縮が，30 mg/kg/日投与群で観察されたが，1 ヵ月間の休薬期間中に良好な回復性を示した．以上の結果から，イヌ 3 ヵ月反復経口投与毒性試験における無毒性量は 5 mg/kg/日であると判断した．

表 2.6.6.3-5 イヌ 3 ヵ月反復経口投与毒性試験における TK パラメータ

測定物質	TK パラメータ	投与日	投与量 (mg/kg/日)					
			雄			雌		
			1	5	30	1	5	30
ナルデメジン	C_{max} (μg/mL)	1	0.383	2.99	12.0	0.457	2.93	11.9
		28	0.523	3.16	13.7	0.346	2.79	12.6
		91	0.552	3.79	13.9	0.455	2.67	13.6
	$AUC_{0\text{-}24hr}$ (μg·hr/mL)	1	0.705	6.41	47.2	0.726	6.88	50.0
		28	0.767	6.71	70.1	0.511	5.69	44.8
		91	0.880	8.28	90.9	0.724	5.90	78.7

数値は平均値を示す (n = 4).

2.6.6.3.6 イヌ 9 ヵ月反復経口投与毒性試験

評価資料 4.2.3.2-06
概要表 2.6.7.7.6

2.6.6.3.6.1 用量設定根拠

イヌ 3 ヵ月反復経口投与毒性試験 [2.6.6.3.5.2 項参照] では, 30 mg/kg 投与群の雌雄で, ALT, GGT 及び ALP 活性のわずかな上昇を伴う肝細胞の単細胞壊死, 脂肪組織の萎縮及び大腿骨骨髄にゼラチン様物質の沈着が認められたことから，9 ヵ月反復経口投与毒性試験では，肝毒性及び脂肪組織の萎縮が予想される高用量として 20 mg/kg/日を設定した．また，用量反応関係を確認するため 4 及び 1 mg/kg/日を設定した．

2.6.6.3.6.2 試験方法及び成績

ビーグルイヌ (各群雌雄各 4 例) にナルデメジントシル酸塩を 0 (対照群), 1, 4 及び 20 mg/kg/日の用量で, 1 日 1 回 9 ヵ月間反復経口投与し, 毒性を評価した. 対照群には媒体 (0.5 w/v% MC 水溶液) を投与した．また，対照群及び 20 mg/kg/日投与群には，1 ヵ月間の休薬による回復性試験群 (各群雌雄各 3 例) を設け，毒性の回復性を検討した．一般状態，体重，摂餌量，眼科学的検査，心電図，尿検査，血液学及び血液化学的検査，骨髄検査，器官重量，肉眼検査，病理組織学的検査並びに TK を評価した．また，投与 1，136 及び 273 日目の投与前 (投与 1 日目を除く) 並びに投与 0.25，0.5，1，2，7 及び 24 時間後に採取した血漿試料を用い，血漿中ナルデメジン及びその代謝物 (ベンズアミジン) 濃度を測定した．

投与開始から剖検日まで，死亡及び切迫殺例は発生しなかった．血液化学的検査では，20 mg/kg/日投与群の雄及び/又は雌で，肝機能に関連したパラメータの値の増加が認められ，投与期間中に対照群と比較して ALT，GGT 及び ALP 活性の上昇並びに総コレステロール値及びリ

ン脂質の増加も認められた．これらの変化は概ね軽度であり，反復投与による増悪は認められなかった．さらに，総ビリルビンの増加及び AST 活性の上昇が散発的に認められた．

病理組織学的検査では，20 mg/kg/日投与群の雌雄各 2 例に，軽度な肝細胞の単細胞壊死が認められ，同群の雄 1 例及び雌 2 例に，褐色色素を有するクッパー細胞の軽度な増加が認められた．同様の変化は 3 ヵ月反復投与毒性試験でも認められ (対照群，1，5 及び 30 mg/kg/日投与群で，それぞれ雌 2 例と雌 2 例，雄 1 例及び雄 2 例と雌 3 例)，用量依存性はないと判断した．ナルデメジンは主に胆汁を介して糞中に排泄される [2.6.4.6 項参照] ことから，これらの細胞の増加とナルデメジンの吸収又は排泄が関係していることは否定できないが，褐色色素を有するクッパー細胞の増加は 20 mg/kg/日投与群でのみ認められ，細胞障害性を示すものではないことから，毒性学的意義はないと判断した．

上述した 20 mg/kg/日投与群での変化は，1 ヵ月間の休薬期間中に回復した．

一般状態，体重，摂餌量，眼科学的検査，心電図検査，血液学的検査，尿検査，肉眼検査及び器官重量測定に，ナルデメジントシル酸塩に起因した変化は認められなかった．

ナルデメジンの TK 解析では，血漿中曝露量 (C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24hr}$) は，投与 1，136 及び 273 日目の 1～4 mg/kg/日まで，用量にほぼ比例して増大し，4～20 mg/kg/日までの $AUC_{0\text{-}24hr}$ は，用量比以上に増大した (表 2.6.6.3-6)．また，明らかな反復投与による影響及び性差は認められなかった．また，代謝物であるベンズアミジンの血漿中曝露量 (C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24hr}$) も，用量にほぼ比例して増大し，明らかな反復投与による影響及び性差は認められなかった．投与 1，136 及び 273 日目のベンズアミジンの血漿中曝露量は，ナルデメジンよりも低かった．

本試験では，標的臓器毒性として，軽度な肝細胞の単細胞壊死及び関連する血液化学的検査値の変動が，20 mg/kg/日投与群で観察されたが，1 ヵ月間の休薬期間中に良好な回復性を示した．以上の結果から，イヌ 9 ヵ月反復経口投与毒性試験における無毒性量は 4 mg/kg/日であると判断した．

表 2.6.6.3-6 イヌ 9 ヵ月反復経口投与毒性試験における TK パラメータ

測定物質	TK パラメータ	投与日	投与量 (mg/kg/日)					
			雄			雌		
			1	4	20	1	4	20
ナルデメジン	C_{max} (μg/mL)	1	0.423	2.25	8.04	0.434	2.16	8.74
		136	0.400	2.92	9.89	0.609	2.40	8.98
		273	0.295	2.32	10.0	0.401	1.90	8.35
	AUC_{0-24hr} (μg·hr/mL)	1	0.735	4.08	36.7	1.04	5.87	33.6
		136	0.856	6.56	56.4	1.22	7.03	48.9
		273	0.707	5.85	55.9	0.991	5.97	40.5
ベンズアミジン	C_{max} (μg/mL)	1	0.00318	0.0110	0.0783	0.00315	0.0103	0.0584
		136	0.00371	0.0167	0.0788	0.00332	0.0101	0.0970
		273	0.00416	0.0192	0.0835	0.00453	0.0110	0.0848
	AUC_{0-24hr} (μg·hr/mL)	1	0.0401	0.147	1.07	0.0390	0.125	0.775
		136	0.0551	0.285	1.34	0.0474	0.146	1.60
		273	0.0663	0.303	1.39	0.0661	0.158	1.35

数値は平均値を示す (n = 4).

2.6.6.4 遺伝毒性試験

2.6.6.4.1 細菌を用いる復帰突然変異試験

評価資料 4.2.3.3-01
概要表 2.6.7.8.1

ナルデメジントシル酸塩の復帰突然変異誘発性を評価するため，ネズミチフス菌 (TA98，TA100，TA1535 及び TA1537) 並びに大腸菌 (WP2*uvrA*) の 5 菌株を用いて，代謝活性化系 (S9 mix：フェノバルビタール及び 5,6-ベンゾフラボンで誘導した Sprague-Dawley 系ラット肝 9000 *g* 上清) の有無の条件下でプレインキュベーション法により復帰突然変異試験を実施した．陰性対照としてジメチルスルホキシド (DMSO) を用いた．用量設定試験の結果を基に，TA100，TA1535 及び WP2*uvrA* の S9 mix 存在下及び非存在下条件並びに TA98 及び TA1537 の S9 mix 存在下条件では，156，313，625，1250，2500 及び 5000 μg/プレートの用量で，TA98 及び TA1537 の S9 mix 非存在下条件では，78.1，156，313，625，1250 及び 2500 μg/プレートの用量で試験を実施した．

すべての菌株において，S9 mix の有無にかかわらず，いずれの用量においても，ナルデメジントシル酸塩群の復帰変異コロニー数は，陰性対照群と同程度であり，陰性対照値の 2 倍以上の復帰変異コロニー数を示さなかった．これらの結果は，再現性が認められた．細菌の生育阻害 (背景細菌叢の減少) は，S9 mix 非存在下条件では，TA98 及び TA1537 の 1250 μg/プレート以上の用量並びに TA100，TA1535 及び WP2*uvrA* の 2500 μg/プレート以上の用量で観察され，S9 mix 存在下条件では，TA98，TA100，TA1535 及び TA1537 の 2500 μg/プレート以上の用量並びに WP2*uvrA* の 5000 μg/プレートの用量で観察された．なお，S9 mix 非存在下条件の 2500 μg/プレート以上の用量及び S9 mix 存在下条件の 5000 μg/プレートの用量で，プレート上にナルデメジントシル酸塩由来の析出物が認められた．

以上の成績から，ナルデメジントシル酸塩の細菌を用いる復帰突然変異試験は陰性と判断した．

2.6.6.4.2 ほ乳類の培養細胞を用いる染色体異常試験

評価資料 4.2.3.3-02
概要表 2.6.7.8.2

ナルデメジントシル酸塩の染色体異常誘発性を評価するため，チャイニーズハムスター肺由来培養 (CHL/IU) 細胞を用いて，*in vitro* 染色体異常試験を実施した．CHL/IU 細胞にナルデメジントシル酸塩を S9 mix の有無の条件下で 6 時間処理 (処理後 18 時間再培養) 又は S9 mix 非存在下条件で 24 時間連続処理した．陰性対照として DMSO を用いた．用量設定試験の結果を基に，細胞毒性が 50%以上を示す用量の 1.5 倍を最高用量に設定した．

S9 mix 非存在下及び存在下条件での 6 時間処理 (237，356 及び 533 μg/mL) 並びに S9 mix 非存在下での 24 時間処理 (70.2，105 及び 158 μg/mL) のいずれの処理条件においても，陰性対照群と比較して，構造異常細胞及び数的異常 (倍数性) 細胞の有意な増加は認められなかった．

以上の成績から，ナルデメジントシル酸塩の CHL/IU 細胞を用いる染色体異常試験は陰性と判断した．

2.6.6.4.3 げっ歯類骨髄細胞を用いる小核試験

評価資料 4.2.3.3-03
概要表 2.6.7.9.1

ナルデメジントシル酸塩の *in vivo* 染色体異常誘発性を評価するため，Sprague-Dawley 系ラット (各群雄 5 例) にナルデメジントシル酸塩を 0 (陰性対照群)，250，500，1000 及び 2000 mg/kg/日の用量で 1 日 1 回 2 日間経口投与した. 陰性対照群には媒体 (0.5 w/v% MC 水溶液) を投与した．最終投与後 24 時間に，陰性対照群並びに 500，1000 及び 2000 mg/kg/日投与群について骨髄塗抹標本を作製した.

全群において, 一般状態に変化は認められなかったが, ナルデメジントシル酸塩全投与群で, 投与翌日に体重減少が観察された．多染性赤血球中の小核を有する細胞の出現頻度は，陰性対照群と比較して，いずれのナルデメジントシル酸塩投与群においても有意な増加は認められなかった．また，全赤血球中の多染性赤血球の割合には，いずれのナルデメジントシル酸塩投与群においても陰性対照群との有意差はなく，ナルデメジントシル酸塩による骨髄細胞の増殖抑制は認められなかった.

以上の成績から，ナルデメジントシル酸塩のラット小核試験は陰性と判断した.

2.6.6.5 がん原性試験

2.6.6.5.1 マウスがん原性試験

評価資料 4.2.3.4-01
参考資料 4.2.3.4-03，4.2.3.4-04
概要表 2.6.7.10.1，2.6.7.10.2

2.6.6.5.1.1 用量設定根拠

概要表 2.6.7.10.1 に示すように, ICR 系マウス (各群雌雄各 10 例) にナルデメジントシル酸塩を 0 (対照群)，30，100，300 及び 1000 mg/kg/日の用量で，1 日 1 回 2 週間反復経口投与し，マウスにおける毒性を予備的に評価した．対照群には媒体 (0.5 w/v% MC 水溶液) を投与した．本試験は GLP 非適用下で実施した．

死亡の発生及びナルデメジントシル酸塩に起因した一般状態の変化は，認められなかった．

以上のことから，13 週間反復投与用量設定試験の高用量として，1000 mg/kg/日を設定した．また，用量反応関係を確認するため，300 及び 100 mg/kg/日を設定した．

概要表 2.6.7.10.1 に示すように，13 週間反復投与用量設定試験として，ICR 系マウスに (各群雌雄各 12 例) ナルデメジントシル酸塩を 0 (対照群)，100，300 及び 1000 mg/kg/日の用量で，1 日 1 回 13 週間反復経口投与し，毒性を評価した．対照群には媒体 (0.5 w/v% MC 水溶液) を投与した．また，ナルデメジン及びその代謝物 (nor-ナルデメジン，ナルデメジン 3-G，ナルデメジン 6-G 及びベンズアミジン) の TK 評価のため，別のマウス (対照群 : 雌雄各 24 例，投与群 : 雌雄各 60 例) に主群と同じ条件で投与した．

死亡の発生及びナルデメジントシル酸塩に起因した一般状態の変化は，認められなかった．血液学及び血液化学的検査で, 対照群と比較して以下の変化が認められた. 血液学的検査では，300 mg/kg/日以上の投与群で，HGB 及び RBC の低下並びに網状赤血球数及び平均赤血球容積の増加が認められた．血液化学的検査では，100 mg/kg/日以上の投与群で，ALP 活性の上昇，尿素の低値，トリグリセリドの低値，カリウムの高値，アルブミンの高値，リンの低値及びアルブミン/グロブリン比の増加が認められ，いずれも軽度であった．また，100 mg/kg/日以上の投与群で，体重増加量の増加，病理組織学的検査では主として小葉中心性の肝細胞肥大及び門脈周囲の肝細胞の空胞化が認められた．また，黄体の減数又は消失が認められ，発情期及び発情後期の膣粘膜の状態を示す例数が増加していた．

血漿中ナルデメジンの曝露量 (C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24hr}$) は，用量比以下で増大した．また，血漿中 nor-ナルデメジン及びベンズアミジンの曝露量 (C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24hr}$) は用量比以下で増大し，ナルデメジン 3-G 及びナルデメジン 6-G は用量比以上に増大した．なお，投与 91 日目における 100 mg/kg/日投与群の雄及び雌の $AUC_{0\text{-}24hr}$ 値は，それぞれ 194 及び 165 μg·hr/mL であった．

以上のように，300 mg/kg/日投与群で血液学及び血液化学的変化が認められたが，100 mg/kg/日投与群で認められたナルデメジントシル酸塩投与に起因した変化は，小葉中心性の肝細胞肥大のみであったことから，100 mg/kg/日の用量を最大耐量と考え，がん原性試験の高用量として設定した．また，発がんポテンシャルの用量反応関係を確認するため，30 及び 10 mg/kg/日を設定した．

2.6.6.5.1.2 試験方法及び成績

ICR 系マウス (各群雌雄各 60 例) にナルデメジントシル酸塩を 0 (対照群), 10, 30 及び 100 mg/kg/日の用量で, 1 日 1 回 104 週間反復経口投与し, がん原性を評価した. 対照群には媒体 (0.5 w/v% MC 水溶液) を投与した. また, ナルデメジン及びその代謝物 (nor-ナルデメジン, ナルデメジン 3-G, ナルデメジン 6-G 及びベンズアミジン) の TK 評価のため, 別のマウス (各群雌雄各 18 例) にがん原性評価群と同じ条件で投与した. 生存率, 一般状態 (触診を含む), 体重, 摂餌量, 血液学的検査 (投与終了時), 器官重量, 肉眼検査, 病理組織学的検査及び TK を評価した. また, 投与 13 及び 26 週目の投与後 1, 2 及び 24 時間に採取した血漿試料を用い, 血漿中ナルデメジン及び上記代謝物濃度を測定した.

生存率, 一般状態, 摂餌量及び血液学的検査に, ナルデメジンに起因した変化は認められず, 病理組織学的検査ではナルデメジンに起因した腫瘍性病変及び非腫瘍性病変は認められなかった.

投与 26 週目における血漿中ナルデメジン, nor-ナルデメジン, ナルデメジン 3-G, ナルデメジン 6-G 及びベンズアミジンの曝露量 (C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24hr}$) は, 10～100 mg/kg/日投与群の間で, 用量比以下で増大した (表 2.6.6.5-1). また, 血漿中ナルデメジン及び上記代謝物の曝露量 (C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24hr}$) に性差は認められなかった. なお, 投与 26 週目における血漿中ナルデメジン, nor-ナルデメジン, ナルデメジン 3-G 及びナルデメジン 6-G の曝露量 (C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24hr}$) は, 投与 13 週目に比べ, 高値を示した.

以上の結果から, ナルデメジントシル酸塩を 10, 30 及び 100 mg/kg/日の用量で 104 週間反復経口投与したマウスにおいて, がん原性は認められず, 非腫瘍性病変の無毒性量は 100 mg/kg/日と判断した.

表 2.6.6.5-1 マウスがん原性試験における TK パラメータ

測定物質	TK パラメータ	投与週	投与量 (mg/kg/日)					
			雄			雌		
			10	30	100	10	30	100
ナルデメジン	C_{max} (μg/mL)	13	2.90	8.03	18.7	3.41	10.5	21.2
		26	2.58	8.37	27.4	5.08	10.8	23.8
	$AUC_{0\text{-}24hr}$ (μg·hr/mL)	13	35.8	73.5	182	38.7	90.3	189
		26	32.2	104	339	47.2	134	297
Nor-ナルデメジン	C_{max} (μg/mL)	13	0.295	0.692	1.98	0.204	0.689	1.19
		26	0.242	1.28	2.30	0.296	0.699	2.13
	$AUC_{0\text{-}24hr}$ (μg·hr/mL)	13	3.54	8.48	24.0	2.50	8.52	14.9
		26	3.00	15.40	28.5	3.67	8.60	25.7
ナルデメジン 3-G	C_{max} (μg/mL)	13	0.00684	0.0366	0.107	N.C.	0.0234	0.0611
		26	N.C.	0.0379	0.241	0.00425 (a)	0.0580	0.156
	$AUC_{0\text{-}24hr}$ (μg·hr/mL)	13	0.0806	0.177	1.31	N.C.	0.190	0.546
		26	N.C.	0.394	2.92	0.00425 (b)	0.208	1.90
ナルデメジン 6-G	C_{max} (μg/mL)	13	N.C.	0.00855	0.0299	N.C.	0.0106	0.0255
		26	N.C.	0.0114	0.0521	N.C.	0.0124	0.0619
	$AUC_{0\text{-}24hr}$ (μg·hr/mL)	13	N.C.	0.533	0.361	N.C.	0.108	0.276
		26	N.C.	0.138	0.628	N.C.	0.133	0.738
ベンズアミジン	C_{max} (μg/mL)	13	0.0135	0.0261	0.0974	0.0150	0.0406	0.109
		26	0.0172	0.0377	0.0782	0.0245	0.0329	0.0935
	$AUC_{0\text{-}24hr}$ (μg·hr/mL)	13	0.159	0.329	1.20	0.176	0.511	1.41
		26	0.206	0.464	1.00	0.298	0.415	1.24

数値は平均値 (n = 3) を示す. N.C.：測定限界未満 (< 0.02 μg/mL) のため算出せず.
(a)：2 例の平均値を示す.
(b)：1 例の血漿濃度を示す.

2.6.6.5.2 ラットがん原性試験

評価資料 4.2.3.4-02
概要表 2.6.7.10.3

2.6.6.5.2.1 用量設定根拠

ラットがん原性試験の用量は，ラット 6 ヵ月反復経口投与毒性試験 [2.6.6.3.3.2 項参照] の結果に基づいて設定した．体重増加抑制と血液学的パラメータの変化が 1000 mg/kg/日投与群で認められ，血液学的パラメータの変化は 100 mg/kg/日投与群でもわずかに観察されたことから，100 mg/kg/日を最大耐量と判断し，がん原性試験の高用量として設定した．また，ラット 6 ヵ月反復経口投与毒性試験における 100 mg/kg/日投与群の $AUC_{0\text{-}24hr}$ (61.5～67.9 μg· hr/mL) は，当時ヒトにおける投与可能な最大用量と推定された 10 mg/日での $AUC_{0\text{-}24hr}$ (1.24 μg· hr/mL) より 50 倍以上で，充分な安全域がある．さらに，発がんポテンシャルの用量反応関係を確認するため，30 及び 10 mg/kg/日を設定した．なお，現在の対象疾患であるオピオイド誘発の便秘に対する臨床予定用量は，0.2 mg/日 ($AUC_{0\text{-}24hr}$：0.01694 μg·hr/mL) であることから，設定した高用量での血漿中曝露量は，臨床予定用量での曝露よりはるかに高い (3630 倍以上) と考えられる．

2.6.6.5.2.2 試験方法及び成績

Sprague-Dawley 系ラット(各群雌雄各 65 例) にナルデメジントシル酸塩を 0 (対照群)，10，30 及び 100 mg/kg/日 (各群雌雄各 65 例) の用量で，1 日 1 回 104 週間反復経口投与し，がん原性を評価した．対照群には媒体 (0.5 w/v% MC 水溶液) を投与した．また，ナルデメジン及びその代謝物 (nor-ナルデメジン，ナルデメジン 3-G，ナルデメジン 6-G 及びベンズアミジン) の TK 評価のため，別ラット (各群雌雄各 3 例) にがん原性評価群と同じ条件で投与した．生存率，一般状態 (触診を含む)，体重，摂餌量，眼科学的検査，血液化学及び血液学的検査 (投与終了時)，尿検査，肉眼検査，病理組織学的検査並びに TK を評価した．また，投与 13 及び 26 週目の投与後 1，2 及び 24 時間に採取した血漿試料を用い，血漿中ナルデメジン及び上記代謝物濃度を測定した．

対照群の雌の生存数が 15 例まで減少したため，投与期間を計画より 1 週間短縮して，投与開始後 103 週目に全例解剖した．雄の生存例は，計画通りに 104 週間の投与終了時に解剖した．雌雄の投与期間は，がん原性の評価には十分であると判断した．

生存率，一般状態，眼科学的検査，血液学的及び尿検査パラメータに，ナルデメジントシル酸塩に起因した変化は認められなかった．わずかな体重増加抑制が，ナルデメジントシル酸塩全投与群で認められ，雄では摂餌量の低値を伴っていた．血液化学的検査では，100 mg/kg/日投与群の雌雄で，血漿中トリグリセリドのわずかな低値が観察された．病理組織学的検査では，ナルデメジントシル酸塩投与に起因する腫瘍性病変及び非腫瘍性病変は認められなかった．

投与 26 週目における血漿中ナルデメジンの雌雄の曝露量 (C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24hr}$) 並びに雄の血漿中 nor-ナルデメジン，ナルデメジン 3-G 及びナルデメジン 6-G の曝露量 (C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24hr}$) は，10 及び 100 mg/kg/日投与群の間で，用量比以上に増大した (表 2.6.6.5-2)．また，30 及び 100 mg/kg/日投与群において，血漿中ナルデメジンの反復投与の影響は認められなかったが，投与 26 週目における血漿中 nor-ナルデメジン，ナルデメジン 3-G，ナルデメジン 6-G 及びベンズ

アミジンの曝露量は，13 週目に比べ増大した．また，100 mg/kg/日投与群において，血漿中ナルデメジンの曝露量に性差は認められなかったが，雄の血漿中 nor-ナルデメジン，ナルデメジン 3-G，ナルデメジン 6-G 及びベンズアミジンの曝露量は雌より高かった．

以上の結果から，ナルデメジントシル酸塩を 10，30 及び 100 mg/kg/日の用量で 104 週間まで経口投与したラットにおいて，がん原性は認められず，非腫瘍性病変の無毒性量は 100 mg/kg/日と判断した．

表 2.6.6.5-2　ラットがん原性試験における TK パラメータ

測定物質	TK パラメータ	投与週	投与量 (mg/kg/日)					
			雄			雌		
			10	30	100	10	30	100
ナルデメジン	C_{max} (μg/mL)	13	1.30	3.13	7.05	1.47	5.58	9.38
		26	0.763	3.17	9.42	1.30	6.95	13.2
	$AUC_{0\text{-}24hr}$ (μg·hr/mL)	13	9.52	27.0	84.8	9.98	36.3	61.0
		26	6.44	29.7	109	8.59	48.2	107
Nor-ナルデメジン	C_{max} (μg/mL)	13	0.0704	0.167 (a)	0.702	0.0665	0.0927 (a)	0.139
		26	0.0509	0.201 (a)	1.75	0.0713	0.154	0.306
	$AUC_{0\text{-}24hr}$ (μg·hr/mL)	13	0.565	1.57	8.18	0.365	0.686	1.12
		26	0.297	2.21	21.5	0.465	1.04	2.95
ナルデメジン 3-G	C_{max} (μg/mL)	13	0.0724	0.228 (a)	2.79	0.164	0.340	0.744
		26	0.0887	0.362 (a)	10.1	0.245	0.769	2.32
	$AUC_{0\text{-}24hr}$ (μg·hr/mL)	13	0.450	1.37 (a)	25.1	0.769	2.13	5.19
		26	0.528	2.79 (a)	125	0.869	3.51	17.5
ナルデメジン 6-G	C_{max} (μg/mL)	13	N.C.	0.0164 (a)	0.0543	N.C.	0.0102	0.0196
		26	N.C.	0.0136 (a)	0.123	N.C.	0.0151	0.0423
	$AUC_{0\text{-}24hr}$ (μg·hr/mL)	13	N.C.	0.0164 (a)	0.419	N.C.	0.0102	0.0947
		26	N.C.	0.0508 (a)	1.38	N.C.	0.0384	0.272
ベンズアミジン	C_{max} (μg/mL)	13	0.0236	0.0483 (a)	0.0571	0.00614	0.0434	0.0752
		26	0.0187	0.0557 (a)	0.160	0.00824	0.0254	0.155
	$AUC_{0\text{-}24hr}$ (μg·hr/mL)	13	0.351	0.905 (a)	1.01	0.117	0.695	1.32
		26	0.259	0.791 (a)	2.28	0.127	0.391	2.40

数値は平均値 (n = 3)を示す.　　N.C.：測定限界未満 (< 0.02 μg/mL) のため算出せず.
(a)：2 例の平均値を示す.

2.6.6.6 生殖発生毒性試験

2.6.6.6.1 ラット受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験

評価資料 4.2.3.5-01
概要表 2.6.7.12.1

2.6.6.6.1.1 用量設定根拠

ラット 1 ヵ月反復経口投与毒性試験 (投与量 : 30，100 及び 1000 mg/kg/日) [2.6.6.3.1.2 項参照] では，ナルデメジントシル酸塩全投与群において，雌雄で体重の低値，摂餌量の減少及び雌で性周期異常が認められた．また，性周期異常をより低用量で無影響量を求めるために実施した追加試験 (投与量 : 0.3，1，3 及び 10 mg/kg/日) [2.6.6.3.2 項参照] では，ナルデメジントシル酸塩全投与群で性周期異常が認められた．以上の結果から，体重の低値及び性周期異常の発現が予想される高用量として，生殖発生毒性ガイドライン [2] に記載された 1 日限界用量である 1000 mg/kg/日を設定した．また，用量反応関係を確認するため，100，10 及び 1 mg/kg/日を設定した．

2.6.6.6.1.2 試験方法及び成績

Sprague-Dawley 系ラット (各群雌雄各 20 例) にナルデメジントシル酸塩を 0 (対照群), 1, 10, 100 及び 1000 mg/kg/日の用量で，1 日 1 回反復経口投与し，雌雄の受胎能並びに初期胚発生への影響を評価した．対照群には媒体 (0.5 w/v% MC 水溶液) を投与した．雄は，交配前 28 日から交配期間を経て剖検前日までの合計 70～73 日間反復経口投与した．雌は，交配前 14 日から交配期間を経て妊娠 7 日まで反復経口投与し, 妊娠 13 日に帝王切開した. 試験では, 一般状態, 体重，摂餌量，肉眼検査，雄の生殖器官重量及び精子検査，性周期，交尾率，受胎率並びに胚の生存性を評価した．

投与期間を通じて，死亡及び切迫殺例は発生しなかった．流涎が，1000 mg/kg/日投与群の雌雄で散発的に認められたが，投与後の一時的なものであることから，毒性学的意義はないと判断した．

雄では, 10 mg/kg/日以上の投与群で, 投与期間を通して体重及び摂餌量の低値が認められた．一方，1 mg/kg/日投与群でも，投与初期に体重増加量が低値を示したが，一時的でわずかな変化であり，体重に対照群との有意差は認められなかったことから，毒性学的意義はないと判断した．雄の肉眼検査で異常は認められず，生殖器の器官重量及び精子検査でもナルデメジントシル酸塩投与による影響は認められなかった．

雌では，1000 mg/kg/日投与群で，投与初期及び妊娠初期に体重増加量及び摂餌量の低値が認められた．また，100 mg/kg/日以下の投与群でも，投与期間の初期に体重増加量及び摂餌量が低値を示したが，いずれも一時的でわずかな変化であったことから，毒性学的意義はないと判断した．雌の肉眼検査で異常は認められなかった．性周期異常が，10 mg/kg/日以上の投与群で，用量依存的 (10，100 及び 1000 mg/kg/日投与群で，それぞれ 5，12 及び 13 例) に認められ，発情期の発現回数が低値を示した．しかしながら，1000 mg/kg/日投与群の 1 例を除き，全ての雌で発情期が交配前又は交配期間中に認められ，交配期間中に交尾が成立した．

交配所要日数，交尾率，受胎率，黄体数，着床数，生存胚数及び着床前・着床後死亡率に，

ナルデメジントシル酸塩投与による影響は認められなかった.

以上の結果から, 雄及び雌親動物の一般毒性に関する無毒性量は, それぞれ 1 及び 100 mg/kg/日, 雄及び雌親動物の生殖能に関する無毒性量は, それぞれ 1000 及び 1 mg/kg/日, 胚の発生に関する無毒性量は, 1000 mg/kg/日と判断した.

2.6.6.6.2 ラット胚・胎児発生に関する試験

評価資料 4.2.3.5-02
概要表 2.6.7.13.1

2.6.6.6.2.1 用量設定根拠

ラット受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験 [2.6.6.6.1.2 項参照] では, 10 mg/kg/日以上の投与群の雌で, 体重増加抑制及び摂餌量の低値が投与初期に認められたが, 胚に対するナルデメジントシル酸塩の影響は, 1000 mg/kg/日投与群まで認められなかった. 以上の結果から, 胚・胎児発生に関する試験の高用量として, 生殖発生毒性ガイドライン [2] に記載された 1 日限界用量である 1000 mg/kg/日を設定した. また, 用量反応関係を確認するため, 100 及び 10 mg/kg/日を設定した.

2.6.6.6.2.2 試験方法及び成績

妊娠 Sprague-Dawley 系ラット (各群 19～20 例) にナルデメジントシル酸塩を 0 (対照群), 10, 100 及び 1000 mg/kg/日の用量で, 妊娠 7～17 日に, 1 日 1 回反復経口投与し, 胚・胎児発生への影響を評価した. 対照群には媒体 (0.5 w/v% MC 水溶液) を投与した. また, 妊娠 20 日に帝王切開した. さらに, ナルデメジンの TK 評価のため, 別の妊娠ラット (各群 3 例) に胚・胎児発生評価群と同じ条件で投与した. 一般状態, 体重, 摂餌量, 肉眼検査, 胚・胎児の生存性, 子宮内発育, 胎児の外表, 内臓及び骨格の形態並びに母動物の TK を評価した. 妊娠 7 日及び 17 日の投与前 (妊娠 17 日のみ) 並びに投与後 0.5, 1, 2, 4, 8 及び 24 時間に採取した血漿試料を用い, 血漿中ナルデメジン濃度を測定した.

投与開始から剖検日まで, 試験期間を通じて死亡及び切迫殺例は発生しなかった. また, 1000 mg/kg/日投与群で, 流涎が散発的に認められたが, 投与後の一時的なものであることから, 毒性学的意義はないと判断した. ナルデメジントシル酸塩全投与群で, 投与初期に体重増加抑制及び摂餌量の低値が認められた. 肉眼検査では影響は認められなかった.

生存胎児数, 着床後死亡率, 生存胎児の性比, 生存胎児の体重及び胎盤重量と胎盤の形態, 生存胎児の外表, 内部器官, 骨格の形態並びに骨化進行度に, ナルデメジントシル酸塩投与による影響は認められなかった.

血漿中ナルデメジンの曝露量 (C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24hr}$) は, 妊娠 7 及び 17 日において 10～100 mg/kg/日まで用量にほぼ比例して増大し, 100 から 1000 mg/kg/日までは用量比以下で増大した (表 2.6.6.6-1). 妊娠 17 日における 1000 mg/kg/日投与群の C_{max} 及び 100 mg/kg/日以上の投与群の $AUC_{0\text{-}24hr}$ は, 妊娠 7 日に比べて高値を示した.

以上の結果から, 母動物の一般毒性に関する無毒性量は, 10 mg/kg/日未満, 母動物の生殖能及び胚・胎児の発生に関する無毒性量は, 1000 mg/kg/日と判断した.

表 2.6.6.6-1 ラット胚・胎児発生に関する試験における TK パラメータ

測定物質	TK パラメータ	妊娠日	投与量 (mg/kg/日)		
			10	100	1000
ナルデメジン	C_{max} (μg/mL)	7	1.23	9.58	15.6
		17	1.39	9.84	29.4
	$AUC_{0\text{-}24hr}$ (μg·hr/mL)	7	5.66	58.4	163
		17	8.78	126	391

数値は平均値 (n = 3)を示す.

2.6.6.6.3 ウサギ胚・胎児発生に関する試験

評価資料 4.2.3.5-03
参考資料 4.2.3.5-05，4.2.3.5-06
概要表 2.6.7.11，2.6.7.13.2

2.6.6.6.3.1 用量設定根拠

概要表 2.6.7.11 に示すように，非妊娠ウサギにおける 2 週間反復投与毒性試験として，日本白色種雌ウサギ (各群 3 例) にナルデメジントシル酸塩を 0 (対照群), 100, 300 及び 1000 mg/kg/日の用量で，1 日 1 回 2 週間反復経口投与し，ウサギにおける毒性を評価した.

投与開始から剖検日まで，死亡及び切迫殺例は発生しなかった．また，1000 mg/kg/日投与群では，投与期間を通じて摂餌量が顕著に低下し，体重及び糞量の減少が認められた．さらに，300 mg/kg/日投与群では，摂餌量の低下，体重の低値及び糞量の減少が認められ，100 mg/kg/日投与群では，軽度な摂餌量の低下が，それぞれの投与群で投与初期に認められた．いずれの投与群においても，肉眼検査に変化は認められなかった.

これらの結果から，妊娠ウサギにおける用量設定試験の高用量として 600 mg/kg/日を設定した．また，用量反応関係を確認するため，200 及び 60 mg/kg/日を設定した.

概要表 2.6.7.11 に示すように，妊娠ウサギにおける用量設定試験として，妊娠日本白色種ウサギ (各群 6 例) にナルデメジントシル酸塩を 0 (対照群), 60, 200 及び 600 mg/kg/日の用量で，妊娠 6～18 日に，1 日 1 回反復経口投与し，胚・胎児発生への影響を評価した.

投与開始から剖検日まで, 母動物に死亡, 切迫殺及び早産は発生しなかった. また, 600 mg/kg/日投与群では，妊娠 20 日に流産が 1 例で認められた．同群で，顕著な摂餌量の低下が投与期間を通じて認められ，体重減少及び糞量の減少が認められた (対照群と比較して，妊娠 19 日の体重は 11%低値)．さらに，200 及び 60 mg/kg/日投与群では，投与初期に，わずかな摂餌量減少に関連した軽度な体重減少 (対照群と比較して妊娠 8 日にそれぞれ，3%及び 4%低値) が，認められた．いずれの投与群においても，肉眼検査に影響は認められなかった.

胚・胎児に関して，黄体数及び着床数，着床後死亡率，生存胎児数並びに性比に，ナルデメジントシル酸塩投与による影響は認められなかった．その他，胎児体重及び胎盤重量，外表の形態に，ナルデメジントシル酸塩投与の影響は認められなかった.

以上の結果から, 胚･胎児発生に関する試験の高用量として, 400 mg/kg/日を設定した. また, 用量反応関係を確認するため，100 及び 25 mg/kg/日を設定した.

2.6.6.6.3.2 試験方法及び成績

妊娠日本白色種ウサギ (各群 19～20 例) にナルデメジントシル酸塩を 0 (対照群), 25, 100 及び 400 mg/kg/日の用量で妊娠 6 日～18 日に 1 日 1 回反復経口投与し, 妊娠 28 日に帝王切開した. 対照群には媒体 (0.5 w/v% MC 水溶液) を投与した. 一般状態, 体重, 摂餌量, 肉眼検査, 胚・胎児の生存性, 子宮内発育, 胎児の外表, 内臓及び骨格の形態並びに母動物の TK を評価した. 妊娠 6 及び 18 日の投与前 (妊娠 18 日のみ) 並びに投与後 0.5, 1, 2, 4, 8 及び 24 時間に採取した血漿試料を用い, 血漿中ナルデメジン及び代謝物 (nor-ナルデメジン, ナルデメジン 3-G 及びナルデメジン 6-G) 濃度を測定した.

投与開始から剖検日まで, 死亡及び切迫殺例は発生しなかった. また, 400 mg/kg/日投与群では, 妊娠 21 日及び 22 日に流産が 2 例で, 妊娠 27 日に早産が 1 例で認められた. 同群で, 顕著な摂餌量の低下並びに体重及び糞量の減少がみられた. さらに, 25 mg/kg/日以上の投与群では, 体重増加量及び摂餌量の低値が用量依存的に観察された. 肉眼検査にナルデメジントシル酸塩投与による影響は認められなかった.

黄体数, 着床数, 生存胎児数, 着床後死亡率及び生存胎児の性比にナルデメジントシル酸塩投与による影響はなかった. 400 mg/kg/日投与群では, 胎児体重及び胎盤重量が低値を示した. 生存胎児の外表, 内部器官, 骨格の形態及び骨化進行度に, 影響は認められなかった.

血漿中ナルデメジンの曝露量 (C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24hr}$) は, 用量の増加に伴って増大し, 妊娠 18 日の曝露量は, 妊娠 6 日と同程度であった (表 2.6.6.6-2). また, 血漿中 nor-ナルデメジン, ナルデメジン 3-G 及びナルデメジン 6-G の曝露量 (C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24hr}$) も, 用量の増加に伴って増大した. さらに, 400 mg/kg/日投与群の妊娠 18 日における血漿中ナルデメジン 6-G の曝露量が, 妊娠 6 日よりもわずかに低かったことを除き, 妊娠 18 日におけるこれら代謝物の血漿中曝露量は, 妊娠 6 日よりもわずかに高い若しくはほぼ同程度であった. なお, 血漿中 nor-ナルデメジン及びナルデメジン 6-G の C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24hr}$ 値は, ナルデメジンよりも低く, ナルデメジン 3-G の C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24hr}$ 値は, ナルデメジンよりも高かった.

以上の結果から, 母動物の一般毒性に関する無毒性量は, 25 mg/kg/日未満, 母動物の生殖能及び胚・胎児の発生に関する無毒性量は, 100 mg/kg/日と判断した.

表 2.6.6.6-2 ウサギ胚・胎児発生に関する試験における TK パラメータ

測定物質	TK パラメータ	妊娠日	投与量 (mg/kg/日)		
			25	100	400
ナルデメジン	C_{max} (μg/mL)	6	0.173	2.37	6.45
		18	0.351	3.46	8.65
	$AUC_{0\text{-}24hr}$ (μg·hr/mL)	6	0.205	2.80	11.4
		18	0.366	3.82	14.3
Nor-ナルデメジン	C_{max} (μg/mL)	6	0.0398	0.179	0.543
		18	0.0609	0.212	0.557
	$AUC_{0\text{-}24hr}$ (μg·hr/mL)	6	0.0331	0.323	1.20
		18	0.0633	0.358	1.22
ナルデメジン 3-G	C_{max} (μg/mL)	6	5.34	26.8	64.7
		18	7.52	32.4	51.1
	$AUC_{0\text{-}24hr}$ (μg·hr/mL)	6	8.64	53.5	155
		18	12.30	57.2	144
ナルデメジン 6-G	C_{max} (μg/mL)	6	0.0122	0.105	0.519
		18	0.0191	0.136	0.278
	$AUC_{0\text{-}24hr}$ (μg·hr/mL)	6	0.0173	0.203	1.02
		18	0.0270	0.218	0.588

数値は平均値 (n = 3)を示す.

2.6.6.6.4 ラット出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験

評価資料 4.2.3.5-04
概要表 2.6.7.14.1

2.6.6.6.4.1 用量設定根拠

ラット胚・胎児発生に関する試験で，10 mg/kg/日以上の投与群で母動物の体重及び摂餌量の低値が認められたが，1000 mg/kg/日投与群で胚・胎児への影響は認められなかった [2.6.6.6.2.2 項参照]. したがって，高用量として，生殖発生毒性ガイドライン [1] に記載された 1 日限界用量である 1000 mg/kg/日を設定した．また，用量反応関係を確認するため，30 及び 1 mg/kg/日を設定した.

2.6.6.6.4.2 試験方法及び成績

妊娠雌性 Sprague-Dawley 系ラット (各群 22 例) にナルデメジントシル酸塩を 0 (対照群)，1，30 及び 1000 mg/kg/日の用量で，妊娠 7 日から分娩を経て哺育 20 日まで，1 日 1 回反復経口投与し，出生前及び出生後の発生並びに母体の機能を評価した．対照群には媒体 (0.5 w/v% MC 水溶液) を投与した．母動物の一般状態，体重，摂餌量及び肉眼検査，及び出生児の生存性，一般状態，離乳後の体重，生後発育，反射・感覚機能，オープンフィールド試験，条件回避反応，生殖器発達，性周期，交尾能，受胎能，肉眼検査，F_1 母動物の妊娠 13 日における着床並びに F_2 胚の生存性を評価した.

1000 mg/kg/日投与群の 1 例の母動物が妊娠 22 日の分娩中に死亡した．また，30 mg/kg 以上の投与群で, 妊娠期間中に母動物の体重増加抑制及び摂餌抑制が認められた. さらに, 30 及び 1000

mg/kg 群では，哺育 0 日から 4 日に，哺育不良に起因すると考えられる全児死亡が，それぞれ 5 及び 3 例の母動物で認められた．肉眼検査にナルデメジントシル酸塩の影響は認められなかった．F_1 出生児では，30 mg/kg/日以上の投与群で，死産児数の増加，出生率及び生後 4 日生存率の低下が，1000 mg/kg/日投与群で，離乳前の出生児の低体重及び耳介展開の遅れが認められた．出生児の離乳後の体重，反射・感覚機能，オープンフィールドテスト，条件回避反応，性成熟，性周期，交尾能，受胎能及び肉眼検査並びに F_2 胚の生存性に，ナルデメジントシル酸塩投与による影響は認められなかった．

以上の結果から，母動物の一般毒性及び生殖能並びに次世代の発生に関する無毒性量は，1 mg/kg/日と判断した．

2.6.6.7 局所刺激性試験

2.6.6.7.1 ウサギ皮膚刺激性試験

参考資料 4.2.3.6-01
概要表 2.6.7.16

ナルデメジントシル酸塩 (0.5 g/site) を雄性日本白色種ウサギ (3 例) 背部の正常皮膚及び損傷皮膚に 24 時間閉塞経皮投与し，ナルデメジントシル酸塩の皮膚刺激性を評価した．閉塞経皮投与後 24，48 及び 72 時間に，Draize の基準に従って，皮膚反応を評価した．本試験は，GLP 適用外，信頼性基準適用下で実施した．

いずれの観察時間でも，健常皮膚及び損傷皮膚に影響は見られず，ナルデメジントシル酸塩はウサギの皮膚に対して一次刺激性を示さなかった．

2.6.6.7.2 ウサギ眼粘膜刺激性試験

参考資料 4.2.3.6-02
概要表 2.6.7.16

ナルデメジントシル酸塩 (0.1 g/site) を雄性日本白色種ウサギ (6 例) の左眼の結膜嚢に投与し，ナルデメジントシル酸塩の眼粘膜刺激性を評価した．各動物の右眼は，無処置対照とした．また，6 例中 3 例は，投与後 20～30 秒で洗眼し (洗眼群)，残りの 3 例は，投与後そのままとした (非洗眼群)．眼の反応は，投与後 1，24，48 及び 72 時間並びに投与 4 日及び 7 日に，Draize の基準に従って評価し，各評価時間の急性眼粘膜刺激性指数 (I.A.O.I.) の値を算出した．

I.A.O.I.の値は，Association Française de Normalisation の評価基準に従って，0～5 を無刺激物，5～15 を軽度刺激物，15～30 を刺激物，30～60 を中等度刺激物，60～80 を中～強度刺激物及び 80～100 を強度刺激物とする 6 段階の分類とした．本試験は，GLP 適用外，信頼性基準適用下で実施した．

非洗眼群では，結膜の中程度の発赤 (評点 2)，中程度の浮腫 (評点 2) 及び中程度の分泌物 (評点 2 又は 3) が，投与 1 時間後に認められた．これらの所見は投与後 48 時間までには消失した．投与 1 時間後の I.A.O.I.は 13.33 であった．洗顔群では，結膜の軽度の発赤 (評点 1) 及び軽度の結膜浮腫 (評点 1) が，投与後 1 時間に認められた．これらの所見は投与後 24 時間までには消失した．投与後 1 時間の I.A.O.I.は 4.00 であった．

洗眼群では，投与後 1 時間の平均値が非洗眼群の値と比較して低いことから，洗眼による眼粘膜刺激性の減弱が認められ，非洗眼群よりも早く症状が消失した．

以上の結果から，ナルデメジントシル酸塩は，軽度刺激物に分類された．また，ナルデメジントシル酸塩はウサギの眼粘膜に軽度の刺激性を示すが，その作用は洗眼によって減弱することが示された．

2.6.6.8 その他の毒性試験

2.6.6.8.1 ラット免疫毒性試験

評価資料 4.2.3.7-01
概要表 2.6.7.17.1

本薬はオピオイド製剤を服用する患者が対象となることから，免疫応答が抑制されている患者へ投与される可能性が考えられるため，医薬品の免疫毒性試験に関するガイドライン [3] に従い，免疫毒性試験を実施した．

Sprague-Dawley 系ラット (各群雌雄各 10 例) にナルデメジントシル酸塩を 0 (対照群)，30，100 及び 1000 mg/kg/日の用量で，1 日 1 回 1 ヵ月間反復経口投与し，T 細胞依存性抗体応答に及ぼすナルデメジントシル酸塩の影響を評価した．対照群には媒体 (0.5 w/v% MC 水溶液) を投与した．試験では，一般状態，体重，キーホールリンペットヘモシアニンに対する抗体価及び T 細胞依存性抗体産生を評価した．

観察期間を通じて，死亡及び切迫殺例は発生しなかった．投与期間中に，1000 mg/kg/日投与群の雌雄で流涎がみられ，ナルデメジントシル酸塩全投与群で一過性の体重減少が認められた．

いずれのナルデメジントシル酸塩投与群の雌雄においても，抗キーホールリンペットヘモシアニン抗体価に影響は認められなかった．

以上の結果から，ナルデメジントシル酸塩は，ラットにおける T 細胞依存性抗体産生能に影響を及ぼさないと判断した．

2.6.6.8.2 雌ラット性周期及び血漿中性ホルモン濃度への影響に関する予備試験

参考資料 4.2.3.7-07
概要表 2.6.7.17.2

ラット反復経口投与毒性試験 [2.6.6.3.1.2 及び 2.6.6.3.2 項参照] 並びに受胎能及び初期胚発生に関する試験 [2.6.6.6.1.2 項参照] において，性周期異常 (発情間期の延長) が認められ，ナルデメジントシル酸塩が雌性ラットの性ホルモンに影響を及ぼす可能性が示唆された．

雌性ラットの性ホルモン変動に及ぼすナルデメジントシル酸塩の影響を予備的に調べるために，雌性 Sprague-Dawley 系ラット (各群 20 例) にナルデメジントシル酸塩を 0 (対照群) 及び 1000 mg/kg/日の用量で，1 日 1 回 16 日間反復経口投与した．対照群には媒体 (0.5 w/v% MC 水溶液) を投与した．また，正常な性周期 (4 日周期) を示す雌性ラットを選択し，発情後期に投与を開始した．各試験群は，2 つのサブグループ (10 例/サブグループ，サブグループ 1：投与 1 及び 9 日目の投与後 1，2 及び 4 時間並びに投与 2 日目の午前採血群，サブグループ 2：投与 3 日目の投与後 1，2 及び 4 時間採血群) に分けた．性周期の観察に加え，投与 1 及び 2 日目に血漿中プロラクチン，エストラジオール及びプロゲステロン濃度を測定し，投与 3 及び 9 日目に血漿中黄体形成ホルモン，卵胞刺激ホルモン，プロラクチン，エストラジオール及びプロゲステロン濃度を測定した．本試験は GLP 非適用下で実施した．

観察期間を通じて，死亡及び切迫殺例は発生せず，一般状態にも変化は認められなかった．1000 mg/kg/日投与群で投与期間中に体重が低値を示し，発情期回数の減少及び発情間期の延長の性周期の異常が 20 例中 8 例で認められた．

血漿中ホルモン濃度では，プロラクチン濃度が，1000 mg/kg/日投与群で，投与 1 日目の投与後 4 時間に対照群と比較して顕著な上昇を示した．また，プロゲステロン濃度が投与 1 日目の投与後 1 及び 2 時間並びに投与後 2 日目に上昇傾向を示した．一方，1000 mg/kg/日投与群で，プロラクチン濃度が投与 1 日目の投与後 1 時間及び 2 日目に，エストラジオール濃度が投与 1，2 及び 9 日目のすべての測定ポイントで，それぞれ減少傾向を示した．さらに，1000 mg/kg/日投与群で，卵胞刺激ホルモン濃度が投与 9 日目の投与後 2 及び 4 時間に上昇傾向を示した．しかしながら，これらエストラジオール及び卵胞刺激ホルモンの変動とナルデメジントシル酸塩投与の関連性は明確ではなかった．

以上の結果から，ナルデメジントシル酸塩の 1000 mg/kg/日投与により，性周期の異常が発現し，プロラクチン及びプロゲステロン濃度が上昇することが示された．黄体形成ホルモン，卵胞刺激ホルモン及びエストラジオール濃度に顕著な変動は，認められなかった．

2.6.6.8.3 ラット血漿中プロラクチン濃度への影響

評価資料 4.2.3.7-06
概要表 2.6.7.17.3

血漿中プロラクチン濃度が性周期の異常の原因である可能性が考えられたことから，血漿中プロラクチン濃度に及ぼすナルデメジントシル酸塩の影響を調べた．

Sprague-Dawley 系ラット (各群雌雄各 10 例) にナルデメジントシル酸塩を 0 (対照群), 1, 10, 100 及び 1000 mg/kg の用量で単回経口投与し，血漿中プロラクチン濃度に及ぼすナルデメジントシル酸塩の影響を調べた．雌は，正常な性周期を示す動物を選択し，発情後期にナルデメジントシル酸塩を単回投与した．対照群には媒体 (0.5 w/v% MC 水溶液) を投与した．血漿中プロラクチン濃度は，投与後 1，2，4，8 及び 24 時間に測定した．本試験は GLP 基準適用外，信頼性基準適用下で実施した．

観察期間を通じて，死亡及び切迫殺例はなく，一般状態に変化も認められなかった．雄では，いずれのナルデメジントシル酸塩投与群においても，プロラクチン濃度に明らかな変化はなかった．一方，10，100 及び 1000 mg/kg 投与群の雌では，投与 8 時間後にプロラクチン濃度が上昇したが (それぞれ 67.85，58.98 及び 66.13 ng/mL)，上昇の程度はほぼ同じであり，用量依存性は認められなかった．なお，1 mg/kg 投与群の雌及び対照群では，プロラクチン濃度の明らかな変動は認められなかった．

以上の結果より，ナルデメジントシル酸塩は，10 mg/kg 以上の単回投与で，雌ラットの血漿中プロラクチン濃度を上昇させることが明らかとなった．

2.6.6.8.4 不純物の細菌を用いる復帰突然変異試験

評価資料 4.2.3.7-02，4.2.3.7-03，4.2.3.7-04
参考資料 4.2.3.7-08，4.2.3.7-09，4.2.3.7-10，4.2.3.7-11，4.2.3.7-12，4.2.3.7-13
概要表 2.6.7.17.4，2.6.7.17.5，2.6.7.17.6，2.6.7.17.7，2.6.7.17.8，2.6.7.17.9

本項では，ICH M7 ガイドライン [1] に従い，ナルデメジントシル酸塩原薬の製造工程中で

発生する可能性がある潜在的不純物 (*不純物A，*不純物B，*不純物C，*不純物E，*不純物F，*不純物G，*不純物D，*不純物H，*不純物I，*不純物J，*不純物K及び*不純物Lの復帰突然変異試験について記載する．ICH M7 ガイドラインの Step 4 施行前に行ったいくつかの試験は，GLP 基準適用外として実施した．

*不純物A，*不純物B 及び *不純物C の復帰突然変異誘発性を評価するため，ネズミチフス菌 (TA98，TA100，TA1535 及び TA1537) 並びに大腸菌 (WP2*uvrA*) の 5 菌株を用いて，S9 mix の有無の条件下でプレート法により復帰突然変異試験を実施した．陰性対照にはDMSO を用いた．最高用量は 5000 µg/plate 若しくは細胞毒性 (細菌の増殖阻害) が認められる用量を設定した．

S9 mix 存在下条件における TA1535 の 20.6 µg/プレートの*不純物A 処理を除き，すべての菌株において，S9 mix の有無にかかわらず，いずれの用量においても，*不純物A，*不純物B 及び *不純物C は，陰性対照値の 2 倍以上の復帰変異コロニー数を示さなかった．なお，上述した20.6 µg/プレートの*不純物A処理で陰性対照値と比較して復帰変異コロニー数が 2 倍増加したが，その平均値（14コロニー/プレート) は，背景値の範囲内 (20 コロニー/プレート，陰性対照の平均値 + 3 SD)であり，用量依存性は認められなかったことから陰性と判断した．

*不純物E 及び*不純物F の復帰突然変異誘発性を評価するため，上述の 5 菌株を用いて，同様の条件下でプレインキュベーション法により復帰突然変異試験を実施した．これらの試験は労働安全衛生法 GLP 基準適用下で実施した．

いずれの条件においても，*不純物E 及び *不純物F は，陰性対照値の2 倍以上の復帰変異コロニー数を示さなかった．

*不純物G，*不純物A，*不純物D，*不純物H，*不純物I，*不純物J 及び *不純物Kの復帰突然変異誘発性を評価するため，上述した同じ 5 菌株を用いて，同様の条件下でプレインキュベーション法により復帰突然変異試験を実施した．これらの試験は信頼性基準適用下で実施した．

いずれの条件においても，*不純物G，*不純物A，*不純物H，*不純物I，*不純物J 及び *不純物K は，陰性対照値の 2 倍以上の復帰変異コロニー数を示さなかった．しかしながら，*不純物D は，すべての菌株において，S9 mix の有無にかかわらず，陰性対照値の2 倍以上の復帰変異コロニー数を示した．

*不純物L の復帰突然変異誘発性を予備的に評価するため，上述した 5 菌株を用いて，同様の条件下でプレインキュベーション法により復帰突然変異予備試験を実施した．本試験はGLP 適用外試験として実施した．

いずれの条件においても，*不純物L は，陰性対照値の 2 倍以上の復帰変異コロニー数を示さなかった．

以上の結果から，細菌を用いる突然変異誘発試験で，*不純物D は陽性，*不純物A，*不純物B，*不純物C，*不純物E，*不純物F，*不純物G，*不純物H，*不純物I，*不純物J，*不純物K 及び*不純物Lは陰性と判断した．

2.6.6.8.5 ヘアレスマウス皮膚光毒性試験

評価資料 4.2.3.7-05
参考資料 4.2.3.7-14
概要表 2.6.7.17.10，2.6.7.17.11

概要表 2.6.7.17.10 に示すマウス皮膚光毒性予備試験の結果に基づき，本試験の投与量及び紫外線 (UV) 照射時間を設定した．

雌性 Hos:HR-1 系マウス (UV 照射及び非照射の対照群並びに UV 非照射のナルデメジントシル酸塩投与群：各群 5 例，UV 照射のナルデメジントシル酸塩投与群：各群 10 例) にナルデメジントシル酸塩を 0 (対照群)，30 及び 300 mg/kg/日の用量で単回経口投与し，皮膚光毒性を評価した．対照群には媒体 (0.5 w/v% MC 水溶液) を投与した．また，ナルデメジンの TK 評価のため，別の雌性マウス (対照群 : 5 例，各ナルデメジントシル酸塩投与群 : 20 例) にナルデメジントシル酸塩を 0 (対照群)，30 及び 300 mg/kg/日の用量で単回経口投与した．UV (UV 照射量：10 J/cm^2，波長範囲：290～400 nm) の照射は，ナルデメジントシル酸塩の最高血漿中濃度到達時間 (T_{max}) 付近である投与 30 分後から約 1 時間行った．UV 照射終了後，肉眼的観察及び触診によって，各動物の皮膚状態を評価した．投与後 1，3，6 及び 24 時間に採取した血漿試料を用い，血漿中ナルデメジン濃度を測定した．

観察期間を通じて，死亡及び切迫殺例は発生せず，体重及び一般状態に，ナルデメジントシル酸塩に起因した変化は認められなかった．また，全ナルデメジントシル酸塩投与群において，皮膚光毒性を示唆する所見は認められなかった．

血漿中ナルデメジンの曝露量 (C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24hr}$) は，用量の増加に伴って増大し，T_{max} は 1 時間であった (表 2.6.6.8-1)．また，30 から 300 mg/kg まで血漿中 C_{max} は用量比以下で増大し，血漿中 $AUC_{0\text{-}24hr}$ は用量比以上に増大した．

以上の結果から，ナルデメジントシル酸塩はヘアレスマウスに対して皮膚光毒性を惹起しないと判断した．

表 2.6.6.8-1 ヘアレスマウス皮膚光毒性試験における TK パラメータ

測定物質	TK パラメータ	投与量 (mg/kg/日)	
		雌	
		30	300
ナルデメジン	C_{max} (μg/mL)	4.40	30.4
	$AUC_{0\text{-}24hr}$ (μg·hr/mL)	9.73	163
	T_{max} (hr)	1.0	1.0

時点採血における血漿中濃度の平均値 (n = 5) を用いて算出.

2.6.6.8.6 ラット薬物弁別試験

評価資料 4.2.3.7-15
参考資料 4.2.3.7-18
概要表 2.6.7.17.12，2.6.7.17.13

2.6.6.8.6.1 用量設定根拠

概要表 2.6.7.17.12 に示すように用量設定試験を実施し，ラット薬物弁別試験の投与量を選択するための情報を得た．雄性 Long-Evans 系ラット (各群 3 例) に，0.5 w/v% MC 水溶液に懸濁したナルデメジントシル酸塩 (投与量：0.003，0.01，0.03，0.1，0.3 及び 1 mg/kg) を単回経口投与し，投与後 5，15，30，60 及び 120 分における血漿中ナルデメジン及び nor-ナルデメジン濃度を測定した．

表 2.6.6.8-2 に示すように，ナルデメジンの C_{max} は用量にほぼ比例して増大し，0.003，0.01，0.03，0.1 及び 0.3 mg/kg 投与群の C_{max} 値は投与後 30 分に得られ，1 mg/kg 投与群の C_{max} 値は投与後 15 分に得られた．また，0.03，0.1，0.3 及び 1 mg/kg で，nor-ナルデメジンの曝露が認められ，その C_{max} は用量にほぼ比例して増大した．いずれの個体においても投与開始前から投与後 120 分までの一般症状に影響はなかった．

表 2.6.6.8-2　薬物弁別試験の用量設定試験におけるナルデメジントシル酸塩投与後の血漿中ナルデメジン及び nor-ナルデメジン濃度

投与量 (mg/kg)	C_{max} (ng/mL)		予定臨床用量との血中濃度比	
	ナルデメジン	Nor-ナルデメジン	ナルデメジン [(a)]	Nor-ナルデメジン [(b)]
0.003	0.150	N.C.	0.075	–
0.01	0.521	N.C.	0.260	–
0.03	1.69	0.0545	0.85	0.4
0.1	5.77	0.240	2.9	1.6
0.3	15.2	0.610	7.6	4.2
1	58.2	2.90	29.1	19.9

平均値 (n = 3).
N.C.：定量限界未満 (< 0.04 ng/mL) のため計算せず.
(a)：予定臨床用量 (0.2 mg/日) におけるナルデメジンの C_{max} 値 (2 ng/mL) [2.7.2.2.2.6 項参照] に対するナルデメジンの C_{max} 値の比.
(b)：予定臨床用量 (0.2 mg/日) における nor-ナルデメジンの C_{max} 値 (0.146 ng/mL) [2.7.2.3.3 項参照] に対する nor-ナルデメジンの C_{max} 値の比.
データは参考資料 4.2.3.7-18 から引用.

これらの成績より，0.03 mg/kg におけるナルデメジンの C_{max} 値 (1.69 ng/mL) が，ナルデメジントシル酸塩の予定臨床用量 (0.2 mg/日) における値 (2 ng/mL) [2.7.2.2.2.6 項参照] とほぼ同程度であったことから，ラット薬物弁別試験における最低用量として，0.03 mg/kg を設定した．また，より高い用量として，予定臨床用量 (0.2 mg/日) におけるナルデメジンの C_{max} 値のそれぞれ 2.9 及び 7.6 倍の C_{max} 値が得られた 0.1 及び 0.3 mg/kg を設定した．さらに，0.1 及び 0.3 mg/kg における nor-ナルデメジンの C_{max} 値 (それぞれ 0.240 及び 0.610 ng/mL) は，ナルデメジントシル酸塩の予定臨床用量 (0.2 mg/日) における nor-ナルデメジンの C_{max} 値 (0.146 ng/mL) [2.7.2.3.3

項参照] を上回ることが期待された.

2.6.6.8.6.2 試験方法及び成績

ナルデメジントシル酸塩のモルヒネ様弁別刺激効果を評価するために，2 レバー選択法による薬物弁別試験を実施した．モルヒネと生理食塩液の弁別を獲得した雄性 Long-Evans 系ラットを用いて，μ オピオイド受容体作動薬であるモルヒネからナルデメジントシル酸塩への般化の有無を調べた.

般化試験の実施に先立ち，餌強化によるレバー押し行動を獲得した動物に対して，モルヒネ (投与量 : 3 mg/kg) と生理食塩液の弁別訓練を実施した．訓練セッション (15 分) の頻度は 1 日 1 回に制限し，モルヒネ (D) 又は生理食塩液 (V) を，二重交代投与法の投与スケジュール (例：V, V, D, D, V, V, D, D, …) で，各訓練セッション 30 分前に腹腔内投与した．訓練セッションの餌強化スケジュールは，定率 1 [1 回の正レバー押しに対して，錠剤型飼料 (45 mg) 1 個が与えられる] で開始し，定率 10 (連続 10 回の正レバー押しに対して，錠剤型飼料 1 個が与えられる) まで徐々に増加させた．定率 10 の条件下，少なくとも連続 5 日間，動物が 1 セッションで 20 個の錠剤型飼料を獲得し，かつ，最初の錠剤型飼料を獲得するまでのレバー押し回数及び 20 個の錠剤型飼料を獲得するまでの正レバー押し回数が総レバー押し回数の 80%以上であった場合，動物がモルヒネと生理食塩液を弁別したと判断した.

最初に，般化試験実施の基準を満たした 33 匹の動物を用い，モルヒネ (投与量 : 3 mg/kg) の般化試験を実施し，80%以上のモルヒネ側のレバー押し回数を示した 15 匹の動物を得た．これらの動物を用い，ナルデメジントシル酸塩 (投与量 : 0.03，0.1 及び 0.3 mg/kg) 又はモルヒネ (投与量 : 1 及び 0.3 mg/kg) の般化試験を継続した．各般化試験セッションの 30 分前に，0.5 w/v% MC 水溶液に懸濁したナルデメジントシル酸塩を経口投与，又は生理食塩液に溶解したモルヒネを腹腔内投与した．なお，各用量における般化試験は，少なくとも 3 セッション連続で，動物がモルヒネと生理食塩液の弁別を獲得していること (般化試験実施の基準) を確認した後に実施し，いずれか一方のレバー押し回数が 10 回に達した時点で，錠剤型飼料を与えずに終了とした．総レバー押し回数に対するモルヒネ側のレバー押し回数の割合が，80%以上であった場合，ナルデメジントシル酸塩は，モルヒネに対して般化したと判定 (般化基準) した.

ナルデメジントシル酸塩の 0.03，0.1 及び 0.3 mg/kg における般化試験で，総レバー押し回数に対するモルヒネ側レバー押し回数の割合は，それぞれ 3.2%，19.3%及び 29.8%であった (各群 8 例)．これらの結果から，ナルデメジントシル酸塩はいずれの用量においても，モルヒネからナルデメジントシル酸塩への般化基準を満たさないことが示された．一方，モルヒネの 0.3，1 及び 3 mg/kg における般化試験では，総レバー押し回数に対するモルヒネ側レバー押し回数の割合は，それぞれ 32.6%，43.1%及び 94.3%であった (各群それぞれ 8，8 及び 15 例)．なお，ナルデメジントシル酸塩及びモルヒネのいずれの用量においても，レバー押し頻度の低下は認められず，評価に影響を及ぼすようなレバー押し行動の抑制は認められなかった.

以上の結果から，ナルデメジントシル酸塩は，本試験条件下では，モルヒネ様弁別刺激効果は示さないと結論した.

2.6.6.8.7 サル自己投与試験

評価資料 4.2.3.7-16
参考資料 4.2.3.7-19
概要表 2.6.7.17.12，2.6.7.17.14

2.6.6.8.7.1 用量設定根拠

概要表 2.6.7.17.12 に示すように用量設定試験を実施し，サル静脈内自己投与試験の投与量を選択するための情報を得た．雄性アカゲザル (各群 2 例) に，2.5 v/v% DMSO 及び 2 v/v% Tween 80 含有生理食塩液に溶解したナルデメジントシル酸塩 (投与量：0.1，1 及び 10 µg/kg/注入，約 0.1 mL/sec の速度) を単回静脈内投与し，投与後 5，15，30，60 及び 120 分における血漿中ナルデメジン及び nor-ナルデメジン濃度を測定した．

表 2.6.6.8-3 に示すように，ナルデメジンの C_{max} は用量に比例して増大し，いずれの投与群の C_{max} 値も投与後 5 分に得られた．また，1 及び 10 µg/kg/注入投与群では，nor-ナルデメジンの曝露が認められ，その C_{max} 値は投与後 60 分に得られた．いずれの個体においても，投与後 120 分までの一般症状に影響はなかった．

表 2.6.6.8-3 自己投与試験の用量設定試験におけるナルデメジントシル酸塩投与後の血漿中ナルデメジン及び nor-ナルデメジン濃度

投与量 (µg/kg/注入)	C_{max} (ng/mL)		予定臨床用量との血中濃度比	
	ナルデメジン	Nor-ナルデメジン	ナルデメジン [(a)]	Nor-ナルデメジン [(b)]
0.1	0.534	N.C.	0.27	–
1	5.45	0.0672	2.7	0.5
10	54.1	0.918	27	6.3

平均値 (n = 2).
N.C.：定量限界未満 (< 0.04 ng/mL) のため計算せず.
(a)：予定臨床用量 (0.2 mg/日) におけるナルデメジンの C_{max} 値 (2 ng/mL) [2.7.2.2.2.6 項参照] に対するナルデメジンの C_{max} 値の比.
(b)：予定臨床用量 (0.2 mg/日) における nor-ナルデメジンの C_{max} 値 (0.146 ng/mL) [2.7.2.3.3 項参照] に対する nor-ナルデメジンの C_{max} 値の比.
データは参考資料 4.2.3.7-19 から引用.

これらの成績より，サルの静脈内自己投与試験の用量は，単回又は数回の自己投与によって，ナルデメジントシル酸塩の予定臨床用量 (0.2 mg/日) における C_{max} 値 (2 ng/mL) [2.7.2.2.2.6 項参照] を上回る用量として，0.03，0.1，0.3，1，3 及び 10 µg/kg/注入を設定した．また，1，3 及び 10 µg/kg/注入の単回又は数回の自己投与による nor-ナルデメジンの C_{max} は，ナルデメジントシル酸塩の予定臨床用量 (0.2 mg/日) における C_{max} 値 (0.146 ng/mL) [2.7.2.3.3 項参照] を上回ることも期待された．

2.6.6.8.7.2 試験方法及び成績

ナルデメジントシル酸塩の強化効果を検討するために，コカイン，ペンタゾシン，コデイン及び/又はペントバルビタールの投与実績のある 4 例の雌雄アカゲザルを用いて，2 及び 24 時間静脈内自己投与試験を実施した．自己投与は，頸静脈又は大腿静脈に留置したカテーテルより

0.25 mL/kg/注入で薬液を持続注入することにより実施した．また，薬液は 5 回のレバー押しに対して 1 回注入されるように設定した (定率 5).

2 時間静脈内自己投与試験では，陽性対照であるコデイン (投与量：0.06 mg/kg/注入) の自己投与回数が 3 日間連続で 11 回以上，媒体 (2.5 v/v% DMSO 及び 10 v/v%ポリエチレングリコール 400 含有生理食塩液) の自己投与回数が 3 日間連続で 10 回以下であった動物に，ナルデメジントシル酸塩 (投与量：10，3，1，0.3，0.1 及び 0.03 µg/kg/注入) を，高用量から順に各群 4 日間ずつ，1 日 2 時間自己投与させた．各用量，投与初日を除く 3 日間の投与回数を解析した．その結果，コデイン，媒体及びナルデメジントシル酸塩の 1 日あたりの自己投与回数は，それぞれ 20 回，2.7～5.7 回及び 0～6 回であり，ナルデメジントシル酸塩及び媒体の自己投与回数は同程度であった．また，ナルデメジントシル酸塩の自己投与期間中，いずれの動物においても，レバー押し行動を抑制するような一般状態変化は認められなかった．これらの結果から，24 時間静脈内自己投与試験では，1，3 及び 10 µg/kg/注入の用量を設定した．

24 時間静脈内自己投与試験では，陽性対照であるコデイン (投与量: 0.06 mg/kg/注入) の自己投与回数が 3 日間連続で 11 回以上，媒体 (2.5 v/v% DMSO 及び 10 v/v%ポリエチレングリコール 400 含有生理食塩液) の自己投与回数が 7 日間連続で 10 回以下であった動物に，ナルデメジントシル酸塩 (投与量：10，3 及び 1 µg/kg/注入) を，高用量から順に各群 2～3 週間ずつ，24 時間自己投与させた．各用量，全投与期間の投与回数を解析した．その結果，コデイン，媒体及びナルデメジントシル酸塩の 1 日あたりの自己投与回数は，それぞれ 19.7 回，0.6～5.9 回及び 0～3.2 回であり，ナルデメジントシル酸塩及び媒体の自己投与回数は同程度であった．ナルデメジントシル酸塩は, いずれの用量においても, 強化効果判定基準 (24 時間自己投与期間中，少なくとも 5 日間連続で 11 回以上自己投与する動物が，いずれかの用量で 1 例でも認められた場合，強化効果ありと判定) を満たさなかった．なお，ナルデメジントシル酸塩の自己投与期間中，いずれの動物においても，レバー押し行動を抑制するような一般状態変化は認められなかった．

以上の結果から，ナルデメジントシル酸塩は，本試験条件下では，アカゲザルにおいて静脈内自己投与による強化効果を示さないと結論した．

2.6.6.8.8 ラット身体依存性試験

評価資料 4.2.3.7-17
参考資料 4.2.3.7-20
概要表 2.6.7.17.12，2.6.7.17.15

2.6.6.8.8.1 用量設定根拠

概要表 2.6.7.17.12 に示すように用量設定試験を実施し，ラット身体依存性試験の投与量を選択するための情報を得た．雄性 Sprague-Dawley 系ラット (各群 3 例) に，0.5 w/v% MC 水溶液に懸濁したナルデメジントシル酸塩 [投与量：20 (10 × 2)，60 (30 × 2) 及び 200 (100 × 2) mg/kg] を約 10 時間間隔で 2 回経口投与し，初回投与後 1，10 (2 回目投与直前) 及び 24 時間における血漿中ナルデメジン及び nor-ナルデメジン濃度を測定した．

表 2.6.6.8-4 に示すように, ナルデメジンの C_{max} は, 用量にほぼ比例して増大し, 20～200 mg/kg

の初回投与後 24 時間でもナルデメジンの曝露が認められた．また，いずれの用量においても nor-ナルデメジンの曝露が認められ，その C_{max} は用量にほぼ比例して増大した．いずれの個体においても，初回投与後 24 時間までの一般症状に影響はなかった．

これらの成績より，60 及び 200 mg/kg/日におけるナルデメジン及び nor-ナルデメジンの投与後 24 時間の血漿中濃度 (C_{24hr}) が，ナルデメジントシル酸塩の予定臨床用量 (0.2 mg/日) におけるナルデメジン及び nor-ナルデメジンの C_{max} 値 (それぞれ 2 及び 0.146 ng/mL) [2.7.2.2.2.6 項及び 2.7.2.3.3 項参照] を上回ることが期待されたことから，ラット身体依存性試験の用量として，60 (30 × 2) 及び 200 (100 × 2) mg/kg/日を設定した．

表 2.6.6.8-4 身体依存性試験の用量設定試験におけるナルデメジントシル酸塩投与後の血漿中ナルデメジン及び nor-ナルデメジン濃度

投与量 (mg/kg)	血漿中濃度 (ng/mL)				予定臨床用量との血中濃度比			
	ナルデメジン		Nor-ナルデメジン		ナルデメジン [(a)]		Nor-ナルデメジン [(b)]	
	C_{max}	C_{24hr} [(c)]	C_{max}	C_{24hr} [(c)]	C_{max}	C_{24hr} [(c)]	C_{max}	C_{24hr} [(c)]
20	712	0.886	50.3	1.08	356	0.44	345	7.40
60	2290	2.44	232	2.45	1145	1.22	1589	16.78
200	8230	193	507	5.39	4115	96.5	3473	36.92

平均値 (n = 3).
(a) : 予定臨床用量 (0.2 mg/日) におけるナルデメジンの C_{max} 値 (2 ng/mL) [2.7.2.2.2.6 項参照] に対するナルデメジンの C_{max} 値又は C_{24hr} 値の比.
(b): 予定臨床用量 (0.2 mg/日) における nor-ナルデメジンの C_{max} 値 (0.146 ng/mL) [2.7.2.3.3 項参照] に対する nor-ナルデメジンの C_{max} 値又は C_{24hr} 値の比.
(c) : 初回投与後 24 時間の値.
データは参考資料 4.2.3.7-20 から引用.

2.6.6.8.8.2 試験方法及び成績

ラットにおけるナルデメジントシル酸塩の身体依存形成能を検討した．雄性 Sprague-Dawley 系ラット (各群 10 例) に，媒体 (0.5 w/v% MC 水溶液) 又はナルデメジントシル酸塩 [投与量：60 (30 × 2) 及び 200 (100 × 2) mg/kg/日] を，約 10 時間間隔で 1 日 2 回 28 日間反復経口投与した．また，陽性対照として，モルヒネ (投与量：30 mg/kg/日) を，1 日 1 回 28 日間反復経口投与した．28 日間の反復投与期間後に 7 日間の休薬期間を設け，退薬症候発現の有無を検討し，ナルデメジントシル酸塩の身体依存形成能を評価した．投与期間中，一般状態観察，体重及び摂餌量を調べた．休薬期間中，退薬症候の指標として，FOB 観察項目を含む一般状態，体重，体重増加率及び摂餌量を調べた．また，全身曝露を検討するために，サテライト動物を用いて(各群 10 例)，投与 1 及び 28 日目に血漿中ナルデメジン及び nor-ナルデメジン濃度を測定した．

ナルデメジントシル酸塩 60 及び 200 mg/kg/日投与群は，投与 4 日後より投与期間を通じ，媒体対照群と比較して統計学的有意な摂餌量の減少又は減少傾向及び体重増加抑制が認められたが，投与期間中に投与起因性と考えられる一般状態の変化は認められなかった．休薬後 1～4 日目には，ナルデメジントシル酸塩 60 及び 200 mg/kg/日投与群で，それぞれ 5 及び 9 例に筋緊張の亢進が認められた．しかしながら，身体依存形成能を有する薬物における典型的な退薬症候

である休薬時の一過性の体重減少，体重増加抑制及び摂餌量の減少，その他の一般状態変化はいずれも観察されなかった．したがって，休薬期間中にみられた筋緊張の亢進は，ナルデメジントシル酸塩の身体依存形成能を示唆する退薬症候ではないと考えられる．モルヒネ投与群では，投与期間中に動作緩慢が 6 例に観察され，統計学的に有意な摂餌量の減少及び体重増加抑制が認められた．休薬期間中には，明らかな退薬症候として，ハンドリング時の反応性亢進，軟便，立毛及び筋緊張の亢進が観察され，一過性の体重減少，体重増加抑制及び摂餌量の減少も認められた．

表 2.6.6.8-5 に示すように，60 及び 200 mg/kg/日における血漿中ナルデメジン及び nor-ナルデメジン濃度は，用量にほぼ比例して増大した．投与 1 並びに 28 日目におけるナルデメジン及び nor-ナルデメジンの C_{max} 並びに C_{24hr} 値は，ナルデメジントシル酸塩の予定臨床用量 (0.2 mg/日) におけるナルデメジン及び nor-ナルデメジンの C_{max} 値 (それぞれ 2 及び 0.146 ng/mL) [2.7.2.2.2.6 項及び 2.7.2.3.3 項参照] を上回っていることが確認された．

表 2.6.6.8-5 身体依存性試験におけるナルデメジントシル酸塩投与後の血漿中ナルデメジン及び nor-ナルデメジン濃度

投与量 (mg/kg/日)	血漿中濃度 (ng/mL)				予定臨床用量との血中濃度比			
	ナルデメジン		Nor-ナルデメジン		ナルデメジン [(a)]		Nor-ナルデメジン [(b)]	
	C_{max}	C_{24hr} [(c)]	C_{max}	C_{24hr} [(c)]	C_{max}	C_{24hr} [(c)]	C_{max}	C_{24hr} [(c)]
1 日目								
60	2160	3.06	148	2.16	1080	1.53	1014	14.79
200	6560	6.19	527	3.94	3280	3.10	3610	26.97
28 日目								
60	3890	6.71	174	3.36	1945	3.36	1192	23.01
200	8650	18.9	421	6.87	4325	9.45	2883	47.05

平均値 (n = 10).
(a)：予定臨床用量 (0.2 mg/日) におけるナルデメジンの C_{max} 値 (2 ng/mL) [2.7.2.2.2.6 項参照] に対するナルデメジンの C_{max} 値又は C_{24hr} 値の比.
(b)：予定臨床用量 (0.2 mg/日) における nor-ナルデメジンの C_{max} 値 (0.146 ng/mL) [2.7.2.3.3 項参照] に対する nor-ナルデメジンの C_{max} 値又は C_{24hr} 値の比.
(c)：初回投与後 24 時間の値.
データは評価資料 4.2.3.7-17 から引用.

以上の結果から，ナルデメジントシル酸塩は，本試験条件下では退薬症候は発現させず，身体依存形成能を示さないと結論した．

2.6.6.8.9 退薬症候の発現リスクの検討

2.6.6.8.9.1 モルヒネ依存マウスにおけるナルデメジントシル酸塩，メチルナルトレキソン及びナロキソンで誘発される退薬症候

評価資料 4.2.3.7-21
概要表 2.6.7.17.16

モルヒネ依存マウスにおけるナルデメジントシル酸塩で誘発される末梢性及び中枢性退薬症候を検討し，参照物質であるメチルナルトレキソン及びナロキソンで誘発されるそれらと比較した．雄性 C57BL/6N 系マウス (各群 12～13 例) にモルヒネ (投与量 : 25 mg/kg) 又は生理食塩液を，1 日 5 回 4 日連続皮下投与した．モルヒネ又は生理食塩液の 5 日目の最終投与後 3 時間に，ナルデメジントシル酸塩 (投与量 : 0.01，0.1，1 及び 10 mg/kg) 又は媒体 (0.5 w/v% MC 水溶液) を経口投与，あるいはメチルナルトレキソン (投与量 : 0.01，0.1，1 及び 10 mg/kg)，ナロキソン (投与量 : 0.1 mg/kg) 又は媒体 (5%キシリトール又は生理食塩液) を皮下投与した．ナルデメジントシル酸塩，メチルナルトレキソン又はナロキソン投与直後より 30 分間，末梢性及び中枢性退薬症候の指標として，それぞれ急性下痢症状及び跳躍行動を発現する動物数を計測し，発現率を解析した．

ナルデメジントシル酸塩は, 1 及び 10 mg/kg で下痢症状を呈する動物数を有意に増加させた．メチルナルトレキソンは，10 mg/kg ですべての動物に下痢症状を発現させた．ナルデメジントシル酸塩投与によって，マウスはいずれの用量でも跳躍行動を示さなかった．メチルナルトレキソン投与によって，10 mg/kg で 13 例中 3 例のマウスに跳躍行動がみられたが，跳躍行動の発現率の増加は媒体投与群と比較して有意ではなかった．一方，ナロキソンは下痢及び跳躍行動の発現率を有意に増加させた．ナルデメジントシル酸塩の跳躍行動に対する 50%有効量 (ED_{50}) 値は求めることができず，メチルナルトレキソンの跳躍行動に対する ED_{50} 値は 10 mg/kg 以上と推定された．一方，ナルデメジントシル酸塩及びメチルナルトレキソンの下痢症状に対する ED_{50} 値は，それぞれ 1.07 mg/kg 及び 1～10 mg/kg の範囲内であった．これらの結果から，投与後 30 分間で評価した場合，ナルデメジントシル酸塩は，メチルナルトレキソンと同様に末梢性のオピオイド受容体拮抗薬の特徴を持つと考えられた．

2.6.6.8.9.2 モルヒネ依存ラットにおけるナルデメジントシル酸塩及びナロキソンで誘発される退薬症候

評価資料 4.2.3.7-22
概要表 2.6.7.17.17

モルヒネ依存ラットにおけるナルデメジントシル酸塩及びナロキソンで誘発される末梢性及び中枢性退薬症候を検討した．モルヒネ依存ラットは，モルヒネを 0.25 mg/hr の注入速度で持続投与する浸透圧ポンプを，イソフルラン吸入麻酔下で雄性 Wistar 系ラット (各群 8 例) の背部皮下に埋め込むことによって作製した．浸透圧ポンプ埋め込み 5 日後に，ナルデメジントシル酸塩 (投与量 : 0.01，0.03，0.1，0.3，1 及び 3 mg/kg) 又は媒体 (0.5 w/v% MC 水溶液) を経口投与，あるいはナロキソン (投与量 : 0.1 mg/kg) 又は媒体 (生理食塩液) を皮下投与した．ナルデメジントシル酸塩投与直後並びに投与後 1，2，4，6 及び 8 時間に，ナロキソン投与直後並び

に投与 1，2 及び 4 時間後に，末梢性退薬症候 (下痢) 並びに中枢性退薬症候 (跳躍行動，身震い行動及び歯をカタカタ鳴らす行動) の発現をそれぞれ 20 分間観察した．観察時間中の跳躍行動及び身震い行動の発現回数を測定すると共に，下痢及び歯をカタカタ鳴らす行動については，スコア化 (0：正常，1：軽度～中等度，2：顕著) した．また，投与前と比較した投与 4 又は 8 時間後の体重減少も末梢性退薬症候の指標とした．

ナルデメジントシル酸塩は，いずれの用量でもモルヒネ依存ラットにおいて跳躍行動及び身震い行動を発現させなかった．しかし，3 mg/kg 投与群の投与後 1，4 及び 8 時間に，歯をカタカタ鳴らす行動発現スコアを増加させた．ナルデメジントシル酸塩は，0.03 mg/kg 以上で下痢を発現させた個体が認められ，1 mg/kg 投与群の投与後 2 時間後及び 3 mg/kg 投与群の投与後 1 時間に，下痢発現スコアを統計学的有意に増加させた．また，0.3 mg/kg 以上で，投与後 8 時間に有意な体重減少が認められた．一方，ナロキソンは，投与直後から跳躍行動，身震い行動，歯をカタカタ鳴らす行動及び下痢を発現させた．これらの退薬症候は，投与後 2 時間にはほとんど観察されなくなった．また，ナロキソン投与後 4 時間に体重減少も認められた．以上の成績から，本試験条件下のモルヒネ依存ラットにおいて，ナルデメジントシル酸塩は，0.3 mg/kg 以上で末梢性退薬症候 (下痢及び体重減少) を，3 mg/kg 以上で中枢性退薬症候 (歯をカタカタ鳴らす行動) を発現させることが明らかとなった．

2.6.6.9 考察及び結論

ナルデメジントシル酸塩の安全性を評価するため，単回及び反復投与毒性試験，遺伝毒性試験，がん原性試験，生殖発生毒性試験，免疫毒性試験，皮膚光毒性試験，ラットにおける性周期異常の発生機序を解明するための予備試験，並びに不純物の変異原性の評価を行うために，類縁物質の復帰突然変異試験を実施した．また，ナルデメジントシル酸塩は臨床で錠剤として経口投与されるため，その局所刺激性の評価は必須ではないが，製造時における作業者の安全の観点から，ウサギ皮膚及び眼粘膜刺激性試験を実施した．なお，ナルデメジンはナルトレキソンの誘導体である．ナルトレキソン及びその塩類自体は国内での規制対象物質ではないが，米国における承認申請にあたり，米国食品医薬品局 (FDA) から，その誘導体についての非臨床依存性評価が求められた．このことから，ナルデメジントシル酸塩の依存性について検討するために，薬物弁別試験，自己投与試験及び身体依存性試験を実施した．さらに，モルヒネ依存マウス及びラットを用いた退薬症候の発現リスクの検討も実施した．

単回投与毒性試験でのラット及びイヌにおける概略の致死量は，それぞれ 2000 mg/kg (C_{max}：33.78 μg/mL，$AUC_{0\text{-}24hr}$：193.44 μg·hr/mL) を超える量及び 1000 mg/kg (C_{max}：62.30 μg/mL，$AUC_{0\text{-}24hr}$：244.18 μg·hr/mL) を超える量と判断した．また，単回投与毒性試験で認められた所見は，ラットに 500 mg/kg 以上を投与した際の体重の増加抑制及び減少と，イヌに 200 mg/kg 以上を投与した際の用量に関連した嘔吐あるいは吐物発現頻度の増加，血漿中 ALP 活性の上昇及び総ビリルビン値の増加であった．ラットにナルデメジントシル酸塩を 500 mg/kg の用量で投与した際の血漿中ナルデメジンの C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24hr}$ は，それぞれ 25.33 μg/mL 及び 86.19 μg·hr/mL であり，予定臨床用量 (0.2 mg/日) での血漿中ナルデメジンの C_{max} 及び台形法により算出した投与間隔 τ における血漿中濃度–時間曲線下面積 ($AUC_{0\text{-}\tau}$) 値 (それぞれ 0.002 μg/mL 及び 0.01694 μg·hr/mL) [2.7.2.2.2.6 項参照] と比較して，それぞれ 12665 倍及び 5088 倍であった．同様に，イヌに 200 mg/kg の用量で投与した際の C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24hr}$ は，それぞれ 40.70 μg/mL 及び 194.37 μg·hr/mL であり，曝露比は，予定臨床用量のそれぞれ 20350 倍及び 11474 倍であった．ラット及びイヌ単回経口投与毒性試験で認められた所見は軽度であり，影響が認められた用量における曝露は予定臨床用量での曝露と比較して非常に高いことから，ヒトで偶発的に過量投与された場合でも，ナルデメジントシル酸塩に起因した重篤な有害事象が起こるリスクは極めて低いと考えられる．

反復投与毒性試験で認められた最も重要な毒性所見は，イヌにおける血漿中 AST 又は ALT 活性の上昇を伴う軽度な肝細胞の単細胞壊死であり，その他の主な毒性所見は，ラットにおける体重増加抑制であった．また，ナルデメジントシル酸塩に起因する所見として，雌性ラットにおいて性周期の異常が認められた．ラット及びイヌ反復投与毒性試験で認められた所見の概要を表 2.6.6.9-1 に記載し，各試験における血漿中曝露量 (C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24hr}$) 並びに予定臨床用量における血漿中曝露量との比を表 2.6.6.9-2 に記載した．

表 2.6.6.9-1　反復投与毒性試験における主な毒性所見

動物種	投与期間	投与経路	投与量 [(a)] (mg/kg/日)	主な毒性所見
ラット	1 ヵ月	経口	30,　100,　<u>1000</u>	毒性学的に意義のある変化はなし (ただし，雌の全投与群で性周期の異常が認められた)
	6 ヵ月	経口	10，<u>100</u>，1000	1000 mg/kg/日：体重増加抑制
イヌ	1 ヵ月	経口	1，3，<u>10</u>，50	50 mg/kg/日：嘔吐，ALT 及び ALP 活性の上昇，総コレステロール値の増加，軽度な肝細胞の単細胞壊死
	3 ヵ月	経口	1，<u>5</u>，30	30 mg/kg/日：ALT，GGT 及び ALP 活性の上昇，総コレステロール値の増加，軽度な肝細胞の単細胞壊死
	9 ヵ月	経口	1，<u>4</u>，20	20 mg/kg/日：ALT，GGT 及び ALP 活性の上昇，総コレステロール値の増加，軽度な肝細胞の単細胞壊死

(a)：下線は無毒性量を示す.

表 2.6.6.9-2　ナルデメジントシル酸塩の経口投与による血漿中曝露量及び臨床との曝露比

動物種 (投与期間)	投与量 (mg/kg/day)	性別	C_{max} (μg/mL)		$AUC_{0\text{-}24hr}$ (μg·hr/mL)		曝露比	
			投与 開始日	投与 最終日	投与 開始日	投与 最終日	C_{max} [(a)]	$AUC_{0\text{-}24hr}$ [(b)]
ラット (1 ヵ月 [追加])	0.3	雌	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	–	–
	1	雌	0.05	0.10	0.10	0.20	50	12
	3	雌	0.17	0.46	0.54	0.87	230	51
	10	雌	0.74	1.91	2.28	3.04	955	179
ラット (1 ヵ月)	30	雄	3.17	3.71	7.84	11.32	1855	668
		雌	3.73	4.26	9.22	10.60	2130	626
	100	雄	10.78	12.53	36.27	61.79	6265	3648
		雌	12.85	10.58	41.97	36.44	5290	2151
	1000 (無毒性量)	雄	32.03	48.68	281.18	524.43	24340	30958
		雌	28.20	42.38	204.14	286.63	21190	16920
ラット (6 ヵ月)	10	雄	0.761	1.93	3.43	6.51	965	384
		雌	0.988	2.71	2.26	7.36	1355	434
	100 (無毒性量)	雄	8.33	10.2	35.9	67.9	5100	4008
		雌	10.1	18.7	23.8	61.5	9350	3630
	1000	雄	25.3	31.0	288	420	15500	24793
		雌	22.7	47.8	145	453	23900	26741
イヌ (1 ヵ月)	1	雄	0.65	0.52	1.01	1.26	260	74
		雌	0.64	0.57	1.02	1.27	285	75
	3	雄	1.92	2.29	3.63	5.03	1145	297
		雌	1.80	2.04	2.81	4.24	1020	250

N.C.：定量限界以下 (< 0.002 μg/mL) のため算出せず.
(a)：予定臨床用量 (0.2 mg/日) における C_{max} (0.002 μg/mL) [2.7.2.2.2.6 項参照] に対する各毒性試験における投与最終日の C_{max} の比.
(b)：予定臨床用量 (0.2 mg/日) における $AUC_{0\text{-}\tau}$ (0.01694 μg·hr/mL) [2.7.2.2.2.6 項参照] に対する各毒性試験における投与最終日の $AUC_{0\text{-}24hr}$ の比.

(続く)

表 2.6.6.9-2　ナルデメジントシル酸塩の経口投与による血漿中曝露量及び臨床との曝露比 (続き)

動物種 (投与期間)	投与量 (mg/kg/day)	性別	C_{max} (μg/mL)		$AUC_{0\text{-}24hr}$ (μg·hr/mL)		曝露比	
			投与開始日	投与最終日	投与開始日	投与最終日	C_{max} [(a)]	$AUC_{0\text{-}24hr}$ [(b)]
イヌ (1 ヵ月) (続き)	10 (無毒性量)	雄	5.78	6.48	18.40	23.95	3240	1414
		雌	6.78	7.47	15.37	19.60	3735	1157
	50	雄	31.04	20.12	93.86	142.80	10060	8430
		雌	21.16	22.24	98.29	130.09	11120	7679
イヌ (3 ヵ月)	1	雄	0.383	0.522	0.705	0.880	261	52
		雌	0.457	0.455	0.726	0.724	228	43
	5 (無毒性量)	雄	2.99	3.79	6.41	8.28	1895	489
		雌	2.93	2.67	6.88	5.90	1335	348
	30	雄	12.0	13.9	47.2	90.9	6950	5366
		雌	11.9	13.6	50.0	78.7	6800	4646
イヌ (9 ヵ月)	1	雄	0.423	0.295	0.735	0.707	148	42
		雌	0.434	0.401	1.04	0.991	201	59
	4 (無毒性量)	雄	2.25	2.32	4.08	5.85	1160	345
		雌	2.16	1.90	5.87	5.97	950	352
	20	雄	8.04	10.0	36.7	55.9	5000	3300
		雌	8.74	8.35	33.6	40.5	4175	2391
妊娠 ラット	10	雌	1.23	1.39	5.66	8.78	695	518
	100	雌	9.58	9.84	58.4	126	4920	7438
	1000	雌	15.6	29.4	163	391	14700	23081
妊娠 ウサギ	25	雌	0.173	0.351	0.205	0.366	176	22
	100	雌	2.37	3.46	2.80	3.82	1730	226
	400	雌	6.45	8.65	11.4	14.3	4325	844
マウス (104 週)	10	雄	2.90	2.58	35.8	32.2	1290	1901
		雌	3.41	5.08	38.7	47.2	2540	2786
	30	雄	8.03	8.37	73.5	104	4185	6139
		雌	10.5	10.8	90.3	134	5400	7910
	100	雄	18.7	27.4	182	339	13700	20012
		雌	21.2	23.8	189	297	11900	17532
ラット (104 週)	10	雄	1.3	0.76	9.52	6.44	380	380
		雌	1.47	1.30	9.98	8.59	650	507
	30	雄	3.13	3.17	27.0	29.7	1585	1753
		雌	5.58	6.95	36.3	48.2	3475	2845
	100	雄	7.05	9.42	84.8	109	4710	6434
		雌	9.38	13.2	61	107	6600	6316
ヒト (28 日)	0.2 mg/day	男女	0.002		0.01694		−	−

−：適用せず.

(a)：予定臨床用量 (0.2 mg/日) における C_{max} (0.002 μg/mL) [2.7.2.2.2.6 項参照] に対する各毒性試験における投与最終日の C_{max} の比.

(b)：予定臨床用量 (0.2 mg/日) における $AUC_{0\text{-}\tau}$ (0.01694 μg·hr/mL) [2.7.2.2.2.6 項参照] に対する各毒性試験における投与最終日の $AUC_{0\text{-}24hr}$ の比.

イヌ 1，3 及び 9 ヵ月反復投与毒性試験では，血漿中 ALT，ALP，GGT 又は AST 活性の上昇あるいは総コレステロール値の増加が認められ，病理組織学的検査において軽度な肝細胞の単細胞壊死が認められた．しかしながら，これらの変化は休薬により良好な回復性を示した．これら一連の変化は，投与期間を 1 ヵ月から 9 ヵ月に延長しても増悪しなかった．イヌ反復投与毒性試験でみられた主な所見は肝臓に関連するものであり，9 ヵ月反復投与毒性試験における無毒性量は 4 mg/kg/日であった．表 2.6.6.9-2 に示すように，4 mg/kg/日における血漿中曝露量 (C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24hr}$) は，予定臨床用量 (0.2 mg/日) における血漿中曝露量のそれぞれ 950 倍及び 345 倍であった．

臨床試験では，本剤の副作用と判断された肝障害関連有害事象が認められたものの，肝機能に関する臨床検査値の変動 (基準値上限からの一定の外れ値) を伴った被験者の割合を検討した結果では，がん患者，非がん性慢性疼痛患者，並びに国内，海外に関わらず，プラセボ併合群と比較して外れ値の発現頻度に大きな差はなく，肝機能検査値に対する大きな影響は認められなかった [2.7.4.3.2.2 項参照]．以上のことから，注意は必要であるものの，ナルデメジントシル酸塩投与によるヒトでの肝障害のリスクは低いと考えられる．

ラット 6 ヵ月反復投与毒性試験では，1000 mg/kg/日投与群の雌雄で，投与初期に一過性の摂餌量低下を伴う，わずかではあるが明確な体重増加抑制が認められた．その詳細な機序は現時点で明らかではないが，ナロキソンやナルトレキソンのようなオピオイド受容体アンタゴニストは，ラットにおいて摂餌量及び体重増加抑制作用を示すことが報告されている [4]．このことから，摂餌量及び体重増加抑制作用は，オピオイド受容体に対するアンタゴニスト作用が関連していると考えられる．そのため，ナルデメジントシル酸塩は，体重増加抑制作用を示す可能性があると考えられる．しかし，1000 mg/kg/日投与群で認められた摂餌量の抑制は投与初期の一過性変化であり，反復投与期間中に回復すること，そして投与最終日の平均体重は，対照群と比較してわずかな低値であることや，ラット 6 ヵ月反復投与毒性試験の無毒性量は 100 mg/kg/日であり，100 mg/kg/日における C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24hr}$ は，表 2.6.6.9-2 に示すように，予定臨床用量 (0.2 mg/日) における血漿中曝露量のそれぞれ 5100 倍及び 3630 倍高いことから，ナルデメジントシル酸塩がヒトで体重増加に影響を及ぼす可能性は低いと考えられる．

ラット 1 ヵ月反復投与毒性試験 (投与量：30，100 及び 1000 mg/kg/日) におけるナルデメジントシル酸塩全投与群の雌並びに受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験 (投与量：1，10，100 及び 1000 mg/kg/日) における 10 mg/kg/日以上の投与群の雌で，性周期の異常が認められた．性ホルモン濃度を調べた試験 (投与量：1，10，100 及び 1000 mg/kg/日) の結果より，ナルデメジントシル酸塩がプロラクチン濃度を増加させることが性周期異常の原因であると考えられる．ラットは非常に短い黄体期を有しており，高濃度のプロラクチンによって，黄体が非活性状態から活性状態に推移し，長い黄体期が誘導されることが知られている [5]．これに対して，ヒトでは，プロラクチン濃度に関わらず，黄体が長期間生理学的に機能化されるという点でラットとは黄体機能化のメカニズムが異なる [6]．したがって，ナルデメジントシル酸塩は血漿中プロラクチン上昇作用を有するものの，性周期の異常はラット特異的と考えられ，ヒトへ

の外挿性はないと考えられる.

ナルデメジントシル酸塩を用いた，一連の遺伝毒性試験の結果は陰性であった．また，マウス及びラットに最大 100 mg/kg/日の用量で 104 週まで投与したがん原性試験において，ナルデメジントシル酸塩に起因した腫瘍発生増加は認められなかったことから，ナルデメジントシル酸塩に発がん性はないと判断した.

生殖発生毒性試験で認められた主な毒性所見及び無毒性量を表 2.6.6.9-3 に示す.

表 2.6.6.9-3　生殖発生毒性試験における主な毒性所見及び無毒性量

動物種	試験種	投与経路	投与量 (mg/kg/日)	主な毒性所見と無毒性量
ラット	受胎能及び着床までの初期胚発生	経口	1, 10, 100, 1000	雄 ≥ 10 mg/kg/日：体重及び，摂餌量の低値 雌 1000 mg/kg/日：体重及び摂餌量の低値 ≥ 10 mg/kg/日：性周期の異常 無毒性量 雄一般毒性：1 mg/kg/日 雄生殖毒性：1000 mg/kg/日 雌一般毒性：100 mg/kg/日 雌生殖毒性：1 mg/kg/日 初期胚発生毒性：1000 mg/kg/日
	出生前・出生後の発生並びに母体の機能	経口	1, 30, 1000	母動物 1000 mg/kg/日：死亡 ≥ 30 mg/kg/日：妊娠中の体重増加量及び摂餌量の低値，出生率低値，哺育不良，全児死亡 F_1 出生児 1000 mg/kg/日：離乳前児体重低値，耳介展開遅延 ≥ 30 mg/kg/日：生後 4 日の生存率低下 無毒性量 母動物一般毒性，母動物生殖毒性，次世代の発生毒性：1 mg/kg/日
	胚・胎児発生	経口	10, 100, 1000	母動物 ≥ 10 mg/kg/日：体重及び摂餌量の低値 胚・胎児 1000 mg/kg/日：影響なし 無毒性量 母動物一般毒性：＜10 mg/kg/日 母動物生殖毒性，胚・胎児発生毒性：1000 mg/kg/日
ウサギ	胚・胎児発生	経口	25, 100, 400	母動物 400 mg/kg/日：流産，早産，顕著な摂餌低下，体重減少及び糞量減少 ≥ 25 mg/kg/日：体重増加量及び摂餌量の低値 胚・胎児 400 mg/kg/日：胎盤重量及び胎児体重の低値 無毒性量 母動物一般毒性：＜25 mg/kg/日 母動物生殖毒性，胚・胎児発生毒性：100 mg/kg/日

ラット受胎能及び初期胚発生に関する試験では，10 mg/kg/日以上の雌で，1 ヵ月反復投与毒性試験と同様に，性周期異常 (発情間期の延長) が認められたが，雌雄の交尾能及び受胎能などのその他の生殖機能に対する毒性は認められず，初期胚発生に対しても影響は認められなかった．また，ラット胚・胎児発生に関する試験では，1000 mg/kg/日でも母体の生殖機能及び胚・胎児発生に影響は認められなかった．したがって，雌の性周期異常を除いた雌雄の生殖毒性，初期胚発生及び胚・胎児発生に関する無毒性量は，いずれも 1000 mg/kg/日と判断した．受胎能及び初期胚発生に関する試験における血漿中曝露量は測定していないが，胚・胎児発生に関する試験の 1000 mg/kg/日における血漿中ナルデメジンの曝露量 (C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24hr}$) は，それぞれ 29.4 μg·hr/mL 及び 391 μg·hr/mL であった．表 2.6.6.9-2 に示すように，これら C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24hr}$ の値は，予定臨床用量 (0.2 mg/日) における曝露のそれぞれ 14700 倍及び 23081 倍であった．

ウサギ胚・胎児発生に関する試験では，400 mg/kg/日で，顕著な摂餌抑制を伴う体重減少を示した動物で流産あるいは早産が認められた．妊娠ウサギでは顕著な摂餌抑制により流産及び早産が認められることが報告されていることから [7], 本試験で認められた流産及び早産はナルデメジントシル酸塩投与による顕著な摂餌抑制に起因していると推察された．また，400 mg/kg/日で，母動物のナルデメジントシル酸塩投与による顕著な体重減少の 2 次的影響と考えられる胎児体重の低値が 400 mg/kg/日において認められたが，胚致死性及び催奇形性は認められなかった．これらの結果から，本試験における母動物の生殖毒性及び胚・胎児発生に関する無毒性量は，いずれも 100 mg/kg/日と判断した．この時の妊娠ウサギにおける血漿中ナルデメジンの曝露量 (C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24hr}$) は，それぞれ 3.46 μg/mL 及び 3.82 μg·hr/mL であり，表 2.6.6.9-2 に示すように, 予定臨床用量 (0.2 mg/日) における曝露のそれぞれ 1730 倍及び 226 倍であった．

ラット出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験では，1000 mg/kg/日で，分娩時の母動物の死亡が，30 mg/kg/日以上で，出生率の低値並びに死産児数の増加が認められた．また，30 及び 1000 mg/kg/日で，生後 4 日生存率の低値が，1000 mg/kg/日で，出生児の体重低値及び耳介展開の遅延を含む離乳前の発育遅延が認められた．これらの変化は，30 及び 1000 mg/kg/日投与群における母動物の哺育不良 (ケージ内に出生児を散乱させる行動) に起因していると考えられる．なお，生後 4 日以降は出生児の生存率の低下は認められず，1000 mg/kg/日投与群における離乳後の出生児の発育も対照群と同等であった．以上の結果から，本試験における母動物の生殖毒性並びに出生児の発育に関する無毒性量は 1 mg/kg/日と判断した．本試験において血漿中曝露量は測定していないが，本試験の無毒性量における非妊娠雌性ラットの血漿中ナルデメジンの曝露量 (C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24hr}$) は，ラット 1 ヵ月反復投与毒性追加試験の曝露量を参照すると, それぞれ 0.10 μg/mL 及び 0.20 μg·hr/mL であり, 表 2.6.6.9-2 に示すように，予定臨床用量 (0.2 mg/日) における血漿中曝露量のそれぞれ 50 倍及び 12 倍であった．

以上のように, 生殖発生毒性試験では, ナルデメジントシル酸塩は催奇形性を示さなかった．しかしながら，母動物の摂餌量の低下に起因すると考えられる流産，早産及び体重減少が認められており，母動物に毒性が認められる用量で，胎児の生存性の低下及び発育遅延が認められている. さらに, ナルデメジンは授乳ラットの乳汁に移行する [2.6.4.6.1.5 項参照]. したがって，ナルデメジントシル酸塩は予定臨床用量で毒性を示す可能性は低いと考えられるが，妊婦及び

授乳婦への投与は，本薬使用による母体の利益が危険性を上回ると判断された場合にのみ投与すべきである．

ナルデメジントシル酸塩は，ウサギ皮膚刺激性試験で，皮膚一次刺激性を示さなかった．また，ウサギ眼粘膜刺激性試験では，軽度の一次刺激性を示したが，その作用は洗眼により減弱した．さらに，ラット及びイヌ反復投与毒性試験で，食道や胃に刺激性を疑う変化は認められなかった．

医薬品の免疫毒性試験に関するガイドライン [3] に従い，ナルデメジントシル酸塩の免疫毒性を評価した．ナルデメジントシル酸塩は，ラットにおいて 1000 mg/kg/日の投与量で T 細胞依存性抗体産生能に影響を及ぼさなかった．また，ラット及びイヌ反復投与毒性試験でも，免疫毒性を示唆する所見は認められなかった．したがって，ナルデメジントシル酸塩には免疫毒性リスクはないと考えられる．

ナルデメジントシル酸塩原薬の潜在的不純物の復帰突然変異誘発試験では，*不純物D が陽性であり，ICH M7 ガイドライン [1] に従い，*不純物D は製造工程において許容限度値以下で管理する対象とした．

ヘアレスマウスを用いた皮膚光毒性試験では，300 mg/kg の投与量において，紫外線照射に伴う一般状態及び皮膚に変化は認められなかった．本試験の 300 mg/kg/日投与時における血漿中ナルデメジンの曝露量 (C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24hr}$) は，それぞれ 30.4 μg/mL 及び 163 μg·hr/mL であり，ヒト予定臨床用量における曝露のそれぞれ 15200 倍及び 9622 倍であった．したがって，ナルデメジントシル酸塩に光毒性リスクはないと考えられる．

ナルデメジントシル酸塩の依存性について検討するために，薬物弁別試験，自己投与試験及び身体依存性試験を実施した．ラット薬物弁別試験では，ナルデメジントシル酸塩は，0.03，0.1 及び 0.3 mg/kg の用量における経口投与でモルヒネに対して般化しなかった．また，0.03，0.1 及び 0.3 mg/kg におけるナルデメジンの C_{max} 値は，それぞれ 1.69，5.77 及び 15.2 ng/mL であり，ナルデメジントシル酸塩の予定臨床用量 (0.2 mg/日) における C_{max} 値 (2 ng/mL) のそれぞれ 0.85，2.9 及び 7.6 倍であった [2.7.2.2.2.6 項参照].

サル静脈内自己投与試験では，24 時間静脈内自己投与試験での 1，3 及び 10 μg/kg/注入におけるナルデメジントシル酸塩の 1 日あたりの自己投与回数は，媒体の自己投与回数の値と比較して増加しないことが確認された．また，1 及び 10 μg/kg/注入投与群のナルデメジンの C_{max} 値は，それぞれ 5.45 及び 54.1 ng/mL であり，ナルデメジントシル酸塩の予定臨床用量 (0.2 mg/日) における C_{max} 値 (2 ng/mL) のそれぞれ 2.7 及び 27 倍であった [2.7.2.2.2.6 項参照].

ラット身体依存性試験では，ナルデメジントシル酸塩を 60 及び 200 mg/kg/日の用量で 1 日 2 回 28 日間反復経口投与し，その後の 7 日間の休薬期間中に発現する退薬症候を観察したが，体重減少や摂餌量の減少などの退薬症候と関連した所見は認められなかった．また，60 及び 200

mg/kg/日における投与 28 日目のナルデメジンの C_{max} 値は，それぞれ 3890 及び 8650 ng/mL であり，ナルデメジントシル酸塩の予定臨床用量 (0.2 mg/日) における C_{max} 値 (2 ng/mL) のそれぞれ 1945 及び 4325 倍高かった [2.7.2.2.2.6 項参照]．さらに，60 及び 200 mg/kg/日における C_{24hr} 値は，投与 1 日目では，それぞれ 3.06 及び 6.19 ng/mL で，投与 28 日目では，それぞれ 6.71 及び 18.9 ng/mL であり，トラフ濃度として，ナルデメジントシル酸塩の予定臨床用量 (0.2 mg/日) における C_{max} 値を超えていることが確認された．

ヒト血漿中主代謝物の nor-ナルデメジン [2.7.2.2.1.3 項参照] に関し，薬物弁別試験，自己投与試験及び身体依存性試験で用いたナルデメジントシル酸塩の最高投与量における nor-ナルデメジンの C_{max} 値は，それぞれ 0.61，0.918 及び 421 ng/mL であった．これらの値は，ナルデメジントシル酸塩の予定臨床用量 (0.2 mg/日) における nor-ナルデメジンの C_{max} 値 (0.146 ng/mL) [2.7.2.3.3 項参照] を上回っていた．

これら 3 つの非臨床依存性試験の結果，ナルデメジントシル酸塩は，ラットにおいてモルヒネ様弁別刺激効果を示さず，サルにおいて強化効果を示さず，また，ラットにおいて退薬症候を発現しなかったことから，精神依存性及び身体依存性を有さないと考えられる．

ナルデメジントシル酸塩は，安全性薬理試験コアバッテリー試験におけるラットの中枢神経系試験 (機能観察総合評価法) において中枢神経系への影響は認められず，ラット及びイヌにおけるその他の安全性薬理試験でも，中枢神経系への影響を示唆する所見は認められなかった．ラット及びイヌにおけるすべての反復投与毒性試験では，投与及び回復期間を通して，中枢神経系に対する興奮又は抑制性の作用は認められず，休薬期間中にも顕著な体重及び摂餌量の減少は認められなかった．また，62 種の各種受容体，イオンチャネル又はトランスポーター及び 9 種の酵素に対するナルデメジントシル酸塩の阻害作用を 10 μmol/L の濃度で評価した結果，ドパミン，ノルエピネフィリン，セロトニン，γ-アミノブチル酪酸やカンナビノイド受容体及び/又はトランスポーターなど，薬物乱用に関連するオピオイド受容体以外の受容体，イオンチャネル，トランスポーター及び酵素に対する阻害率はいずれも 50%未満であった．

以上の結果から，ナルデメジントシル酸塩は依存性を有さないと結論した．

モルヒネ依存ラットを用いて，ナルデメジントシル酸塩で誘発される中枢性退薬症候の発現リスクを検討した結果，ナルデメジントシル酸塩は，跳躍行動及び身震い行動を発現させなかったが，3 mg/kg で歯をカタカタ鳴らす行動を起させた．これらの成績から，ナルデメジントシル酸塩の中枢性退薬症候発現の無影響量は 1 mg/kg であることが示されたが，本用量はナルデメジントシル酸塩の抗便秘作用の ED_{50} 値 (0.03 mg/kg) より少なくとも 30 倍であることを示している．また，ナルデメジントシル酸のラットにおける抗便秘作用の薬効血漿中ナルデメジン濃度 (0.974～2.51 ng/mL) [2.6.2.6.2 項参照] は，予定臨床用量 (0.2 mg/日) における血漿中濃度の C_{max} 値 (2 ng/mL) [2.7.2.2.2.6 項参照] とほぼ同じであることから，予定臨床用量でヒトに中枢性退薬症候が発現するリスクは低いと考えられる．

ヒトにおけるナルデメジントシル酸塩の主代謝物は nor-ナルデメジンであり，ヒトに 2 mg の [carbonyl-^{14}C]-ナルデメジントシル酸塩又は [oxadiazole-^{14}C]-ナルデメジントシル酸塩を投与し

たヒトマスバランス試験 [2.7.2.2.1.3 項参照] で，nor-ナルデメジンは血漿中放射能の 9%～13%として検出された．各毒性試験における無毒性量又はその付近の投与量での血漿中 nor-ナルデメジンの曝露量 (C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24hr}$) 並びに予定臨床用量の血漿中曝露量との比を表 2.6.6.9-4 に記載した．これらの毒性試験における血漿中曝露量は，予定臨床用量 (0.2 mg/日) における血漿中曝露量 (それぞれ 0.146 ng/mL 及び 2.457 ng·hr/mL) の 30 倍以上であることが示された．このことから，nor-ナルデメジンの毒性は，ナルデメジントシル酸塩の毒性試験で十分に評価されていると判断した．なお，ヒトマスバランス試験で血漿中に検出された代謝物のナルデメジン 3-G 及びナルデメジン (7R)-7-水酸化体は，ラット及びイヌの血漿中でも検出されている [2.6.4.5 項参照].

表 2.6.6.9-4 毒性試験における無毒性量又はその付近の投与量のナルデメジントシル酸塩投与時における nor-ナルデメジンの血漿中曝露量及び臨床との曝露比

動物種	投与期間	ナルデメジントシル酸塩の投与量 (mg/kg/日)	性別	Nor-ナルデメジン		曝露比	
				C_{max} (ng/mL)	$AUC_{0\text{-}24hr}$ (ng·hr/mL)	C_{max} (f)	$AUC_{0\text{-}24hr}$ (g)
ラット (a)	1 ヵ月	100	雄	630	3270	4315	1331
		100	雌	180	570	1233	232
イヌ (b)	1 ヵ月	3	雄	50	90	342	37
		3	雌	50	80	342	33
妊娠ウサギ (c)	12 日	100	雌	212	358	1452	146
マウス (d)	104 週	100	雄	2300	28500	15753	11600
		100	雌	2130	25700	14589	10460
ラット (e)	104 週	100	雄	1750	21500	11986	8751
		100	雌	306	2950	2096	1201
ヒト	1 日	0.2 mg	男女	0.146	2.457	−	−

−：適用せず.
(a)：ラット 1 ヵ月反復経口投与毒性試験.
(b)：イヌ 1 ヵ月反復経口投与毒性試験.
(c)：ウサギ胚・胎児発生に関する試験.
(d)：マウスがん原性試験.
(e)：ラットがん原性試験.
(f)：予定臨床用量 (0.2 mg/日) における nor-ナルデメジンの C_{max} (0.146 ng/mL) [2.7.2.3.3 項参照] に対する各毒性試験における投与最終日の C_{max} との比.
(g)：予定臨床用量 (0.2 mg/日) における nor-ナルデメジンの $AUC_{0\text{-}inf}$ (2.457 ng·hr/mL) [2.7.2.3.3 項参照] に対する各毒性試験における投与最終日の $AUC_{0\text{-}24hr}$ との比.

以上のように，ナルデメジントシル酸塩の安全性評価のために実施した各毒性試験の無毒性量における血漿中ナルデメジンの曝露量には，表 2.6.6.9-2 に示すように，予定臨床用量 (0.2 mg/日) における曝露に対して十分な安全域が認められた．したがって，予定臨床用量でナルデメジントシル酸塩に起因した毒性が発現する可能性は低いと考えられる.

2.6.6.10 図表

図表は本文中の適切な場所に記載した.

2.6.6.11 参考文献

1. ICH Harmonised Tripartite Guideline M7. Assessment and control of DNA reactive (mutagenic) impurities in pharmaceuticals to limit potential carcinogenic risk (November, 2015).

2. ICH Harmonised Tripartite Guideline S5 (R2). Detection of toxicity to reproduction for medicinal products & toxicity to male fertility (November, 2000).

3. ICH Harmonised Tripartite Guideline S8. Guidance on immunotoxicity studies for human pharmaceuticals. Step 4 version (September, 2005).

4. Brands B, Thornhill JA., Hirst M, Gowdey CW. Suppression of food intake and body weight gain by naloxone in rats. Life Sci. 1979 May 7; 24(19): 1773-8.

5. Freeman ME. The ovarian cycle of the rat. In: Knobil E, Neil JD, Ewing LL, Greenwald GS, Markert CL, Pfaff DW, editors. The physiology of reproduction. Raven Press, 1988: 1893-919.

6. Knobil E and Hotchkiss J. The Menstrual cycles and its neuroendocrine control. In: Knobil E, Neil JD, Ewing LL, Greenwald GS, Markert CL, Pfaff DW, editors. The physiology of reproduction. Raven Press, 1988: 1971-94.

7. Matsuzawa T, Nakata M, Goto I, Tsushima M. Dietary deprivation induces fetal loss and abortion in rabbits. Toxicology. 1981; 22(3): 255-9.

スインプロイク錠 0.2 mg

第 2 部 (モジュール 2) : CTD の概要 (サマリー)

2.6 非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.7 毒性試験概要表

塩野義製薬株式会社

目次

略号及び用語定義一覧表 4
2.6.7 毒性試験概要表 6
2.6.7.1 毒性試験： 一覧表 6
2.6.7.2 トキシコキネティクス： トキシコキネティクス試験の一覧表 16
2.6.7.3 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 17
2.6.7.4 毒性試験： 被験物質 (ロット毎) 一覧 21
2.6.7.5 単回投与毒性試験 23
2.6.7.6 反復投与毒性試験： 重要な試験以外の試験 24
2.6.7.7 反復投与毒性試験： 重要な試験 25
2.6.7.7.1 One-Month Repeat-Dose Toxicity Study in Rats 25
2.6.7.7.2 One-Month Repeat-Dose Toxicity Study in Rats (Supplemental Study) 30
2.6.7.7.3 Six-Month Repeat-Dose Toxicity Study in Rats 32
2.6.7.7.4 One-Month Repeat-Dose Toxicity Study in Dogs 35
2.6.7.7.5 Three-Month Repeat-Dose Toxicity Study in Dogs 41
2.6.7.7.6 Nine-Month Repeat-Dose Toxicity Study in Dogs 45
2.6.7.8 *In Vitro* 遺伝毒性試験 48
2.6.7.8.1 Reverse Mutation Test with Bacteria 48
2.6.7.8.2 Chromosomal Aberration Test in Chinese Hamster Lung Cells 51
2.6.7.9 *In Vivo* 遺伝毒性試験 53
2.6.7.9.1 Micronucleus Test in Rats 53
2.6.7.10 がん原性試験 54
2.6.7.10.1 Non-pivotal Carcinogenicity Study 54
2.6.7.10.2 Carcinogenicity Study in Mice 56
2.6.7.10.3 Carcinogenicity Study in Rats 68
2.6.7.11 生殖発生毒性試験： 重要な試験以外の試験 77
2.6.7.12 生殖発生毒性試験： 受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験 78
2.6.7.12.1 Fertility and Early Embryonic Development to Implantation in Rats 78
2.6.7.13 生殖発生毒性試験： 胚・胎児発生に関する試験 82
2.6.7.13.1 Embryo-Fetal Development in Rats 82
2.6.7.13.2 Embryo-Fetal Development in Rabbits 85
2.6.7.14 生殖発生毒性試験： 出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験 89
2.6.7.14.1 Prenatal and Postnatal Development, Including Maternal Function in Rats 89
2.6.7.15 新生児を用いた試験 94
2.6.7.16 局所刺激性試験 95
2.6.7.17 その他の毒性試験 96
2.6.7.17.1 Immunotoxicity Study in Rats 96
2.6.7.17.2 Preliminary Study for Effects on Estrous Cycle and Plasma Reproductive Hormone

Concentration in Female Rats 97
2.6.7.17.3 Study for Effects on Plasma Prolactin Concentration in Rats 98
2.6.7.17.4 Reverse Mutation Test of *Impurity A with Bacteria 99
2.6.7.17.5 Reverse Mutation Test of *Impurity B with Bacteria 101
2.6.7.17.6 Reverse Mutation Test of *Impurity C with Bacteria 103
2.6.7.17.7 Reverse Mutation Test of *Impurity E with Bacteria 105
2.6.7.17.8 Reverse Mutation Test of *Impurity F with Bacteria 108
2.6.7.17.9 Non-GLP Reverse Mutation Tests of Naldemedine Impurities with Bacteria 111
2.6.7.17.10 Preliminary Skin Phototoxicity Study in Mice 125
2.6.7.17.11 Skin Phototoxicity Study in Mice 125
2.6.7.17.12 Abuse Liability: Dose Finding Studies 126
2.6.7.17.13 Drug Discrimination of Naldemedine Tosylate in Rats 127
2.6.7.17.14 Psychological Dependence Liability by Intravenous Self-Administration of Naldemedine Tosylate in Monkeys 127
2.6.7.17.15 Physical Dependence Liability of Naldemedine Tosylate in Rats 128
2.6.7.17.16 Withdrawal Symptoms Induced by Naldemedine Tosylate, Methylnaltrexone, and Naloxone in Morphine-Dependent Mice 129
2.6.7.17.17 Withdrawal Symptoms Induced by Naldemedine Tosylate and Naloxone in Morphine-Dependent Rats 131

＊新薬承認情報提供時に置き換え

2.6.7 略号及び用語定義一覧表

略号	用語定義
2AA	2-aminoanthracene
9AA	9-aminoacridine hydrochloride
AF-2	2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl) acrylamide
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)
*Impurity G	[redacted]
*Impurity K	[redacted]
*Impurity L	[redacted]
$AUC_{0\text{-}24hr}$	時間 0 から 24 時間までの濃度－時間曲線下面積（area under the concentration-time curve from 0 to 24 hours)
*Impurity F	[redacted]
BLQ	検出限界以下（below the lower limit of quantification)
*Impurity C	[redacted]
CHL/IU	チャイニーズハムスター肺由来（Chinese hamster lung)
C_{24hr}	投与後 24 時間目の血漿中濃度（plasma drug concentration 24 hours post-dose)
C_{max}	最高血漿中濃度（maximum concentration)
DMSO	ジメチルスルフォキシド（dimethyl sulfoxide)
*Impurity B	[redacted]
GGT	γ-グルタミルトランスフェラーゼ（γ-glutamyl transferase)
GLP	試験実施適正基準（good laboratory practice)
HCT	ヘマトクリット値 (hematocrit)
HGB	ヘモグロビン濃度 (hemoglobin)
*Impurity A	[redacted]
MC	メチルセルロース（methylcellulose)
*Impurity D	[redacted]
*Impurity E	[redacted]
MNPCE	小核を有する多染性赤血球（micronucleated polychromatic erythrocyte)
naldemedine 3-G	ナルデメジン 3-*O*-β-D-グルクロナイド (naldemedine 3-*O*-β-D-glucuronide)
naldemedine 6-G	ナルデメジン 6-*O*-β-D-グルクロナイド (naldemedine 6-*O*-β-D-glucuronide)
NaN_3	窒化ナトリウム（sodium azide)
NOAEL	無毒性量（no observed adverse effect level)
*Impurity I	[redacted]
*Impurity H	[redacted]

＊新薬承認情報提供時に置き換え

*Impurity J	[redacted]
PCE	多染性赤血球（polychromatic erythrocyte)
RBC	赤血球（red blood cell count)
S9 mix	代謝活性化系（metabolic activation system)
T.BIL	総ビリルビン (total bilirubin)
T.CHO	総コレステロール (total cholesterol)
T_{max}	最高血漿中濃度到達時間 (time to maximum plasma concentration)

＊新薬承認情報提供時に置き換え

2.6.7 毒性試験概要表

2.6.7.1 毒性試験： 一覧表

Test Article: Naldemedine Tosylate;

Type of Study	Species/Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Doses [a] (mg/kg or mg/kg/day)	Good Laboratory Practice (GLP) Compliance	Testing Facility	Study Number [b]	Location in CTD
Single-Dose Toxicity	Rat/ Crl:CD(SD)	Gavage	Single	0, 500, 2000	Yes	Shionogi & Co., Ltd.	R-297995-TB-047-L	4.2.3.1-01
	Dog/ TOYO Beagle	Gavage	Single	0, 200, 1000	Yes	Shionogi & Co., Ltd	R-297995-TB-045-L	4.2.3.1-02
Repeat-Dose Toxicity	Rat/ Crl:CD(SD)	Gavage	2 weeks	0, 8, 40, 200, 1000	No	Shionogi & Co., Ltd	R-297995-TB-003-R	4.2.3.2-07
	Rat/ Crl:CD(SD)	Gavage	1 month	0, 30, 100, 1000	Yes	Shionogi & Co., Ltd	R-297995-TB-048-L	4.2.3.2-01
	Rat/ Crl:CD(SD)	Gavage	1 month	0, 0.3, 1, 3, 10	Yes	Shionogi & Co., Ltd	R-297995-TB-091-L	4.2.3.2-02
	Rat/ Crl:CD(SD)	Gavage	6 months	0, 10, 100, 1000	Yes	[redacted]	R-297995-TF-108-L ([redacted]08274)	4.2.3.2-03
	Dog/ TOYO Beagle	Gavage	2 weeks	0, 3, 10, 100	No	Shionogi & Co., Ltd	R-297995-TB-002-R	4.2.3.2-08
	Dog/ TOYO Beagle	Gavage	1 month	0, 1, 3, 10, 50	Yes	Shionogi & Co., Ltd	R-297995-TB-046-L	4.2.3.2-04
	Dog/ TOYO Beagle	Gavage	3 months	0, 1, 5, 30	Yes	[redacted]	S-297995-TF-109-L ([redacted]08275)	4.2.3.2-05
	Dog/ TOYO Beagle	Gavage	9 months	0, 1, 4, 20	Yes	[redacted]	S-297995-TF-219-L ([redacted]10119)	4.2.3.2-06

[a] As naldemedine. No observed adverse effect levels (NOAELs) are underlined.
[b] In parentheses, CRO study numbers are shown.

(続く)

2.6.7.1 毒性試験： 一覧表 (続き)

Test Article: Naldemedine Tosylate

Type of Study	Species/Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Doses [a] (mg/kg/day)	GLP Compliance	Testing Facility	Study Number [b]	Location in CTD
Genotoxicity	*Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*	*In vitro*	-	0, 78.1, 156, 313, 625, 1250, 2500, 5000 µg/plate	Yes	Shionogi & Co., Ltd	R-297995-TB-051-L	4.2.3.3-01
	Chinese hamster lung cells	*In vitro*	-	0, 70.2, 105, 158, 237, 356, 533, 800 µg/mL	Yes	[redacted]	R-297995-TF-052-L ([redacted]07-070)	4.2.3.3-02
	Rat/ Crl:CD(SD)	Gavage	2 days	0, 250, 500, 1000, 2000	Yes		R-297995-TF-053-L ([redacted]07-071)	4.2.3.3-03
Carcinogenicity	Mouse/ Crl:CD1(ICR)	Gavage	2 weeks	0, 30, 100, 300	No	Shionogi & Co., Ltd	S-297995-TB-218-R	4.2.3.4-03
	Mouse/ Crl:CD1(ICR)	Gavage	13 weeks	0, 100, 300, 1000	Yes	[redacted]	S-297995-TF-226-L ([redacted]0024)	4.2.3.4-04
	Mouse/ Crl:CD1(ICR)	Gavage	104 weeks	0, 10, 30, 100	Yes		S-297995-TF-265-L ([redacted]0037)	4.2.3.4-01
	Rat/ Crl:CD(SD)	Gavage	104 weeks	0, 10, 30, 100	Yes		S-297995-TF-266-L ([redacted]0036)	4.2.3.4-02

[a] As naldemedine.
[b] In parentheses, CRO study numbers are shown.

(続く)

2.6.7.1 毒性試験： 一覧表 (続き)

Test Article: Naldemedine Tosylate

Type of Study	Species/Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Doses [a] (mg/kg/day)	GLP Compliance	Testing Facility	Study Number [b]	Location in CTD
Reproductive and Developmental Toxicity	Rat/ Crl:CD(SD)	Gavage	M: 70 – 73 [c] F: 23 – 25 [c]	0, 1, 10, 100, <u>1000</u>	Yes	[redacted]	S-297995-TF-104-L (100428)	4.2.3.5-01
	Rat/ Crl:CD(SD)	Gavage	GD 7 – 17	0, 10, 100, <u>1000</u>	Yes	[redacted]	S-297995-TF-146-L (200129)	4.2.3.5-02
	Rabbit/ Kbl:JW	Gavage	2 weeks	0, 100, 300, 1000	Yes	[redacted]	S-297995-TF-119-L (250228A)	4.2.3.5-05
	Rabbit/ Kbl:JW	Gavage	GD 6 – 18	0, 60, 200, 600	Yes	[redacted]	S-297995-TF-163-L (250228P)	4.2.3.5-06
	Rabbit/ Kbl:JW	Gavage	GD 6 – 18	0, 25, <u>100</u>, 400	Yes	[redacted]	S-297995-TF-182-L (250228)	4.2.3.5-03
	Rat/ Crl:CD(SD)	Gavage	GD 7 – LD 20	0, <u>1</u>, 30, 1000	Yes	[redacted]	S-297995-TF-275-L ([redacted]12011)	4.2.3.5-04
Local Tolerance	Rabbit/ Kbl:JW	Percutaneous	24 hours	0.5 g/site	No	[redacted]	R-297995-TF-085-N (702028)	4.2.3.6-01
	Rabbit/ Kbl:JW	Application to the eyes	20 – 30 seconds	0.1 g/left eye	No	[redacted]	R-297995-TF-084-N (702128)	4.2.3.6-02
Other Toxicity Studies								
Immunotoxicity Study	Rat/ Crl:CD(SD)	Gavage	4 weeks	0. 30, 100, 1000	Yes	Shionogi & Co., Ltd	S-297995-TB-234-L	4.2.3.7-01

GD, Gestation day. LD, Lactation day.
[a] As naldemedine. NOAELs for reproductive functions, maternal reproductive function, and embryo-fetal development are underlined. .
[b] In parentheses, CRO study numbers are shown.
[c] Males, 4 weeks prior to mating and continuing until the day before necropsy (a total of 70-73 days); Females, 2 weeks prior to mating throughout GD 7.

(続く)

2.6.7.1 毒性試験： 一覧表 (続き)

Test Article: Naldemedine Tosylate;
*Impurity A
*Impurity B

Type of Study	Species/Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Doses [(a)] (mg/kg/day)	GLP Compliance	Testing Facility	Study Number [(b)]	Location in CTD
Other Toxicity Studies (Continued)								
Peliminary Study for Effects on Estrous Cycle and Plasma Reproductive Hormone Concentration	Rat/ Crl:CD(SD)	Gavage	16 days	1000	No	[redacted]	R-297995-TF-105-R ([redacted]080796)	4.2.3.7-07
Study for Effects on Plasma Prolactin Concentration	Rat/ Crl:CD(SD)	Gavage	Single	0, 1, 10, 100, 1000	No	[redacted]	S-297995-TF-162-N ([redacted]090377)	4.2.3.7-06
Reverse Mutation Test of *Impurity A with Bacteria	*Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*	*In vitro*	-	0, 20.6, 61.7, 185, 556, 1670, 5000 µg/plate	Yes	Shionogi & Co., Ltd	S-297995-TB-305-L	4.2.3.7-02
Reverse Mutation Test of *Impurity B with Bacteria	*Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*	*In vitro*	-	0, 20.6, 61.7, 185, 556, 1670, 5000 µg/plate	Yes	Shionogi & Co., Ltd	S-297995-TB-319-L	4.2.3.7-03

[(a)] The doses of naldemedine tosylate are expressed as naldemedine.
[(b)] In parenthesis, CRO study number is shown.

(続く)

2.6.7.1 毒性試験： 一覧表 (続き)

Test Article: *Impurity C
*Impurity E
*Impurity F

Type of Study	Species/Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Doses (mg/kg/day)	GLP Compliance	Testing Facility	Study Number [a]	Location in CTD
Other Toxicity Studies (Continued)								
Reverse Mutation Test of *Impurity C with Bacteria	*Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*	*In vitro*	-	0, 20.6, 61.7, 185, 556, 1670, 5000 µL/plate	Yes	Shionogi & Co., Ltd	S-297995-TB-320-L	4.2.3.7-04
Reverse Mutation Test of *Impurity E with Bacteria	*Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*	*In vitro*	-	0, 4.88, 19.5, 78.1, 156, 313, 625, 1250, 2500, 5000 µL/plate	Yes [b]	[redacted]	S-297995-TF-242-L ([redacted]01-4842)	4.2.3.7-08
Reverse Mutation Test of *Impurity F with Bacteria	*Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*	*In vitro*	-	0, 1.2, 4.9, 20, 78, 313, 625, 1250, 2500, 5000 µL/plate	Yes [b]	[redacted]	[redacted]10083	4.2.3.7-09

[a] In parenthesis, CRO study number is shown.
[b] GLP regulations for Occupational Safety and Health Act in Japan

(続く)

2.6.7.1 毒性試験： 一覧表 (続き)

Test Article: *Impurity G
*Impurity A
*Impurity D
*Impurity H
*Impurity I
*Impurity J

Type of Study	Species/Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Doses (mg/kg/day)	GLP Compliance	Testing Facility	Study Number [(a)]	Location in CTD
Other Toxicity Studies (Continued)								
√on-GLP Reverse Mutation Tests of Naldemedine Impurities (*Impurity G, *Impurity A, *Impurity D, and *Impurity H) with Bacteria	*Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*	*In vitro*	-	0, 4.88, 9.77, 19.5, 39.1, 78.1, 156, 313, 625, 1250, 2500, 5000 µg/plate	No	[redacted]	S-297995-TF-263-N ([redacted]01-5047)	4.2.3.7-10
Non-GLP Reverse Mutation Tests of Naldemedine Impurities (*Impurity I and *Impurity J) with Bacteria	*Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*	*In vitro*	-	0, 4.88, 9.77, 19.5, 39.1, 78.1, 156, 313, 625, 1250, 2500, 5000 µg/plate	No	[redacted]	S-297995-TF-272-N ([redacted]01-5134)	4.2.3.7-11

[(a)] In parentheses, CRO study numbers are shown.

(続く)

2.6.7.1 毒性試験： 一覧表 (続き)

Test Article: *Impurity K
*Impurity L
NaldemedineTosylate

Type of Study	Species/Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Doses [(a)] (mg/kg/day)	GLP Compliance	Testing Facility	Study Number [(b)]	Location in CTD
Other Toxicity Studies (Continued)								
Non-GLP Reverse Mutation Test of Naldemedine Impurity (*Impurity K) with Bacteria	*Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*	*In vitro*	-	0, 4.88, 19.5, 39.1, 78.1, 156, 313, 625, 1250, 5000 µg/plate	No	[redacted]	S-297995-TF-287-N ([redacted]01-5342)	4.2.3.7-12
Non-GLP Reverse Mutation Test of Naldemedine Impurity (*Impurity L) with Bacteria	*Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*	*In vitro*	-	0, 6.86, 20.6, 61.7, 185, 556, 1667, 5000 µg/plate	No	Shionogi & Co., Ltd	GEN-2007-193	4.2.3.7-13
Preliminary Skin Phototoxicity Study	Mouse/ Hos:HR-1	Gavage	Single	0, 30, 300	No	Shionogi & Co., Ltd	R-297995-TB-006-R	4.2.3.7-14
Skin Phototoxicity Study	Mouse/ Hos:HR-1	Gavage	Single	0, 30, 300	Yes	Shionogi & Co., Ltd	S-297995-TB-249-L	4.2.3.7-05

[(a)] The doses of naldemedine tosylate are expressed as naldemedine.
[(b)] In parenthesis, CRO study number is shown.

(続く)

2.6.7.1 毒性試験： 一覧表 (続き)

Test Article: Naldemedine Tosylate

Type of Study	Species/Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Doses [a] (mg/kg or mg/kg/day)	GLP Compliance	Testing Facility	Study Number [b]	Location in CTD
Other Toxicity Studies (Continued)								
Drug discrimination of naldemedine tosylate in rats (Dose Finding Study)	Rat/ Crlj:LE	Oral	Single	0.003, 0.01, 0.03, 0.1, 0.3, 1	No	[redacted]	S-297995-TF-323-N ([redacted]14427)	4.2.3.7-18
Drug discrimination of naldemedine tosylate in rats	Rat/ Crlj:LE	Oral	Single	0.03, 0.1, 0.3	Yes	[redacted]	S-297995-TF-334-L ([redacted]14428)	4.2.3.7-15
Psychological dependence liability by intravenous self-administration of naldemedine tosylate in monkeys (Dose Finding Study)	Monkey/ Rhesus	Intravenous	Single	0.1, 1, 10 μg/kg	No	[redacted]	S-297995-TF-322-N ([redacted]14425)	4.2.3.7-19

[a] The doses of naldemedine tosylate are expressed as naldemedine.
[b] In parentheses, CRO study numbers are shown.

(続く)

2.6.7.1 毒性試験： 一覧表 (続き)

Test Article: Naldemedine Tosylate

Type of Study	Species/Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Doses [(a)] (mg/kg/day)	GLP Compliance	Testing Facility	Study Number [(b)]	Location in CTD
Other Toxicity Studies (Continued)								
Psychological dependence liability by intravenous self-administration of naldemedine tosylate in monkeys	Monkey/ Rhesus	Intravenous	2-hour self-administration for 4 day/dose and 24-hour self-administration for 2 or 3 weeks/dose	0.03, 0.1, 0.3, 1, 3, 10 µg/kg/infusion (2-hour self-administration experiment) 1, 3, 10 µg/kg/infusion (24-hour self-administration experiment)	Yes	[redacted]	S-297995-TF-335-L ([redacted]14426)	4.2.3.7-16
Physical dependence of naldemedine tosylate in rats (Dose Finding Study)	Rat/ Crl:CD(SD)	Oral	1 day (twice daily)	20 (10×2), 60 (30×2), 200 (100×2)	No	[redacted]	S-297995-TF-324-N ([redacted]14429)	4.2.3.7-20
Physical dependence of naldemedine tosylate in rats	Rat/ Crl:CD(SD)	Oral	28 days (twice daily)	60 (30×2), 200 (100×2)	Yes	[redacted]	S-297995-TF-333-L ([redacted]14430)	4.2.3.7-17

[(a)] The doses of naldemedine tosylate are expressed as naldemedine.
[(b)] In parentheses, CRO study numbers are shown.

(続く)

2.6.7.1 毒性試験： 一覧表 (続き)

Test Article: Naldemedine Tosylate

Type of Study	Species/Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Doses [(a)] (mg/kg)	GLP Compliance	Testing Facility	Study Number	Location in CTD
Other Toxicity Studies (Continued)								
Withdrawal symptoms induced by naldemedine tosylate, methylnaltrexone, and naloxone in morphine-dependent mice	Mouse/ C57BL/6NCrl Crlj	Naldemedine tosylate: Oral Methylnaltrexone and Naloxone: Subcutaneous	Single	Naldemedine tosylate: 0.01, 0.1, 1, 10 Methylnaltrexone: 0.01, 0.1, 1, 10 Naloxone: 0.1	No	Shionogi & Co., Ltd.	R-297995-EB-073-N	4.2.3.7-21
Withdrawal symptoms induced by naldemedine tosylate and naloxone in morphine-dependent rats	Rat/ Jcl:Wistar	Naldemedine tosylate: Oral Naloxone: Subcutaneous	Single	Naldemedine tosylate: 0.01, 0.03, 0.1, 0.3, 1, 3 Naloxone: 0.1	No	Shionogi & Co., Ltd.	S-297995-SB-270-N	4.2.3.7-22

[(a)] The doses of naldemedine tosylate are expressed as naldemedine.

2.6.7.2 トキシコキネティクス： トキシコキネティクス試験の一覧表

Test Article: Naldemedine Tosylate

Type of Study	Test System	Method of Administration	Doses [(a)] (mg/kg/day)	GLP Compliance	Study Number	Location in CTD
One-Month Repeat-Dose Toxicity Study	Rats	Gavage	30, 100, 1000	Yes	R-297995-TB-048-L	4.2.3.2-01
One-Month Repeat-Dose Toxicity Study (Supplemental Study)	Rats	Gavage	0.3, 1, 3, 10	Yes	R-297995-TB-091-L	4.2.3.2-02
Six-Month Repeat-Dose Toxicity Study	Rats	Gavage	10, 100, 1000	Yes	R-297995-TF-108-L	4.2.3.2-03
One-Month Repeat-Dose Toxicity Study	Dogs	Gavage	1, 3, 10, 50	Yes	R-297995-TB-046-L	4.2.3.2-04
Three-Month Repeat-Dose Toxicity Study	Dogs	Gavage	1, 5, 30	Yes	S-297995-TF-109-L	4.2.3.2-05
Nine-Month Repeat-Dose Toxicity Study	Dogs	Gavage	1, 4, 20	Yes	S-297995-TF-219-L	4.2.3.2-06
Thirteen-Week Dose Range-Finding Study For Carcinogenicity Study	Mice	Gavage	100, 300, 1000	Yes	S-297995-TF-226-L	4.2.3.4-04
Carcinogenicity Study	Mice	Gavage	10, 30, 100	Yes	S-297995-TF-265-L	4.2.3.4-01
Carcinogenicity Study	Rats	Gavage	10, 30, 100	Yes	S 297995-TF-266-L	4.2.3.4-02
Embryo-Fetal Development Study	Rats	Gavage	10, 100, 1000	Yes	S-297995-TF-146-L	4.2.3.5-02
Embryo-Fetal Development Study	Rabbits	Gavage	25, 100, 400	Yes	S-297995-TF-182-L	4.2.3.5-03

[(a)] As naldemedine.

2.6.7.3 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: Naldemedine Tosylate

Daily Dose [a] (mg/kg)	Steady State Maximum Concentration (C_{max}, μg/mL) of Naldemedine							
	Mice [b]		Rats [b]		Rabbits [b]	Dogs [b]		Humans [c]
	M	F	M	F	F	M	F	M & F
0. 004 [d]								0.002 [n]
0.3				N.C. [h]				
1				0.10 [h]		0.52 [k], 0.552 [l], 0.295 [m]	0.57 [k], 0.455 [l], 0.401 [m]	
3				0.46 [h]		2.29 [k]	2.04 [k]	
4						2.32 [m]	1.90 [m]	
5						3.79 [l]	2.67 [l]	
10	2.58 [e]	5.08 [e]	1.93 [f], 0.76 [g]	2.71 [f], 1.30 [g], 1.91 [h], 1.39 [i]		6.48 [k]	7.47 [k]	
20						10.0 [m]	8.35 [m]	
25					0.351 [j]			

N.C., Not calculated because of below the lower limit of quantification (BLQ, < 0.02 μg/mL).
[a] As naldemedine.
[b] By gavage.
[c] By tablet.
[d] Calculated from the clinical dose (0.2 mg) and human body weight (assumed to be 50 kg).
[e] The C_{max} on Week 26 of carcinogenicity study in mice [4.2.3.4-01].
[f] The C_{max} on Day 183 of 6-month repeat-dose toxicity study in rats [4.2.3.2-03].
[g] The C_{max} on Week 26 of carcinogenicity study in rats [4.2.3.4-02].
[h] The C_{max} on Day 30 of 1-month repeat-dose toxicity study in rats (Supplemental study) [4.2.3.2-02].
[i] The C_{max} on Gestation Day 17 of embryo-fetal development study in rats [4.2.3.5-02].
[j] The C_{max} on Gestation Day 18 of embryo-fetal development study in rabbits [4.2.3.5-03].
[k] The C_{max} on Day 30 of 1-month repeat-dose toxicity study in dogs [4.2.3.2-04].
[l] The C_{max} on Day 91 of 3-month repeat-dose toxicity study in dogs [4.2.3.2-05].
[m] The C_{max} on Day 273 of 9-month repeat-dose toxicity study in dogs [4.2.3.2-06].
[n] The geometric mean C_{max} at Week 28 at the intended clinical dose (0.2 mg/day) [5.3.5.1-04].

(続く)

2.6.7.3 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 (続き)

Test Article: Naldemedine Tosylate

Daily Dose [a] (mg/kg)	Steady State C_{max} (μg/mL) of Naldemedine (Continued)							
	Mice [b]		Rats [b]		Rabbits [b]	Dogs [b]		Humans [c]
	M	F	M	F	F	M	F	M & F
0. 004 [d]								0.002 [o]
30	8.37 [e]	10.8 [e]	3.17 [g,h], 3.71 [i]	6.95 [g,h], 4.26 [i]		13.9 [m]	13.6 [m]	
50						20.12 [n]	22.24 [n]	
100	27.4 [e], 21.2 [f]	23.8 [e], 20.6 [f]	9.42 [g], 12.53 [i], 10.2 [j]	13.2 [g], 10.58 [i], 18.7 [j], 9.84 [k]	3.46 [l]			
300	43.8 [f]	46.6 [f]						
400					8.65 [l]			
1000	78.6 [f]	70.8 [f]	48.68 [i], 31.0 [j]	42.38 [i], 47.8 [j], 29.3 [k]				

[a] As naldemedine.
[b] By gavage.
[c] By tablet.
[d] Calculated from the clinical dose (0.2 mg) and human body weight (assumed to be 50 kg).
[e] The C_{max} on Week 26 of carcinogenicity study in mice [4.2.3.4-01].
[f] The C_{max} on Day 91 of 13-week dose range-finding study for carcinogenicity study in mice [4.2.3.4-04].
[g] The C_{max} on Week 26 of carcinogenicity study in rats [4.2.3.4-02].
[h] Note that this mean value was calculated from two animals.
[i] The C_{max} on Day 30 of 1-month repeat-dose toxicity study in rats [4.2.3.2-01].
[j] The C_{max} on Day 182 of 6-month repeat-dose toxicity study in rats [4.2.3.2-03].
[k] The C_{max} on Gestation Day 17 of embryo-fetal development study in rats [4.2.3.5-02].
[l] The C_{max} on Gestation Day 18 of embryo-fetal development study in rabbits [4.2.3.5-03].
[m] The C_{max} on Day 91 of 3-month repeat-dose toxicity study in dogs [4.2.3.2-05].
[n] The C_{max} on Day 30 of 1-month repeat-dose toxicity study in dogs [4.2.3.2-04].
[o] The geometric mean C_{max} at Week 28 at the intended clinical dose (0.2 mg/day) [5.3.5.1-04].

(続く)

2.6.7.3 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 (続き)

Test Article: Naldemedine Tosylate

Daily Dose [a] (mg/kg)	Steady State Area Under the Concentration-Time Curve from 0 to 24 Hours (AUC_{0-24hr}, µg·hr/mL) of Naldemedine							
	Mice [b]		Rats [b]		Rabbits [b]	Dogs [b]		Humans [c]
	M	F	M	F	F	M	F	M & F
0. 004 [d]								0.01694 [n]
0.3				N.C. [h]				
1				0.20 [h]		1.26 [k], 0.880 [l], 0.707 [m]	1.27 [k], 0.724 [l], 0.991 [m]	
3				0.87 [h]		5.03 [k]	4.24 [k]	
4						5.85 [m]	5.97 [m]	
5						8.28 [l]	5.90 [l]	
10	32.2 [e]	47.2 [e]	6.51 [f], 6.44 [g]	7.36 [f], 8.59 [g], 3.04 [h], 8.78 [i]		23.95 [k]	19.60 [k]	
20						55.9 [m]	40.5 [m]	
25					0.366 [j]			

N.C., Not calculated because of BLQ (< 0.02 µg/mL).
[a] As naldemedine.
[b] By gavage.
[c] By tablet.
[d] Calculated from the clinical dose (0.2 mg) and human body weight (assumed to be 50 kg).
[e] The AUC_{0-24hr} on Week 26 of carcinogenicity study in mice [4.2.3.4-01].
[f] The AUC_{0-24hr} on Day 182 of 6-month repeat-dose toxicity study in rats [4.2.3.2-03].
[g] The AUC_{0-24hr} on Week 26 of carcinogenicity study in rats [4.2.3.4-02].
[h] The AUC_{0-24hr} on Day 30 of 1-month repeat-dose toxicity study in rats (Supplemental study) [4.2.3.2-02].
[i] The AUC_{0-24hr} on Gestation Day 17 of embryo-fetal development study in rats [4.2.3.5-02].
[j] The AUC_{0-24hr} on Gestation Day 18 of embryo-fetal development study in rabbits [4.2.3.5-03].
[k] The AUC_{0-24hr} on Day 30 of 1-month repeat-dose toxicity study in dogs [4.2.3.2-04].
[l] The AUC_{0-24hr} on Day 91 of 3-month repeat-dose toxicity study in dogs [4.2.3.2-05].
[m] The AUC_{0-24hr} on Day 273 of 9-month repeat-dose toxicity study in dogs [4.2.3.2-06].
[n] The geometric mean $AUC_{0-\tau}$ at Week 28 at the intended clinical dose (0.2 mg/day) [5.3.5.1-04].

(続く)

2.6.7.3 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 (続き)

Test Article: Naldemedine Tosylate

Daily Dose [a] (mg/kg)	Steady State $AUC_{0\text{-}24hr}$ (μg·hr/mL) of Naldemedine (Continued)							
	Mice [b]		Rats [b]		Rabbits [b]	Dogs [b]		Humans [c]
	M	F	M	F	F	M	F	M & F
0. 004 [d]								0.01694 [o]
30	104 [e]	134 [e]	29.7 [g,h], 11.32 [i]	48.2 [g], 10.60 [i]		90.9 [m]	78.7 [m]	
50						142.8 [n]	130.09 [n]	
100	339 [e], 194 [f]	297 [e], 165 [f]	109 [g], 61.79 [i], 67.9 [j]	107 [g], 36.44 [i], 61.5 [j], 126 [k]	3.82 [l]			
300	475 [f]	362 [f]						
400					14.3 [l]			
1000	787 [f]	865 [f]	524.43 [i], 420 [j]	286.63 [i], 453 [j], 391 [k]				

[a] As naldemedine.
[b] By gavage.
[c] By tablet.
[d] Calculated from the clinical dose (0.2 mg) and human body weight (assumed to be 50 kg).
[e] The $AUC_{0\text{-}24hr}$ on Week 26 of carcinogenicity study in mice [4.2.3.4-01].
[f] The $AUC_{0\text{-}24hr}$ on Day 91 of 13-week dose range-finding study for carcinogenicity study in mice [4.2.3.4-04].
[g] The $AUC_{0\text{-}24hr}$ on Week 26 of carcinogenicity study in rats [4.2.3.4-02].
[h] Note that this mean value was calculated from two animals.
[i] The $AUC_{0\text{-}24hr}$ on Day 30 of 1-month repeat-dose toxicity study in rats [4.2.3.2-01].
[j] The $AUC_{0\text{-}24hr}$ on Day 182 of 6-month repeat-dose toxicity study in rats [4.2.3.2-03].
[k] The $AUC_{0\text{-}24hr}$ on Gestation Day 17 of embryo-fetal development study in rats [4.2.3.5-02].
[l] The $AUC_{0\text{-}24hr}$ on Gestation Day 18 of embryo-fetal development study in rabbits [4.2.3.5-03].
[m] The $AUC_{0\text{-}24hr}$ on Day 91 of 3-month repeat-dose toxicity study in dogs [4.2.3.2-05].
[n] The $AUC_{0\text{-}24hr}$ on Day 30 of 1-month repeat-dose toxicity study in dogs [4.2.3.2-04].
[o] The geometric mean $AUC_{0\text{-}\tau}$ at Week 28 at the intended clinical dose (0.2 mg/day) [5.3.5.1-04].

2.6.7.4 毒性試験： 被験物質（ロット毎）一覧

Test Article: Naldemedine Tosylate

Batch No.	Purity (%)	Specified Impurities (%)			Study Number	Type of Study
		Naltrexone	The Largest Individual (Except Naltrexon)	Total of Related Substances		
A81001	97.5	0.21	0.13	0.54	R-297995-TB-047-L	Single-Dose Toxicity Study In Rats [4.2.3.1-01]
					R-297995-TB-045-L	Single-Dose Toxicity Study In Dogs [4.2.3.1-02]
					R-297995-TB-048-L	One-Month Repeat-Dose Toxicity Study In Rats [4.2.3.2-01]
					R-297995-TB-091-L	One-Month Repeat-Dose Toxicity Study In Rats (Supplemental Study) [4.2.3.2-02]
					R-297995-TF-108-L	Six-Month Repeat-Dose Toxicity Study In Rats [4.2.3.2-03]
					R-297995-TB-046-L	One-Month Repeat-Dose Toxicity Study In Dogs [4.2.3.2-04]
					R-297995-TF-109-L	Three-Month Repeat-Dose Toxicity Study In Dogs [4.2.3.2-05]
					S-297995-TF-219-L	Nine-Month Repeat-Dose Toxicity Study In Dogs [4.2.3.2-06]
					R-297995-TB-051-L	Reverse Mutation Test with Bacteria [4.2.3.3-01]
					R-297995-TF-052-L	Chromosomal Aberration Test in Chinese Hamster Lung Cells [4.2.3.3-02]
					R-297995-TF-053-L	Micronucleus Test with Rat Bone Marrow Cells [4.2.3.3-03]
					S-297995-TB-218-R	Preliminary 2-week Dose Range-finding Study for Carcinogenicity Study in Mice [4.2.3.4-03]
					S-297995-TF-226-L	Thirteen-week Dose Range-finding Study for Carcinogenicity Study in Mice [4.2.3.4-04]
					S-297995-TF-104-L	Fertility and Early Embryonic Development to Implantation in Rats [4.2.3.5-01]
					S-297995-TF-146-L	Embryo-Fetal Development In Rats [4.2.3.5-02]
					S-297995-TF-119-L	Preliminary 2-Week Repeat-Dose Toxicity Study In Non-Pregnant Rabbits [4.2.3.5-05]
					S-297995-TF-163-L	Dose Range-Finding Study In Pregnant Rabbits [4.2.3.5-06]
					S-297995-TF-182-L	Embryo-Fetal Development In Rabbits [4.2.3.5-03]
					S-297995-TF-275-L	Prenatal and Postnatal Development, Including Maternal Function in Rats [4.2.3.5-04]

(続く)

2.6.7.4 毒性試験： 被験物質（ロット毎）一覧（続き）

Test Article: Naldemedine Tosylate

Batch No.	Purity (%)	Specified Impurities (%)			Study Number	Type of Study
		Naltrexone	The Largest Individual (Except Naltrexon)	Total of related substances		
A81001	97.5	0.21	0.13	0.54	R-297995-TF-084-N	Ocular Irritation Study in Rabbits [4.2.3.6-01]
					R-297995-TF-085-N	Dermal Irritation Study in Rabbits [4.2.3.6-02]
					S-297995-TB-234-L	Immunotoxicity Study in Rats [4.2.3.7-01]
					S-297995-TF-162-N	Study for Effects on Plasma Prolactin Concentration in Rats [4.2.3.7-06]
					R-297995-TF-105-R	Preliminary Study for Effects on Estrous Cycle and Plasma Reproductive Hormone Concentration in Female Rats [4.2.3.7-07]
A81002	96.4	0.13	0.20	0.76	S-297995-TB-249-L	Skin Phototoxicity Study in Mice [4.2.3.7-05]
					R-297995-EB-073-N	Effect on Precipitate Withdrawal Symptoms in Morphine-Dependent Mice [4.2.3.7-21]
					S-297995-SB-270-N	Study on Precipitated Withdrawal Symptoms in Morphine-Dependent Rats [4.2.3.7-22]
B15001	99.7	< 0.05 [(a)]	< 0.05 [(a)]	0.07	S-297995-TF-265-L	Carcinogenicity Study in Mice [4.2.3.4-01]
					S-297995-TF-266-L	Carcinogenicity Study in Rats [4.2.3.4-02]
					S-297995-TF-334-L	Study on Drug Discrimination in Rats [4.2.3.7-15]
					S-297995-TF-335-L	Study on Psychological Dependence Liability by Intravenous Self-Administration in Monkeys [4.2.3.7-16]
					S-297995-TF-333-L	Study on Physical Dependence Liability in Rats [4.2.3.7-17]
					S-297995-TF-323-N	Preliminary Study on Drug Discrimination in Rats [4.2.3.7-18]
					S-297995-TF-322-N	Preliminary Study on Psychological Dependence Liability by Intravenous Self-Administration in Monkeys [4.2.3.7-19]
					S-297995-TF-324-N	Preliminary Study on Physical Dependence Liability in Rats [4.2.3.7-20]

[(a)] Below the reporting threshold defined by ICH Q3.

2.6.7.5 単回投与毒性試験

Test Article: Naldemedine Tosylate

<table>
<tr><th>Species/ Strain</th><th>Method of Administration (Vehicle/ Formulation)</th><th>Doses [(a)] (mg/kg)</th><th>Gender and No. per Group</th><th>Observed Maximum Nonlethal Dose (mg/kg)</th><th>Approxi-mate Lethal Dose (mg/kg)</th><th>Noteworthy Findings</th><th>Study Number [Location in CTD]</th></tr>
<tr><td>Rat/
Crl:CD(SD)</td><td>Gavage
(0.5 w/v% methylcellulose [MC] aqueous solution/ Suspension)</td><td>0, 500, 2000</td><td>5M
5F</td><td>2000</td><td>> 2000</td><td>500:
Suppression of body weight increase in males
2000:
Compound-colored feces; Suppression of body weight increase
Toxicokinetics of naldemedine
(Mean value of 4 rats)
<table>
<tr><th rowspan="2">Dose (mg/kg)</th><th colspan="2">C_{max} (μg/mL)</th><th colspan="2">AUC_{0-24hr} (μg·hr/mL)</th></tr>
<tr><th>M</th><th>F</th><th>M</th><th>F</th></tr>
<tr><td>0</td><td>N.E.</td><td>N.E.</td><td>N.E.</td><td>N.E.</td></tr>
<tr><td>500</td><td>25.33</td><td>26.83</td><td>86.19</td><td>104.26</td></tr>
<tr><td>2000</td><td>38.50</td><td>33.78</td><td>193.44</td><td>201.47</td></tr>
</table></td><td>R-297995-TB-047-L [4.2.3.1-01]</td></tr>
<tr><td>Dog/
TOYO Beagle</td><td>Gavage
(0.5 w/v% MC aqueous solution/ Suspension)</td><td>0, 200, 1000</td><td>1M
1F</td><td>1000</td><td>> 1000</td><td>200:
Vomiting/vomitus; Increase of alkaline phosphatase (ALP) and/or total bilirubin (T.BIL)
1000:
Vomiting/vomitus (more frequent than 200 mg/kg); Slight decrease in body weight; Increase of ALP (greater extent than 200 mg/kg) and/or T.BIL
Toxicokinetics of naldemedine
<table>
<tr><th rowspan="2">Dose (mg/kg)</th><th colspan="2">C_{max} (μg/mL)</th><th colspan="2">AUC_{0-24hr} (μg·hr/mL)</th></tr>
<tr><th>M</th><th>F</th><th>M</th><th>F</th></tr>
<tr><td>0</td><td>N.E.</td><td>N.E.</td><td>N.E.</td><td>N.E.</td></tr>
<tr><td>200</td><td>40.70</td><td>52.20</td><td>194.37</td><td>248.33</td></tr>
<tr><td>1000</td><td>62.30</td><td>73.70</td><td>244.18</td><td>663.11</td></tr>
</table></td><td>R-297995-TB-045-L [4.2.3.1-02]</td></tr>
</table>

N.E., Not estimated because of BLQ (< 0.02 μg/mL).
[(a)] As naldemedine.

2.6.7.6 反復投与毒性試験： 重要な試験以外の試験

Test Article: Naldemedine Tosylate

Species/ Strain	Method of Administration (Vehicle/ Formulation)	Duration of Dosing	Doses [(a)] (mg/kg/ day)	Gender and No. per Group	NOAEL (mg/kg/ day)	Noteworthy Findings	Study Number [Location in CTD]
Rat/ Crl:CD(SD)	Gavage (0.5 w/v% MC aqueous solution/ Suspension)	2 Weeks	0, 8, 40, 200, 1000	4M 4F	40	≥ 200: Pseudopregnancy-like effects in females 1000: Suppression of body weight increase accompanied with slight decrease in food consumption in males	R-297995-TB-003-R [4.2.3.2-07]
Dog/ TOYO Beagle	Gavage (0.5 w/v% MC aqueous solution/ Suspension)	2 Weeks	0, 3, 10, 100	1M 1F	3	≥ 10: Inflammatory cell infiltration in liver 100: Vomiting/vomitus; Single cell necrosis of hepatocyte; Increase in alanine aminotransferase (ALT) activity	R-297995-TB-002-R [4.2.3.2-08]

[(a)] As naldemedine.

2.6.7.7 反復投与毒性試験： 重要な試験

2.6.7.7.1 One-Month Repeat-Dose Toxicity Study in Rats

Test Article: Naldemedine Tosylate

Report Title: One-Month Oral Toxicity Study of RSC-297995 monotosylate in Rats			
Species/Strain: Rat/Crl:CD(SD)	**Duration of Dosing:** 1 month	**Duration of Post-dose:** 1 month	**Study No.** R-297995-TB-048-L
Initial Age: 6 weeks	**Method of Administration:** Oral gavage		**Location in CTD:** 4.2.3.2-01
Date of First Dose: [redacted] 20[redacted]	**Vehicle/Formulation:** 0.5 w/v% MC aqueous solution/Suspension		**GLP Compliance:** Yes
Special Features: None			
NOAEL: 1000 mg/kg/day			

Daily Dose (mg/kg, as naldemedine)			**0 (Control)**		**30**		**100**		**1000**	
Number Evaluated			**M: 15**	**F:15**	**M: 10**	**F:10**	**M: 10**	**F:10**	**M: 15**	**F:15**
Toxicokinetics [(a)]										
Number of Animals			4	4	4	4	4	4	4	4
Naldemedine	**C_{max} (μg/mL)**	**Day 1**	N.C.	N.C.	3.17	3.73	10.78	12.85	32.03	28.20
		Day 30	N.C.	N.C.	3.71	4.26	12.53	10.58	48.68	42.38
	$AUC_{0\text{-}24hr}$ (μg·hr/mL)	**Day 1**	N.C.	N.C.	7.84	9.22	36.27	41.97	281.18	204.14
		Day 30	N.C.	N.C.	11.32	10.60	61.79	36.44	524.43	286.63
Nor-naldemedine	**C_{max} (μg/mL)**	**Day 1**	N.C.	N.C.	0.19	0.07	0.49	0.26	1.64	0.45
		Day 30	N.C.	N.C.	0.25	0.09	0.63	0.18	1.27	0.44
	$AUC_{0\text{-}24hr}$ (μg·hr/mL)	**Day 1**	N.C.	N.C.	0.51	0.10	1.85	0.69	12.40	2.62
		Day 30	N.C.	N.C.	0.78	0.17	3.27	0.57	12.59	2.49
Naldemedine 3-*O*-β-D-glucuronide (Naldemedine 3-G)	**C_{max} (μg/mL)**	**Day 1**	N.C.	N.C.	0.37	0.30	1.16	0.91	6.01	3.78
		Day 30	N.C.	N.C.	0.12	0.21	1.35	0.75	29.85	12.54
	$AUC_{0\text{-}24hr}$ (μg·hr/mL)	**Day 1**	N.C.	N.C.	0.66	0.49	3.94	2.64	44.25	21.28
		Day 30	N.C.	N.C.	0.29	0.37	6.49	2.13	281.79	70.64
Naldemedine 6-*O*-β-D-glucuronide (Naldemedine 6-G)	**C_{max} (μg/mL)**	**Day 1**	N.C.	N.C.	0.024	0.010	0.061	0.031	0.171	0.132
		Day 30	N.C.	N.C.	0.018	0.011	0.061	0.021	0.569	0.289
	$AUC_{0\text{-}24hr}$ (μg·hr/mL)	**Day 1**	N.C.	N.C.	0.027	0.009	0.149	0.058	1.077	0.721
		Day 30	N.C.	N.C.	0.032	0.013	0.285	0.056	5.773	1.816

Day 1, The initiation day of dosing.
N.C., Not calculated because of BLQ (< 0.02 μg/mL for naldemedine, nor-naldemedine, and naldemedine 3-G; < 0.002 μg/mL for naldemedine 6-G).
[(a)] Group means are shown.

(続く)

2.6.7.7.1 One-Month Repeat-Dose Toxicity Study in Rats (続き)

Test Article: Naldemedine Tosylate

Daily Dose (mg/kg, as naldemedine)		0 (Control)		30		100		1000	
Number Evaluated		M: 15	F:15	M: 15	F:15	M: 15	F:15	M: 15	F:15
Noteworthy Findings									
Died or Sacrificed Moribund		0	0	0	0	0	0	0	0
Clinical Observations	Salivation (transient)	−	−	−	−	−	−	+	+
Body Weight [a]	Day 2	215.2	161.4	−4 **	−3	−7 **	−5	−11 **	−7 **
	Day 4	233.1	168.3	−5 **	−5	−7 **	−4	−12 **	−5 *
	Day 10	287.9	184.3	−6 **	−3	−6 **	+2	−10 **	0
	Day 22	376.6	216.0	−5 *	0	−9 **	+3	−9 **	+1
	Day 31	423.7	232.2	−5 *	-2	-10 **	+3	−9 **	+2
Food Consumption [b]	Day 2	22.5	17.0	−27 **	−28 **	−41 **	−41 **	−69 **	−65 **
	Day 4	23.0	15.4	−14 **	−19 **	−20 **	−16 **	−28 **	−25 **
	Day 10	24.2	15.1	−8 **	−2	−10 **	+3	−12 **	+7
	Day 22	25.6	16.6	−7 *	−1	−14 **	0	−4	0
	Day 31	25.0	15.7	−6	−4	−16 **	−1	−5	+2
Ophthalmoscopy		–	–	–	–	–	–	–	–
Estrus cycle	Irregular Estrus Cycle [c]	N.E.	–	N.E.	5	N.E.	6	N.E.	8

Day 1, The initiation day of dosing. +, Confirmed. N.E., Not examined. −, No noteworthy findings.

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

[b] For controls, group means of food consumption (g/rat/day) are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown. Statistical significance based on actual data (not on the percentage differences).

[c] Number of animals which duration of estrus and following estrus were over 5 days (prolongation of diestrus phase).

* P < 0.05, ** P < 0.01 vs. control (Dunnett's parametric multiple t-test).

(続く)

2.6.7.7.1 One-Month Repeat-Dose Toxicity Study in Rats (続き)

Test Article: Naldemedine Tosylate

Daily Dose (mg/kg, as naldemedine)			0 (Control)		30		100		1000	
Number Evaluated			M: 15	F: 15	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10	M: 15	F: 15
Noteworthy Findings (Continued)										
Urinalysis	Number Examined		10	10	10	10	10	10	10	10
	Volume (mL) [a]		3.6	1.3	3.5	1.0	3.0	1.6	2.0 **	2.1
	Specific gravity [a]		1.027	1.036	1.031	1.044	1.035	1.036	1.053 **	1.038
	Protein								§	
		Negative	0	5	0	2	0	5	0	0
		Trace	4	3	1	5	4	4	0	3
		30 mg/dL	6	2	9	3	5	1	4	6
		100 mg/dL	0	0	0	0	1	0	6	1
Hematology			–	–	–	–	–	–	–	–
Blood Chemistry	Number Examined		10	10	10	10	10	10	10	10
	Triglyceride (mg/dL)		149	51	114	51	80 **	46	59 **	36
Organ Weight [b]	Number Examined		10	10	10	10	10	10	10	10
	Liver	Absolute	16.552 g	7.942 g	−0.8	+1.2	−5.4	+8.3	+10.5 *	+16.2 *
		Relative	3.94%	3.48%	+3.3	+1.1	+4.3	+3.7	+19.8 **	+12.9 **
	Pituitary	Absolute	13.0 mg	11.7 mg	+2.3	+17.9	−5.4	+15.4	−4.6	+22.2 *
		Relative	3.11 mg%	5.15 mg%	+6.8	+16.7	+3.5	+10.5	+2.9	+19.2 *
Gross Pathology	Number Examined		10	10	10	10	10	10	10	10
	Cecum	Enlargement	–	–	–	–	–	–	–	4
Histopathology			–	–	–	–	–	–	–	–

Day R1, The first day of recovery period. −, No noteworthy findings.
[a] Group means are shown.
[b] For controls, group means of organ weight (g) are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown. Statistical significance based on actual data (not on the percentage differences).
* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. control (Dunnett's parametric multiple t-test).
§ $P < 0.05$ vs. control (Cumulative Chi-squares test with Dunn-Sidak adjustment).

(続く)

2.6.7.7.1 One-Month Repeat-Dose Toxicity Study in Rats (続き)

Test Article: Naldemedine Tosylate

Daily Dose (mg/kg, as naldemedine)		0 (Control)		30		100		1000	
Number Evaluated		M: 15	F: 15	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10	M: 15	F: 15
Post-dose Evaluation									
Noteworthy Findings									
Number Examined		5	5	0	0	0	0	5	5
Died or Sacrificed Moribund		0	0					0	0
Clinical Observations		–	–					–	–
Body Weight [a]	Day R2	433.5	242.4					−10 *	+3
	Day R11	480.3	255.5					−8 *	0
Food Consumption [b]	Day R6	25.5	17.0					+16 **	+26 **
	Day R11	26.1	16.1					+12 *	+12
Ophthalmoscopy		–	–					–	–
Estrus Cycle	Irregular Estrus Cycle [c]	N.E.	1					N.E.	3 [d]
Urinalysis		–	–					–	–

Day R1, The first day of recovery period. N.E., Not examined. −, No noteworthy findings.
[a] For controls, group means of body weight (g) are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown. Statistical significance based on actual data (not on the percentage differences).
[b] For controls, group means of food consumption (g/day/rat) are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown. Statistical significance based on actual data (not on the percentage differences).
[c] Number of animals which duration of estrus and following estrus were over 5 days (prolongation of diestrus phase).
[d] In 2 females, prolongation of estrus cycle was continued from administration period.
* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. control (Dunnett's parametric multiple t-test).

(続く)

2.6.7.7.1 One-Month Repeat-Dose Toxicity Study in Rats (続き)

Test Article: Naldemedine Tosylate

Daily Dose (mg/kg, as naldemedine)	**0 (Control)**		**30**		**100**		**1000**	
Number Evaluated	**M: 15**	**F: 15**	**M: 10**	**F: 10**	**M: 10**	**F: 10**	**M: 15**	**F: 15**
Post-dose Evaluation (Continued)								
Noteworthy Findings (Continued)								
Number Examined	5	5	0	0	0	0	5	5
Hematology	–	–					–	–
Blood Chemistry	–	–					–	–
Organ Weight (%)	–	–					–	–
Gross Pathology	–	–					–	–
Histopathology	–	–					–	–

–, No noteworthy findings.

2.6.7.7.2 One-Month Repeat-Dose Toxicity Study in Rats (Supplemental Study)

Test Article: Naldemedine Tosylate

Report Title: One-Month Oral Toxicity Study of RSC-297995 monotosylate in Rats		
Species/Strain: Rat/Crl:CD(SD)/Female	**Duration of Dosing:** 1 month	**Study No.** R-297995-TB-091-L
Initial Age: 6 weeks	**Duration of Post-dose:** None	**Location in CTD:** 4.2.3.2-02
Date of First Dose: [redacted] 20[redacted]	**Method of Administration:** Oral gavage	**GLP Compliance:** Yes
	Vehicle/Formulation: 0.5 w/v% MC aqueous solution/Suspension	
Special Features: None		
NOAEL: Not determined		

Daily Dose (mg/kg, as naldemedine)			**0 (Control)**	**0.3**	**1**	**3**	**10**
Number Evaluated			**F: 10**	**F: 10**	**F: 10**	**F: 10**	**F: 10**
Toxicokinetics [(a)]							
Number of Animals			4	4	4	4	4
Naldemedine	**C_{max} (μg/mL)**	**Day 1**	N.C.	N.C.	0.05	0.17	0.74
		Day 30	N.C.	N.C.	0.10	0.46	1.91
	$AUC_{0\text{-}24hr}$ (μg·hr/mL)	**Day 1**	N.C.	N.C.	0.10	0.54	2.28
		Day 30	N.C.	N.C.	0.20	0.87	3.04
Nor-naldemedine	**C_{max} (μg/mL)**	**Day 1**	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.
		Day 30	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	0.03
	$AUC_{0\text{-}24hr}$ (μg·hr/mL)	**Day 1**	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.
		Day 30	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	0.03
Naldemedine 3-G	**C_{max} (μg/mL)**	**Day 1**	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	0.10
		Day 30	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	0.09
	$AUC_{0\text{-}24hr}$ (μg·hr/mL)	**Day 1**	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	0.25
		Day 30	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	0.08
Naldemedine 6-G	**C_{max} (μg/mL)**	**Day 1**	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	0.004
		Day 30	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	0.006
	$AUC_{0\text{-}24hr}$ (μg·hr/mL)	**Day 1**	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	0.004
		Day 30	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	0.004

Day 1, The initiation day of dosing.
N.C., Not calculated because of BLQ (< 0.02 μg/mL for naldemedine, nor-naldemedine, and naldemedine 3-G; < 0.002 μg/mL for naldemedine 6-G).
[(a)] Group means are shown.

(続く)

2.6.7.7.2 One-Month Repeat-Dose Toxicity Study in Rats (Supplemental Study) (続き)

Test Article: Naldemedine Tosylate

Daily Dose (mg/kg, as naldemedine)		0 (Control)	0.3	1	3	10
Number Evaluated		F: 10	F: 10	F: 10	F: 10	F: 10
Noteworthy Findings						
Died or Sacrificed Moribund		0	0	0	0	0
Clinical Observations		–	–	–	–	–
Body Weight		–	–	–	–	–
Estrus cycle	Number of Animals	10	10	10	10	10
	Irregular Estrus Cycle [(a)]	1	3	1	4	3

–, No noteworthy findings.
[(a)] Number of animals which duration of estrus and following estrus were over 5 days (prolongation of diestrus phase).

2.6.7.7.3 Six-Month Repeat-Dose Toxicity Study in Rats

Test Article: Naldemedine Tosylate

Report Title: Six-Month Oral Toxicity Study of RSC-297995 monotosylate in Rats		
Species/Strain: Rat/Crl:CD(SD)	**Duration of Dosing:** 6 months	**Study No.** R-297995-TF-108-L (CRO Study No. [redacted]08274)
Initial Age: 6 weeks	**Duration of Post-dose:** 1 month	**Location in CTD:** 4.2.3.2-03
Date of First Dose: [redacted] 20[redacted]	**Method of Administration:** Oral gavage	**GLP Compliance:** Yes
	Vehicle/Formulation: 0.5 w/v% MC aqueous solution/Suspension	
Special Features: None		
NOAEL: 100 mg/kg/day		

Daily Dose (mg/kg, as naldemedine)			**0 (Control)**		**10**		**100**		**1000**	
Number Evaluated			**M: 18**	**F: 18**	**M: 12**	**F: 12**	**M: 12**	**F: 12**	**M: 18**	**F: 18**
Toxicokinetics [(a)]										
Number of Animals			4	4	4	4	4	4	4	4
Naldemedine	**C_{max} (μg/mL)**	**Day 1**	N.C.	N.C.	0.761	0.988	8.33	10.1	25.3	22.7
		Day 91	N.C.	N.C.	2.03	3.53	12.5	20.1	43.7	48.8
		Day 182	N.C.	N.C.	1.93	2.71	10.2	18.7	31.0	47.8
	$AUC_{0\text{-}24hr}$ (μg·hr/mL)	**Day 1**	N.C.	N.C.	3.43	2.26	35.9	23.8	288	145
		Day 91	N.C.	N.C.	6.56	6.91	95.9	58.4	561	513
		Day 182	N.C.	N.C.	6.51	7.36	67.9	61.5	420	453
Noteworthy Findings										
Died or Sacrificed Moribund			0	0	0	0	0	0	0	0
Clinical Observations [(b)]		**Salivation**	0	0	0	0	1	0	14	4
		Increased amount of spilt food	0	0	0	0	0	0	4	0
		Soiled fur	0	0	0	0	0	0	2	5
Body Weight [(c, d)]		**Day 182**	758	364	−6	+1	−7	−5	−11 **	−13 *

Day 1, The initiation day of dosing. N.C., Not calculated because of BLQ (< 0.02 μg/mL).
[(a)] Group means are shown.
[(b)] Numerals represent number of animals with the finding.
[(c)] For controls, group means of body weight (g) are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown. Statistical significance based on actual data (not on the percentage differences).
[(d)] Body weight decreased on Day 7 and thereafter in males, and on Day 35 and thereafter in females in the 1000 mg/kg group.
* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. control (Dunnett's test or mean rank test of Dunnett type).

(続く)

2.6.7.7.3 Six-Month Repeat-Dose Toxicity Study in Rats (続き)

Test Article: Naldemedine Tosylate

Daily Dose (mg/kg, as naldemedine)			0 (Control)		10		100		1000	
Number Evaluated			M: 18	F: 18	M: 12	F: 12	M: 12	F: 12	M: 18	F: 18
Noteworthy Findings (Continued)										
Food Consumption [a]	Day 7		27.3	18.2	−7 *	−9 *	−16 **	−16 **	−26 **	−25 **
	Day 14		29.3	18.4	−4	+1	−8 *	−3	−8 *	−2
Ophthalmoscopy			–	–	–	–	–	–	–	–
Hematology	Red blood cell count (RBC) (10^6/μL)		9.21	8.12	9.02	8.00	9.06	8.12	9.07	7.61 *
	Hemoglobin (HGB) (g/dL)		15.3	14.9	15.4	14.7	15.5	14.7	15.4	13.8 **
	Hematocrit (HCT) (%)		46.5	44.2	46.7	43.8	47.1	44.0	46.7	41.1 **
	Prothrombin time (sec)		10.9	7.5	12.8	7.3	14.7 *	7.3	18.6 **	7.2 *
	Fibrinogen (mg/dL)		286.9	202.7	304.3	193.7	300.2	195.1	355.8 **	197.4
Blood Chemistry	Amylase (U/L)		–	759	–	799	–	703	–	1045 *
	Total cholesterol (T.CHO) (mg/dL)		72	80	73	85	72	87	89 *	126 **
	Phospholipids (mg/dL)		–	165	–	176	–	163	–	233 **
Urinalysis			–	–	–	–	–	–	–	–
Gross Pathology			–	–	–	–	–	–	–	–
Organ Weight	Day 183	Thymus (mg)	192	202	195	181	209	158 *	143	147 **
		Thymus (%)	27.0	59.7	28.4	52.0	30.9	48.2	22.4	50.6
Histopathology			–	–	–[b]	–[b]	–[b]	–[b]	–	–

–, No noteworthy findings.
[a] For controls, group means (g/rat/day) are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown. Statistical significance based on actual data (not on the percentage differences).
[b] A part of organs were evaluated.
* P < 0.05, ** P < 0.01 vs. control (Dunnett's test or mean rank test of Dunnett type).

(続く)

2.6.7.7.3 Six-Month Repeat-Dose Toxicity Study in Rats (続き)

Test Article: Naldemedine Tosylate

Daily Dose (mg/kg, as naldemedine)			**0 (Control)**		**10**		**100**		**1000**	
Number Evaluated			**M: 18**	**F: 18**	**M: 12**	**F: 12**	**M: 12**	**F: 12**	**M: 18**	**F: 18**
Post-dose Evaluation										
Noteworthy Findings										
Number Evaluated			6	6	0	0	0	0	6	6
Died or Sacrificed Moribund			0	0					0	0
Body Weight Gain [(a)]	**Day R28**		32	20					54	36
Organ Weights	**Day R29**	**Thymus (mg)**	150	176					156	117
		Thymus (%)	19.4	47.5					23.5	36.0
Other parameters			–	–					–	–

Day R1, The first day of recovery period. –, No noteworthy findings.
[(a)] Differences of body weight (g) between R1 and R28 are shown.

2.6.7.7.4 One-Month Repeat-Dose Toxicity Study in Dogs

Test Article: Naldemedine Tosylate

Report Title: One-Month Oral Toxicity Study of S-297995 monotosylate in Dogs		
Species/Strain: Dog/TOYO Beagle	**Duration of Dosing:** 1 month	**Study No.** R-297995-TB-046-L
Initial Age: 9 months	**Duration of Post-dose:** 1 month	**Location in CTD:** 4.2.3.2-04
Date of First Dose: [redacted] 20[redacted]	**Method of Administration:** Oral gavage	**GLP Compliance:** Yes
	Vehicle/Formulation: 0.5 w/v% MC aqueous solution/Suspension	
Special Features: None		
NOAEL: 10 mg/kg/day		

Daily Dose (mg/kg, as naldemedine)			**0 (Control)**		**1**		**3**		**10**		**50**	
Number Evaluated			**M: 5**	**F: 5**	**M: 3**	**F: 3**	**M: 3**	**F: 3**	**M: 3**	**F: 3**	**M: 5**	**F: 5**
Toxicokinetics [(a)]												
Naldemedine	**C_{max} (µg/mL)**	**Day 1**	N.C.	N.C.	0.65	0.64	1.92	1.80	5.78	6.78	31.04	21.16
		Day 9	N.C.	N.C.	0.64	0.71	2.44	1.90	7.18	5.57	19.80	20.72
		Day 30	N.C.	N.C.	0.52	0.57	2.29	2.04	6.48	7.47	20.12	22.24
	$AUC_{0\text{-}24hr}$ (µg·hr/mL)	**Day 1**	N.C.	N.C.	1.01	1.02	3.63	2.81	18.40	15.37	93.86	98.29
		Day 9	N.C.	N.C.	1.04	1.07	4.58	3.28	24.51	14.41	121.57	103.86
		Day 30	N.C.	N.C.	1.26	1.27	5.03	4.24	23.95	19.60	142.80	130.09
	Time to maximum plasma concentration (T_{max}, hr)	**Day 1**	N.C.	N.C.	0.3	0.4	0.4	0.4	0.5	0.4	1.3	0.9
		Day 9	N.C.	N.C.	0.3	0.4	0.4	0.4	0.7	0.4	1.4	1.0
		Day 30	N.C.	N.C.	0.6	0.5	0.5	0.4	0.6	0.7	1.1	1.1
	Plasma drug concentration at 24 hours post-dose (C_{24hr}, µg/mL)	**Day 1**	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	0.03	0.04
		Day 9	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	0.07	0.05
		Day 30	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	0.15	0.11

Day 1, The initiation day of dosing. N.C., Not calculated because of BLQ (< 0.02 µg/mL).
[(a)] Group means are shown.

(続く)

2.6.7.7.4 One-Month Repeat-Dose Toxicity Study in Dogs (続き)

Test Article: Naldemedine Tosylate

Daily Dose (mg/kg, as naldemedine)			0 (Control)		1		3		10		50	
Number Evaluated			M: 5	F: 5	M: 3	F: 3	M: 3	F: 3	M: 3	F: 3	M: 5	F: 5
Toxicokinetics [a] (Continued)												
Nor-naldemedine	C_{max} (µg/mL)	Day 1	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	0.06	0.06	0.16	0.34	0.78	0.64
		Day 9	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	0.06	0.05	0.16	0.12	0.49	0.53
		Day 30	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	0.05	0.05	0.13	0.11	0.78	0.54
	AUC_{0-24hr} (µg·hr/mL)	Day 1	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	0.08	0.06	0.43	0.64	2.47	2.59
		Day 9	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	0.10	0.06	0.46	0.23	2.74	2.37
		Day 30	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	0.09	0.08	0.41	0.30	7.00	2.89
	T_{max} (hr)	Day 1	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	0.5	0.4	0.8	1.0	1.3	1.0
		Day 9	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	0.5	0.4	0.8	0.5	2.0	1.7
		Day 30	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	0.5	0.5	0.8	0.5	2.4	1.6
	C_{24hr} (µg/mL)	Day 1	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.
		Day 9	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.
		Day 30	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.
Naldemedine 3-G	C_{max} (µg/mL)	Day 1	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	0.02	0.16	0.12
		Day 9	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	0.02	N.C.	0.18	0.11
		Day 30	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	0.02	0.03	0.51	0.19
	AUC_{0-24hr} (µg·hr/mL)	Day 1	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	0.01	0.37	0.31
		Day 9	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	0.04	N.C.	0.78	0.42
		Day 30	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	0.02	0.02	3.46	0.78
	T_{max} (hr)	Day 1	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	0.4	1.3	0.9
		Day 9	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	0.4	N.C.	1.4	0.8
		Day 30	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	0.4	0.5	1.3	1.1
	C_{24hr} (µg/mL)	Day 1	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.
		Day 9	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.
		Day 30	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.

Day 1, The initiation day of dosing. N.C., Not calculated because of BLQ (< 0.02 µg/mL).
[a] Group means are shown.

(続く)

2.6.7.7.4 One-Month Repeat-Dose Toxicity Study in Dogs (続き)

Test Article: Naldemedine Tosylate

Daily Dose (mg/kg, as naldemedine)			0 (Control)		1		3		10		50	
Number Evaluated			M: 5	F: 5	M: 3	F: 3	M: 3	F: 3	M: 3	F: 3	M: 5	F: 5
Toxicokinetics [a] (Continued)												
Naldemedine 6-G	C_{max} (μg/mL)	Day 1	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	0.005	0.009	0.061	0.044
		Day 9	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	0.005	0.006	0.066	0.033
		Day 30	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	0.001	0.002	0.006	0.023	0.095	0.053
	AUC_{0-24hr} (μg·hr/mL)	Day 1	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	0.010	0.014	0.258	0.198
		Day 9	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	0.014	0.015	0.412	0.167
		Day 30	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	0.001	0.002	0.016	0.057	0.790	0.318
	T_{max} (hr)	Day 1	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	1.0	0.7	1.3	1.0
		Day 9	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	0.8	0.7	1.8	0.9
		Day 30	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	0.8	0.8	0.8	0.8	1.6	1.2
	C_{24hr} (μg/mL)	Day 1	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.
		Day 9	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.
		Day 30	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.
Noteworthy Findings												
Died or Sacrificed Moribund			0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Clinical Observations [b]	Vomiting/vomitus		0	1	1	1	2	2	1	2	5	5
	Salivation		0	0	0	0	0	0	0	0	5	3
Body Weight			–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Food Consumption			–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Ophthalmoscopy			–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Electrocardiography			–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Urinalysis			–	–	–	–	–	–	–	–	–	–

Day 1, The initiation day of dosing. N.C., Not calculated because of BLQ (< 0.002 μg/mL). −, No noteworthy findings.
[a] Group means are shown.
[b] Numerals represent number of animals with the finding.

(続く)

2.6.7.7.4 One-Month Repeat-Dose Toxicity Study in Dogs (続き)

Test Article: Naldemedine Tosylate

Daily Dose (mg/kg, as naldemedine)			0 (Control)		1		3		10		50	
Number Evaluated			M: 5	F: 5	M: 3	F: 3	M: 3	F: 3	M: 3	F: 3	M: 5	F: 5
Noteworthy Findings (Continued)												
Hematology [a]	RBC (10^6/μL)	Day −14	–	6.82	–	6.73	–	6.65	–	6.92	–	6.61 *(6.75 [5202], 6.56 [5204], 6.47 [5205])* [b]
		Day −5	–	6.93	–	6.89	–	6.76	–	7.10	–	6.79 *(6.85 [5202], 6.61 [5204], 6.17 [5205])* [b]
		Day 10	–	6.75	–	6.42	–	6.49	–	7.06	–	6.08 *(5.90 [5202], 6.05 [5204], 5.14 [5205])* [b]
		Day 28	–	7.05	–	6.81	–	6.66	–	7.17	–	6.04 * (*5.60 [5202], 5.77 [5204], 5.50 [5205])* [b]
	HGB (g/dL)	Day −14	–	15.8	–	15.1	–	15.2	–	15.8	–	15.4 *(16.0 [5202], 15.9 [5204], 14.6 [5205])* [b]
		Day −5	–	16.1	–	15.4	–	15.5	–	16.1	–	15.8 *(16.2 [5202], 15.8 [5204], 14.2 [5205])* [b]
		Day 10	–	16.0	–	14.6	–	15.1	–	16.2	–	14.4 *(14.2 [5202], 14.8 [5204], 12.0 [5205])* [b]
		Day 28	–	16.5	–	15.4	–	15.3	–	16.2	–	14.0 * (*13.2 [5202], 13.6 [5204], 12.6 [5205])* [b]
	HCT (%)	Day −14	–	45.7	–	44.0	–	43.8	–	45.7	–	44.4 *(45.9 [5202], 45.6 [5204],42.6 [5205])* [b]
		Day −5	–	46.6	–	44.9	–	44.7	–	47.1	–	45.7 *(47.1 [5202], 45.9 [5204], 40.5 [5205])* [b]
		Day 10	–	45.3	–	41.4	–	42.8	–	46.4	–	40.6 *(40.6 [5202], 41.4 [5204], 33.9 [5205])* [b]
		Day 28	–	47.4	–	44.4	–	43.9	–	47.0	–	39.9 ** (*37.6 [5202], 38.6 [5204], 36.2 [5205])* [b]

Day 1, The initiation day of dosing. –, No noteworthy findings.
[a] Group means are shown.
[b] Individual data and identification number of animals are described in italics in the parenthesis and brackets, respectively.
* P < 0.05, ** P < 0.01 vs. control (Dunnett's parametric multiple t-test).

(続く)

2.6.7.7.4 One-Month Repeat-Dose Toxicity Study in Dogs (続き)

Test Article: Naldemedine Tosylate

Daily Dose (mg/kg, as naldemedine)			0 (Control)		1		3		10		50	
Number Evaluated			M: 5	F: 5	M: 3	F: 3	M: 3	F: 3	M: 3	F: 3	M: 5	F: 5
Noteworthy Findings (Continued)												
Blood Chemistry [a]	Aspartate aminotransferase (U/L)	Day 10	30	–	28	–	31	–	34	–	42 *(67 [5105])* [b]	–
		Day 28	30	–	26	–	32	–	29	–	48 *(110 [5104])* [b]	–
	ALT (U/L)	Day 10	35	32	32	29	52	36	58	44	114 **	80 **
		Day 28	37	34	29	29	57	37	37	36	161	77 **
	ALP (U/L)	Day 10	298	287	286	203	375	326	338	417	555 **	431
		Day 28	285	286	274	195	345	338	312	480	1061 **	692 **
	T.CHO (mg/dL)	Day 10	–	130	–	123	–	156 *(209 [3203])* [b]	–	137	–	155 *(163 [5202])* [b]
		Day 28	119	138	114	121	123	162	139	152	179 **	203 **
Bone Marrow Analysis	Number of samples prepared		3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
	Changes		N.E.	–	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	–
Organ Weight	Number Examined		3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
	Changes		–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Gross Pathology	Number Examined		3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
	Changes		–	–	–	–	–	–	–	–	–	–

Day 1, The initiation day of dosing. –, No noteworthy findings.
N.E., Not examined, because no test substance-related changes were observed in the females of the 50 mg/kg group necropsied at the end of the administration period,.
[a] Group means are shown..
[b] Individual data and identification number of animals are described in italics in the parenthesis and brackets, respectively.
* P < 0.05, ** P < 0.01 vs. control (Dunnett's parametric multiple t-test).

(続く)

2.6.7.7.4 One-Month Repeat-Dose Toxicity Study in Dogs (続き)

Test Article: Naldemedine Tosylate

Daily Dose (mg/kg, as naldemedine)				0 (Control)		1		3		10		50	
Number Evaluated				M: 5	F: 5	M: 3	F: 3	M: 3	F: 3	M: 3	F: 3	M: 5	F: 5
Noteworthy Findings (Continued)													
Histopathology [a]	Number Examined			3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
	Liver	Single cell necrosis	Mild	0	0	0	0	0	0	0	0	3	3
		Inflammatory cell infiltration	Mild	0	1	0	0	0	0	0	0	2	0
		Hemosiderin deposition		0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
	Spleen	Hemosiderin deposition		0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Post-dose Evaluation													
Noteworthy Findings													
Number Evaluated				2	2							2	2
Died or Sacrificed Moribund				0	0							0	0
Hematology on Day R27 [b]	RBC (10^6/μL)			–	7.39							–	5.80 *(5.48 [5204])* [c]
	HGB (g/dL)			–	17.3							–	13.7 *(13.0 [5204])* [c]
	HCT (%)			–	49.9							–	39.0 *(37.1 [5204])* [c]
Histopathology [a]	Spleen	Hemosiderin deposition		0	0							0	1

Day R1, The first day of recovery period. –, No noteworthy findings.
[a] Numerals represent number of animals with the finding.
[b] Group means are shown.
[c] Individual data and identification number of animals are described in italics in the parenthesis and brackets, respectively.

2.6.7.7.5 Three-Month Repeat-Dose Toxicity Study in Dogs

Test Article: Naldemedine Tosylate

Report Title: Three-Month Oral Toxicity Study of S-297995 monotosylate in Dogs		
Species/Strain: Dog/Beagle	**Duration of Dosing:** 3 months	**Study No.** S-297995-TF-109-L (CRO Study No. [redacted]08275)
Initial Age: 11-13 months	**Duration of Post-dose:** 1 Month	**Location in CTD:** 4.2.3.2-05
Date of First Dose: [redacted] 20[redacted]	**Method of Administration:** Oral gavage	**GLP Compliance:** Yes
	Vehicle/Formulation: 0.5 w/v% MC aqueous solution/Suspension	
Special Features: None		
No Observed Adverse Effect Level: 5 mg/kg/day		

Daily Dose (mg/kg, as naldemedine)			**0 (Control)**		**1**		**5**		**30**	
Number Evaluated			**M: 7**	**F: 7**	**M: 4**	**F: 4**	**M: 4**	**F: 4**	**M: 7**	**F: 7**
Toxicokinetics [(a)]										
Naldemedine	**C_{max} (µg/mL)**	**Day 1**	N.C.	N.C.	0.383	0.457	2.99	2.93	12.0	11.9
		Day 28	N.C.	N.C.	0.523	0.346	3.16	2.79	13.7	12.6
		Day 91	N.C.	N.C.	0.552	0.455	3.79	2.67	13.9	13.6
	AUC_{0-24hr} (µg·hr/mL)	**Day 1**	N.C.	N.C.	0.705	0.726	6.41	6.88	47.2	50.0
		Day 28	N.C.	N.C.	0.767	0.511	6.71	5.69	70.1	44.8
		Day 91	N.C.	N.C.	0.880	0.724	8.28	5.90	90.9	78.7
	T_{max} (hr)	**Day 1**	N.C.	N.C.	0.6	0.5	0.4	0.5	0.8	1.1
		Day 28	N.C.	N.C.	0.4	0.4	0.5	0.5	0.9	0.6
		Day 91	N.C.	N.C.	0.4	0.4	0.4	0.5	1.4	1.3

Day 1, The initiation day of dosing. N.C., Not calculated because of BLQ (< 0.02 µg/mL).
[(a)] Group means are shown.

(続く)

2.6.7.7.5 Three-Month Repeat-Dose Toxicity Study in Dogs (続き)

Test Article: Naldemedine Tosylate

Daily Dose (mg/kg, as naldemedine)			0 (Control)		1		5		30	
Number Evaluated			M: 7	F: 7	M: 4	F: 4	M: 4	F: 4	M: 7	F: 7
Noteworthy Findings										
Died or Sacrificed Moribund			0	0	0	0	0	0	0	0
Clinical Observations [a]	Vomitus		0	0	0	0	1	0	4	4
	Salivation		0	0	0	0	0	0	4	3
	Scant Feces		0	0	0	0	0	0	0	1
Body Weight [b]	Day 91		11.29	10.36	−4	−3	−4	−1	−5	−3 [e]
Food Consumption [c]	Day 45		300	300	0	0	0	0	0	−23 [f]
Ophthalmoscopy			–	–	–	–	–	–	–	–
Electrocardiography			–	–	–	–	–	–	–	–
Hematology [d]	RBC (10^6/μL)	Week 4	7.33	7.34	6.80	6.99	7.24	7.01	6.62*	6.42**
		Week 13	7.46	7.19	6.83	6.38	7.37	6.43	6.41**	6.51
	HGB (g/dL)	Week 4	16.6	17.4	15.7	16.3	16.6	16.8	15.4*	15.3**
		Week 13	16.8	17.1	15.8	14.9	16.8	15.4	14.9*	15.5
	HCT (%)	Week 4	49.3	50.8	46.5	47.9	48.3	48.8	44.9*	44.3**
		Week 13	47.7	47.5	44.6	41.2	46.7	42.5	41.7**	43.4
	Reticulocyte (10^9/L)	Week 4	62.3	43.2	43.8	32.7	34.4*	38.2	21.2**	24.4
		Week 13	50.0	45.9	37.8	35.4	27.1	27.4	18.5**	17.8*

Day 1, The initiation day of dosing.
[a] Numerals represent number of animals with the finding.
[b] For controls, group means of body weight (kg) are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown.
[c] For controls, group means of food consumption (g/day) are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown.
[d] Group means are shown.
[e] Individual body weight of a female (animal No. 74) decreased from 10.00 kg on Day 36 of dosing to 8.82 kg on Day 50 of dosing and from 9.44 kg on Day 78 of dosing to 9.06 kg on Day 85 of dosing.
[f] Individual food consumption of a female (animal No. 74) was 0 (zero) on Day 45 and 70% of the provided amount were left uneaten on Days 41 to 43, 46, 47, 52 and 83 of dosing.
* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. control (Dunnett's test or mean rank test of Dunnett type).

(続く)

2.6.7.7.5 Three-Month Repeat-Dose Toxicity Study in Dogs (続き)

Test Article: Naldemedine Tosylate

Daily Dose (mg/kg, as naldemedine)			0 (Control)		1		5		30	
Number Evaluated			M: 7	F: 7	M: 4	F: 4	M: 4	F: 4	M: 7	F: 7
Noteworthy Findings (Continued)										
Blood Chemistry [a]	ALT (U/L)	Week 4	45	39	42	36	64	37	99*	103
		Week 13	46	42	44	44	57	40	119*	165**
	γ-glutamyl transferase (GGT, U/L)	Week 4	4.0	3.4	3.8	4.5	4.7	3.9	5.9*	5.3**
		Week 13	4.5	3.8	4.3	4.6	4.6	4.3	8.2*	7.6**
	ALP (U/L)	Week 4	250	205	236	218	282	295	439*	495**
		Week 13	237	237	205	254	275	337	984**	1090**
	Amylase (U/L)	Week 4	992	1016	746	854	722	675	718*	623**
		Week 13	962	1011	725	920	702	821	618*	611**
	T.CHO (mg/dL)	Week 4	119	133	124	151	121	142	149*	169*
		Week 13	120	126	124	131	114	147	155*	168**
	T.BIL (mg/dL)	Week 4	–	–	–	–	–	–	–	–
		Week 13	–	0.06	–	0.06	–	0.06	–	0.08 [0.18] [b]

Day 1, The initiation day of dosing.
[a] Group means are shown.
[b] Value of animal No. 74 (female) in the brackets.
* P < 0.05, ** P < 0.01 vs. control (Dunnett's test or mean rank test of Dunnett type).

(続く)

2.6.7.7.5 Three-Month Repeat-Dose Toxicity Study in Dogs (続き)

Test Article: Naldemedine Tosylate

Daily Dose (mg/kg, as naldemedine)			0 (Control)		1		5		30	
Number Evaluated			M: 7	F: 7	M: 4	F: 4	M: 4	F: 4	M: 7	F: 7
Noteworthy Findings (Continued)										
Urinalysis			–	–	–	–	–	–	–	–
Gross Pathology			–	–	–	–	–	–	–	–
Organ Weights			–	–	–	–	–	–	–	–
Histopathology [(a)]	Liver	Single cell necrosis of the hepatocyte	0	0	0	0	0	0	1	1
		Extramedullary hematopoiesis	0	0	0	0	0	0	3	1
	Femoral bone marrow	Atrophy of the adipose tissue and deposition of the gelatinous material	0	0	0	0	0	0	1	1
	Heart	Atrophy of the pericardial adipose tissue	0	0	0	0	0	0	1	1
	Kidney	Atrophy of the perirenal adipose tissue	0	0	0	0	0	0	1	1
Post-dose Evaluation										
Noteworthy Findings										
Number Evaluated			3	3	0	0	0	0	3	3
Died or Sacrificed Moribund			0	0					0	0
Noteworthy Findings			–	–					–	–

–, No noteworthy findings.
[(a)] Numerals represent number of animals with the finding.

2.6.7.7.6 Nine-Month Repeat-Dose Toxicity Study in Dogs

Test Article: Naldemedine Tosylate

Report Title: Nine-Month Oral Toxicity Study of S-297995 monotosylate in Dogs		
Species/Breed: Dog/Beagle	**Duration of Dosing:** 9 months	**Study No.** S-297995-TF-219-L (CRO Study No. [redacted]10119)
	Duration of Post-dose: 1 Month	**Location in CTD:** 4.2.3.2-06
Initial Age: 9-10 months	**Method of Administration:** Oral gavage	**GLP Compliance:** Yes
Date of First Dose: [redacted] 20[redacted]	**Vehicle/Formulation:** 0.5 w/v% MC aqueous solution/Suspension	
Special Features: None		
No Observed Adverse Effect Level: 4 mg/kg/day		

Daily Dose (mg/kg, as naldemedine)			**0 (Control)**		**1**		**4**		**20**	
Number Evaluated			**M: 7**	**F: 7**	**M: 4**	**F: 4**	**M: 4**	**F: 4**	**M: 7**	**F: 7**
Toxicokinetics [(a)]										
Naldemedine	**C_{max} (μg/mL)**	**Day 1**	N.C.	N.C.	0.423	0.434	2.25	2.16	8.04	8.74
		Day 136	N.C.	N.C.	0.400	0.609	2.92	2.40	9.89	8.98
		Day 273	N.C.	N.C.	0.295	0.401	2.32	1.90	10.0	8.35
	$AUC_{0\text{-}24hr}$ (μg·hr/mL)	**Day 1**	N.C.	N.C.	0.735	1.04	4.08	5.87	36.7	33.6
		Day 136	N.C.	N.C.	0.856	1.22	6.56	7.03	56.4	48.9
		Day 273	N.C.	N.C.	0.707	0.991	5.85	5.97	55.9	40.5
Benzamidine	**C_{max} (ng/mL)**	**Day 1**	N.C.	N.C.	3.18	3.15	11.0	10.3	78.3	58.4
		Day 136	N.C.	N.C.	3.71	3.32	16.7	10.1	78.8	97.0
		Day 273	N.C.	N.C.	4.16	4.53	19.2	11.0	83.5	84.8
	$AUC_{0\text{-}24hr}$ (ng·hr/mL)	**Day 1**	N.C.	N.C.	40.1	39.0	147	125	1070	775
		Day 136	N.C.	N.C.	55.1	47.4	285	146	1340	1600
		Day 273	N.C.	N.C.	66.3	66.1	303	158	1390	1350

Day 1, The initiation day of dosing. N.C., Not calculated because of BLQ (< 0.02 μg/mL for naldemedine; < 0.005 μg/mL for benzamidine).
[(a)] Group means are shown.

(続く)

2.6.7.7.6 Nine-Month Repeat-Dose Toxicity Study in Dogs (続き)

Test Article: Naldemedine Tosylate

Daily Dose (mg/kg, as naldemedine)			0 (Control)		1		4		20	
Number Evaluated			M: 7	F: 7	M: 4	F: 4	M: 4	F: 4	M: 7	F: 7
Noteworthy Findings										
Died or Sacrificed Moribund			0	0	0	0	0	0	0	0
Clinical Observations			–	–	–	–	–	–	–	–
Body Weight			–	–	–	–	–	–	–	–
Food Consumption			–	–	–	–	–	–	–	–
Ophthalmoscopy			–	–	–	–	–	–	–	–
Electrocardiography			–	–	–	–	–	–	–	–
Hematology			–	–	–	–	–	–	–	–
Blood Chemistry [a]	ALT (U/L)	Week 4	34	33	37	30	36	37	52 *	61
		Week 13	37	40	44	42	41	40	60 *	80 *
		Week 26	43	37	41	34	35	37	63	88
		Week 39	41	37	43	37	37	39	74	93 **
	GGT (U/L)	Week 4	3.9	3.7	3.7	4.2	4.3	3.8	4.7	5.2 **
		Week 13	4.3	4.0	3.3	4.1	4.6	5.4 [6.0] [c]	5.0	5.5 *
		Week 26	4.3	4.1	3.7	4.2	5.2	5.5 [6.5] [c], [6.4] [d]	5.7	6.3 **
		Week 39	5.0	4.3	3.9	5.1	4.9	4.8	6.0	6.4 **
	ALP (U/L)	Week 4	258	232	229	283	286	349 [602] [c]	379	444 **
		Week 13	220	180	214	280	248	295 [497] [c]	444	512 **
		Week 26	211	175	190	270	215	330	504 *	512 **
		Week 39	218	174	198	313	241	331 [481]	548 *	727 **
	T.CHO (mg/dL)	Week 4	–	122	–	145	–	142	–	173 **
		Week 13	–	119	–	122	–	129	–	169 **
		Week 26	–	129	–	128	–	142	–	189 **
		Week 39	–	135	–	144 [231] [b]	–	138	–	189 *

–, No noteworthy findings.
[a] Group means are shown.
[b] Value of animal No. US51 (female) in the brackets.
[c] Value of animal No. US61 (female) in the brackets.
[d] Value of animal No. US63 (female) in the brackets.
* P < 0.05, ** P < 0.01 (Dunnett's test or mean rank test of Dunnett type).

(続く)

2.6.7.7.6 Nine-Month Repeat-Dose Toxicity Study in Dogs (続き)

Test Article: Naldemedine Tosylate

Daily Dose (mg/kg, as naldemedine)			0 (Control)		1		4		20	
Number Evaluated			M: 7	F: 7	M: 4	F: 4	M: 4	F: 4	M: 7	F: 7
Noteworthy Findings (Continued)										
Blood Chemistry [a] (Continued)	Phospholipids (mg/dL)	Week 4	–	259	–	298	–	291	–	328 *
		Week 13	–	263	–	268	–	276	–	328 *
		Week 26	–	282	–	273	–	297	–	358
		Week 39	–	285	–	285 [419] [c]	–	291	–	355
	T.BIL (mg/dL)	Week 13	0.08	0.07	0.09	0.08	0.10 [0.14] [d]	0.07	0.09	0.09 [0.16] [f]
		Week 26	–	0.06	–	0.08	–	0.06	–	0.08 [0.14] [f]
		Week 39	0.08	0.06	0.06	0.07	0.07	0.08	0.09 [0.15] [e]	0.08 [0.14] [f]
Urinalysis			–	–	–	–	–	–	–	–
Gross Pathology			–	–	–	–	–	–	–	–
Organ Weights			–	–	–	–	–	–	–	–
Histopathology [b]	Liver	Single cell necrosis of the hepatocyte	0	0	0	0	0	0	2	2
		Increase, pigment deposition brownish, Kupffer cell	0	0	0	0	0	0	1	2
Post-dose Evaluation										
Noteworthy Findings										
Number Evaluated			3	3	0	0	0	0	3	3
Died or Sacrificed Moribund			0	0					0	0
Noteworthy Findings			–	–					–	–

A given period from Day 1 to Day 7 is Week 1. –, No noteworthy findings.
[a] Group means are shown.
[b] Numerals represent number of animals with the finding.
[c] Value of animal No. US51 (female) is described in the brackets.
[d] Value of animal No. US21 (male) is described in the brackets.
[e] Value of animal No. US31 (male) is described in the brackets.
[f] Value of animal No. US72 (female) is described in the brackets.
* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. control (Dunnett's test or mean rank test of Dunnett type).

2.6.7.8 *In Vitro* 遺伝毒性試験

2.6.7.8.1 Reverse Mutation Test with Bacteria

Test Article: Naldemedine Tosylate

Report Title: Reverse Mutation Test of RSC-297995 monotosylate with Bacteria		
Test for Induction of: Reverse mutation in bacterial cells	**No. of Independent Assays:** 2	**Study No.** R-297995-TB-051-L
Strains: *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*	**No. of Replicate Cultures:** 2	**Location in CTD:** 4.2.3.3-01
Metabolizing System: Phenobarbital and 5,6-benzoflavone induced rat liver S9, 10% in metabolic activation system (S9 mix)	**No. of Cells Analyzed/Cultured:** −	**GLP Compliance:** Yes
Vehicles: **Test Article:** Dimethyl sulfoxide (DMSO) **Positive Controls :** DMSO		**Date of Treatment:** [redacted] - [redacted] 20[redacted]
Treatment: Preincubation method (37°C, 20 min.) and incubation for 48 hours (37°C)		
Cytotoxic Effects: Reduction of the bacterial background lawn was observed at doses of 1250 μg/plate and above in TA98 and TA1537 and at doses of 2500 μg/plate and above in TA100, TA1535 and WP2*uvrA* without S9 mix, and at doses of 2500 μg/plate and above in TA98, TA100, TA1535 and TA1537 and at dose of 5000 μg/plate in WP2*uvrA* with S9 mix.		
Genotoxic Effects: None		

(続く)

2.6.7.8.1 Reverse Mutation Test with Bacteria (続き)

Test Article: Naldemedine Tosylate

Metabolic Activation	Test Article	Dose Level [a] (μg/plate)	Assay No. 1 (First mutation test) Revertant Colony Counts (Mean of 2 plates)				
			TA100	TA1535	WP2*uvrA*	TA98	TA1537
Without Activation	DMSO	100 μL/plate	114	12	30	16	14
	Naldemedine Tosylate	78.1	N.T.	N.T.	N.T.	16	14
		156	99	8	33	19	17
		313	108	7	32	19	15
		625	112	8	24	15	14
		1250	106	12	27	18 [c]	12 [c]
		2500 [b]	103 [c]	7 [c]	24 [c]	18 [c]	9 [c]
		5000 [b]	12 [c]	2 [c]	20 [c]	N.T.	N.T.
	2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl) Acrylamide (AF-2)	0.01	671	N.T.	233	N.T.	N.T.
		0.1	N.T.	N.T.	N.T.	797	N.T.
	Sodium Azide (NaN_3)	0.5	N.T.	486	N.T.	N.T.	N.T.
	9-Aminoacridine Hydrochloride (9AA)	80	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	705
With Activation	DMSO	100 μL/plate	107	9	32	25	26
	Naldemedine Tosylate	156	124	9	30	28	22
		313	110	9	26	25	21
		625	133	9	37	22	22
		1250	120	9	33	26	20
		2500	102 [c]	5 [c]	28	30 [c]	7 [c]
		5000 [b]	23 [c]	4 [c]	23 [c]	20 [c]	0 [c]
	2-Aminoanthracene (2AA)	0.5	N.T.	N.T.	N.T.	284	N.T.
		1	1166	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.
		2	N.T.	281	N.T.	N.T.	257
		10	N.T.	N.T.	745	N.T.	N.T.

N.T., Not tested.
[a] The dose levels of naldemedine tosylate are expressed as naldemedine.
[b] Precipitation derived from the test article.
[c] Reduction of the bacterial background lawn.

(続く)

2.6.7.8.1 Reverse Mutation Test with Bacteria (続き)

Test Article: Naldemedine Tosylate

Metabolic Activation	Test Article	Dose Level [a] (μg/plate)	Assay No. 2 (Second mutation test) Revertant Colony Counts (Mean of 2 plates)				
			TA100	TA1535	WP2*uvrA*	TA98	TA1537
Without Activation	DMSO	100 μL/plate	114	12	34	18	12
	Naldemedine Tosylate	78.1	N.T.	N.T.	N.T.	18	13
		156	100	7	40	17	14
		313	103	10	28	12	6
		625	105	9	34	20	9
		1250	101	12	35	16	9 [c]
		2500 [b]	71 [c]	4 [c]	26 [c]	17 [c]	2 [c]
		5000 [b]	19 [c]	1 [c]	22 [c]	N.T.	N.T.
	AF-2	0.01	601	N.T.	237	N.T.	N.T.
		0.1	N.T.	N.T.	N.T.	811	N.T.
	NaN_3	0.5	N.T.	329	N.T.	N.T.	N.T.
	9AA	80	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	646
With Activation	DMSO	100 μL/plate	115	14	42	22	22
	Naldemedine Tosylate	156	103	11	32	24	20
		313	109	8	42	24	18
		625	108	8	39	20	14
		1250	108	14	35	27	9
		2500	89 [c]	6 [c]	32	36	7 [c]
		5000 [b]	28 [c]	2 [c]	28 [c]	25 [c]	4 [c]
	2AA	0.5	N.T.	N.T.	N.T.	289	N.T.
		1	966	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.
		2	N.T.	260	N.T.	N.T.	292
		10	N.T.	N.T.	765	N.T.	N.T.

N.T., Not tested.
[a] The dose levels of naldemedine tosylate are expressed as naldemedine.
[b] Precipitation derived from the test article.
[C] Reduction of the bacterial background lawn.

2.6.7.8.2 Chromosomal Aberration Test in Chinese Hamster Lung Cells

Test Article: Naldemedine Tosylate

Report Title: Chromosomal Aberration Test of RSC-297995 monotosylate in Cultured Chinese Hamster Lung Cells		
Test for Induction of: Chromosomal aberration	**No. of Independent Assays:** 1	**Study No.** R-297995-TF-052-L (CRO Study No. [redacted]07-070)
Strains: Chinese hamster lung (CHL/IU) cells	**No. of Replicate Cultures:** 2	**Location in CTD:** 4.2.3.3-02
Metabolizing System: Phenobarbital and 5,6-benzoflavone induced rat liver S9, 5 vol%	**No. of Cells Analyzed/Cultured:** 100 for structural aberrations, 100 for polyploid cells	**GLP Compliance:** Yes
Vehicles: **Test Article:** DMSO **Positive Controls:** Water for injection JP		**Date of Treatment:** [redacted] 20[redacted]
Treatment: Short-term treatment for 6 hours and recovery time for 18 hours with and without S9 mix, continuous treatment for 24 hours without S9 mix		
Cytotoxic Effects: Dose-dependent cytotoxicity was observed in all treatment conditions.		
Genotoxic Effects: No effect was observed on the induction of structural aberrations or polyploidy in any treatment condition.		

Metabolic Activation	Treatment – Recovery (hour)	Test Article	Dose Level [a] (μg/plate)	Cytotoxicity [b] (% of control)	Aberrant Cells [c] (%)	Polyploid Cells [d] (%)
Without Activation	**6 – 18**	**DMSO**	1 vol%	100	1.5	0.0
		Naldemedine Tosylate	237	89	2.5	0.5
			356	78	1.0	0.0
			533	56	3.5	0.0
			800	14	Not made chromosome specimens [e]	
		Mitomycin C	0.1	N.A.	46.0 *	0.0
With Activation	**6 – 18**	**DMSO**	1 vol%	100	2.0	0.0
		Naldemedine Tosylate	237	103	2.5	0.5
			356	97	1.0	1.0
			533	64	3.0	0.0
			800	35	Not observed (no metaphase cells) [e]	
		Cyclophosphamide	10	N.A.	24.0 *	0.0

N.A., Not analyzed.
[a] The dose levels of naldemedine tosylate are expressed as naldemedine.
[b] The relative confluency was measured with Monocellater™.
[c] The incidence of cells with structural chromosomal aberrations excluding gaps in 200 metaphase cells per dose.
[d] The incidence of polyploid cells in 200 metaphase cells per dose.
[e] Because of severe cytotoxicity.
* $P < 0.01$ vs. control (Fisher's exact probability test, one-side).

(続く)

2.6.7.8.2 Chromosomal Aberration Test in Chinese Hamster Lung Cells (続き)

Test Article: Naldemedine Tosylate

Metabolic Activation	Treatment – Recovery (hour)	Test Article	Dose Level [a] (µg/plate)	Cytotoxicity [b] (% of control)	Aberrant Cells [c] (%)	Polyploid Cells [d] (%)
Without Activation	**24 – 0**	**DMSO**	1 vol%	100	2.0	0.0
		Naldemedine Tosylate	70.2	86	3.0	0.5
			105	71	1.0	0.0
			158	55	3.0	0.5
			237	38	Not observed (no metaphase cells) [e]	
		Mitomycin C	0.05	N.A.	50.5 *	0.0

N.A., not analyzed.
[a] The dose levels of naldemedine tosylate are expressed as naldemedine.
[b] The relative confluency was measured with Monocellater™.
[c] The incidence of cells with structural chromosomal aberrations excluding gaps in 200 metaphase cells per dose.
[d] The incidence of polyploid cells in 200 metaphase cells per dose.
[e] Because of severe cytotoxicity.
* $P < 0.01$ vs. DMSO group (Fisher's exact probability test, one-side).

2.6.7.9 *In Vivo* 遺伝毒性試験

2.6.7.9.1 Micronucleus Test in Rats

Test Article: Naldemedine Tosylate

Report Title: Micronucleus Test of RSC-297995 monotosylate with Rat Bone Marrow Cells		
Test for Induction of: Bone marrow micronuclei	**Treatment Schedule:** 2 daily doses	**Study No.** R-297995-TF-053-L (CRO Study No. [redacted]07-071)
Species/Strain: Rat/Crl:CD(SD)	**Sampling Time:** 24 hours after the last dose	**Location in CTD:** 4.2.3.3-03
Age at dosing: 7 weeks	**Method of Administration:** Oral gavage	**GLP Compliance:** Yes
Cell Evaluated: Polychromatic erythrocytes	**Vehicle/Formulation:** 0.5 w/v% MC aqueous solution/Suspension	**Date of Dosing:** [redacted] to [redacted] 20[redacted]
No. of Cells Evaluated/Animal: 2000		
Special Features: None		
Toxic/Cytotoxic Effects: Decrease in body weight was observed in all treated groups.		
Genotoxic Effects: None		
Evidence of Exposure: Decrease in body weight		

Test Article	Dose [(a)] (mg/kg)	No. of Animals	% PCEs [(b)]	% MNPCEs [(c)]
Vehicle	0	5M	54.8 ± 8.4	0.11 ± 0.08
Naldemedine Tosylate	250	5M	N.E.	N.E.
	500	5M	57.1 ± 6.1	0.15 ± 0.11
	1000	5M	57.1 ± 6.7	0.14 ± 0.10
	2000	5M	54.7 ± 8.5	0.06 ± 0.04
Cyclophosphamide Monohydrate [(d)]	20	5M	55.5 ± 6.5	2.55 ± 0.39 *

N.E., Not examined.
[(a)] The doses of naldemedine tosylate are expressed as naldemedine.
[(b)] Number of polychromatic erythrocytes (PCEs)/1000 erythrocytes per animal, mean ± standard deviation.
[(c)] Number of micronucleated polychromatic erythrocytes (MNPCEs)/2000 polychromatic erythrocytes per animal, mean ± standard deviation.
[(d)] Positive control, single oral administration.
* $P < 0.01$ vs vehicle group (Fisher's exact probability test).

2.6.7.10 がん原性試験

2.6.7.10.1 Non-pivotal Carcinogenicity Study

Test Article: Naldemedine Tosylate

Species/ Strain	**Method of Administration (Vehicle/ Formulation)**	**Duration of Dosing**	**Doses [(a)] (mg/kg)**	**Gender and No. per Group**	**NOAEL (mg/kg)**	**Noteworthy Findings**	**Study Number [Location in CTD]**
Mice/Crl: CD1(ICR)	Gavage (0.5 w/v% MC aqueous solution/ Suspension)	2 Weeks	0, 30, 100, 300, 1000	10M 10F	Not estimated	No significant toxicological findings at all doses	S-297995-TB-218-R [4.2.3.4-03]

[(a)] As naldemedine.

(続く)

2.6.7.10.1 Non-pivotal Carcinogenicity Study (続き)

Test Article: Naldemedine Tosylate

Species/ Strain	**Method of Administration (Vehicle/ Formulation)**	**Duration of Dosing**	**Doses [(a)] (mg/kg)**	**Gender and No. per Group**	**NOAEL (mg/kg)**	**Noteworthy Findings**	**Study Number [Location in CTD]**
Mice/Crl: CD1(ICR)	Gavage (0.5 w/v% MC aqueous solution/ Suspension)	13 Weeks	0, 100, 300, 1000	12M 12F	100	≥ 100 High body weight gain 100: Centrilobular hypertrophy; Periportal vacuolation; Reduced/absent corpora lutea in the ovaries and estrus; Metestrus morphological characteristics in the vagina Toxicokinetic data are listed below.	S-297995-TF-226-L (CRO Study No. [redacted]0024) [4.2.3.4-04]

Toxicokinetics [(b)]	Dose (mg/kg/ day)	C_{max} (μg/mL)						$AUC_{0\text{-}24hr}$ (μg·hr/mL)					
		Day 1		Day 28		Day 91		Day 1		Day 28		Day 91	
		M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F
Naldemedine	100	26.4	23.7	26.6	31.9	21.2	20.6	111	132	154	170	194	165
	300	41.5	50.8	38.0	40.3	43.8	46.6	270	291	388	332	475	362
	1000	67.7	72.3	87.6	97.7	78.6	70.8	590	611	1220	1410	787	865
Nor-naldemedine	100	3.86	3.49	2.73	2.03	3.16	1.70	27.4	16.8	17.8	12.1	31.4	14.3
	300	6.86	5.65	3.20	2.27	5.05	2.17	52.6	42.3	29.9	20.0	51.0	20.2
	1000	10.3	8.58	3.32	2.73	5.27	2.84	114	80.4	47.0	41.7	52.7	37.6
Naldemedine 3-G	100	0.217	0.0641	0.157	0.141	0.216	0.0863	0.508	0.176	0.579	0.629	1.28	0.523
	300	0.807	0.222	0.968	0.567	0.902	0.771	3.06	0.856	3.33	2.58	4.79	4.81
	1000	2.48	0.494	3.75	4.36	3.01	1.70	14.3	6.72	48.5	53.9	21.9	14.8
Naldemedine 6-G	100	0.0443	0.0365	0.0315	0.0480	0.0348	0.0351	0.217	0.154	0.231	0.292	0.409	0.296
	300	0.123	0.157	0.0819	0.175	0.110	0.132	0.651	0.767	1.03	1.21	1.17	1.17
	1000	0.263	0.176	0.624	0.641	0.460	0.262	2.27	2.13	7.62	8.20	4.17	3.45
Benzamidine	100	0.221	0.286	0.127	0.217	0.203	0.283	2.83	3.66	1.63	2.76	2.64	3.34
	300	0.511	0.972	0.420	0.491	0.646	0.748	6.74	11.8	4.78	6.30	7.96	9.09
	1000	1.52	1.49	1.39	1.41	1.42	1.59	19.2	18.6	18.2	21.8	17.7	22.8

Day 1, The initiation day of dosing.
The C_{max} and $AUC_{0\text{-}24hr}$ values of control group were not estimated because all samples were BLQ (< 0.02 μg/mLfor naldemedine and nor-naldemedine; < 5.00 ng/mL for naldemedine 3-G and naldemedine 6-G; < 1.00 ng/mL for benzamidine**)**.
[(a)] As naldemedine.
[(b)] Group means are shown.

2.6.7.10.2 Carcinogenicity Study in Mice

Test Article: Naldemedine Tosylate

Report Title: 104-Week Carcinogenicity Study of S-297995 monotosylate in Mice by Gavage		
Species/Strain: Mouse/Crl:CD1(ICR)	**Duration of Dosing:** 104 weeks	**Study No.** R–297995–TF–265–L (CRO Study No. [redacted]0037)
Initial Age: 36-42 days	**Method of Administration:** Oral gavage	**Location in CTD:** 4.2.3.4-01
Date of First Dose: [redacted] 20[redacted]	**Vehicle/Formulation:** 0.5 w/v% MC aqueous solution/Suspension	**GLP Compliance:** Yes
Special Features: None		
No Observed Adverse Effect Level for Non-neoplastic Findings: 100 mg/kg/day		
Carcinogenicity potential: None		

Daily Dose (mg/kg, as naldemedine)			**0 (Control)**		**10**		**30**		**100**	
Number Evaluated			**M: 60**	**F: 60**	**M: 60**	**F: 60**	**M: 60**	**F: 60**	**M: 60**	**F: 60**
Toxicokinetics [(a)]										
Number of Animals			18	18	18	18	18	18	18	18
Naldemedine	**C_{max} (ng/mL)**	**Week 13**	N.C.	N.C.	2900	3410	8030	10500	18700	21200
		Week 26	N.C.	N.C.	2580	5080	8370	10800	27400	23800
	AUC_{0-24hr} (ng·hr/mL)	**Week 13**	N.C.	N.C.	35800	38700	73500	90300	182000	189000
		Week 26	N.C.	N.C.	32200	47200	104000	134000	339000	297000
Nor–naldemedine	**C_{max} (ng/mL)**	**Week 13**	N.C.	N.C.	295	204	692	689	1980	1190
		Week 26	N.C.	N.C.	242	296	1280	699	2300	2130
	AUC_{0-24hr} (ng·hr/mL)	**Week 13**	N.C.	N.C.	3540	2500	8480	8520	24000	14900
		Week 26	N.C.	N.C.	3000	3670	15400	8600	28500	25700
Naldemedine 3-G	**C_{max} (ng/mL)**	**Week 13**	N.C.	N.C.	6.84	N.C.	36.6	23.4	107	61.1
		Week 26	N.C.	N.C.	N.C.	4.25 [(b)]	37.9	58.0	241	156
	AUC_{0-24hr} (ng·hr/mL)	**Week 13**	N.C.	N.C.	80.6	N.C.	177	190	1310	546
		Week 26	N.C.	N.C.	N.C.	4.25 [(c)]	394	208	2920	1900
Naldemedine 6-G	**C_{max} (ng/mL)**	**Week 13**	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	8.55	10.6	29.9	25.5
		Week 26	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	11.4	12.4	52.1	61.9
	$AUC_{0-24\ hr}$ (ng·hr/mL)	**Week 13**	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	53.3	108	361	276
		Week 26	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	138	133	628	738

N.C., not calculated because of BLQ (< 0.02 μg/mL for naldemedine and nor-naldemedine; < 0.005 μg/mL for naldemedine 3-G and naldemedine 6-G).
[(a)] Group means are shown.
[(b)] Note that this mean value was calculated from two animals.
[(c)] Calculated from only one mean plasma concentration.

(続く)

2.6.7.10.2 Carcinogenicity Study in Mice (続き)

Test Article: Naldemedine Tosylate

Daily Dose (mg/kg, as naldemedine)			0 (Control)		10		30		100	
Number Evaluated			M:60	F:60	M:60	F:60	M:60	F:60	M:60	F:60
Toxicokinetics [a] (Continued)										
Benzamidine	C_{max} (ng/mL)	Week 13	N.C.	N.C.	13.5	15.0	26.1	40.6	97.4	109
		Week 26	N.C.	N.C.	17.2	24.5	37.7	32.9	78.2	93.5
	AUC_{0-24hr} (ng·hr/mL)	Week 13	N.C.	N.C.	159	176	329	511	1200	1410
		Week 26	N.C.	N.C.	206	298	464	415	1000	1240
Noteworthy Findings										
Number Examined	At start		60	60	60	60	60	60	60	60
	Died/Sacrificed Moribund		32	37 [e]	34	40 [e]	30 [e]	37	37	34 [e]
	Terminal Sacrifice		28	23	26	20	30	23	23	26
Survival (%)			47	38	43	33	50	38	38	43
Body Weight [b]			45.7	42.7	+3.1	+0.7	+2.2	−2.1	+2.0	+0.5
Food Consumption [c]			36	34	+2.8	−2.9	+2.8	0	+5.6	+2.9
Clinical Observations			–	–	–	–	–	–	–	–
Hematology			–	–	–	–	–	–	–	–
Gross Pathology [d]	Liver Masses		2	1	5	1	21	0	6	0
	Distended Seminal Vesicles		16	–	22	–	24	–	22	–
Number of Animals with Neoplastic Lesions:										
Adipose tissue	B–Lipoma		1	0	0	0	0	0	0	0
	M–Osteosarcoma		0	0	0	1	0	0	0	0
	N–Bronchiolo–Alveolar Carcinoma		0	0	0	0	0	0	0	1
	N–Granulosa Cell Tumor		0	1	0	0	0	0	0	0
	N–Hemangiosarcoma		0	0	0	0	1	0	0	0
	N–Histiocytic Sarcoma		0	0	0	0	0	2	0	1
	N–Lymphoma		1	4	1	3	0	2	0	1

B, benign; M, malignant; N, metastatic. N.C., Not calculated because of BLQ (< 0.001 μg/mL). −, No noteworthy finding.
[a] Group means are shown.
[b] For controls, group means (g) are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown.
[c] For controls, group means for 104 weeks (g/mice/week) are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown.
[d] Numerals represent number of animals with the finding.
[e] Note that this mean value was calculated from two animals.
[f] Include one accidental death.

(続く)

2.6.7.10.2 Carcinogenicity Study in Mice (続き)

Test Article: Naldemedine Tosylate

Daily Dose (mg/kg, as naldemedine)		0 (Control)		10		30		100	
Number Evaluated		M:60	F:60	M:60	F:60	M:60	F:60	M:60	F:60
Number of Animals with Neoplastic Lesions: (Continued)									
Adrenals	B–Cortical Adenoma	0	0	1	0	0	0	0	0
	B–Pheochromocytoma	1	0	1	0	0	0	1	0
	B–Subcapsular Cell Adenoma	1	0	1	1	8	3	4	0
	M–Malignant Pheochromocytoma	0	0	1	0	0	0	1	0
	N–Fibrosarcoma	0	0	0	1	0	0	0	0
	N–Histiocytic Sarcoma	0	1	0	0	0	1	0	1
	N–Leiomyosarcoma	0	0	0	0	0	1	0	0
	N–Leukemia	1	0	0	0	1	0	1	1
	N–Lymphoma	2	9	4	6	4	9	5	6
Aorta (thoracic)	N–Histiocytic Sarcoma	0	0	0	0	0	0	0	1
	N–Leukemia	1	0	0	0	0	0	1	1
	N–Lymphoma	4	10	7	6	5	9	8	8
Bone	B–Odontoma	0	0	0	1	0	0	0	0
	B–Osteoma	0	0	0	2	0	0	0	0
	M–Osteosarcoma	0	1	0	0	0	0	0	0
	N–Lymphoma	0	0	1	1	0	0	1	0
Brain	N–Carcinoma, Pars Intermedia	0	1	0	0	0	0	0	0
	N–Leukemia	1	0	0	0	1	0	1	1
	N–Lymphoma	3	6	4	2	2	1	3	4
Brown adipose	N–Granulosa Cell Tumor	0	1	0	0	0	0	0	0
Bulbocavernous M	N–Lymphoma	0	0	1	0	0	0	0	0
Cecum	B–Adenoma	0	0	1	0	0	0	0	0
	N–Histiocytic Sarcoma	0	0	0	0	0	1	0	0
	N–Leukemia	1	0	0	0	0	1	0	1
	N–Lymphoma	2	2	4	3	2	3	2	3
	N–Malignant Schwannoma	0	0	0	0	0	0	0	1
Clitoral glands	N–Lymphoma	N/A	7	N/A	2	N/A	4	N/A	5
Coagulating gland	N–Lymphoma	1	0	2	0	2	0	3	0

B, benign; M, malignant; N, metastatic. N/A, Not applicable for this group.

(続く)

2.6.7.10.2 Carcinogenicity Study in Mice (続き)

Test Article: Naldemedine Tosylate

Daily Dose (mg/kg, as naldemedine)		0 (Control)		10		30		100	
Number Evaluated		M:60	F:60	M:60	F:60	M:60	F:60	M:60	F:60
Number of Animals with Neoplastic Lesions: (Continued)									
Colon	N–Histiocytic Sarcoma	0	0	0	0	0	1	0	1
	N–Lymphoma	0	3	3	4	1	2	1	2
Diaphragm	N–Hemangiosarcoma	0	0	0	0	1	0	0	0
	N–Histiocytic Sarcoma	0	0	0	0	0	1	0	0
Duodenum	B–Adenoma	0	0	0	0	0	0	0	1
	M–Adenocarcinoma	0	0	1	0	0	0	0	0
	N–Histiocytic Sarcoma	0	0	0	0	0	0	0	1
	N–Leukemia	1	0	0	0	1	0	0	1
	N–Lymphoma	2	2	2	1	1	2	2	1
Epididymides	N–Hemangiosarcoma	0	N/A	0	N/A	1	N/A	0	N/A
	N–Leukemia	1	N/A	0	N/A	1	N/A	0	N/A
	N–Lymphoma	8	N/A	5	N/A	7	N/A	7	N/A
Esophagus	N–Histiocytic Sarcoma	0	0	0	0	0	0	0	1
	N–Lymphoma	2	9	4	3	1	5	4	5
Eyes	N–Leukemia	0	0	0	0	0	0	1	1
	N–Lymphoma	1	2	3	2	0	0	2	2
Femur including Joint	M–Hemangiosarcoma	0	0	0	0	1	0	0	0
	N–Histiocytic Sarcoma	0	0	0	0	0	1	0	2
	N–Leukemia	1	0	0	0	1	0	1	0
	N–Lymphoma	5	8	5	8	6	8	6	10
	N–Malignant Mast Cell Tumor	0	0	0	0	0	0	1	0
Gall bladder	B–Adenoma	2	0	0	2	1	0	0	1
	N–Histiocytic Sarcoma	1	0	0	0	0	0	0	0
	N–Leukemia	1	0	0	0	0	0	0	0
	N–Lymphoma	3	4	6	5	2	6	5	6

B, benign; M, malignant; N, metastatic. N/A, Not applicable for this group.

(続く)

2.6.7.10.2 Carcinogenicity Study in Mice (続き)

Test Article: Naldemedine Tosylate

aily Dose (mg/kg, as naldemedine)		0 (Control)		10		30		100	
Number Evaluated		M:60	F:60	M:60	F:60	M:60	F:60	M:60	F:60
Number of Animals with Neoplastic Lesions: (Continued)									
Harderian gland	B–Adenoma	5	3	2	4	8	5	7	2
	N–Histiocytic Sarcoma	0	1	0	0	0	0	0	0
	N–Leukemia	1	0	0	0	1	0	0	0
	N–Lymphoma	7	10	5	8	8	8	8	12
Head	M–Osteosarcoma	0	0	0	0	0	0	1	0
Heart	N–Histiocytic Sarcoma	0	0	0	1	0	0	0	3
	N–Leukemia	1	0	0	0	1	0	1	1
	N–Lymphoma	3	12	3	8	1	6	5	12
Hematopoietic Tumor	M–Histiocytic Sarcoma	1	1	0	3	1	3	0	3
	M–Malignant Lymphoma	9	21	9	16	13	18	11	22
	M–Malignant Mast Cell Tumor	0	0	0	0	0	0	1	0
	M–Myeloid Cell Leukemia	1	0	0	0	1	0	1	1
Ileum	N–Histiocytic Sarcoma	0	1	0	0	0	0	0	2
	N–Leukemia	1	0	0	0	0	0	0	0
	N–Lymphoma	0	4	3	3	2	4	4	3
Jejunum	M–Adenocarcinoma	1	0	0	1	0	0	0	0
	N–Histiocytic Sarcoma	0	0	0	0	0	1	0	2
	N–Lymphoma	1	4	2	3	3	4	0	2
	N–Osteosarcoma	0	0	0	1	0	0	0	0
Kidneys	B–Tubular Adenoma	0	0	0	0	0	0	1	0
	M–Tubular Carcinoma	1	0	0	0	0	0	0	0
	N–Histiocytic Sarcoma	0	1	0	1	0	0	0	2
	N–Leukemia	1	0	0	0	1	0	1	1
	N–Lymphoma	9	17	8	14	10	15	11	18
	N–Mammary Adenocarcinoma	0	0	0	1	0	0	0	0
Lacrimal gland	N–Leukemia	1	0	0	0	1	0	1	1
	N–Lymphoma	5	11	5	11	9	9	11	14
Larynx	N–Leukemia	1	0	0	0	1	0	0	0
	N–Lymphoma	3	8	6	4	8	5	5	12

B, benign; M, malignant; N, metastatic.

(続く)

2.6.7.10.2 Carcinogenicity Study in Mice (続き)

Test Article: Naldemedine Tosylate

Daily Dose (mg/kg, as naldemedine)		0 (Control)		10		30		100	
Number Evaluated		M:60	F:60	M:60	F:60	M:60	F:60	M:60	F:60
Liver	B–Hemangioma	0	0	1	1	2	0	2	1
	B–Hepatocellular Adenoma	4	0	8	0	10	0	10	0
	M–Hemangiosarcoma	0	0	1	0	1	0	2	0
	M–Hepatocellular Carcinoma	0	0	0	0	3	0	0	1
	N–Fibrosarcoma	0	0	0	0	1	0	0	0
	N–Histiocytic Sarcoma	1	1	0	3	0	2	0	3
	N–Leukemia	1	0	0	0	1	0	1	1
	N–Lymphoma	5	17	9	15	6	12	9	18
	N–Osteosarcoma	0	1	0	1	0	0	0	0
LN Axillary, left	N–Histiocytic Sarcoma	0	1	0	0	0	0	0	1
	N–Leukemia	1	0	0	0	0	0	0	1
	N–Lymphoma	7	16	7	10	6	10	7	9
	N–Mammary Adenocarcinoma	0	0	0	0	0	1	0	0
LN Axillary, right	N–Histiocytic Sarcoma	1	0	0	0	0	0	0	0
	N–Lymphoma	2	5	4	1	0	2	1	2
LN Bronchial	N–Bronchiolo Alveolar Carcinoma	0	0	0	0	1	0	0	0
	N–Histiocytic Sarcoma	1	0	0	0	0	0	0	0
	N–Lymphoma	0	1	1	0	0	2	1	0
LN Cisternal	N–Hemangiosarcoma	0	0	0	0	1	0	0	0
	N–Histiocytic Sarcoma	0	1	0	0	0	0	0	1
	N–Leukemia	1	0	0	0	0	0	0	0
	N–Lymphoma	1	0	1	2	3	4	0	1
LN Inguinal	N–Leukemia	1	0	0	0	0	0	0	1
	N–Lymphoma	2	3	2	3	3	5	3	2
LN Mandibular	N–Histiocytic Sarcoma	1	1	0	0	0	0	0	1
	N–Leukemia	1	0	0	0	1	0	1	1
	N–Lymphoma	6	15	9	13	8	13	7	9
	N–Squamous Cell Carcinoma	0	0	0	0	1	0	0	0

B, benign; M, malignant; N, metastatic. LN, Lymph node.

(続く)

2.6.7.10.2 Carcinogenicity Study in Mice (続き)

Test Article: Naldemedine Tosylate

Daily Dose (mgsurasshukg, as naldemedine)		0 (Control)		10		30		100	
Number Evaluated		M:60	F:60	M:60	F:60	M:60	F:60	M:60	F:60
LN Lumbar	N–Histiocytic Sarcoma	0	1	0	2	0	0	0	2
	N–Leukemia	1	0	0	0	0	0	0	1
	N–Lymphoma	4	10	7	6	3	10	5	4
LN Mediastinal	N–Leukemia	1	0	0	0	0	0	0	0
	N–Lymphoma	2	3	4	2	1	3	5	3
LN Mesenteric	B–Hemangioma	0	0	0	1	1	0	0	1
	M–Hemangiosarcoma	0	0	0	0	1	0	0	0
	N–Histiocytic Sarcoma	1	1	0	0	0	0	0	2
	N–Leukemia	1	0	0	0	1	0	1	1
	N–Lymphoma	5	14	10	13	9	13	9	13
LN Pancreatic	N–Histiocytic Sarcoma	1	0	0	0	0	0	0	1
	N–Lymphoma	1	6	4	1	1	2	2	4
LN Popliteal	N–Lymphoma	0	0	0	0	0	0	1	0
LN Renal	B–Hemangioma	0	0	0	0	0	0	0	1
	N–Histiocytic Sarcoma	0	1	0	0	0	0	0	2
	N–Leukemia	0	0	0	0	0	0	0	1
	N–Lymphoma	1	8	0	7	5	8	3	4
Lungs + Bronchi	B–Bronchiolo–Alveolar Adenoma	21	11	9	7	21	11	11	8
	M–Bronchiolo–Alveolar Carcinoma	9	2	9	3	6	3	3	2
	N–Fibrosarcoma	0	1	0	0	0	0	0	0
	N–Granulosa Cell Tumor	0	1	0	0	0	0	0	0
	N–Hemangiosarcoma	0	0	1	0	0	0	0	0
	N–Histiocytic Sarcoma	0	1	0	1	0	1	0	3
	N–Leukemia	1	0	0	0	1	0	1	1
	N–Lymphoma	9	17	7	14	8	16	10	18
	N–Mammary Adenocarcinoma	0	1	0	2	0	1	0	0
	N-Osteosarcoma	0	1	0	0	0	0	0	0

B, benign; M, malignant; N, metastatic. LN, Lymph node.

(続く)

2.6.7.10.2 Carcinogenicity Study in Mice (続き)

Test Article: Naldemedine Tosylate

Daily Dose (mg/kg, as naldemedine)		0 (Control)		10		30		100	
Number Evaluated		M:60	F:60	M:60	F:60	M:60	F:60	M:60	F:60
Mammary	B–Mammary Adenoma	0	0	0	0	0	0	0	1
	B–Mammary Adenomyoepithelioma	0	1	0	0	0	0	0	0
	M–Adenosquamous Carcinoma	0	1	0	0	0	0	0	0
	M–Mammary Adenocarcinoma	0	6	0	3	0	2	0	4
	N–Histiocytic Sarcoma	0	1	0	0	0	0	0	1
	N–Leukemia	0	0	0	0	0	0	0	1
	N–Lymphoma	6	9	3	5	2	5	3	7
Mandibular salivary gland	N–Histiocytic Sarcoma	1	1	0	0	0	0	0	0
	N–Leukemia	1	0	0	0	1	0	0	1
	N–Lymphoma	6	14	6	10	7	11	10	14
Optic nerves	N–Leukemia	0	0	0	0	0	0	0	1
	N–Lymphoma	0	1	2	1	1	1	3	2
Ovaries	B–Cystadenoma	N/A	1	N/A	0	N/A	0	N/A	0
	B–Granulosa Cell Tumor	N/A	0	N/A	0	N/A	0	N/A	1
	B–Hemangioma	N/A	0	N/A	0	N/A	0	N/A	1
	B–Luteoma	N/A	0	N/A	2	N/A	0	N/A	1
	B–Tubulostromal Adenoma	N/A	0	N/A	0	N/A	0	N/A	1
	M–Malignant Granulosa Cell Tumor	N/A	1	N/A	0	N/A	0	N/A	0
	M–Mixed Stromal Tumor, Malignant	N/A	0	N/A	1	N/A	0	N/A	0
	N–Histiocytic Sarcoma	N/A	1	N/A	0	N/A	2	N/A	3
	N–Leiomyosarcoma	N/A	0	N/A	0	N/A	1	N/A	0
	N–Leukemia	N/A	0	N/A	0	N/A	0	N/A	1
	N–Lymphoma	N/A	10	N/A	9	N/A	9	N/A	9
Pancreas	B–Islet Cell Adenoma	0	0	1	1	2	0	0	2
	N–Hemangiosarcoma	0	0	0	0	1	0	0	0
	N–Histiocytic Sarcoma	1	1	0	0	0	1	0	1
	N–Leukemia	1	0	0	0	1	0	0	0
	N–Lymphoma	6	10	8	5	7	9	8	9

B, benign; M, malignant; N, metastatic. N/A, Not applicable for this group.

(続く)

2.6.7.10.2 Carcinogenicity Study in Mice (続き)

Test Article: Naldemedine Tosylate

Daily Dose (mg/kg, as naldemedine)		0 (Control)		10		30		100	
Number Evaluated		M:60	F:60	M:60	F:60	M:60	F:60	M:60	F:60
Parathyroids	N–Lymphoma	0	0	0	1	0	0	0	0
Peyer's patch	N–Lymphoma	2	5	5	3	5	4	6	0
Pituitary	B–Adenoma, Pars Distalis	1	3	1	0	0	0	1	0
	B–Adenoma, Pars Intermedia	0	0	0	0	0	0	1	0
	M–Carcinoma, Pars Intermedia	0	1	0	0	0	0	0	0
	N–Leukemia	1	0	0	0	0	0	0	1
	N–Lymphoma	1	2	3	0	0	0	3	2
Preputial glands	N–Fibrosarcoma	0	N/A	0	N/A	0	N/A	1	N/A
	N–Leukemia	1	N/A	0	N/A	0	N/A	0	N/A
	N–Lymphoma	5	N/A	6	N/A	6	N/A	8	N/A
Prostate	N–Leiomyosarcoma	0	N/A	1	N/A	0	N/A	0	N/A
	N–Leukemia	1	N/A	0	N/A	1	N/A	1	N/A
	N–Lymphoma	8	N/A	7	N/A	10	N/A	10	N/A
Rectum	N–Histiocytic Sarcoma	0	0	0	1	0	0	0	1
	N–Lymphoma	1	2	0	2	0	3	1	2
	N–Malignant Schwannoma	0	0	0	0	0	1	0	0
Salivary gland	N–Lymphoma	2	0	0	0	0	0	0	0
Sciatic nerve	N–Leukemia	1	0	0	0	0	0	0	0
	N–Lymphoma	0	7	5	4	2	4	6	3
Seminal vesicles	B–Adenoma	0	N/A	1	N/A	0	N/A	0	N/A
	B–Granular Cell Tumor	0	N/A	0	N/A	1	N/A	0	N/A
	M–Leiomyosarcoma	0	N/A	1	N/A	0	N/A	0	N/A
	N–Hemangiosarcoma	0	N/A	0	N/A	1	N/A	0	N/A
	N–Leukemia	0	N/A	0	N/A	1	N/A	0	N/A
	N–Lymphoma	6	N/A	3	N/A	7	N/A	7	N/A

B, benign; M, malignant; N, metastatic. N/A, Not applicable for this group.

(続く)

2.6.7.10.2 Carcinogenicity Study in Mice (続き)

Test Article: Naldemedine Tosylate

Daily Dose (mg/kg, as naldemedine)		0 (Control)		10		30		100	
Number Evaluated		M:60	F:60	M:60	F:60	M:60	F:60	M:60	F:60
Skeletal muscle	M–Fibrosarcoma	0	1	0	0	0	0	0	0
	N–Histiocytic Sarcoma	0	0	0	0	0	0	0	1
	N–Leiomyosarcoma	0	0	0	0	0	1	0	0
	N–Leukemia	1	0	0	0	1	0	0	0
	N–Lymphoma	4	5	5	1	1	2	6	7
	N–Mammary Adenocarcinoma	0	0	0	1	0	0	0	0
	N–Osteosarcoma	0	1	0	0	0	0	0	0
Skin	B–Fibroma	1	0	0	0	0	0	0	0
	B–Lipoma	2	0	0	0	0	0	0	0
	B–Papilloma	0	0	0	0	1	0	0	0
	B–Sebaceous Cell Adenoma	0	0	0	0	0	0	1	0
	M–Fibrosarcoma	8	1	4	5	5	1	2	2
	M–Hemangiosarcoma	0	1	0	0	0	0	0	0
	M–Squamous Cell Carcinoma	0	0	0	0	1	0	0	0
	N–Leukemia	0	0	0	0	1	0	0	0
	N–Lymphoma	1	4	1	0	1	1	0	2
Spinal cord (cervical)	N–Leukemia	1	0	0	0	1	0	1	1
	N–Lymphoma	0	3	0	1	0	1	3	2
Spinal cord (thoracic)	N–Leukemia	1	0	0	0	1	0	0	1
	N–Lymphoma	1	3	0	0	0	2	3	3
Spinal cord (lumbar)	N–Leukemia	1	0	0	0	1	0	1	1
	N–Lymphoma	1	3	1	1	0	3	2	2
Spleen	M–Hemangiosarcoma	0	2	1	0	1	0	1	0
	N–Histiocytic Sarcoma	1	1	0	0	1	0	0	2
	N–Leukemia	1	0	0	0	1	0	1	1
	N–Lymphoma	6	18	9	16	11	15	10	16
	N–Malignant Mast Cell Tumor	0	0	0	0	0	0	1	0
	N–Osteosarcoma	0	0	0	1	0	0	0	0

B, benign; M, malignant; N, metastatic.

(続く)

2.6.7.10.2 Carcinogenicity Study in Mice (続き)

Test Article: Naldemedine Tosylate

Daily Dose (mg/kg, as naldemedine)		0 (Control)		10		30		100	
Number Evaluated		M:60	F:60	M:60	F:60	M:60	F:60	M:60	F:60
Sternum + Marrow	N–Histiocytic Sarcoma	0	0	0	0	0	0	0	2
	N–Leukemia	1	0	0	0	1	0	1	1
	N–Lymphoma	4	11	7	12	6	11	7	13
	N–Malignant Mast Cell Tumor	0	0	0	0	0	0	1	0
Stomach	B–Squamous Cell Papilloma	1	0	0	0	1	0	0	0
	N–Histiocytic Sarcoma	0	0	0	0	0	2	0	1
	N–Leukemia	1	0	0	0	1	0	0	1
	N–Lymphoma	7	14	6	10	9	16	8	12
	N–Malignant Schwannoma	0	0	0	0	0	1	0	0
Testes	B–Interstitial (Leydig) Cell Adenoma	0	N/A	1	N/A	1	N/A	1	N/A
	N–Lymphoma	0	N/A	1	N/A	1	N/A	1	N/A
Thorax	N–Histiocytic Sarcoma	0	1	0	0	0	0	0	0
	N–Lymphoma	1	6	0	2	0	5	2	5
Thymus	N–Histiocytic Sarcoma	1	1	0	0	0	1	0	2
	N–Leukemia	1	0	0	0	0	0	0	1
	N–Lymphoma	9	20	8	14	10	17	11	19
Thyroid	B–C–Cell Adenoma	0	0	1	0	0	0	0	0
	B–Follicular Cell Adenoma	0	0	0	1	1	0	1	0
	N–Leukemia	1	0	0	0	0	0	0	0
	N–Lymphoma	1	2	1	1	2	1	3	5
Tongue	N–Leukemia	0	0	0	0	0	0	1	0
	N–Lymphoma	0	5	1	1	3	1	2	4
Trachea	N–Leukemia	0	0	0	0	0	0	0	1
	N–Lymphoma	3	7	3	5	2	5	7	11
Ureters	N–Histiocytic Sarcoma	1	1	0	0	0	0	0	1
	N–Leukemia	0	0	0	0	1	0	1	1
	N–Lymphoma	6	15	8	11	8	13	11	11

B, benign; M, malignant; N, metastatic. N/A, Not applicable for this group.

(続く)

2.6.7.10.2 Carcinogenicity Study in Mice (続き)

Test Article: Naldemedine Tosylate

Daily Dose (mg/kg, as naldemedine)		0 (Control)		10		30		100	
Number Evaluated		M:60	F:60	M:60	F:60	M:60	F:60	M:60	F:60
Urinary bladder	N–Histiocytic Sarcoma	1	1	0	0	0	0	0	1
	N–Leukemia	1	0	0	0	1	0	0	1
	N–Lymphoma	8	16	4	12	8	16	10	17
	N–Malignant Schwannoma	0	0	0	0	0	0	0	1
Uterine cervix	B–Granular Cell Tumor	N/A	0	N/A	0	N/A	0	N/A	1
	N–Histiocytic Sarcoma	N/A	0	N/A	1	N/A	0	N/A	1
	N–Lymphoma	N/A	6	N/A	2	N/A	1	N/A	1
	N–Malignant Schwannoma	N/A	0	N/A	0	N/A	1	N/A	1
Uterus	B–Deciduoma	N/A	0	N/A	0	N/A	0	N/A	1
	B–Endometrial Adenoma	N/A	0	N/A	0	N/A	0	N/A	1
	B–Endometrial Polyp	N/A	10	N/A	12	N/A	7	N/A	6
	B–Granular Cell Tumor	N/A	0	N/A	0	N/A	1	N/A	0
	B–Hemangioma	N/A	1	N/A	0	N/A	0	N/A	1
	B–Leiomyoma	N/A	1	N/A	3	N/A	1	N/A	2
	M–Endometrial Adenocarcinoma	N/A	1	N/A	1	N/A	0	N/A	0
	M–Endometrial Stromal Cell Sarcoma	N/A	0	N/A	0	N/A	1	N/A	0
	M–Hemangiosarcoma	N/A	1	N/A	0	N/A	1	N/A	0
	M–Leiomyosarcoma	N/A	0	N/A	0	N/A	2	N/A	0
	M–Malignant Schwannoma	N/A	0	N/A	0	N/A	1	N/A	1
	N–Histiocytic Sarcoma	N/A	1	N/A	2	N/A	3	N/A	2
	N–Lymphoma	N/A	9	N/A	7	N/A	8	N/A	6
	N–Osteosarcoma	N/A	0	N/A	1	N/A	0	N/A	0
Vagina	N–Lymphoma	N/A	4	N/A	4	N/A	1	N/A	4
	N–Malignant Schwannoma	N/A	0	N/A	0	N/A	1	N/A	1

B, benign; M, malignant; N, metastatic. N/A, Not applicable for this group.

2.6.7.10.3 Carcinogenicity Study in Rats

Test Article: Naldemedine Tosylate

Report Title: 104-Week Carcinogenicity Study of S-297995 monotosylate in Rats by Gavage		
Species/Strain: Rat/Crl:CD(SD)	**Duration of Dosing:** 104 weeks	**Study No.** R–297995–TF–266–L (CRO Study No. [redacted]0036)
Initial Age: 33-40 days	**Method of Administration:** Oral gavage	**Location in CTD:** 4.2.3.4-02
Date of First Dose: [redacted] 20[redacted]	**Vehicle/Formulation:** 0.5 w/v% MC aqueous solution/Suspension	**GLP Compliance:** Yes
Special Features: None		
No Observed Adverse Effect Level for Non-neoplastic Findings: 100 mg/kg/day		
Carcinogenicity potential: None		

Daily Dose (mg/kg, as naldemedine)			**0 (Control)**		**10**		**30**		**100**	
Number Evaluated			**M: 65**	**F: 65 [a]**	**M: 65**	**F: 65 [a]**	**M: 65**	**F: 65 [a]**	**M: 65**	**F: 65 [a]**
Toxicokinetics [b]										
Gender and No. per Group			18	18	18	18	18	18	18	18
Naldemedine	**C_{max} (ng/mL)**	**Week 13**	N.C.	N.C.	1300	1470	3130	5580	7050	9380
		Week 26	N.C.	N.C.	763	1300	3170	6950	9420	13200
	AUC_{0-24hr} (ng·hr/mL)	**Week 13**	N.C.	N.C.	9520	9980	27000 [c]	36300	84800	61000
		Week 26	N.C.	N.C.	6440	8590	29700 [c]	48200	109000	107000
Nor–naldemedine	**C_{max} (ng/mL)**	**Week 13**	N.C.	N.C.	70.4	66.5	167 [c]	92.7 [c]	702	139
		Week 26	N.C.	N.C.	50.9	71.3	201 [c]	154	1750	306
	AUC_{0-24hr} (ng·hr/mL)	**Week 13**	N.C.	N.C.	565	365	1570	686	8180	1120
		Week 26	N.C.	N.C.	297	465	2210	1040	21500	2950
Naldemedine 3-G	**C_{max} (ng/mL)**	**Week 13**	N.C.	N.C.	72.4	164	228 [c]	340	2790	744
		Week 26	N.C.	N.C.	88.7	245	362 [c]	769	10100	2320
	AUC_{0-24hr} (ng·hr/mL)	**Week 13**	N.C.	N.C.	450	769	1370 [c]	2130	25100	5190
		Week 26	N.C.	N.C.	528	869	2790 [c]	3510	125000	17500
Naldemedine 6-G	**C_{max} (ng/mL)**	**Week 13**	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	16.4 [c]	10.2	54.3	19.6
		Week 26	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	13.6 [c]	15.1	123	42.3
	AUC_{0-24hr} (ng·hr/mL)	**Week 13**	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	16.4 [c]	10.2	419	94.7
		Week 26	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	50.8 [c]	38.4	1380	272

N.C., Not calculated because of BLQ (< 0.02 μg/mL for naldemedine and nor-naldemedine; < 0.005 μg/mL for naldemedine 3-G and naldemedine 6-G).
[a] All surviving females were terminated early, from Week 103, after surviving numbers of females in Group 1 (control) fell to fifteen animals.
[b] Group means are shown.
[c] Note that this mean value was calculated from two animals.

(続く)

2.6.7.10.3 Carcinogenicity Study in Rats (続き)

Test Article: Naldemedine Tosylate

Daily Dose (mg/kg, as naldemedine)			0 (Control)		10		30		100	
Number Evaluated			M: 65	F: 65 [a]	M: 65	F: 65 [a]	M: 65	F: 65 [a]	M: 65	F: 65 [a]
Toxicokinetics [b] (Continued)										
Benzamidine	C_{max} (ng/mL)	Week 13	N.C.	N.C.	23.6	6.14	48.3 [f]	43.4	57.1	75.2
		Week 26	N.C.	N.C.	18.7	8.24	55.7 [f]	25.4	160	155
	AUC_{0-24hr} (ng·hr/mL)	Week 13	N.C.	N.C.	351	117	905 [f]	695	1010	1320
		Week 26	N.C.	N.C.	259	127	791 [f]	391	2280	2400
Noteworthy Findings										
Number of Animals	At start		65	65	65	65	65	65	65	65
	Died/Sacrificed Moribund		36	50	33 [e]	46	39	46	37 [g]	48
	Terminal Sacrifice		29	15	32	19	26	19	28	17
Clinical Observations			–	–	–	–	–	–	–	–
Blood Chemistry [b]	Triglyceride (nmol/L)		1.65	1.84	–	–	–	–	0.98 **	1.11 **
Urinalysis			–	–	–	–	–	–	–	–
Survival (%)			45	23	49	29	40	29	43	26
Body Weight [c]	Week 0 to 104		632	N/A	−0.17 **	N/A	−0.20 **	N/A	−0.19 **	N/A
	Week 0 to 103		N/A	398	N/A	−0.18	N/A	−0.14	N/A	−0.21 *
Food Consumption [d]	Mean for 104 weeks		201	N/A	−0.07 **	N/A	−0.08 **	N/A	−0.06	N/A
	Mean for 100 weeks		N/A	147g	N/A	−0.03	N/A	−0.02	N/A	−0.03

N.C., Not calculated because of BLQ (< 0.001 μg/mL). N/A, Not applicable for this group. −, No noteworthy finding.
[a] All surviving females were terminated early, from Week 103, after surviving numbers of females in Group 1 (control) fell to fifteen animals.
[b] Group means are shown.
[c] For controls, group means of body weight (g) are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown.
[d] For controls, group means of food consumption (g/rat/week) are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown.
[e] Includes one accidental death.
[f] Note that this mean value was calculated from two animals.
[g] Includes two accidental deaths.
* P < 0.05, ** P < 0.01 vs control (Williams' test).

(続く)

2.6.7.10.3 Carcinogenicity Study in Rats (続き)

Test Article: Naldemedine Tosylate

Daily Dose (mg/kg, as naldemedine)		0 (Control)		10		30		100	
Number Evaluated		M: 65	F: 65 [(a)]	M: 65	F: 65 [(a)]	M: 65	F: 65 [(a)]	M: 65	F: 65 [(a)]
Number of Animals with Neoplastic Lesions:									
Adipose tissue	B–Lipoma	0	0	0	0	0	0	1	0
	N–Adenocarcinoma	0	0	1	0	0	0	0	1
	N–Histiocytic Sarcoma	1	0	0	0	0	0	0	0
	N–Tubular Carcinoma	1	0	0	0	0	0	0	0
	N–Yolk Sac Tumor	0	0	0	0	0	1	0	0
Bone	B–Odontoma, Ameloblastic,	0	0	1	0	0	0	0	0
Brain	M–Astrocytoma	2	1	1	0	2	2	1	1
	M–Malignant Granular Cell Tumor	0	0	0	0	0	0	0	1
	M–Meningioma	1	0	0	0	0	0	0	0
	M–Mixed Glioma	0	0	0	0	0	0	1	0
	N–Carcinoma, Pituitary	0	0	0	0	1	0	0	2
	N–Histiocytic Sarcoma	0	0	1	0	0	0	0	0
	N–Lymphoma	0	0	0	0	1	0	0	0
Cecum	N–Fibrosarcoma, Pleomorphic	0	0	1	0	0	0	0	0
Colon	N–Adenocarcinoma	0	0	1	0	0	0	0	0
Diaphragm	N–Adenocarcinoma	0	0	1	0	0	0	0	0
	N–Histiocytic Sarcoma	0	0	1	0	0	0	0	0
	N–Tubular Carcinoma	1	0	0	0	0	0	0	0
Epididymides	M–Mesothelioma	0	N/A	0	N/A	1	N/A	0	N/A
	N–Adenocarcinoma	0	N/A	1	N/A	0	N/A	0	N/A
Eyes	M–Malignant Schwannoma	1	0	0	0	0	0	0	0
Femur including joint	M–Osteosarcoma	0	0	0	0	0	1	0	0
	N–Fibrosarcoma, Pleomorphic	0	0	0	0	1	0	0	0
	N–Histiocytic Sarcoma	1	0	0	0	0	0	1	0
	N–Leukemia	0	0	0	0	0	0	1	0
	N–Lymphoma	0	0	0	0	1	0	2	0

B, benign; M, malignant; N, metastatic. N/A, Not applicable for this group.
[(a)] The study in female rats was terminated one week earlier (Week 103) than scheduled, since the surviving number of females in control group fell to 15 animals on the week.

(続く)

2.6.7.10.3 Carcinogenicity Study in Rats (続き)

Test Article: Naldemedine Tosylate

Daily Dose (mg/kg, as naldemedine)		0 (Control)		10		30		100	
Number Evaluated		M: 65	F: 65 [(a)]	M: 65	F: 65 [(a)]	M: 65	F: 65 [(a)]	M: 65	F: 65 [(a)]
Number of Animals with Neoplastic Lesions: (Continued)									
Harderian gland	B–Adenoma	1	0	0	0	0	0	0	0
	M–Squamous Cell Carcinoma	0	0	1	0	0	0	0	0
	N–Lymphoma	0	0	0	0	1	0	2	0
Head	M–Sebaceous Gland Carcinoma, Zymbal's Gland	0	0	0	0	1	0	0	0
	M–Squamous Cell Carcinoma	1	0	1	0	1	0	3	1
	N–Lymphoma	0	0	0	0	0	0	1	0
Heart	N–Histiocytic Sarcoma	0	0	1	0	0	0	0	0
	N–Pheochromocytoma	0	0	0	0	0	1	0	0
Hematopoietic tumor	M–Histiocytic Sarcoma	1	0	2	0	0	0	1	0
	M–Malignant Lymphoma	0	0	0	0	2	0	3	0
	M–Myeloid Cell Leukemia	0	0	0	0	0	0	1	0
Kidneys	B–Tubular Adenoma	0	0	0	0	1	0	0	0
	M–Nephroblastoma	0	0	0	0	0	0	0	1
	M–Renal Liposarcoma	0	1	1	0	0	0	0	0
	M–Tubular Carcinoma	2	0	0	1	0	0	0	0
	N–Histiocytic Sarcoma	0	0	0	0	0	0	1	0
	N–Lymphoma	0	0	0	0	1	0	2	0
Lacrimal gland	N–Lymphoma	0	0	0	0	1	0	3	0
Larynx	N–Lymphoma	0	0	0	0	1	0	0	0

B, benign; M, malignant; N, metastatic.
[(a)] The study in female rats was terminated one week earlier (Week 103) than scheduled, since the surviving number of females in control group fell to 15 animals on the week.

(続く)

2.6.7.10.3 Carcinogenicity Study in Rats (続き)

Test Article: Naldemedine Tosylate

Daily Dose (mg/kg, as naldemedine)		0 (Control)		10		30		100	
Number Evaluated		M: 65	F: 65 [(a)]	M: 65	F: 65 [(a)]	M: 65	F: 65 [(a)]	M: 65	F: 65 [(a)]
Number of Animals with Neoplastic Lesions: (Continued)									
Liver	B–Cholangioma	0	1	0	1	0	1	0	0
	B–Hepatocellular Adenoma	0	0	0	0	1	0	1	0
	M–Hepatocellular Carcinoma	0	0	0	0	0	0	2	0
	N–Histiocytic Sarcoma	1	0	2	0	0	0	1	0
	N–Lymphoma	0	0	0	0	1	0	2	0
	N–Thymoma	0	0	0	0	0	0	0	1
	N–Tubular Carcinoma	1	0	0	0	0	0	0	0
LN Axillary, left	N–Histiocytic Sarcoma	0	0	1	0	0	0	1	0
	N–Lymphoma	0	0	0	0	2	0	3	0
LN Axillary, right	N–Lymphoma	0	0	0	0	1	0	0	0
LN Cisternal	N–Histiocytic Sarcoma	1	0	0	0	0	0	0	0
	N–Lymphoma	0	0	0	0	1	0	1	0
LN Deep Cervical	N–C Cell Carcinoma	1	0	0	0	0	0	0	0
LN Inguinal	N–Lymphoma	0	0	0	0	1	0	0	0
LN Lumbar	M–Hemangiosarcoma	0	0	0	0	1	0	0	0
	N–Adenocarcinoma	0	0	0	0	0	0	0	1
	N–Histiocytic Sarcoma	1	0	2	0	0	0	0	0
	N–Lymphoma	0	0	0	0	1	0	2	0
LN Mandibular	N–Lymphoma	0	0	0	0	1	0	3	0
	N–Squamous Cell Carcinoma	0	0	0	0	0	0	1	0
LN Mediastinal	N–Histiocytic Sarcoma	0	0	0	0	0	0	1	0
LN Mesenteric	B–Hemangioma	1	1	1	0	3	0	1	0
	N–Histiocytic Sarcoma	0	0	0	0	0	0	1	0
	N–Lymphoma	0	0	0	0	2	0	3	0
	N–Tubular Carcinoma	1	0	0	0	0	0	0	0
LN Pancreatic	N–Histiocytic Sarcoma	0	0	1	0	0	0	1	0
	N–Lymphoma	0	0	0	0	0	0	2	0
LN Renal	N–Lymphoma	0	0	0	0	1	0	1	0

B, benign; M, malignant; N, metastatic. LN, Lymph node.
[(a)] The study in female rats was terminated one week earlier (Week 103) than scheduled, since the surviving number of females in control group fell to 15 animals on the week.

(続く)

2.6.7.10.3 Carcinogenicity Study in Rats (続き)

Test Article: Naldemedine Tosylate

Daily Dose (mg/kg, as naldemedine)		0 (Control)		10		30		100	
Number Evaluated		M: 65	F: 65 [(a)]	M: 65	F: 65 [(a)]	M: 65	F: 65 [(a)]	M: 65	F: 65 [(a)]
Number of Animals with Neoplastic Lesions: (Continued)									
Lungs + Bronchi	M–Bronchiolo–Alveolar Adenocarcinoma	0	0	0	1	0	0	0	0
	N–Adenocarcinoma	0	1	1	0	0	0	0	1
	N–Adrenal Cortical Carcinoma	0	0	1	0	0	0	0	0
	N–Fibrosarcoma Pleomorphic	0	0	0	0	1	0	0	0
	N–Histiocytic Sarcoma	1	0	2	0	0	0	1	0
	N–Lymphoma	0	0	0	0	1	0	3	0
	N–Pheochromocytoma	0	1	0	0	1	1	0	0
Mammary	B–Mammary Adenoma	0	2	0	2	0	5	1	3
	B–Mammary Fibroadenoma	1	29	0	36	1	35	1	35
	B–Mixed Tumor	0	0	0	0	0	0	0	1
	M–Carcinosarcoma	0	0	0	0	0	0	0	1
	M–Mammary Adenocarcinoma	1	17	0	21	0	20	0	16
	M–Mammary Adenocarcinoma Arising In Mammary Adenoma	0	1	0	4	0	4	0	2
	N–Lymphoma	0	0	0	0	0	0	1	0
Mandibular S.G.	N–Lymphoma	0	0	0	0	0	0	1	0
Ovaries	B–Tumor, Sex Cord Stromal, Mixed	N/A	0	N/A	2	N/A	2	N/A	1
	M–Malignant Granulosa Cell Tumor	N/A	0	N/A	0	N/A	1	N/A	0
	M–Yolk Sac Tumor	N/A	0	N/A	0	N/A	1	N/A	0
Pancreas	B–Acinar Cell Adenoma	1	0	2	0	1	0	0	0
	B–Islet Cell Adenoma	5	1	6	0	5	3	7	1
	M–Islet Cell Carcinoma	2	0	1	0	0	0	1	0
	N–Adenocarcinoma	0	0	1	0	0	0	0	0
	N–Histiocytic Sarcoma	0	0	1	0	0	0	0	0
	N–Lymphoma	0	0	0	0	0	0	2	0
	N–Tubular Carcinoma	1	0	0	0	0	0	0	0

B, benign; M, malignant; N, metastatic. S.G, Salivary gland. N/A, Not applicable for this group.
[(a)] The study in female rats was terminated one week earlier (Week 103) than scheduled, since the surviving number of females in control group fell to 15 animals on the week.

(続く)

2.6.7.10.3 Carcinogenicity Study in Rats (続き)

Test Article: Naldemedine Tosylate

Daily Dose (mg/kg, as naldemedine)		0 (Control)		10		30		100	
Number Evaluated		M: 65	F: 65 [(a)]	M: 65	F: 65 [(a)]	M: 65	F: 65 [(a)]	M: 65	F: 65 [(a)]
Number of Animals with Neoplastic Lesions: (Continued)									
Parathyroids	B–Chief Cell Adenoma	2	0	0	0	3	4	1	0
Paws	B–Keratoacanthoma	0	0	1	0	0	0	1	0
	B–Osteoma	0	0	2	0	0	0	0	0
Peyer's patch	N–Histiocytic Sarcoma	1	0	0	0	0	0	0	0
	N–Lymphoma	0	0	0	0	0	0	3	0
Pituitary	B–Adenoma, Pars Distalis	22	46	24	51	22	44	18	45
	B–Adenoma, Pars Intermedia	1	0	1	0	0	0	0	0
	M–Carcinoma, Pars Distalis	0	0	0	0	2	0	0	2
	N–Lymphoma	0	0	0	0	1	0	1	0
Preputial glands	N–Histiocytic Sarcoma	0	N/A	1	N/A	0	N/A	0	N/A
	N–Lymphoma	0	N/A	0	N/A	0	N/A	2	N/A
Prostate	M–Adenocarcinoma	0	N/A	1	N/A	0	N/A	0	N/A
	N–Histiocytic Sarcoma	0	N/A	1	N/A	0	N/A	0	N/A
	N–Lymphoma	0	N/A	0	N/A	0	N/A	2	N/A
Seminal vesicles	N–Adenocarcinoma	0	N/A	1	N/A	0	N/A	0	N/A
	N–Lymphoma	0	N/A	0	N/A	0	N/A	1	N/A
	N–Tubular Carcinoma	1	N/A	0	N/A	0	N/A	0	N/A
Skeletal muscle	N–Histiocytic Sarcoma	0	0	2	0	0	0	0	0

B, benign; M, malignant; N, metastatic. N/A, Not applicable for this group.
[(a)] The study in female rats was terminated one week earlier (Week 103) than scheduled, since the surviving number of females in control group fell to 15 animals on the week.

(続く)

2.6.7.10.3 Carcinogenicity Study in Rats (続き)

Test Article: Naldemedine Tosylate

Daily Dose (mg/kg, as naldemedine)		0 (Control)		10		30		100	
Number Evaluated		M: 65	F: 65 [(a)]	M: 65	F: 65 [(a)]	M: 65	F: 65 [(a)]	M: 65	F: 65 [(a)]
Number of Animals with Neoplastic Lesions: (Continued)									
Skin	B–Basal Cell Tumor	1	0	0	1	1	0	0	0
	B–Fibroma	6	4	9	1	9	2	9	2
	B–Hemangioma	1	0	0	0	0	0	0	0
	B–Keratoacanthoma	5	0	5	0	4	0	3	1
	B–Lipoma	2	0	2	0	3	0	1	0
	B–Sebaceous Cell Adenoma	0	0	0	0	1	0	1	0
	B–Squamous Cell Papilloma	0	0	2	1	0	0	2	0
	B–Tumor Hair Follicle	2	0	0	0	2	0	2	0
	M–Basal Cell Carcinoma	0	0	0	0	1	0	0	0
	M–Fibrosarcoma	2	0	5	1	3	2	1	0
	M–Fibrosarcoma, Pleomorphic	0	1	2	0	2	0	0	1
	M–Osteosarcoma	0	0	1	0	0	0	0	0
	M–Schwannoma	0	0	0	0	0	0	2	0
	M–Sebaceous Cell Carcinoma	1	0	0	0	0	0	0	0
	N–Histiocytic Sarcoma	0	0	1	0	0	0	1	0
	N–Lymphoma	0	0	0	0	0	0	1	0
Spinal cord (thoracic)	M–Meningeal Sarcoma	1	0	0	0	0	0	0	0
Spleen	B–Hemangioma	0	1	0	0	0	0	0	0
	M–Hemangiosarcoma	1	0	0	0	1	0	0	0
	M–Splenic Sarcoma NOS	0	0	1	0	1	0	0	0
	N–Histiocytic Sarcoma	1	0	0	0	0	0	0	0
	N–Lymphoma	0	0	0	0	1	0	3	0
Sternum + Marrow	N–Histiocytic Sarcoma	1	0	0	0	0	0	0	0
	N–Leukemia	0	0	0	0	0	0	1	0
	N–Lymphoma	0	0	0	0	0	0	2	0

B, benign; M, malignant; N, metastatic.
[(a)] The study in female rats was terminated one week earlier (Week 103) than scheduled, since the surviving number of females in control group fell to 15 animals on the week.

(続く)

2.6.7.10.3 Carcinogenicity Study in Rats (続き)

Test Article: Naldemedine Tosylate

Daily Dose (mg/kg, as naldemedine)		0 (Control)		10		30		100	
Number Evaluated		M: 65	F: 65 [(a)]	M: 65	F: 65 [(a)]	M: 65	F: 65 [(a)]	M: 65	F: 65 [(a)]
Number of Animals with Neoplastic Lesions: (Continued)									
Stomach	N–Histiocytic Sarcoma	0	0	1	0	0	0	1	0
	N–Lymphoma	0	0	0	0	0	0	1	0
	N–Tubular Carcinoma	1	0	0	0	0	0	0	0
Tail	B–Hemangioma	0	0	0	0	0	0	1	0
	M–Liposarcoma	0	1	0	0	0	0	0	0
Testes	B–Hemangioma	1	N/A	0	N/A	0	N/A	0	N/A
	B–Interstitial (Leydig) Cell Adenoma	3	N/A	3	N/A	8	N/A	6	N/A
	N–Mesothelioma	0	N/A	0	N/A	1	N/A	0	N/A
Thorax	N–Histiocytic Sarcoma	0	0	1	0	0	0	0	0
	N–Lymphoma	0	0	0	0	0	0	1	0
Thymus	B–Thymoma	0	0	0	0	0	0	0	2
	M–Thymoma	0	0	0	1	0	2	0	1
	N–Histiocytic Sarcoma	0	0	1	0	0	0	0	0
	N–Lymphoma	0	0	0	0	0	0	3	0
Thyroid	B–C–Cell Adenoma	8	3	5	6	6	2	7	8
	B–Follicular Cell Adenoma	1	1	0	1	2	0	1	1
	M–C–Cell Carcinoma	1	0	1	1	1	1	1	0
	M–Follicular Cell Carcinoma	0	1	1	1	0	0	0	1
	N–Lymphoma	0	0	0	0	0	0	1	0
Tongue	B–Squamous Cell Papilloma	1	0	0	0	0	0	0	0
Urinary bladder	N–Lymphoma	0	0	0	0	1	0	0	0
Uterine cervix	B–Granular Cell Tumor	N/A	0	N/A	0	N/A	1	N/A	0
	M–Schwannoma	N/A	1	N/A	1	N/A	0	N/A	1
Uterus	B–Endometrial Polyp	N/A	1	N/A	4	N/A	3	N/A	2
	M–Endometrial Adenocarcinoma	N/A	2	N/A	0	N/A	0	N/A	0
Vagina	B–Granular Cell Tumor	N/A	0	N/A	1	N/A	0	N/A	0

B, benign; M, malignant; N, metastatic. N/A, Not applicable for this group.
[(a)] The study in female rats was terminated one week earlier (Week 103) than scheduled, since the surviving number of females in control group fell to 15 animals on the week.

2.6.7.11 生殖発生毒性試験： 重要な試験以外の試験

Species/ Strain	Method of Administration (Vehicle/ Formulation)	Duration of Dosing	Doses [(a)] (mg/kg)	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	Study Number [Location in CTD]
Rabbit/ Kbl:JW	Gavage (0.5 w/v% MC aqueous solution/ Suspension)	2 Weeks	0, 100, 300, 1000	3F	≥ 100: Decrease in food consumption ≥ 300: Decrease in fecal volume; Suppression of body weight gain 1000: Body weight loss	S-297995-TF-119-L (CRO Study No. 250228A) [4.2.3.5-05]
Rabbit/ Kbl:JW	Gavage (0.5 w/v% MC aqueous solution/ Suspension)	GD 6-18	0, 60, 200, 600	6F (Pregnant)	60 and 200: Body weight loss (−3% and −4% decrease body weight on GD 8, compared with the control group); Suppression of body weight gain; Decrease in food consumption 600: One dam aborted; decrease in fecal volume and food consumption; Body weight loss (−11% decreased body weight on GD 19, compared with the control group)	S-297995-TF-163-L (CRO Study No. 250228P) [4.2.3.5-06]

GD, Gestation day.
[(a)] As naldemedine.

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

2.6.7.12.1 Fertility and Early Embryonic Development to Implantation in Rats

Test Article: Naldemedine Tosylate

Report Title: Oral Study for Effects of S-297995 monotosylate on Fertility and Early Embryonic Development to Implantation in Rats		
Design similar to ICH 4.1.1. ?: Yes	**Duration of Dosing:** M: 4 weeks prior to mating and continuing until the day before necropsy (a total of 70 to 73 days) F: 2 weeks prior to mating, through GD 7	**Study No.** S-297995-TF-104-L (CRO Study No. 100428)
Species/Strain: Rat/Crl:CD(SD)		
Initial Age: M: 9 weeks, F: 10 weeks **Age at Copulation:** M: 13 weeks, F: 12 weeks		**Location in CTD:** 4.2.3.5-01
Day of Mating: Day 0	**Day of Caesarean section:** GD 13	**GLP Compliance :** Yes
Date of First Dose: M: [redacted] 20[redacted] F: [redacted], 20[redacted]	**Method of Administration:** Oral gavage	
Special Features: None	**Vehicle/Formulation:** 0.5 w/v% MC aqueous solution/Suspension	
NOAEL: F0 Males: 1 mg/kg/day for general toxicity and 1000 mg/kg/day for reproductive function F0 Females: 100 mg/kg/day for general toxicity and 1 mg/kg/day for reproductive function F1 litters: 1000 mg/kg/day for early embryo development		

Daily Dose (mg/kg, as naldemedine)		**0 (Control)**	**1**	**10**	**100**	**1000**
Males						
Number of Males Evaluated		**20**	**20**	**20**	**20**	**20**
Noteworthy Findings						
Died or Sacrificed Moribund		0	0	0	0	0
Clinical Observations [(a)]	**Salivation (sporadically, transiently)**	0	0	0	0	20
Necropsy Observations		–	–	–	–	–
Body Weight [(b)]	**Day 8**	339	−2	−4	−6	−9
	Day 29 (Before Mating)	420	−3	−5	−8 **	−12 **
	Day 71	518	−1	−5 *	−11 **	−14 **

GD, Gestation day. Day 1, The initiation day of dosing. –, No noteworthy findings.
[(a)] Numerals represent number of animals with the finding.
[(b)] For controls, group means of body weight (g) are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown. Statistical significance based on actual data (not on the percentage differences).
* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. control (Dunnett's test). † $P < 0.05$, †† $P < 0.01$ vs. control (Steel's test).

(続く)

2.6.7.12.1 Fertility and Early Embryonic Development to Implantation in Rats (続き)

Test Article: Naldemedine Tosylate

Daily Dose (mg/kg, as naldemedine)		0 (Control)	1	10	100	1000
Males (Continued)						
Number of Males Evaluated		**20**	**20**	**20**	**20**	**20**
Noteworthy Findings						
Body Weight Gain (g)	**Day 1-8**	31	24 *	20 **	12 **	4 **
	Day 1-29 (Before Mating)	111	98	93 *	77 **	65 **
	Day 1-71	209	202	183 *	153 **	139 **
Food Consumption [(a)]	**Day 2**	22.5	−1	−16 †	−49 ††	−72 ††
	Day 26 (Before Mating)	24.0	−1	−8	−8	−7
Reproductive Organ Weight [(b)]		–	–	–	–	–
Sperm Analysis [(c)]		–	–	–	–	–
Mean Number of Days Prior to Copulation		2.4	3.8†	3.9	3.1	2.5
Number of Males Copulated (%, Copulation)		20 (100.0)	20 (100.0)	20 (100.0)	20 (100.0)	19 (95.0)
Number of Fertile Males (%, Fertility)		20 (100.0)	20 (100.0)	19 (95.0)	19 (95.0)	18 (94.7)
Additional Mating with Untreated Females [(d)]	**No. of Males Paired with Untreated Females**	0	0	1	1	2
	No. of Males Copulated (%, Copulation)			1 (100.0)	1 (100.0)	2 (100.0)
	No. of Fertile Males (%, Fertility)			0 (0.0)	1 (100.0)	1 (50.0)
Females						
Number of Females Evaluated		**20**	**20**	**20**	**20**	**20**
Noteworthy Findings						
Died or Sacrificed Moribund		0	0	0	0	0

Day 1, The initiation day of dosing. –, No noteworthy findings.
[(a)] For controls, group means of food consumption (g/day) are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown. Statistical significance based on actual data (not on the percentage differences).
[(b)] Testes, epididymides, seminal vesicles, and ventral prostate.
[(c)] Sperm motility, sperm morphology and number of sperms.
[(d)] Performed for the males which failed to copulate or whose female partners failed to conceive.
* $P < 0.05$ vs. control (Dunnett's test).
† $P < 0.05$ vs. control (Steel's test).

(続く)

2.6.7.12.1 Fertility and Early Embryonic Development to Implantation in Rats (続き)

Test Article: Naldemedine Tosylate

Daily Dose (mg/kg, as naldemedine)			0 (Control)	1	10	100	1000
Females (Continued)							
Number of Females Evaluated			**20**	**20**	**20**	**20**	**20**
Noteworthy Findings							
Clinical Observation [a]	**Pre-Mating Periods**	**Salivation (sporadically, transiently)**	0	0	0	0	16
	Pregnancy Periods	**Salivation (sporadically, transiently)**	0	0	0	0	13
Necropsy Observations			–	–	–	–	–
Body Weight [b]		**Pre-mating Day 4**	243	0	0	−3	−4 *
		Pre-mating Day 15	265	0	+1	+1	+2
		GD 7	306	−1	+1	−2	−3
		GD 13	334	−1	+2	+1	−1
Body Weight Gain (g)		**Pre-mating Day 1-4**	8	7	4 †	1 ††	−1 ††
		Pre-mating Day 1-15	31	29	29	32	35
		GD 0-1	8	6	5 **	4 **	5 *
		GD 0-7	37	32	32	32	29 **
		GD 0-13	65	61	65	69	61
Food Consumption [c]		**Pre-mating Day 2**	16.1	−2	−11 *	−42 **	−63 **
		Pre-mating Day 12	19.0	−5	−3	−1	+1
		GD 1	21.0	−11 *	−10	−15 **	−13 **
		GD 7	24.7	−5	−4	−6	−9 *
		GD 13	23.6	0	+6	+15 **	+20 **

Day 1, The initiation day of dosing. GD, Gestation day. –, No noteworthy findings.
[a] Numerals represent number of animals with the finding.
[b] For controls, group means of body weight (g) are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown. Statistical significance is based on actual data (not on the percentage differences).
[c] For controls, group means of food consumption (g/day) are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown. Statistical significance is based on actual data (not on the percentage differences).
* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. control (Dunnett's test).
† $P < 0.05$, †† $P < 0.01$ vs. control (Steel's test).

(続く)

2.6.7.12.1 Fertility and Early Embryonic Development to Implantation in Rats (続き)

Test Article: Naldemedine Tosylate

Daily Dose (mg/kg, as naldemedine)	0 (Control)	1	10	100	1000
Females (Continued)					
Number of Females Evaluated	**20**	**20**	**20**	**20**	**20**
Noteworthy Findings					
Mean Number of Estrus/14 days	3.6	3.3	2.6††	2.2††	1.8††
Number of Females with Irregular Estrous Cycle	0	1	5	12	13
Mean Number of Days Prior to Copulation	2.4	3.8†	3.9	3.1	2.5
Number of Females Sperm-Positive (%, Copulation)	20 (100.0)	20 (100.0)	20 (100.0)	20 (100.0)	19 (95.0)
Number of Pregnant Females (%, Fertility)	20 (100.0)	20 (100.0)	19 (95.0)	19 (95.0)	18 (94.7)
Mean Number of Corpora Lutea	15.6	16.0	15.8	16.3	15.9
Mean Number of Implantations	14.5	14.0	14.6	15.7	15.4
Mean % Pre-implantation Loss	6.8	14.5	7.6	3.5	3.2
Embryos					
Number of Litters Evaluated	**20**	**20**	**19**	**19**	**18**
Noteworthy Findings					
Mean Number of Live Embryos	13.9	12.8	13.7	14.8	14.8
Mean Number of Dead Embryos	0.7	1.2	0.8	0.9	0.6
Mean % Post-implantation Loss	4.4	7.5	5.6	5.8	4.4

† $P < 0.05$, †† $P < 0.01$ vs. control (Steel's test).

2.6.7.13 生殖発生毒性試験： 胚・胎児発生に関する試験

2.6.7.13.1 Embryo-Fetal Development in Rats

Test Article: Naldemedine Tosylate

Report Title: Oral Study for Effects of S-297995 monotosylate on Embryo-Fetal Development in Rats		
Design similar to ICH 4.1.3. ?: Yes	**Duration of Dosing:** GD 7 – 17	**Study No.** S-297995-TF-146-L (CRO Study No. 200129)
Species/Strain: Rat/Crl:CD(SD)		**Location in CTD:** 4.2.3.5-02
Initial Age at Copulation: 12 weeks		
Day of Mating: GD 0	Day of Caesarean section: **GD 20**	**GLP Compliance:** Yes
Date of First Dose: [redacted] 20[redacted]	**Method of Administration:** Oral gavage	
Special Features: None	**Vehicle/Formulation:** 0.5 w/v% MC aqueous solution/Suspension	
NOAEL: F0 dams: Less than 10 mg/kg/day for general toxicity and 1000 mg/kg/day for reproductive function F1 litter: 1000 mg/kg/day for embryo-fetal development		

Daily Dose (mg/kg, as naldemedine)			**0 (Control)**	**10**	**100**	**1000**
Dams						
Toxicokinetics [a]						
Number of Pregnant Animals Evaluated			**3**	**3**	**3**	**3**
Naldemedine	**C_{max} (µg/mL)**	**GD 7**	**N.C.**	1.23	9.58	15.6
		GD 17	**N.C.**	1.39	9.84	29.3
	$AUC_{0\text{-}24hr}$ (µg·hr/mL)	**GD 7**	**N.C.**	5.66	58.4	163
		GD 17	**N.C.**	8.78	126	391
Noteworthy Findings						
Number of Pregnant Animals Evaluated			**19**	**20**	**20**	**20**
Number Died or Sacrificed Moribund			0	0	0	0
Number Aborted or with Total Resorption Loss			0	0	0	0
Clinical Observations [b]	**Salivation**		0	0	0	9
Necropsy Observations			–	–	–	–

GD, Gestation day. N.C., Not calculated because of BLQ (< 0.02 µg/mL).
–, No noteworthy findings.
[a] Group means are shown.
[b] Numerals represent number of animals with the finding.

(続く)

2.6.7.13.1 Embryo-Fetal Development in Rats (続き)

Test Article: Naldemedine Tosylate

Daily Dose (mg/kg, as naldemedine)		0 (Control)	10	100	1000
Dams (Continued)					
Noteworthy Findings					
Number of Pregnant Animals Evaluated		**19**	**20**	**20**	**20**
Body Weight [(a)]	**GD 8**	311	−2	−7 **	−7 **
	GD 18	386	−4 *	−6 **	−7 **
Body Weight Gain (g)	**GD 7-8**	2	−5 ††	−16 ††	−18 ††
	GD 7-18	76	61 **	57 **	51 **
Food Consumption [(b)]	**GD 8**	24.7	−23 **	−50 **	−66 **
	GD 18	29.5	−18 **	−14 **	−12 **
Mean Number of Corpora Lutea		15.1	14.7	15.2	15.3
Mean Number of Implantations		14.0	13.6	14.6	14.8
Mean % of Pre-implantation Loss		7.3	8.1	3.7	3.2
F1 Litters					
Noteworthy Findings					
Number of Litters Evaluated		**19**	**20**	**20**	**20**
Mean Number of Live Fetuses		13.2	13.2	14.0	14.1
Mean Number of Post-implantation Losses [(c)]		0.8	0.5	0.6	0.7
Mean % of Post-implantation Loss		6.0	3.5	4.0	5.0
Total Number of Live Fetuses		250	263	279	282
Fetal Sex Ratio (Male/Male + Female)		0.52	0.53	0.54	0.52
Mean Fetal Body Weight (g)	**Male**	3.85	3.88	3.82	3.95
	Female	3.66	3.63	3.61	3.74

GD, Gestation day. –, No noteworthy findings.
[(a)] For controls, group means of body weight (g) are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown. Statistical significance is based on actual data (not on the percentage differences).
[(b)] For controls, group means of food consumption (g/day) are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown. Statistical significance is based on actual data (not on the percentage differences).
[(c)] Total of implantation scars, early resorption, late resorption, macerated fetuses, and dead fetuses.
* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. control (Dunnett's test).
†† $P < 0.01$ vs. control (Steel's test).

(続く)

2.6.7.13.1 Embryo-Fetal Development in Rats (続き)

Test Article: Naldemedine Tosylate

Daily Dose (mg/kg, as naldemedine)		0 (Control)	10	100	1000
F1 Litters (Continued)					
Noteworthy Findings (Continued)					
Number of Litters Evaluated		19	20	20	20
Mean Placental Weight (g)	Male	0.49	0.49	0.49	0.49
	Female	0.49	0.47	0.47	0.47
Placental Abnormalities		–	–	–	–
External Abnormalities	NF/ND	250/19	263/20	279/20	282/20
	Number of Fetuses	0	0	0	0
	Number of Litters	0	0	0	0
Visceral Abnormalities	NF/ND	120/19	128/20	134/20	136/20
	Number of Fetuses (%)	2 (1.8)	1 (0.7)	3 (2.7)	3 (2.4)
	Number of Litters (%)	2 (10.5)	1 (5.0)	2 (10.0)	2 (10.0)
Visceral Variations	NF/ND	120/19	128/20	134/20	136/20
	Number of Fetuses (%)	2 (1.6)	2 (1.4)	0	0
	Number of Litters (%)	2 (10.5)	1 (5.0)	0	0
Skeletal Abnormalities	NF/ND	130/19	135/20	145/20	146/20
	Number of Fetuses (%)	0	0	0	0
	Number of Litters (%)	0	0	0	0
Skeletal Variations	NF/ND	130/19	135/20	145/20	146/20
	Number of Fetuses (%)	21 (18.7)	16 (11.0)	17 (11.8)	11 (7.4)
	Number of Litters (%)	8 (42.1)	11 (55.0)	10 (50.5)	6 (30.0)
Degree of Ossification		–	–	–	–

NF/ND, Number of fetuses examined/number of dams examined. –, No noteworthy findings.

2.6.7.13.2 Embryo-Fetal Development in Rabbits

Test Article: Naldemedine Tosylate

Report Title: Oral Study for Effects of S-297995 monotosylate on Embryo-Fetal Development in Rabbits		
Design similar to ICH 4.1.3.?: Yes	**Duration of Dosing:** GD 6 – 18	**Study No.** S-297995-TF-182-L (CRO Study No. 250228)
Day of Mating: GD 0		**Location in CTD:** 4.2.3.5-03
Species/Strain: Rabbits/Kbl: JW	**Day of Caesarean section:** GD 28	**GLP Compliance:** Yes
Initial Age at Copulation: 16 or 17 weeks	**Method of Administration:** Oral gavage	
Date of First Dose: [redacted] 20[redacted]	**Vehicle/Formulation:** 0.5 w/v% MC aqueous solution/Suspension	
Special Features: None		
NOAEL: F0 dam: Less than 25 mg/kg/day for general toxicity, 100 mg/kg/day for reproductive function F1 litter: 100 mg/kg/day for embryo-fetal development		

Daily Dose (mg/kg, as naldemedine)			**0 (Control)**	**25**	**100**	**400**
Dams						
Toxicokinetics [(a)]						
Number of Pregnant Animals Evaluated			**3**	**3**	**3**	**3**
Naldemedine	**C_{max} (µg/mL)**	**GD 6**	**N.C.**	0.173	2.37	6.45
		GD 18	**N.C.**	0.351	3.46	8.65
	$AUC_{0\text{-}24hr}$ (µg·hr/mL)	**GD 6**	**N.C.**	0.205	2.80	11.4
		GD 18	**N.C.**	0.366	3.82	14.3
Nor-naldemedine	**C_{max} (µg/mL)**	**GD 6**	**N.C.**	0.0398	0.179	0.543
		GD 18	**N.C.**	0.0609	0.212	0.557
	$AUC_{0\text{-}24hr}$ (µg·hr/mL)	**GD 6**	**N.C.**	0.0331	0.323	1.20
		GD 18	**N.C.**	0.0633	0.358	1.22
Naldemedine 3-G	**C_{max} (µg/mL)**	**GD 6**	**N.C.**	5.34	26.8	64.7
		GD 18	**N.C.**	7.52	32.4	51.1
	$AUC_{0\text{-}24hr}$ (µg·hr/mL)	**GD 6**	**N.C.**	8.64	53.5	155
		GD 18	**N.C.**	12.3	57.2	144

GD, Gestation day. N.C., Not calculated because of BLQ (< 0.02 µg/mL for naldemedine, nor-naldemedine, and naldemedine 3-G).
[(a)] Group means are shown.

(続く)

2.6.7.13.2 Embryo-Fetal Development in Rabbits (続き)

Test Article: Naldemedine Tosylate

Daily Dose (mg/kg, as naldemedine)			0 (Control)	25	100	400
Dams (Continued)						
Toxicokinetics [a] (Continued)						
Number of Pregnant Animals Evaluated			**3**	**3**	**3**	**3**
Naldemedine 6-G	**C_{max} (μg/mL)**	**GD 6**	**N.C.**	0.0122	0.105	0.519
		GD 18	**N.C.**	0.0191	0.136	0.278
	AUC_{0-24hr} (μg·hr/mL)	**GD 6**	**N.C.**	0.0173	0.203	1.02
		GD 18	**N.C.**	0.0270	0.218	0.588
Noteworthy Findings						
Number of Pregnant Animals Evaluated			**19**	**20**	**20**	**19**
Number Died or Sacrificed Moribund			0	0	0	0
Number Aborted or with Total Litter Loss			0	0	0	2 [d]
Number Delivered Prematurely			0	0	0	1 [e]
Clinical Observations (Number of animals)	**Decreased fecal volume**		0	0	0	6
Necropsy Observations			–	–	–	–
Body Weight [b]	**GD 7**		3.47	−1	−3 *	−6 **
	GD 19		3.67	−2	−4	−9 **
Body Weight gain (kg)	**GD 6 – 7**		0.01	−0.04 **	−0.08 **	−0.15 **
	GD 6 – 19		0.21	0.12 †	0.10 ††	−0.07 ††
Food Consumption [c]	**GD 7**		195	−16 ††	−41 ††	−61 ††
	GD 19		186	−8	−10	−39 ††

GD, Gestation day. N.C., Not calculated because of BLQ (< 0.002 μg/mL). –, No noteworthy findings.
[a] Group means are shown.
[b] For the controls, group means of body weight (g) are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown. Statistical significance is based on actual data (not on the percentage differences).
[c] For the controls, group means of food consumption (g/day) are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown. Statistical significance is based on actual data (not on the percentage differences).
[d] Aborted on GD 21 and GD 22.
[e] Delivered prematurely on GD 27.
* P < 0.05, ** P < 0.01 vs. control (Dunnett's test).
† P < 0.05, †† P < 0.01 vs. control (Steel's test).

(続く)

2.6.7.13.2 Embryo-Fetal Development in Rabbits (続き)

Test Article: Naldemedine Tosylate

Daily Dose (mg/kg, as naldemedine)		0 (Control)	25	100	400
Dams (Continued)					
Noteworthy Findings (Continued)					
Number of Pregnant Animals Evaluated		**19**	**20**	**20**	**16**
Mean Number of Corpora Lutea		8.9	9.5	9.2	9.1
Mean Number of Implantations		8.0	8.8	8.5	8.3
Mean % of Pre-implantation Loss		12.6	8.9	9.6	9.9
F1 Litters					
Noteworthy Findings					
Number of Litters Evaluated		**19**	**20**	**20**	**16**
Mean Number of Live Fetuses		7.5	8.0	7.7	8.0
Mean Number of Post-implantation Losses [(a)]		0.5	0.8	0.9	0.3
Mean % of Post-implantation Loss		9.6	9.4	8.9	3.2
Total Number of Fetuses		143	159	153	128
Fetal Sex Ratio (Male/Male + Female)		0.47	0.52	0.51	0.52
Mean Fetal Body Weight (g)	**Male**	40.0 g	39.4 g	39.7 g	36.9 g
	Female	40.2 g	39.5 g	39.1 g	36.1 g *
Mean Placental Weight (g)	**Male**	5.92 g	5.87 g	5.92 g	5.44 g
	Female	6.19 g	5.72 g	5.58 g	5.38 g
Placental Abnormalities		–	–	–	–
External Abnormalities	**NF/ND**	143/19	159/20	153/20	128/16
	Number of Fetuses (%)	0 (0.0)	1 (1.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
	Number of Litters (%)	0 (0.0)	1 (5.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
Visceral Abnormalities	**NF/ND**	143/19	159/20	153/20	128/16
	Number of Fetuses (%)	1 (0.7)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.6)
	Number of Litters (%)	1 (5.3)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (6.3)

NF/ND, Number of fetuses examined/number of dams examined. –, No noteworthy findings.
[(a)] Total of implantation scars, early resorption, late resorption, macerated fetuses, and dead fetuses.
* $P < 0.05$ vs. control (Dunnett's test).

(続く)

2.6.7.13.2 Embryo-Fetal Development in Rabbits (続き)

Test Article: Naldemedine Tosylate

Daily Dose (mg/kg, as naldemedine)		**0 (Control)**	**25**	**100**	**400**
F1 Litters (Continued)					
Noteworthy Findings (Continued)					
Number of Litters Evaluated		**19**	**20**	**20**	**16**
Visceral Variations	**NF/ND**	143/19	159/20	153/20	128/16
	Number of Fetuses (%)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
	Number of Litters (%)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
Skeletal Abnormalities	**NF/ND**	143/19	159/20	153/20	128/16
	Number of Fetuses (%)	1 (0.9)	1 (1.0)	1 (0.6)	0 (0.0)
	Number of Litters (%)	1 (5.3)	1 (5.0)	1 (5.0)	0 (0.0)
Skeletal Variations	**NF/ND**	143/19	159/20	153/20	128/16
	Number of Fetuses (%)	44 (29.2)	60 (39.2)	48 (32.4)	49 (40.6)
	Number of Litters (%)	13 (68.4)	20 (100.0)	18 (90.0)	16 (100.0)
Degree of Ossification		–	–	–	–

NF/ND, Number of fetuses examined/number of dams examined. –, No noteworthy findings.

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

2.6.7.14.1 Prenatal and Postnatal Development, Including Maternal Function in Rats

Test Article: Naldemedine Tosylate

Report Title: Oral Study for Effects of S-297995 monotosylate on Pre- and Postnatal Development, Including Maternal Function, in Rats		
Design similar to ICH 4.1.2.: Yes	**Duration of Dosing:** GD 7 – LD 20 **Day of Mating: GD 0**	**Study No.** S-297995-TF-275-L (CRO Study No. [redacted]12011)
Species/Strain: Rat/Crl:CD(SD)	**Method of Administration:** Oral gavage	**Location in CTD:** 4.2.3.5-04
Initial Age: 10-12 weeks	**Vehicle/Formulation:** 0.5 w/v% MC aqueous solution/Suspension	
Date of First Dose: [redacted] 20[redacted]	**Litters Culled/Not Culled:** Culled to 4/sex/litter	**GLP Compliance:** Yes
Special Features: None		
NOAEL: F0 dam: 1 mg/kg/day for general toxicity and 1 mg/kg/day for reproductive function F1 litters: 1 mg/kg/day for pre- and post-natal development		

Daily Dose (mg/kg, as naldemedine)		**0 (Control)**	**1**	**30**	**1000**
F0 Females					
Noteworthy Findings					
Number of Pregnant Animals Evaluated		**22**	**22**	**22**	**22**
Number Died or Sacrificed Moribund		0	0	0	1 [(c)]
Number of Dams with No Delivery		1 [(a)]	0	0	0
Number of Total Litter Loss		0	0	5 [(b)]	3 [(b)]
Clinical Observations (Number)	**Scattering of All Offspring in the Cage**	0	0	4	4

GD, Gestation day. LD, Lactation day.
[(a)] One dam did not deliver by GD 25. Gross pathology revealed 1 dead fetus in the uterus.
[(b)] Total litter loss at 30 and 1000 mg/kg/day was noted on LDs 0 to 4. Gross pathology revealed small spleen and small thymus in 4 and 2 dams in the 30 and 1000 mg/kg/day group, respectively.
[(c)] Died on GD 22. No clinical abnormality signs were observed for approximately 1.5 hour after dosing. When this dam was found dead approximately 4 hours after dosing on GD 22, 10 newborns (6 live and 4 dead newborns) were observed. Gross pathology revealed 8 dead fetuses in the uterus, dark reddish discoloration of all lobes of the lungs, retention of foamy fluid the trachea and bronchi, and a small thymus. Based on the results, this dam was considered to have died during delivery.

(続く)

2.6.7.14.1 Prenatal and Postnatal Development, Including Maternal Function in Rats (続き)

Test Article: Naldemedine Tosylate

Daily Dose (mg/kg, as naldemedine)		0 (Control)	1	30	1000
F0 Females (Continued)					
Noteworthy Findings (Continued)					
Number of Pregnant Animals Evaluated		22	22	22	22
Necropsy Observations (Number)	LD 21	–	–	–	–
Gestation Body Weight [a]	GD 20	413	−1	−6 *	−7 **
Lactation Body Weight [a]	LD 21	324	0	+1	+1
Body Weight Gain (g)	GD 7-20	115	111	93 **	85 **
	LD 0-21	22	26	41 *	41 *
Gestation Food Consumption [b]	GD 20	25.6	−6	−15 **	−14 **
Lactation Food Consumption [b]	LD 21	70.9	−3	+1	−1
Mean Duration of Gestation (days)		21.9	22.0	22.0	21.8
Number of Delivery (%, Gestation Index) [c]		21 (95.5)	22 (100.0)	21 (95.5)	20 (90.9)
Abnormal Parturition		–	–	–	–
Birth Index (%) [d]		92.7	95.5	84.7	86.9

GD, Gestation day. LD, Lactation day. –, No noteworthy findings.
[a] For the controls, group means of body weight (g) are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown. Statistical significance is based on actual data (not on the percentage differences).
[b] For the controls, group means of food consumption (g/day) are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown. Statistical significance is based on actual data (not on the percentage differences).
[c] Gestation index (%): (Number of dams with live newborns/number of pregnant dams) × 100.
[d] Birth index (%): (Number of live newborns/number of implantation sites) × 100.
* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. control (Dunnett's test).

(続く)

2.6.7.14.1 Prenatal and Postnatal Development, Including Maternal Function in Rats (続き)

Test Article: Naldemedine Tosylate

Daily Dose (mg/kg, as naldemedine)		0 (Control)	1	30	1000
F1 Litters (Pre-weaning)					
Noteworthy Findings					
Number of Litters Evaluated		21	22	21	20
Mean Number of Pups/Litter		15.0	14.9	14.4	14.6
Mean Number of Live Born Pups/Litter		14.5	14.7	12.9	13.4
Mean Pup Sex Ratios (% Males)		46.2	51.7	52.5	49.9
External Malformations (Number Pup)		0	0	0	0
Number of Dead Newborns		10	4	32	25
Mean % Postnatal Survival to BD 4		99.0	95.7	77.8 *	84.4
Mean % Postnatal Survival to Weaning		100.0	100.0	100.0	100.0
Mean Pup Body Weights (g)	BD 0 Male	6.35	6.49	6.24	6.03 *
	BD 0 Female	6.05	6.14	5.93	5.70 *
	BD 21 Male	61.7	62.5	61.3	58.0 *
	BD 21 Female	60.1	59.9	59.0	56.3 *
Pup Clinical Signs (Number Litters)		3	6	11	8
	Subnormal Body Surface Temperature	0	0	4	2
	No Milk in the Stomach	0	0	4	3
	A Small Amount of Milk in the Stomach	0	0	1	1
	Death of Some Offspring	3	6	6	5
	Death of All Offspring	0	0	5	3
Physical Development [(a)]		–	–	–	–
	Pinna Unfolding (Mean %) BD 3 Male	90.0	90.4	93.1	78.4
	Pinna Unfolding (Mean %) BD 3 Female	93.4	92.6	88.3	73.9 *
Early Behavior [(b)]		–	–	–	–
Pup Necropsy Observations		–	–	–	–

BD, Birth day. –, No noteworthy findings.
[(a)] Pinna unfolding on BDs 2 to 4, growth of abdominal hair and eruption of upper incisor on BDs 11 and 14, and eyelid opening on BDs 14 and18. No adverse effects on growth of abdominal hair, eruption of upper incisor and eyelid opening were noted. The incidence of pinna unfolding was 100% in all groups at BD 4.
[(b)] Back righting and negative geotaxis on BDs 11 and 14.
* $P < 0.05$ vs. control (Dunnett's test).

(続く)

2.6.7.14.1 Prenatal and Postnatal Development, Including Maternal Function in Rats (続き)

Test Article: Naldemedine Tosylate

Daily Dose (mg/kg, as naldemedine)		0 (Control)	1	30	1000
F1 Males (Post-weaning)					
Noteworthy Findings					
Number of Males Evaluated Post-weaning (R, B)		42 (21, 21)	44 (22, 22)	34 (17, 17)	36 (18, 18)
Number Died or Sacrificed Moribund		1 [d]	0	0	0
Clinical Observations		–	–	–	–
Necropsy Observations		–	–	–	–
Body Weights [a]	**BD 28**	100	−1	+1	−1
	BD 70	430	−1	−2	+2
Sensory Function [b]	**4 Weeks of Age**	–	–	–	–
Open Field Test	**5 Weeks of Age**	–	–	–	–
Conditioned Avoidance Response	**6-7 Weeks of Age**	–	–	–	–
Preputial Separation		–	–	–	–
Mean Number of Days Prior to Mating		3.3	2.9	3.9	3.3
Number of Males Copulated (%, Copulation) [c]		21 (100.0)	22 (100.0)	17 (100.0)	18 (100.0)
Number of Fertile Males (%, Fertility) [c]		21 (100.0)	22 (100.0)	16 (94.1)	17 (94.4)
F1 Females (Post-weaning)					
Noteworthy Findings					
Number of Females Evaluated Post-weaning (R, B)		42 (21, 21)	44 (22, 22)	34 (17, 17)	36 (18, 18)
Number Died or Sacrificed Moribund		0	0	0	0
Clinical Observations		–	–	–	–
Necropsy Observations		–	–	–	–
Body Weights (g) [a]	**BD 28**	93	−1	−1	−2
	BD 70	259	0	0	+2

R, For reproductive function observations. B, For behavioral evaluations. BD, Birth day. –, No noteworthy findings.
[a] For the controls, group means of body weight (g) are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown.
[b] Visual placing response, pupillary reflex, Preyer's reflex and pain response.
[c] Results during the 1st (14 days) and 2nd (7 days) mating periods.
[d] Died on BD 71.

(続く)

2.6.7.14.1 Prenatal and Postnatal Development, Including Maternal Function in Rats (続き)

Test Article: Naldemedine Tosylate

Daily Dose (mg/kg, as naldemedine)		0 (Control)	1	30	1000
F1 Females (Post-weaning) (Continued)					
Noteworthy Findings (Continued)					
Number of Females Evaluated Post-weaning (R, B)		**42 (21, 21)**	**44 (22, 22)**	**34 (17, 17)**	**36 (18, 18)**
Necropsy Observations		–	–	–	–
Body Weights [a]	**BD 28**	93	−1	−1	−2
	BD 70	259	0	0	+2
Gestation Body Weights (g)	**GD 13**	369	−2	−1	−1
Sensory Function [b]	**4 Weeks of Age**	–	–	–	–
Open Field Test	**5 Weeks of Age**	–	–	–	–
Conditioned Avoidance Response	**6-7 Weeks of Age**	–	–	–	–
Opening of Vagina		–	–	–	–
Mean Days of Estrous Cycle		4.5	4.4	4.3	4.2
Number of Females Sperm-Positive (%, Copulation) [c]		21 (100.0)	22 (100.0)	17 (100.0)	18 (100.0)
Number of Pregnant Females (%, Fertility) [c]		21 (100.0)	22 (100.0)	16 (94.1)	17 (94.4)
Mean Number of Corpora Lutea		16.2	16.0	16.4	15.6
Mean Number of Implantations		14.6	15.5	14.9	13.9
Mean % of Pre-Implantation Loss		9.1	2.9	8.3	11.1
F2 Litters					
Noteworthy Findings					
Number of Litters Evaluated		**21**	**22**	**16**	**17**
Mean Number of Live Conceptuses/Litter		13.7	14.6	14.6	13.4
Number of Dead Conceptuses [d]		19	18	6	9
Mean % Post-Implantation Loss		6.5	5.3	2.8	3.5

R, For reproductive function observations. B, For behavioral evaluations. BD, Birth day. –, No noteworthy findings.
[a] For the controls, group means of body weight (g) are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown.
[b] Visual placing response, pupillary reflex, Preyer's reflex, and pain response.
[c] Results during the 1st (14 days) and 2nd (7 days) mating periods.
[d] Total of early deaths after implantation, unformed embryos and formed embryos with placenta.

2.6.7.15 新生児を用いた試験

該当する試験なし.

2.6.7.16 局所刺激性試験

Test Article: Naldemedine Tosylate

Species/ Strain	Method of Administration (Vehicle/ Formulation)	Doses [(a)] (mg/kg)	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	Study Number [Location in CTD]
Rabbit/ Kbl:JW	Percutaneous (None)	0.5 g/site	3M	Primary irritation index: 0.00 Evaluation: No irritating	R-297995-TF-085-N (CRO Study No. 702028) [4.2.3.6-01]
Rabbit/ Kbl:JW	Application to the eyes (None)	0.1 g/left eye	3M (Eye-washed at 20 to 30 seconds after application) 3M (Non-eye-washed)	Index of acute ocular irritation: 4.00 (Eye-washed group), 13.33 (Non-eye-washed group) Ocular irritation disappeared: By 24 hours after application (Eye-washed group), By 48 hours after application (Non-eye-washed group) Evaluation: Slightly irritating [(b)]	R-297995-TF-084-N (CRO Study No. 702128) [4.2.3.6-02]

[(a)] As naldemedine.

[(a)] The value of index of acute ocular irritation was graded into 6 categories according to Association Française de Normalisation's evaluation criteria as follows: 0 to 5 = no irritating, 5 to 15 = slightly irritating, 15 to 30 = moderately irritating, 30 to 60 = very irritating, 60 to 80 = severely irritating, and 80 to 100 = extremely irritating.

2.6.7.17 その他の毒性試験

2.6.7.17.1 Immunotoxicity Study in Rats

Test Article: Naldemedine Tosylate

Report Title: Immunotoxicity Study of S-297995 monotosylate in Rats: Determination of Specific Antibody Formation against T-cell Dependent Antigen		
Species/Strain: Rat/Crl:CD(SD)	**Duration of Dosing:** 1 month	**Study No.** S-297995-TB-234-L
Initial Age: 6 weeks	**Method of Administration:** Oral gavage	**Location in CTD:** 4.2.3.7-01
Date of First Dose: [redacted] 20[redacted]	**Vehicle/Formulation:** 0.5 w/v% MC aqueous solution/Suspension	**GLP Compliance:** Yes

Daily Dose (mg/kg, as naldemedine)		**0 (Control)**		**30**		**100**		**1000**	
Gender and No. per Group		**M: 10**	**F: 10**	**M: 10**	**F: 10**	**M: 10**	**F: 10**	**M: 10**	**F: 10**
Died or Sacrificed Moribund		0	0	0	0	0	0	0	0
Body Weight (Mean Value) [(a)]	**Day 4**	228.2	168.6	217.1**	160.0*	214.3**	158.9*	205.1**	157.7**
	Day 7	253.2	177.3	242.3*	170.9	241.2*	171.2	232.6**	169.5
	Day 10	277.3	188.0	267.6	180.2	265.3	183.2	258.4**	181.3
	Day 19	343.3	214.5	330.1	205.4	328.2	208.6	325.9	205.1
	Day 28	389.1	230.6	377.5	226.8	373.1	229.7	371.2	222.4
Clinical Observation (Salivation)		–	–	–	–	–	–	+	+
T-cell Dependent Antibody Response Antibody Titer (Mean Value)		885.27	737.09	1664.71	1234.49	1790.56	2240.99	1377.79	1232.59

[(a)] Statistical significance is based on actual data.
* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. control (Dunnett's parametric multiple T-test).

2.6.7.17.2 Preliminary Study for Effects on Estrous Cycle and Plasma Reproductive Hormone Concentration in Female Rats

Test Article: Naldemedine Tosylate

Species/ Strain	Method of Administration (Vehicle/ Formulation)	Duration of Dosing	Doses [(a)] (mg/kg/day)	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	Study Number [Location in CTD]
Rat/ Crl:CD(SD)	Gavage (0.5 w/v% MC aqueous solution/ Suspension)	16 Days	0, 1000	10F	1000: Decrease in body weight, irregular estrous cycle, Increase in plasma prolactin levels, Tendency to increase in plasma progesterone levels Plasma hormone concentrations are listed below.	R-297995-TF-105-R (CRO Study No. [redacted]080796) [4.2.3.7-07]

Plasma Hormone Concentrations [(a)]		Prolactin (ng/mL)		Estradiol (pg/mL)		Progesterone (ng/mL)		Luteinizing hormone (ng/mL)		Follicular stimulating hormone (ng/mL)	
Daily Dose (mg/kg, as naldemedine)		0	1000	0	1000	0	1000	0	1000	0	1000
Day 1 (Metestrus)	Number Examined	10	9	10	9	10	9	0	0	0	0
	1 hour post-dose	10.53	BLQ	11.7	BLQ	14.58	19.95 **				
	2 hours post-dose	4.40	2.14	BLQ	BLQ	13.83	18.01 *				
	4 hours post-dose	3.17	94.29 *	BLQ	BLQ	16.03	16.82				
Day2 (Diestrus)	Number Examined	10	8	10	8	10	8	0	0	0	0
	10:00 to 10:18 am	4.26	BLQ	13.3	BLQ	8.41	17.93 *				
Day 3 (Proestrus)	Number Examined	10	9	10	9	10	9	10	9	10	9
	1 hour post-dose	150.01	239.11	28.7	39.7	6.28	12.80	5.51	2.58	4.06	3.27
	2 hours post-dose	143.26	133.93	26.8	40.6	11.41	17.98	9.56	2.01	5.09	3.50
	4 hours post-dose	169.63	98.90	29.3	29.6	21.32	18.07	16.90	6.27	6.55	4.92
Day 9 (Metestrus)	Number Examined	10	5	10	5	10	5	10	5	10	5
	1 hour post-dose	15.90	8.99	11.2	BLQ	13.36	15.08	1.14	1.47	3.34	4.00
	2 hours post-dose	7.26	14.15	10.2	BLQ	15.93	16.39	0.89	1.47	2.96	4.80 **
	4 hours post-dose	8.49	15.11	BLQ	BLQ	15.73	18.79	BLQ	0.90	2.70	6.23 **

Administration was started on the day expected to show the metestrus phase in each female.
BLQ; < 0.78 ng/mL for prolactin, < 10 pg/mL for estradiol, 0.8 ng/mL for luteinizing hormone.
[(a)] Group means are shown.
* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. control (Student's t-test or Aspin-Welch t-test).

2.6.7.17.3 Study for Effects on Plasma Prolactin Concentration in Rats

Test Article: Naldemedine Tosylate

Species/ Strain	**Method of Administration (Vehicle/ Formulation)**	**Duration of Dosing**	**Doses [(a)] (mg/kg)**	**Gender and No. per Group**	**Noteworthy Findings**	**Study Number [Location in CTD]**
Rat/ Crl:CD(SD)	Gavage (0.5 w/v% MC aqueous solution/ Suspension)	Single	0, 1, 10, 100, 1000	10M 10F	≥ 10: Increase in plasma prolactin levels in female rats Plasma prolactin concentration data are listed below.	S-297995-TF-162-N (CRO Study No. [redacted]090377) [4.2.3.7-06]

Plasma Prolactin Concentrations [(a)]		Prolactin (ng/mL)				
Dose (mg/kg, as naldemedine)		0	1	10	100	1000
Male	1 hour post-dose	0.84	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ *
	2 hours post-dose	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
	4 hours post-dose	1.23	BLQ *	BLQ	BLQ	0.85
	8 hour post-dose	7.77	1.47 **	2.39	3.74	1.37 **
	24 hours post-dose	2.25	0.80	1.22	3.87	1.41
Female (Metestrus)	1 hour post-dose	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
	2 hours post-dose	1.54	0.83	BLQ	BLQ	BLQ
	4 hours post-dose	2.82	1.28	1.01	0.91 *	2.22
	8 hour post-dose	2.92	5.63	67.85 **	58.98 *	66.13 *
	24 hours post-dose	1.78	1.98	1.43	0.84	2.74

Administration was conducted on the day expected to show the metestrus phase in each female.
BLQ, < 0.78 ng/mL.
[(a)] Group means are shown.
* P < 0.05, ** P < 0.01 vs. control (Student's t-test or Aspin-Welch t-test).

2.6.7.17.4 Reverse Mutation Test of *Impurity A with Bacteria

Test Article: *Impurity A

Report Title: Bacterial Reverse Mutation Test of *Impurity A, an Impurity of S-297995		
Test for Induction of: Reverse mutation in bacterial cells	**No. of Independent Assays:** 1	**Study No.** S-297995-TB-305-L
Strains: *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*	**No. of Replicate Cultures:** 3	**Location in CTD:** 4.2.3.7-02
Metabolizing System: Phenobarbital and 5,6-benzoflavone induced rat liver S9, 10% in S9 mix	**No. of Cells Analyzed/Cultured:** −	**GLP Compliance:** Yes
Vehicles: **Test Article:** DMSO **Positive Controls:** DMSO		**Date of Treatment:** [redacted] 20[redacted]
Treatment: Plate incorporation method and plate incubation for 48 hours (37°C)		
Cytotoxic Effects: Cytotoxicity (the growth inhibition of bacteria) by the test substance was observed at dose of 556 µg/plate without the S9 mix in TA98, at doses of 556 and 1670 µg/plate without the S9 mix and 1670 µg/plate with the S9 mix in TA1537, and at doses of 1670 and 5000 µg/plate without the S9 mix and 5000 µg/plate with the S9 mix in WP2uvrA. No cytotoxicity was observed with and without the S9 mix in TA100 and TA1535 and with the S9 mix in TA98.		
Genotoxic Effects: None		

Metabolic Activation	Test Article	Dose Level (µg/plate)	Revertant Colony Counts (Mean of 3 plates)				
			TA100	TA1535	WP2*uvrA*	TA98	TA1537
Without Activation	**DMSO**	100 µL/plate	105	9	32	18	11
	***Impurity A**	20.6	126	12	32	23	11
		61.7	124	11	28	22	15
		185	121	13	31	18	12
		556 [(a)]	96	7	31	0 [(b,c)]	0 [(b,c)]
		1670 [(a)]	86	4	17 [(b)]	17	0 [(b)]
		5000 [(a)]	N.D.	N.D.	N.D. [(b)]	N.D.	N.D.
	AF-2	0.01	466	N.T.	119	N.T.	N.T.
		0.1	N.T.	N.T.	N.T.	481	N.T.
	NaN_3	0.5	N.T.	292	N.T.	N.T.	N.T.
	9AA	80	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	833

N.D., No data obtained because heavy precipitates obscured counting colonies. N.T., Not tested.
[(a)] Precipitation derived from the test substance.
[(b)] Reduction of the bacterial background lawn.
[(c)] Reduction in the numbers of revertant colonies.

(続く)

2.6.7.17.4 Reverse Mutation Test of *Impurity A with Bacteria (続き)

Test Article: *Impurity A

Metabolic Activation	Test Article	Dose Level (µg/plate)	Revertant Colony Counts (Mean of 3 plates)				
			TA100	TA1535	WP2*uvrA*	TA98	TA1537
With Activation	DMSO	100 µL/plate	100	7	43	16	22
	*Impurity A	20.6	108	14	36	28	23
		61.7	118	7	37	18	25
		185	125	9	44	28	18
		556 [(a)]	126	8	30	21	15
		1670 [(a)]	104	6	22	13	0 [(c)]
		5000 [(a)]	N.D.	N.D.	N.D. [(b)]	N.D.	N.D.
	2AA	0.5	N.T.	N.T.	N.T.	306	N.T.
		1	1002	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.
		2	N.T.	323	N.T.	N.T.	197
		10	N.T.	N.T.	821	N.T.	N.T.

N.D., No data obtained because heavy precipitates obscured counting colonies. N.T., Not tested.
[(a)] Precipitation derived from the test substance.
[(b)] Reduction of the bacterial background lawn.
[(c)] Reduction in the numbers of revertant colonies.

2.6.7.17.5 Reverse Mutation Test of *Impurity B with Bacteria

Test Article: *Impurity B

Report Title: Bacterial Reverse Mutation Test of *Impurity B, an Impurity of S-297995		
Test for Induction of: Reverse mutation in bacterial cells	**No. of Independent Assays:** 1	**Study No.** S-297995-TB-319-L
Strains: *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*	**No. of Replicate Cultures:** 3 (Negative control and test substance), 2 (Positive controls)	**Location in CTD:** 4.2.3.7-03
Metabolizing System: Phenobarbital and 5,6-benzoflavone induced rat liver S9, 10% in S9 mix	**No. of Cells Analyzed/Cultured:** −	**GLP Compliance:** Yes
Vehicles: **Test Article:** DMSO **Positive Controls:** DMSO		**Date of Treatment:** [redacted] 20[redacted]
Treatment: Plate incorporation method and plate incubation for 48 hours (37°C)		
Cytotoxic Effects: No cytotoxicity (reduction of the bacterial background lawn) was observed without or with the S9 mix in all tester strains.		
Genotoxic Effects: None		

Metabolic Activation	Test Article	Dose Level (µg/plate)	Revertant Colony Counts (Mean value of 2 or 3 plates)				
			TA100	TA1535	WP2*uvrA*	TA98	TA1537
Without Activation	**DMSO (3 plates)**	100 µL/plate	120	13	32	14	13
	***Impurity B (3 plates)**	20.6	125	16	35	19	9
		61.7 [(a)]	118	10	38	19	8
		185 [(b)]	115	7	36	14	6
		556 [(b)]	106	8	39	12	10
		1670 [(b)]	105	11	20	13	6
		5000 [(b)]	86	12	27	8	9
	AF-2 (2 plates)	0.01	445	N.T.	196	N.T.	N.T.
		0.1	N.T.	N.T.	N.T.	418	N.T.
	NaN_3 (2 plates)	0.5	N.T.	454	N.T.	N.T.	N.T.
	9AA (2 plates)	80	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	1224

N.T., Not tested.
[(a)] Precipitation derived from the test substance after the overlaid agars solidify.
[(b)] Precipitation derived from the test substance after the overlaid agars solidify and incubation.

(続く)

2.6.7.17.5 Reverse Mutation Test of *Impurity B with Bacteria (続き)

Test Article: *Impurity B

Metabolic Activation	Test Article	Dose Level (µg/plate)	Revertant Colony Counts (Mean value of 2 or 3 plates)				
			TA100	TA1535	WP2*uvrA*	TA98	TA1537
With Activation	DMSO (3 plates)	100 µL/plate	121	18	31	23	12
	*Impurity B (3 plates)	20.6	134	19	36	27	13
		61.7	121	15	40	24	12
		185	119	20	46	26	15
		556 [(a)]	145	14	39	17	13
		1670 [(a)]	120	16	30	23	12
		5000 [(a)]	105	18	27	19	15
	2AA (2 plates)	0.5	N.T.	N.T.	N.T.	442	N.T.
		1	1345	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.
		2	N.T.	509	N.T.	N.T.	311
		10	N.T.	N.T.	888	N.T.	N.T.

N.T., Not tested.
[(a)] Precipitation derived from the test substance after the overlaid agars solidify and incubation.

2.6.7.17.6 Reverse Mutation Test of *Impurity C with Bacteria

Test Article: *Impurity C

Report Title: Bacterial Reverse Mutation Test of *Impurity C, an Impurity of S-297995		
Test for Induction of: Reverse mutation in bacterial cells	**No. of Independent Assays:** 1	**Study No.** S-297995-TB-320-L
Strains: *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*	**No. of Replicate Cultures:** 3 (Negative control and test substance), 2 (Positive controls)	**Location in CTD:** 4.2.3.7-04
Metabolizing System: Phenobarbital and 5,6-benzoflavone induced rat liver S9, 10% in S9 mix	**No. of Cells Analyzed/Cultured:** −	**GLP Compliance:** Yes
Vehicles: **Test Article:** DMSO **Positive Controls:** DMSO		**Date of Treatment:** [redacted] 20[redacted]
Treatment: Plate incorporation method and plate incubation for 48 hours (37°C)		
Cytotoxic Effects: No cytotoxicity (reduction of the bacterial background lawn) was observed without or with the S9 mix in all tester strains.		
Genotoxic Effects: None		

Metabolic Activation	Test Article	Dose Level (µg/plate)	Revertant Colony Counts (Mean value of 2 or 3 plates)				
			TA100	TA1535	WP2*uvrA*	TA98	TA1537
Without Activation	**DMSO (3 plates)**	100 µL/plate	127	9	39	26	11
	***Impurity C (3 plates)**	20.6	137	8	38	25	13
		61.7	137	11	42	22	12
		185 [(a)]	126	9	36	19	10
		556 [(b)]	120	9	34	18	14
		1670 [(b)]	122	8	25	18	14
		5000 [(b)]	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	AF-2 (2 plates)	0.01	474	N.T.	164	N.T.	N.T.
		0.1	N.T.	N.T.	N.T.	438	N.T.
	NaN_3 (2 plates)	0.5	N.T.	347	N.T.	N.T.	N.T.
	9AA (2 plates)	80	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	955

N.D., No data obtained because heavy precipitates obscured counting colonies. N.T., Not tested.
[(a)] Precipitation derived from the test substance after the overlaid agars solidify (TA1535, TA1537 and WP2*uvrA*).
[(b)] Precipitation derived from the test substance after the overlaid agars solidify and incubation (all tester strains).

(続く)

2.6.7.17.6 Reverse Mutation Test of *Impurity C with Bacteria (続き)

Test Article: *Impurity C

Metabolic Activation	Test Article	Dose Level (µg/plate)	Revertant Colony Counts (Mean value of 2 or 3 plates)				
			TA100	TA1535	WP2*uvrA*	TA98	TA1537
With Activation	DMSO (3 plates)	100 µL/plate	132	11	39	23	14
	*Impurity C (3 plates)	20.6	151 [(b)]	11	45	26	11
		61.7	160	15	42	29	12
		185	165	10	46	33	9
		556	157	17	42	29	10
		1670 [(a)]	152	10	41	25	9
		5000 [(a)]	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	2AA (2 plates)	0.5	N.T.	N.T.	N.T.	458	N.T.
		1	1435	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.
		2	N.T.	502	N.T.	N.T.	273
		10	N.T.	N.T.	908	N.T.	N.T.

N.D., No data obtained because heavy precipitates obscured counting colonies. N.T., Not tested.
[(a)] Precipitation derived from the test substance after the overlaid agars solidify and incubation (all tester strains).
[(b)] Lack of one plate because of technical error.

2.6.7.17.7 Reverse Mutation Test of *Impurity E with Bacteria

Test Article: *Impurity E

Report Title: Bacterial Reverse Mutation Test of *Impurity E, an Impurity of S-297995		
Test for Induction of: Reverse mutation in bacterial cells	**No. of Independent Assays:** 2 (As dose-finding test and main test)	**Study No.** S-297995-TF-242-L (CRO Study No. [redacted]01-4842)
Strains: *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*	**No. of Replicate Cultures:** 3 (Negative control), 2 (Test substance and positive controls)	**Location in CTD:** 4.2.3.7-08
Metabolizing System: Phenobarbital and 5,6-benzoflavone induced rat liver S9, 10% in S9 mix	**No. of Cells Analyzed/Cultured:** −	**GLP Compliance:** Yes (GLP regulations for Occupational Safety and Health Act in Japan)
Vehicles: **Test Article:** DMSO **Positive Controls:** DMSO		**Date of Treatment:** [redacted] 20[redacted]
Treatment: Preincubation method (37°C, 20 min.) and incubation for 48 hours (37°C)		
Cytotoxic Effects: Cytotoxicity (the growth inhibition of bacteria) by the test substance was observed at dose of 2500 and 5000 µg/plate without the S9 mix in all strains except for WP2*uvrA*, with the S9 mix in all strains. No cytotoxicity was observed without the S9 mix in WP2*uvrA*.		
Genotoxic Effects: None		

Metabolic Activation	**Test Article**	**Dose Level (µg/plate)**	**Assay No. 1 (As dose-finding test) Revertant Colony Counts (Mean value of 2 or 3 plates)**				
			TA100	**TA1535**	**WP2*uvrA***	**TA98**	**TA1537**
Without Activation	**DMSO (3 plates)**	100 µL/plate	112	10	22	17	9
	***Impurity E (2 plates)**	4.88	96	7	24	15	6
		19.5	103	13	20	17	7
		78.1	108	5	23	16	12
		313	114	11	18	21	10
		1250	99	11	13	13	8
		5000 [(a)]	83 [(b)]	8 [(b)]	19	13 [(b)]	5 [(b)]
	AF-2 (2 plates)	0.01	663	N.T.	425	N.T.	N.T.
		0.1	N.T.	N.T.	N.T.	353	N.T.
	NaN_3 (2 plates)	0.5	N.T.	243	N.T.	N.T.	N.T.
	ICR-191 (2 plates)	0.5	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	1460

N.T., Not tested.
[(a)] Precipitation derived from the test substance.
[(b)] Reduction of the bacterial background lawn.

(続く)

2.6.7.17.7 Reverse Mutation Test of *Impurity E with Bacteria (続き)

Test Article: *Impurity E

Metabolic Activation	Test Article	Dose Level (μg/plate)	Assay No. 1 (As dose-finding test) Revertant Colony Counts (Mean value of 2 or 3 plates)				
			TA100	TA1535	WP2*uvrA*	TA98	TA1537
With Activation	DMSO(3plates)	100 μL/plate	123	10	25	31	21
	*Impurity E (2 plates)	4.88	114	10	29	31	18
		19.5	112	8	25	27	19
		78.1	118	9	25	20	16
		313	126	9	30	26	16
		1250	107	14	33	21	13
		5000 [a]	88 [b]	7 [b]	24	22 [b]	13 [b]
	2AA (2 plates)	0.5	N.T.	N.T.	N.T.	280	N.T.
		1	1291	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.
		2	N.T.	278	N.T.	N.T.	467
		10	N.T.	N.T.	634	N.T.	N.T.

N.T., Not tested.
[a] Precipitation derived from the test substance.
[b] Reduction of the bacterial background lawn.

(続く)

2.6.7.17.7 Reverse Mutation Test of *Impurity E with Bacteria (続き)

Test Article: *Impurity E

Metabolic Activation	Test Article	Dose Level (µg/plate)	Assay No. 2 (As main test) Revertant Colony Counts (Mean value of 2 or 3 plates)				
			TA100	TA1535	WP2*uvrA*	TA98	TA1537
Without Activation	DMSO (3 plates)	100 µL/plate	110	13	28	19	7
	*Impurity E (2 plates)	156	103	13	25	16	11
		313	109	11	22	18	10
		625	108	12	24	21	10
		1250	83	11	20	17	6
		2500	73 (b)	6 (b)	18	17 (b)	6 (b)
		5000 (a)	70 (b)	5 (b)	22	15 (b)	3 (b)
	AF-2 (2 plates)	0.01	642	N.T.	384	N.T.	N.T.
		0.1	N.T.	N.T.	N.T.	372	N.T.
	NaN_3 (2 plates)	0.5	N.T.	308	N.T.	N.T.	N.T.
	ICR-191 (2 plates)	0.5	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	1566
With Activation	DMSO (3 plates)	100 µL/plate	103	11	28	31	18
	*Impurity E (2 plates)	156	99	10	28	27	25
		313	114	10	29	25	19
		625	117	10	27	34	16
		1250	100	9	28	24	19
		2500	96 (b)	5 (b)	17 (b)	17 (b)	10 (b)
		5000 (a)	91 (b)	9 (b)	26 (b)	25 (b)	6 (b)
	2AA (2 plates)	0.5	N.T.	N.T.	N.T.	310	N.T.
		1	1448	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.
		2	N.T.	297	N.T.	N.T.	564
		10	N.T.	N.T.	518	N.T.	N.T.

N.T., Not tested.
(a) Precipitation derived from the test substance.
(b) Reduction of the bacterial background lawn.

2.6.7.17.8 Reverse Mutation Test of *Impurity F with Bacteria

Test Article: *Impurity F

Report Title: Bacterial Reverse Mutation Test of *Impurity F		
Test for Induction of: Reverse mutation in bacterial cells	**No. of Independent Assays:** 2 (As dose-finding test and main test)	**CRO Study No.** [redacted]10083
Strains: *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*	**No. of Replicate Cultures:** 3 (Negative control), 2 (Test substance and positive controls)	**Location in CTD:** 4.2.3.7-09
Metabolizing System: Phenobarbital and 5,6-benzoflavone induced rat liver S9, 10% in S9 mix	**No. of Cells Analyzed/Cultured:** −	**GLP Compliance:** Yes (GLP regulations for Occupational Safety and Health Act in Japan)
Vehicles: **Test Article:** DMSO **Positive Controls :** DMSO		**Date of Treatment:** [redacted] 20[redacted]
Treatment: Preincubation method (37°C, 20 min.) and incubation for 48 hours (37°C)		
Cytotoxic Effects: No cytotoxicity (reduction of the bacterial background lawn) was observed without or with the S9 mix in all tester strains.		
Genotoxic Effects: None		

Metabolic Activation	**Test Article**	**Dose Level (μg/plate)**	**Assay No. 1 (As dose-finding test) Revertant Colony Counts (Mean value of 2 or 3 plates)**				
			TA100	**TA1535**	**WP2*uvrA***	**TA98**	**TA1537**
Without Activation	**DMSO (3 plates)**	100 μL/plate	94	11	21	20	7
	***Impurity F (2 plates)**	1.2	95	11	20	19	8
		4.9	92	9	24	16	7
		20	83	10	20	17	7
		78	98	10	19	20	7
		313	92	10	23	19	7
		1250	95	7	22	19	6
		5000	86	9	22	17	7
	AF-2 (2 plates)	0.01	556	N.T.	135	N.T.	N.T.
		0.1	N.T.	N.T.	N.T.	441	N.T.
	NaN_3 (2 plates)	0.5	N.T.	372	N.T.	N.T.	N.T.
	ICR-191 (2 plates)	1.0	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	834

N.T., Not tested.

(続く)

2.6.7.17.8 Reverse Mutation Test of *Impurity F with Bacteria (続き)

Test Article: *Impurity F

Metabolic Activation	Test Article	Dose Level (μg/plate)	Assay No. 1 (As dose-finding test) Revertant Colony Counts (Mean value of 2 or 3 plates)				
			TA100	TA1535	WP2*uvrA*	TA98	TA1537
With Activation	DMSO (3plates)	100 μL/plate	97	11	32	28	18
	*Impurity F (2 plates)	1.2	105	11	28	26	18
		4.9	95	10	25	24	19
		20	100	10	26	26	17
		78	93	12	27	25	18
		313	98	8	35	26	16
		1250	106	10	33	25	18
		5000	104	9	32	25	21
	2AA (2 plates)	0.5	N.T.	N.T.	N.T.	337	N.T.
		1	805	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.
		2	N.T.	224	N.T.	N.T.	131
		10	N.T.	N.T.	720	N.T.	N.T.

N.T., Not tested.

(続く)

2.6.7.17.8 Reverse Mutation Test of *Impurity F with Bacteria (続き)

Test Article: *Impurity F

Metabolic Activation	Test Article	Dose Level (μg/plate)	Assay No. 2 (As main test) Revertant Colony Counts (Mean value of 2 or 3 plates)				
			TA100	TA1535	WP2*uvrA*	TA98	TA1537
Without Activation	DMSO (3 plates)	100 μL/plate	101	12	41	18	7
	*Impurity F (2 plates)	313	101	13	43	18	7
		625	91	10	42	18	7
		1250	92	11	42	18	8
		2500	104	12	42	15	7
		5000	105	10	40	16	6
	AF-2 (2 plates)	0.01	519	N.T.	124	N.T.	N.T.
		0.1	N.T.	N.T.	N.T.	492	N.T.
	NaN_3 (2 plates)	0.5	N.T.	443	N.T.	N.T.	N.T.
	ICR-191 (2 plates)	1.0	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	2048
With Activation	DMSO (3 plates)	100 μL/plate	100	11	46	31	18
	*Impurity F (2 plates)	313	102	11	46	26	18
		625	91	10	43	27	16
		1250	101	10	44	25	14
		2500	105	11	49	27	19
		5000	116	11	44	34	18
	2AA (2 plates)	0.5	N.T.	N.T.	N.T.	386	N.T.
		1	861	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.
		2	N.T.	277	N.T.	N.T.	120
		10	N.T.	N.T.	1118	N.T.	N.T.

N.T., Not tested.

2.6.7.17.9 Non-GLP Reverse Mutation Tests of Naldemedine Impurities with Bacteria

Test Article: *Impurity G;*Impurity A;*Impurity D;*Impurity H;
*Impurity I;*Impurity J;*Impurity K;*Impurity L

Test Article (Vehicle)	Strains	Metabolizing System	No. of Independent Assays	No. of Replicate Cultures	Treatment	Noteworthy Findings	Study Number [Location in CTD]
*Impurity G; *Impurity A; *Impurity D; *Impurity H (DMSO)	*Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*	Phenobarbital and 5,6-benzoflavone induced rat liver S9, 10% in S9 mix	2 (As dose-finding test and main test)	3 (Negative control), 2 (Test articles and positive controls)	Pre-incubation method (37°C, 20 minutes) and incubation for 48 hours (37°C)	Doselevel and revertant colony counts are listed below. *Impurity G , *Impurity A , and *Impurity H did not produce 2-fold or more increase in the revertant colonies over the negative control group at any dose of any tester strain with or without S9 mix. However, *Impurity D produced 2-fold or more increase in the revertant colonies over the negative control group in all tester strains with or without S9 mix.	S-297995-TF-263-N (CRO Study No. [redacted]01-5047) [4.2.3.7-10]

Metabolic Activation	Test Article	Dose Level (µg/plate)	Assay No. 1 (As dose-finding test) Revertant Colony Counts (Mean value of 2 or 3 plates)				
			TA100	TA1535	WP2*uvrA*	TA98	TA1537
Without Activation	DMSO (3 plates)	100 µL/plate	108	10	21	19	8
	*Impurity G (2 plates)	4.88	108	13	24	16	7
		19.5	99	11	23	19	8
		78.1	101	11	17	19	8
		313	96	14	20	20	8
		1250	117	8	19	20	12
		5000	93	7	13	10	7

The appropriateness of the experimental system was confirmed based on the response tendencies in the negative and positive control groups.
(a) Precipitation derived from the test substance after the overlaid agars solidify (all tester strains).

(続く)

2.6.7.17.9 Non-GLP Reverse Mutation Tests of Naldemedine Impurities with Bacteria (続き)

Test Article: *Impurity G;*Impurity A;*Impurity D;*Impurity H;
*Impurity I;*Impurity J;*Impurity K;*Impurity L

Metabolic Activation	Test Article	Dose Level (μg/plate)	Assay No. 1 (As dose-finding test)				
			Revertant Colony Counts (Mean value of 2 or 3 plates)				
			TA100	TA1535	WP2*uvrA*	TA98	TA1537
With Activation	DMSO (3 plates)	100 μL/plate	114	9	25	32	12
	*Impurity G (2 plates)	4.88	112	9	32	31	15
		19.5	104	11	31	27	12
		78.1	98	15	32	32	11
		313	115	11	26	28	10
		1250	114	12	26	33	17
		5000	77	5	16	26	7
Metabolic Activation	**Test Article**	**Dose Level (μg/plate)**	**Assay No. 2 (As main test)**				
			Revertant Colony Counts (Mean value of 2 or 3 plates)				
			TA100	**TA1535**	**WP2*uvrA***	**TA98**	**TA1537**
Without Activation	DMSO (3 plates)	100 μL/plate	110	12	22	17	10
	*Impurity G (2 plates)	313	114	13	19	19	9
		625	111	11	19	18	8
		1250	106	15	26	23	7
		2500	102	13	27	24	5
		5000	82	13	20	15	6
With Activation	DMSO (3 plates)	100 μL/plate	114	13	36	30	19
	*Impurity G (2 plates)	313	116	10	24	34	12
		625	122	14	24	31	17
		1250	107	18	24	29	13
		2500	139	17	17	30	17
		5000	72	6	12	24	16

The appropriateness of the experimental system was confirmed based on the response tendencies in the negative and positive control groups.

(続く)

2.6.7.17.9 Non-GLP Reverse Mutation Tests of Naldemedine Impurities with Bacteria (続き)

Test Article: *Impurity G;*Impurity A;*Impurity D;*Impurity H;
*Impurity I;*Impurity J;*Impurity K;*Impurity L

Metabolic Activation	Test Article	Dose Level (µg/plate)	Assay No. 1 (As dose-finding test)				
			Revertant Colony Counts (Mean value of 2 or 3 plates)				
			TA100	TA1535	WP2*uvrA*	TA98	TA1537
Without Activation	DMSO (3 plates)	100 µL/plate	108	10	21	19	8
	*Impurity A (2 plates)	4.88	98	8	27	18	10
		19.5	103	7	30	24	13
		78.1	99	9	23	20	7
		313	95	7	26	22	7
		1250	90	4	24	22	7
		5000 [(a)]	72	8	20	19	6
With Activation	DMSO (3 plates)	100 µL/plate	114	9	25	32	12
	*Impurity A (2 plates)	4.88	114	12	37	30	16
		19.5	104	7	30	32	10
		78.1	119	10	25	26	11
		313	141	14	26	28	11
		1250	116	7	28	40	17
		5000 [(a)]	82	5	23	20	12
Metabolic Activation	Test Article	Dose Level (µg/plate)	Assay No. 2 (As main test)				
			Revertant Colony Counts (Mean value of 2 or 3 plates)				
			TA100	TA1535	WP2*uvrA*	TA98	TA1537
Without Activation	DMSO (3 plates)	100 µL/plate	101	11	34	18	7
	*Impurity A (2 plates)	313	99	5	25	15	8
		625	90	8	22	18	8
		1250	95	12	20	16	7
		2500 [(a)]	65	8	28	15	6
		5000 [(a)]	76	8	14	14	6

The appropriateness of the experimental system was confirmed based on the response tendencies in the negative and positive control groups.
[(a)] Precipitation derived from the test substance after the overlaid agars solidify (all tester strains).

(続く)

2.6.7.17.9 Non-GLP Reverse Mutation Tests of Naldemedine Impurities with Bacteria (続き)

Test Article: *Impurity G;*Impurity A;*Impurity D;*Impurity H;
*Impurity I;*Impurity J;*Impurity K;*Impurity L

Metabolic Activation	Test Article	Dose Level (µg/plate)	Assay No. 2 (As main test)				
			Revertant Colony Counts (Mean value of 2 or 3 plates)				
			TA100	TA1535	WP2*uvrA*	TA98	TA1537
With Activation	DMSO (3 plates)	100 µL/plate	108	9	41	35	16
	*Impurity A(2 plates)	313	123	9	34	36	22
		625	119	7	41	26	16
		1250	95	9	31	23	15
		2500 [(a)]	90	10	28	24	13
		5000 [(a)]	76	8	20	29	11
Metabolic Activation	**Test Article**	**Dose Level (µg/plate)**	**Assay No. 1 (As dose-finding test)**				
			Revertant Colony Counts (Mean value of 2 or 3 plates)				
			TA100	**TA1535**	**WP2*uvrA***	**TA98**	**TA1537**
Without Activation	DMSO (3 plates)	100 µL/plate	108	10	21	19	8
	*Impurity D (2 plates)	4.88	124	12	22	18	13
		19.5	126	10	29	19	16
		78.1	215	10	28	25	29
		313	526	31	48	38	88
		1250	990	67	83	99	201
		5000 [(a)]	1169	109	201	211	463
With Activation	DMSO (3 plates)	100 µL/plate	114	9	25	32	12
	*Impurity D (2 plates)	4.88	98	11	30	30	13
		19.5	113	12	35	35	19
		78.1	162	5	39	34	32
		313	519	17	50	55	73
		1250	908	34	106	143	225
		5000 [(a)]	1622	84	264	207	548

The appropriateness of the experimental system was confirmed based on the response tendencies in the negative and positive control groups.
[(a)] Precipitation derived from the test substance after the overlaid agars solidify (all tester strains).

(続く)

2.6.7.17.9 Non-GLP Reverse Mutation Tests of Naldemedine Impurities with Bacteria (続き)

Test Article: *Impurity G;*Impurity A;*Impurity D;*Impurity H;
*Impurity I;*Impurity J;*Impurity K;*Impurity L

Metabolic Activation	Test Article	Dose Level (μg/plate)	Assay No. 2 (As main test)				
			Revertant Colony Counts (Mean value of 2 or 3 plates)				
			TA100	TA1535	WP2*uvrA*	TA98	TA1537
Without Activation	DMSO (3 plates)	100 μL/plate	101	11	34	18	7
	*Impurity D(2 plates)	4.88	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	12
		9.77	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	17
		19.5	137	N.T.	N.T.	N.T.	13
		39.1	162	N.T.	N.T.	N.T.	18
		78.1	203	19	37	24	32
		156	331	20	43	38	52
		313	513	33	46	48	88
		625	789	49	70	69	170
		1250	1000	88	98	127	217
		2500	1348	111	163	186	310
		5000	1500	118	244	222	415
With Activation	DMSO (3 plates)	100 μL/plate	108	9	41	35	16
	*Impurity D (2 plates)	19.5	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	23
		39.1	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	22
		78.1	172	12	43	25	32
		156	269	10	39	46	48
		313	468	21	52	63	82
		625	845	25	92	96	133
		1250	1174	28	123	118	238
		2500	1469	45	195	175	374
		5000	1558	84	249	224	576

The appropriateness of the experimental system was confirmed based on the response tendencies in the negative and positive control groups. N.T., Not tested.

(続く)

2.6.7.17.9 Non-GLP Reverse Mutation Tests of Naldemedine Impurities with Bacteria (続き)

Test Article: *Impurity G;*Impurity A;*Impurity D;*Impurity H;
*Impurity I;*Impurity J;*Impurity K;*Impurity L

Metabolic Activation	Test Article	Dose Level (µg/plate)	Assay No. 1 (As dose-finding test)				
			Revertant Colony Counts (Mean value of 2 or 3 plates)				
			TA100	TA1535	WP2*uvrA*	TA98	TA1537
Without Activation	DMSO (3 plates)	100 µL/plate	108	10	21	19	8
	*Impurity H (2 plates)	4.88	111	8	26	22	10
		19.5	106	9	23	24	10
		78.1	117	8	27	15	6
		313	100	8	19	17	4
		1250 [(a)]	90	8	24	15	8
		5000 [(a)]	84	9	23	15	10
With Activation	DMSO (3 plates)	100 µL/plate	114	9	25	32	12
	*Impurity H (2 plates)	4.88	113	12	23	31	12
		19.5	125	11	23	37	10
		78.1	115	10	27	33	11
		313	122	11	30	25	9
		1250 [(a)]	0 [(b)]	0 [(b)]	10 [(b)]	0 [(b)]	0 [(b)]
		5000 [(a)]	0 [(b)]	0 [(b)]	0 [(b)]	0 [(b)]	0 [(b)]
Metabolic Activation	Test Article	Dose Level (µg/plate)	Assay No. 2 (As main test)				
			Revertant Colony Counts (Mean value of 2 or 3 plates)				
			TA100	TA1535	WP2*uvrA*	TA98	TA1537
Without Activation	DMSO (3 plates)	100 µL/plate	110	12	22	17	10
	*Impurity H (2 plates)	313	81	12	27	17	5
		625	95	10	19	20	7
		1250 [(a)]	93	12	17	14	4
		2500 [(a)]	98	7	18	15	7
		5000 [(a)]	90	9	15	12	8

The appropriateness of the experimental system was confirmed based on the response tendencies in the negative and positive control groups.
[(a)] Precipitation derived from the test substance after the overlaid agars solidify (all tester strains).
[(b)] Reduction of the bacterial background lawn.

(続く)

2.6.7.17.9 Non-GLP Reverse Mutation Tests of Naldemedine Impurities with Bacteria (続き)

Test Article: *Impurity G;*Impurity A;*Impurity D;*Impurity H;
*Impurity I;*Impurity J;*Impurity K;*Impurity L

Metabolic Activation	Test Article	Dose Level (µg/plate)	Assay No. 2 (As main test)				
			Revertant Colony Counts (Mean value of 2 or 3 plates)				
			TA100	TA1535	WP2*uvrA*	TA98	TA1537
With Activation	DMSO (3 plates)	100 µL/plate	114	13	36	30	19
	*Impurity H (2 plates)	39.1	137	12	26	39	16
		78.1	133	16	32	40	19
		156	117	10	23	33	15
		313	108	7	33	31	12
		625	46 [(b)]	4 [(b)]	27	19 [(b)]	2 [(b)]
		1250 [(a)]	0 [(b)]	0 [(b)]	8 [(b)]	0 [(b)]	0 [(b)]

The appropriateness of the experimental system was confirmed based on the response tendencies in the negative and positive control groups.
[(a)] Precipitation derived from the test substance after the overlaid agars solidify (all tester strains).
[(b)] Reduction of the bacterial background lawn.

(続く)

2.6.7.17.9 Non-GLP Reverse Mutation Tests of Naldemedine Impurities with Bacteria (続き)

Test Article: *Impurity G;*Impurity A;*Impurity D;*Impurity H;
*Impurity I;*Impurity J;*Impurity K;*Impurity L

Test Article (Vehicle)	Strains	Metabolizing System	No. of Independent Assays	No. of Replicate Cultures	Treatment	Noteworthy Findings	Study Number [Location in CTD]
*Impurity I; *Impurity J (DMSO)	*Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*	Phenobarbital and 5,6-benzoflavone induced rat liver S9, 10% in S9 mix	2 (As dose-finding test and main test), 3 (As dose-finding test-1 and -2, and main test)	3 (Negative control), 2 (Test articles and positive controls)	Pre-incubation method (37°C, 20 minutes) and incubation for 48 hours (37°C)	Dose level and revertant colony counts are listed below. *Impurity I and *Impurity J did not produce 2-fold or more increase in the revertant colonies over the negative control group at any dose of any tester strain with or without S9 mix.	S-297995-TF-272-N (CRO Study No. [redacted]01-5134) [4.2.3.7-11]

Metabolic Activation	Test Article	Dose Level (µg/plate)	Assay No. 1 (As dose-finding test) Revertant Colony Counts (Mean value of 2 or 3 plates)				
			TA100	TA1535	WP2*uvrA*	TA98	TA1537
Without Activation	DMSO (3 plates)	100 µL/plate	95	10	20	16	7
	*Impurity I (2 plates)	4.88	99	10	19	17	8
		19.5	116	8	15	19	9
		78.1	116	11	18	13	6
		313	109	7	20	13	8
		1250	119	9	21	13	9
		5000	108	9	18	13	9
With Activation	DMSO (3 plates)	100 µL/plate	98	6	21	19	11
	*Impurity I (2 plates)	4.88	108	9	29	23	9
		19.5	110	8	26	22	9
		78.1	105	10	19	15	14
		313	112	6	21	16	12
		1250	123	8	28	21	11
		5000	105	7	29	23	12

The appropriateness of the experimental system was confirmed based on the response tendencies in the negative and positive control groups.
(a) Precipitation derived from the test substance after the overlaid agars solidify (all tester strains).

(続く)

2.6.7.17.9 Non-GLP Reverse Mutation Tests of Naldemedine Impurities with Bacteria (続き)

Test Article: *Impurity G;*Impurity A;*Impurity D;*Impurity H;
*Impurity I;*Impurity J;*Impurity K;*Impurity L

Metabolic Activation	Test Article	Dose Level (μg/plate)	Assay No. 2 (As main test)				
			Revertant Colony Counts (Mean value of 2 or 3 plates)				
			TA100	TA1535	WP2*uvrA*	TA98	TA1537
Without Activation	DMSO (3 plates)	100 μL/plate	111	10	20	19	5
	*Impurity I (2 plates)	313	97	10	26	12	7
		625	115	9	24	15	5
		1250	106	12	20	13	6
		2500	112	10	15	13	6
		5000	89	15	15	13	7
With Activation	DMSO (3 plates)	100 μL/plate	107	8	21	19	7
	*Impurity I (2 plates)	313	121	9	20	25	11
		625	121	8	27	20	5
		1250	123	5	23	16	10
		2500	126	13	24	22	11
		5000	118	9	22	23	10
Metabolic Activation	Test Article	Dose Level (μg/plate)	Assay No. 1 (As dose-finding test-1)				
			Revertant Colony Counts (Mean value of 2 or 3 plates)				
			TA100	TA1535	WP2*uvrA*	TA98	TA1537
Without Activation	DMSO (3 plates)	100 μL/plate	95	10	20	16	7
	*Impurity J (2 plates)	4.88	75	9	22	16	9
		19.5	92	9	15	10	5
		78.1	84	8	16	11	5
		313	10 [(b)]	1 [(b)]	10 [(b)]	10 [(b)]	0 [(b)]
		1250	0 [(b)]	0 [(b)]	0 [(b)]	0 [(b)]	0 [(b)]
		5000 [(a)]	0 [(b)]	0 [(b)]	0 [(b)]	0 [(b)]	0 [(b)]

The appropriateness of the experimental system was confirmed based on the response tendencies in the negative and positive control groups.
[(a)] Precipitation derived from the test substance after the overlaid agars solidify (all tester strains).
[(b)] Reduction of the bacterial background lawn.

(続く)

2.6.7.17.9 Non-GLP Reverse Mutation Tests of Naldemedine Impurities with Bacteria (続き)

Test Article: *Impurity G;*Impurity A;*Impurity D;*Impurity H;
*Impurity I;*Impurity J;*Impurity K;*Impurity L

Metabolic Activation	Test Article	Dose Level (µg/plate)	Assay No. 1 (As dose-finding test-1) Revertant Colony Counts (Mean value of 2 or 3 plates)				
			TA100	TA1535	WP2*uvrA*	TA98	TA1537
With Activation	DMSO (3 plates)	100 µL/plate	98	6	21	19	11
	*Impurity J (2 plates)	4.88	124	7	25	17	13
		19.5	120	6	16	21	11
		78.1	127	9	22	23	9
		313	36 [(b)]	2 [(b)]	15 [(b)]	14 [(b)]	0 [(b)]
		1250	0 [(b)]	0 [(b)]	0 [(b)]	0 [(b)]	0 [(b)]
		5000 [(a)]	0 [(b)]	0 [(b)]	0 [(b)]	0 [(b)]	0 [(b)]
Metabolic Activation	**Test Article**	**Dose Level (µg/plate)**	**Assay No. 2 (As dose-finding test-2) Revertant Colony Counts (Mean value of 2 or 3 plates)**				
			TA100	**TA1535**	**WP2*uvrA***	**TA98**	**TA1537**
Without Activation	DMSO (3 plates)	100 µL/plate	111	10	20	19	5
	*Impurity J (2 plates)	9.77	117	9	21	22	6
		19.5	118	11	22	18	6
		39.1	96	6	14	11	6
		78.1	73	5	17	17	3
		156	42 [(b)]	8 [(b)]	12 [(b)]	14 [(b)]	3 [(b)]
		313	13 [(b)]	0 [(b)]	8 [(b)]	8 [(b)]	0 [(b)]
With Activation	DMSO (3 plates)	100 µL/plate	107	8	21	19	7
	*Impurity J (2 plates)	9.77	128	11	18	25	11
		19.5	130	9	20	24	7
		39.1	124	11	18	21	9
		78.1	128	10	24	23	9
		156	115	9	27	29	9
		313	19 [(b)]	3 [(b)]	16 [(b)]	16 [(b)]	1 [(b)]

The appropriateness of the experimental system was confirmed based on the response tendencies in the negative and positive control groups.
[(a)] Precipitation derived from the test substance after the overlaid agars solidify (all tester strains).
[(b)] Reduction of the bacterial background lawn.

(続く)

2.6.7.17.9 Non-GLP Reverse Mutation Tests of Naldemedine Impurities with Bacteria (続き)

Test Article: *Impurity G;*Impurity A;*Impurity D;*Impurity H;
*Impurity I;*Impurity J;*Impurity K;*Impurity L

Metabolic Activation	Test Article	Dose Level (µg/plate)	Assay No. 3 (As main test)				
			Revertant Colony Counts (Mean value of 2 or 3 plates)				
			TA100	TA1535	WP2*uvrA*	TA98	TA1537
Without Activation	DMSO (3 plates)	100 µL/plate	96	9	26	15	6
	*Impurity J (2 plates)	9.77	103	8	21	23	9
		19.5	95	4	17	17	6
		39.1	80	7	25	16	5
		78.1	83	6	14	12	7
		156	51 [(a)]	6 [(a)]	12 [(a)]	14 [(a)]	1 [(a)]
		313	9 [(a)]	0 [(a)]	14 [(a)]	8 [(a)]	0 [(a)]
With Activation	DMSO (3 plates)	100 µL/plate	103	13	24	23	12
	*Impurity J (2 plates)	9.77	111	13	24	30	15
		19.5	140	9	23	18	8
		39.1	116	11	23	19	10
		78.1	118	11	19	23	6
		156	109	10	18	20	11
		313	38 [(a)]	1 [(a)]	15 [(a)]	15 [(a)]	1 [(a)]

The appropriateness of the experimental system was confirmed based on the response tendencies in the negative and positive control groups.
[(a)] Reduction of the bacterial background lawn.

(続く)

2.6.7.17.9 Non-GLP Reverse Mutation Tests of Naldemedine Impurities with Bacteria (続き)

Test Article: *Impurity G;*Impurity A;*Impurity D;*Impurity H;
*Impurity I;*Impurity J;*Impurity K;*Impurity L

Test Article (Vehicle)	Strains	Metabolizing System	No. of Independent Assays	No. of Replicate Cultures	Treatment	Noteworthy Findings	Study Number [Location in CTD]
*Impurity K (DMSO)	*Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*	Phenobarbital and 5,6-benzoflavone induced rat liver S9, 10% in S9 mix	2 (As dose-finding test and main test)	3 (Negative control), 2 (Test articles and positive controls)	Pre-incubation method (37°C, 20 minutes) and incubation for 48 hours (37°C)	Dose level and revertant colony counts are listed below. *Impurity K did not produce 2-fold or more increase in the revertant colonies over the negative control group at any dose of any tester strain with or without S9 mix.	S-297995-TF-287-N (CRO Study No. [redacted]01-5142) [4.2.3.7-12]

Metabolic Activation	Test Article	Dose Level (µg/plate)	Assay No. 1 (As dose-finding test) Revertant Colony Counts (Mean value of 2 or 3 plates)				
			TA100	TA1535	WP2*uvrA*	TA98	TA1537
Without Activation	DMSO (3 plates)	100 µL/plate	99	10	18	16	7
	*Impurity K (2 plates)	4.88	101	9	20	15	5
		19.5	102	8	25	14	7
		78.1	99	10	16	17	8
		313	91	12	22	18	7
		1250	92 [(b)]	4 [(b)]	14 [(b)]	15 [(b)]	6 [(b)]
		5000 [(a)]	87 [(b)]	6 [(b)]	19 [(b)]	16 [(b)]	4 [(b)]
With Activation	DMSO (3 plates)	100 µL/plate	98	7	28	23	15
	*Impurity K (2 plates)	4.88	124	8	38	27	17
		19.5	113	5	30	23	14
		78.1	109	8	25	26	13
		313	105	12	34	21	11
		1250	0 [(b)]	0 [(b)]	10 [(b)]	5 [(b)]	0 [(b)]
		5000 [(a)]	0 [(b)]	0 [(b)]	0 [(b)]	0 [(b)]	0 [(b)]

The appropriateness of the experimental system was confirmed based on the response tendencies in the negative and positive control groups.
[(a)] Precipitation derived from the test substance after the overlaid agars solidify (all tester strains).
[(b)] Reduction of the bacterial background lawn.

(続く)

2.6.7.17.9 Non-GLP Reverse Mutation Tests of Naldemedine Impurities with Bacteria (続き)

Test Article: *Impurity G;*Impurity A;*Impurity D;*Impurity H;
*Impurity I;*Impurity J;*Impurity K;*Impurity L

Metabolic Activation	Test Article	Dose Level (µg/plate)	Assay No. 2 (As main test)				
			Revertant Colony Counts (Mean value of 2 or 3 plates)				
			TA100	TA1535	WP2*uvrA*	TA98	TA1537
Without Activation	DMSO (3 plates)	100 µL/plate	107	9	27	22	17
	*Impurity K (2 plates)	39.1	96	10	26	24	19
		78.1	125	13	24	18	18
		156	90	11	21	14	19
		313	92	8	26	12	18
		625	90	4	29	13	11
		1250	112 [(a)]	6 [(a)]	25 [(a)]	22 [(a)]	5 [(a)]
With Activation	DMSO (3 plates)	100 µL/plate	103	7	30	28	19
	*Impurity K (2 plates)	39.1	107	6	26	29	17
		78.1	104	6	26	24	20
		156	127	8	30	23	14
		313	97	8	28	22	7
		625	28 [(a)]	4 [(a)]	15 [(a)]	18 [(a)]	2 [(a)]
		1250	0 [(a)]	0 [(a)]	11 [(a)]	4 [(a)]	0 [(a)]

The appropriateness of the experimental system was confirmed based on the response tendencies in the negative and positive control groups.
[(a)] Reduction of the bacterial background lawn.

(続く)

2.6.7.17.9 Non-GLP Reverse Mutation Tests of Naldemedine Impurities with Bacteria (続き)

Test Article: *Impurity G;*Impurity A;*Impurity D;*Impurity H;
*Impurity I;*Impurity J;*Impurity K;*Impurity L

Test Article (Vehicle)	Strains	Metabolizing System	No. of Independent Assays	No. of Replicate Cultures	Treatment	Noteworthy Findings	Study Number [Location in CTD]
*Impurity L (DMSO)	*Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*	Phenobarbital and 5,6-benzoflavone induced rat liver S9, 10% in S9 mix	1	2	Pre-incubation method (37°C, 20 minutes) and incubation for 48 hours (37°C)	Doselevel and revertant colony counts are listed below. *Impurity L did not produce 2-fold or more increase in the revertant colonies over the negative control group at any dose of any tester strain with or without S9 mix.	GEN-20[redacted]-193 [4.2.3.7-13]

Metabolic Activation	Test Article	Dose Level (µg/plate)	Revertant Colony Counts (Mean value of 2 plates)				
			TA100	TA1535	WP2*uvrA*	TA98	TA1537
Without Activation	DMSO	100 µL/plate	105	13	32	24	13
	*Impurity L	6.86	93	N.T.	N.T.	20	N.T.
		20.6	91	N.T.	N.T.	29	N.T.
		61.7	97	10	30	25	11
		185	93	8	29	23	13
		556	112	13	31	17	14
		1667	86	11	25	23	12
		5000	23 [(a)]	8 [(a)]	12 [(a)]	11 [(a)]	4 [(a)]
With Activation	DMSO	100 µL/plate	104	13	40	33	24
	*Impurity L	6.86	100	N.T.	N.T.	32	N.T.
		20.6	100	N.T.	N.T.	26	N.T.
		61.7	114	12	40	32	22
		185	108	10	44	30	24
		556	104	14	46	35	28
		1667	97	10	33	36	24
		5000	65 [(a)]	6 [(a)]	11 [(a)]	15 [(a)]	6 [(a)]

*Impurity L is shown as MTS-0378859B in the final report.
The appropriateness of the experimental system was confirmed based on the response tendencies in the negative and positive control groups. N.T., Not tested.
[(a)] Reduction of the bacterial background lawn.

2.6.7.17.10 Preliminary Skin Phototoxicity Study in Mice

Test Article: Naldemedine Tosylate

Species/ Strain	Method of Administration (Vehicle/ Formulation)	Duration of Dosing	Doses [(a)] (mg/kg)	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	Study Number [Location in CTD]
Mouse/ Hos:HR-1	Gavage (0.5 w/v% MC aqueous solution/ Suspension)	Single	0, 100, 200, 300	3F	No significant toxicological findings at all doses	R-297995-TB-006-R [4.2.3.7-14]

[(a)] As naldemedine.

2.6.7.17.11 Skin Phototoxicity Study in Mice

Test Article: Naldemedine Tosylate

Report Title: Skin Phototoxicity Study of RSC-297995 monotosylate in Hairless Mice by Oral Dosing		
Species/Strain: Mouse/Hos:HR-1	**Dosing:** Single	**Study No.** S-297995-TB-249-L
Initial Age: 12 weeks	**Method of Administration:** Oral gavage	**Location in CTD:** 4.2.3.7-05
Date of First Dose: [redacted] 20[redacted]	**Vehicle/Formulation:** 0.5 w/v% MC aqueous solution/Suspension	**GLP Compliance:** Yes
Special Features: None		

Dose (mg/kg, as naldemedine)		0 (Control)	30	300
Number Evaluated		**F: 5**	**F: 10**	**F: 10**
Skin Phototoxicity		–	–	–
Toxicokinetics [(a)]				
Number Evaluated		**F: 4**	**F: 5**	**F: 5**
Naldemedine	**C_{max} (µg/mL)**	N.C.	4.40	30.4
	$AUC_{0\text{-}24hr}$ (µg·hr/mL)	N.C.	9.73	163

N.C., Not calculated because of BLQ (< 0.05 µg/mL). –, No noteworthy findings.
[(a)] Group means are shown.

2.6.7.17.12 Abuse Liability: Dose Finding Studies

Test Article: Naldemedine Tosylate

Species/ Strain	Method of Admin. (Vehicle/ Formulation)	Duration of Dosing	Gender and No. per Group	Doses (mg/kg, as free)	Toxicokinetics						Noteworthy Findings	Study Number [Location in CTD]
					Naldemedine			Nor-naldemedine				
					C_{max} (ng/mL)	T_{max} (min)	C_{24hr} (ng/mL)	C_{max} (ng/mL)	T_{max} (min)	C_{24hr} (ng/mL)		
Rat/ Crlj:LE	Oral (0.5 w/v% methylcellulose aqueous solution)	Single	Male/3	0.003	0.150	30		NC	–		None	S-297995-TF-323-N (CRO Study No. [redacted]14427) [4.2.3.7-18]
				0.01	0.521	30		NC	–			
				0.03	1.69	30		0.0545	30			
				0.1	5.77	30		0.240	30			
				0.3	15.2	30		0.610	30			
				1	58.2	15		2.90	30			
Monkey/ Rhesus	Intravenous (2.5 v/v% DMSO/ 2 v/v% Tween 80/saline solution)	Single	Male/2	0.0001	0.534 [(a)]	5		NC	–		None	S-297995-TF-322-N (CRO Study No. [redacted]14425) [4.2.3.7-19]
				0.001	5.45 [(a)]	5		0.0672	60			
				0.01	54.1 [(a)]	5		0.918	60			
Rat/ Crl:CD (SD)	Oral (0.5 w/v% methylcellulose aqueous solution)	Twice daily	Male/3	20 (10 × 2)	712	60	0.886	50.3	60	1.08	None	S-297995-TF-324-N (CRO Study No. [redacted]14429) [4.2.3.7-20]
				60 (30 × 2)	2290	60	2.44	232	60	2.45		
				200 (100 × 2)	8230	60	193	507	60	5.39		

NC, Not calculated because of below the lower limit of quantification (0.04 ng/mL).
[(a)] The plasma concentration 5 minutes after administration.

2.6.7.17.13 Drug Discrimination of Naldemedine Tosylate in Rats

Test Article: Naldemedine Tosylate

Organ Systems Evaluated	Species/ Strain	Method of Admin. (Vehicle/ Formulation)	Doses (mg/kg, as free)	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	GLP Compliance	Study Number [Location in CTD]
Central nervous system	Rat/ Crlj:LE	Oral (0.5 w/v% methylcellulose aqueous solution)	0.03, 0.1, 0.3	Male/8	Naldemedine tosylate had no morphine-like discriminative stimulus effects at oral doses of 0.03, 0.1, and 0.3 mg/kg in rats.	Yes	S-297995-TF-334-L (CRO Study No. [redacted]14428) [4.2.3.7-15]

2.6.7.17.14 Psychological Dependence Liability by Intravenous Self-Administration of Naldemedine Tosylate in Monkeys

Test Article: Naldemedine Tosylate

Organ Systems Evaluated	Species/ Strain	Method of Admin. (Vehicle/ Formulation)	Doses (μg/kg/infusion, as free)	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	GLP Compliance	Study Number [Location in CTD]
Central nervous system	Rhesus monkeys	Intravenous (2.5 v/v% DMSO/ 10 v/v% polyethylene glycol 400/saline solution)	0.03, 0.1, 0.3, 1, 3, 10 (2-hour self-administration experiment) 1, 3, 10 (24-hour self-administration experiment)	Male and Female/4	Naldemedine tosylate had no reinforcing effects at 1, 3, and 10 μg/kg/infusion in monkeys.	Yes	S-297995-TF-335-L (CRO Study No. [redacted]14426) [4.2.3.7-16]

2.6.7.17.15 Physical Dependence Liability of Naldemedine Tosylate in Rats

Test Article: Naldemedine Tosylate

Organ Systems Evaluated	Species/ Strain	Method of Admin. (Vehicle/ Formulation)	Duration of Dosing	Doses (mg/kg/day, as free)	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	GLP Compliance	Study Number [Location in CTD]
Central nervous system	Rats/ Crl:CD (SD)	Oral (0.5 w/v% methylcellulose aqueous solution)	28-day dosing period and 7-day withdrawal period	60 (30×2), 200 (100×2)	Male/10	Naldemedine tosylate had no physical dependence-producing potential at oral doses of 60 and 200 mg/kg/day in rats.	Yes	S-297995-TF-333-L (CRO Study No. [redacted]14430) [4.2.3.7-17]

Toxicokinetics

Dose (mg/kg/day)	Naldemedine				Nor-naldemedine			
	Day 1		Day 28		Day 1		Day 28	
	C_{max} (ng/mL)	C_{24hr} (ng/mL)	C_{max} (ng/mL)	C_{24hr} (ng/mL)	C_{max} (ng/mL)	C_{24hr} (ng/mL)	C_{max} (ng/mL)	C_{24hr} (ng/mL)
60 (30×2)	2160	3.06	3890	6.71	148	2.16	174	3.36
200 (100×2)	6560	6.19	8650	18.9	527	3.94	421	6.87

2.6.7.17.16 Withdrawal Symptoms Induced by Naldemedine Tosylate, Methylnaltrexone, and Naloxone in Morphine-Dependent Mice

Test Article: Naldemedine Tosylate

Species/Strain	Mouse/C57BL/6NCrlCrlj
Gender and No. per Group	Male and n = 12 – 13/Group
Feed Condition	Non-fasted
Vehicle/Formulation	0.5 w/v% methylcellulose aqueous solution/Suspension
Method of Administration	Single oral administration
Dose (mg/kg, as free)	0.01, 0.1, 1, 10
Reference substances (Vehicle/Formulation, Method of Administration)	Methylnaltrexone (5% Xylitol/Solution, Single subcutaneous administration [Dose: 0.01, 0.1, 1, 10 mg/kg]), Naloxone (Saline/Solution, Single subcutaneous administration [Dose: 0.1 mg/kg])
Treatment	Subcutaneous treatment with morphine (25 mg/kg) or saline
Evaluation items	Number of animals displaying withdrawal diarrhea excrement and jumping behavior (5 and above), ED_{50}
Evaluation method	Morphine or saline was administered subcutaneously to mice 5 times per day for 4 consecutive days and once on the 5th day. Naldemedine tosylate, its vehicle, methylnaltrexone, its vehicle, or naloxone was administered 3 hours after the last injection of morphine or saline. After administration of naldemedine tosylate or the reference substances, the number of animals which showed diarrhea and jumping behavior were investigated for 30 minutes, and their incidences were analyzed as an index to peripherally- and centrally-mediated withdrawal symptoms, respectively. Each ED_{50} value was estimated after fitting a logistic model to the event data.

(続く)

2.6.7.17.16 Withdrawal Symptoms Induced by Naldemedine Tosylate, Methylnaltrexone, and Naloxone in Morphine-Dependent Mice (続き)

Test Article: Naldemedine Tosylate

Results						
Substances	Dose (mg/kg)	Treatment	Diarrhea [(a)]	ED_{50} for Diarrhea	Jumping [(a)]	ED_{50} for Jumping
Naldemedine tosylate	Vehicle	Morphine	0/13	1.07 mg/kg	0/13	Not determined
	0.01	Morphine	0/13		0/13	
	0.1	Morphine	1/12		0/12	
	1	Morphine	8/12 **		0/12	
	10	Morphine	9/12 **,‡‡		0/12	
	10	Saline	1/13		0/13	
Naloxone	0.1	Morphine	11/12 §§		12/12 §§	
Methylnaltrexone	Vehicle	Morphine	0/13	1 – 10 mg/kg	0/13	> 10 mg/kg
	0.01	Morphine	0/13		0/13	
	0.1	Morphine	0/12		0/12	
	1	Morphine	2/13		1/13	
	10	Morphine	13/13 **,‡‡		3/13	
	10	Saline	0/12		0/12	
Naloxone	0.1	Morphine	13/13 §§		13/13 §§	
[(a)] Data are expressed as the number of animals displaying withdrawal diarrhea excrement or jumping behavior (5 and above). ** $P < 0.01$ vs the vehicle + morphine group (Fisher's exact test followed by Dunn-Sidak method for multiplicity adjustments). ‡‡ $P < 0.01$ vs the 10-mg/kg + saline group (Fisher's exact test). §§ $P < 0.01$ vs the vehicle + morphine group (Fisher's exact test).						
Study number [Location in CTD]	R-297995-EB-073-N [4.2.3.7-21]					

2.6.7.17.17 Withdrawal Symptoms Induced by Naldemedine Tosylate and Naloxone in Morphine-Dependent Rats

Test Article: Naldemedine Tosylate

Species/Strain	Rat/Jcl:Wistar
Gender and No. per Group	Male and n = 8/Group
Feed Condition	Fasted
Vehicle/Formulation	0.5 w/v% methylcellulose aqueous solution/Suspension
Method of Administration	Single oral administration
Dose (mg/kg, as free)	0.01, 0.03, 0.1, 0.3, 1, 3
Reference substance (Vehicle/Formulation, Method of Administration)	Naloxone (Saline/Solution, Single subcutaneous administration [Dose: 0.1 mg/kg])
Treatment	Subcutaneous implantation of osmotic pump containing morphine (0.25 mg/hour/animal)
Evaluation items	Frequencies of jumping behavior and wet dog shakes, Scoring of diarrhea and teeth chattering, Weight loss: 100 × [(body weight before dosing) - (body weight 4 or 8 hours post-dose)]/body weight before dosing
Evaluation method	An osmotic pump containing morphine hydrochloride with pumping rate of 0.25 mg/hour/rat was implanted to back neck of the animals subcutaneously under anesthesia to prepare the morphine-dependent rats. Five days after implantation, naldemedine tosylate, its vehicle, Naloxone, or its vehicle was administered to the morphine-dependent rats and withdrawal signs were observed for 20 minutes at each observation periods up to 4 or 8 hours post-dose. The numbers of jumping behavior and wet dog shakes were counted, and diarrhea and teeth chattering were scored during each observation period. Weight loss defined as the difference in body weight measured before and 4 or 8 hours post-dose, was evaluated. Diarrhea and weight loss are considered to be peripherally-mediated withdrawal symptoms, while jumping behavior, wet dog shakes, and teeth chattering are centrally-mediated withdrawal symptoms.

(続く)

2.6.7.17.17 Withdrawal Symptoms Induced by Naldemedine Tosylate and Naloxone in Morphine-Dependent Rats (続き)

Test Article: Naldemedine Tosylate

Results							
Substance	Dose (mg/kg)	Time (hours)	Diarrhea [(a)]	Weight Loss (%) [(b)]	Jumping [(b)]	Wet dog shakes [(b)]	Teeth chattering [(a)]
Naldemedine tosylate	Vehicle	0	0.00 ± 0.00		0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
		1	0.00 ± 0.00		0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
		2	0.00 ± 0.00		0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
		4	0.00 ± 0.00		0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
		6	0.00 ± 0.00		0.00 ± 0.00	0.50 ± 0.38	0.13 ± 0.13
		8	0.00 ± 0.00	5.39 ± 0.60	0.00 ± 0.00	0.13 ± 0.13	0.00 ± 0.00
	0.01	0	0.00 ± 0.00		0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
		1	0.00 ± 0.00		0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
		2	0.00 ± 0.00		0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
		4	0.00 ± 0.00		0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
		6	0.00 ± 0.00		0.00 ± 0.00	0.13 ± 0.13	0.13 ± 0.13
		8	0.00 ± 0.00	5.29 ± 0.41	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
	0.03	0	0.00 ± 0.00		0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
		1	0.00 ± 0.00		0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
		2	0.13 ± 0.13		0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.13 ± 0.13
		4	0.13 ± 0.13		0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.13 ± 0.13
		6	0.00 ± 0.00		0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
		8	0.00 ± 0.00	5.53 ± 0.68	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
	0.1	0	0.00 ± 0.00		0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
		1	0.00 ± 0.00		0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
		2	0.00 ± 0.00		0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.13 ± 0.13
		4	0.50 ± 0.19		0.00 ± 0.00	0.25 ± 0.16	0.13 ± 0.13
		6	0.00 ± 0.00		0.00 ± 0.00	0.50 ± 0.27	0.00 ± 0.00
		8	0.00 ± 0.00	7.41 ± 0.42	0.00 ± 0.00	0.25 ± 0.16	0.13 ± 0.13

Data are expressed as the mean ± S.E. of 8 rats.
[(a)] Scored data: 0, normal; 1, slight to moderate; 2, marked.
[(b)] Quantitative data.
* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs the vehicle group (Steel's multiple comparison test). [†] $P < 0.05$, [††] $P < 0.01$ vs the vehicle group (Wilcoxon rank-sum test).

(続く)

2.6.7.17.17 Withdrawal Symptoms Induced by Naldemedine Tosylate and Naloxone in Morphine-Dependent Rats (続き)

Test Article: Naldemedine Tosylate

Results (Continued)

Substances	Dose (mg/kg)	Time (hours)	Diarrhea [(a)]	Weight Loss (%) [(b)]	Jumping [(b)]	Wet dog shakes [(b)]	Teeth chattering [(a)]
Naldemedine tosylate	0.3	0	0.00 ± 0.00		0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
		1	0.25 ± 0.25		0.00 ± 0.00	0.25 ± 0.16	0.00 ± 0.00
		2	0.75 ± 0.31		0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
		4	0.25 ± 0.16		0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.38 ± 0.18
		6	0.00 ± 0.00		0.00 ± 0.00	0.13 ± 0.13	0.25 ± 0.16
		8	0.00 ± 0.00	8.18 ± 0.51 *	0.00 ± 0.00	0.13 ± 0.13	0.00 ± 0.00
	1	0	0.00 ± 0.00		0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
		1	0.63 ± 0.26		0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.38 ± 0.18
		2	1.38 ± 0.32 *		0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.38 ± 0.18
		4	0.50 ± 0.27		0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.38 ± 0.18
		6	0.00 ± 0.00		0.00 ± 0.00	0.25 ± 0.16	0.63 ± 0.26
		8	0.00 ± 0.00	10.39 ± 0.53 **	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.13 ± 0.13
	3	0	0.25 ± 0.25		0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
		1	0.88 ± 0.30 *		0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.63 ± 0.18 *
		2	0.88 ± 0.35		0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.50 ± 0.19
		4	0.50 ± 0.27		0.00 ± 0.00	0.63 ± 0.26	0.63 ± 0.18 *
		6	0.00 ± 0.00		0.00 ± 0.00	1.00 ± 0.38	0.63 ± 0.32
		8	0.00 ± 0.00	10.73 ± 0.62 **	0.00 ± 0.00	0.50 ± 0.19	1.13 ± 0.30 *
Naloxone	Vehicle	0	0.00 ± 0.00		0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
		1	0.00 ± 0.00		0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
		2	0.00 ± 0.00		0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.13 ± 0.13
		4	0.00 ± 0.00	3.93 ± 0.43	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
	0.1	0	2.00 ± 0.00 ††		18.50 ± 3.15 ††	13.00 ± 1.51 ††	2.00 ± 0.00 ††
		1	1.38 ± 0.32 ††		0.00 ± 0.00	1.38 ± 0.53 †	1.50 ± 0.27 ††
		2	0.00 ± 0.00		0.00 ± 0.00	0.25 ± 0.25	0.38 ± 0.18
		4	0.00 ± 0.00	8.77 ± 0.26 ††	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00

Data are expressed as the mean ± S.E. of 8 rats.
[(a)] Scored data: 0, normal; 1, slight to moderate; 2, marked.
[(b)] Quantitative data.
* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs the vehicle group (Steel's multiple comparison test). † $P < 0.05$, †† $P < 0.01$ vs the vehicle group (Wilcoxon rank-sum test).

Study number [Location in CTD]	S-297995-SB-270-N [4.2.3.7-22]