オゼンピック皮下注 2mg

2.6.6 毒性試験の概要文

ノボ ノルディスク ファーマ株式会社

目次

ページ

目次 2
表目次 6
略語一覧 8
2.6.6.1 まとめ 10
2.6.6.1.1 毒性プログラム 10
2.6.6.1.2 結果 11
2.6.6.1.2.1 一般毒性及びがん原性 12
2.6.6.1.2.2 生殖発生毒性 13
2.6.6.1.2.3 幼若毒性 15
2.6.6.1.2.4 局所刺激性 15
2.6.6.1.2.5 不純物 15
2.6.6.1.3 結論 15
2.6.6.1.4 試験概要の概論 16
2.6.6.2 単回投与毒性試験 17
2.6.6.2.1 マウスを用いた試験 18
2.6.6.2.1.1 マウスを用いた単回皮下投与毒性試験 (Module 2.6.7.5, 206524) 18
2.6.6.2.1.2 マウスを用いた単回静脈内投与毒性試験 (Module 2.6.7.5, 207117) 19
2.6.6.2.2 ラットを用いた試験 20
2.6.6.2.2.1 ラットを用いた単回皮下投与毒性試験 (Module 2.6.7.5, 206523) 20
2.6.6.2.2.2 ラットを用いた単回静脈内投与毒性試験 (Module 2.6.7.5, 207114) 21
2.6.6.3 反復投与毒性試験 22
2.6.6.3.1 マウスを用いた試験 23
2.6.6.3.1.1 マウスを用いた皮下投与 DRF 試験 (Module 2.6.7.6, 207029) 23
2.6.6.3.1.2 マウスを用いた 2 週間反復皮下投与毒性試験 (Module 2.6.7.7.A, 206447) 24
2.6.6.3.1.3 マウスを用いた 13 週間反復皮下投与毒性試験 (Module 2.6.7.7.B, 206663) 26
2.6.6.3.2 ラットを用いた試験 28
2.6.6.3.2.1 ラットを用いた皮下投与用量設定 DRF 試験 (Module 2.6.7.6, 206062) 28
2.6.6.3.2.2 ラットを用いた 2 週間反復皮下投与毒性試験 (Module 2.6.7.7.C, 206448) 30
2.6.6.3.2.3 ラットを用いた 13 週間反復皮下投与毒性及び 4 週間回復性試験(Module 2.6.7.7.D, 206662) 31
2.6.6.3.2.4 ラットを用いた 26 週間反復皮下投与毒性及び 4 週間回復性試験 (Module 2.6.7.7.E, 207377) 33

2.6.6.3.3 サルを用いた試験.....36
2.6.6.3.3.1 カニクイザルを用いた皮下投与用量設定 DRF 試験 (Module 2.6.7.6, 206059).....36
2.6.6.3.3.2 カニクイザルを用いた 2 週間反復皮下投与毒性試験 (Module 2.6.7.7.F, 206449).....37
2.6.6.3.3.3 カニクイザルを用いた 13 週間反復皮下投与毒性及び 4 週間回復性試験 (Module 2.6.7.7.G, 206450).....39
2.6.6.3.3.4 カニクイザルを用いた 52 週間反復皮下投与毒性及び 4 週間回復性試験 (Module 2.6.7.7.H, 207288).....41
2.6.6.4 遺伝毒性試験.....44
2.6.6.4.1 遺伝毒性 in vitro.....44
2.6.6.4.1.1 [redacted]品：4 種のヒスチジン要求性株の *Salmonella thyphimurium* 及び 2 種のトリプトファン要求性株の *Eschericia coli* を用いた復帰突然変異試験 (Module 2.6.7.8.A, 206415).....44
2.6.6.4.1.2 遺伝子組換え品：4 種のヒスチジン要求性株の *Salmonella thyphimurium* 及び 2 種のトリプトファン要求性株の *Eschericia coli* を用いた復帰突然変異試験 (Module 2.6.7.8.B, 210193).....45
2.6.6.4.1.3 [redacted]品：ヒト末梢血リンパ球を用いた染色体異常試験 (Module 2.6.7.8.C, 206417).....45
2.6.6.4.1.4 遺伝子組換え品：ヒト末梢血リンパ球を用いた染色体異常試験 (Module 2.6.7.8.D, 210194).....46
2.6.6.4.2 遺伝毒性 in vivo.....47
2.6.6.4.2.1 セマグルチド投与ラットの骨髄を用いた小核試験 (Module 2.6.7.9, 206409).....47
2.6.6.5 がん原性試験.....47
2.6.6.5.1 マウスを用いた 104 週間反復皮下投与がん原性試験（Module 2.6.7.10.A, 207362）.....48
2.6.6.5.2 ラットを用いた 104 週間反復皮下投与がん原性試験 (Module 2.6.7.10.B, 207363).....50
2.6.6.5.3 がん原性試験－その他の試験.....53
2.6.6.5.3.1 げっ歯類の甲状腺 C 細胞の GLP-1 受容体の活性化に関する検討.....53
2.6.6.5.3.1.1 ラット甲状腺 C 細胞における GLP-1 受容体の活性化：セマグルチド、リラグルチド、エキセナチド及び GLP-1 の比較 (Module 2.6.7.10.C, LBKN150301).....53
2.6.6.5.3.2 げっ歯類のカルシトニン濃度に及ぼすセマグルチドの影響に関する探索試験.....54
2.6.6.5.3.2.1 皮下投与時の血漿中カルシトニン濃度の評価のためのマウスを用いた単回投与試験 (Module 2.6.7.10.D, 208422).....54
2.6.6.5.3.2.2 血漿中カルシトニン濃度の評価のためのマウスを用いた単回投与試験 (Module 2.6.7.10.D, 213448).....55
2.6.6.5.3.2.3 血漿中カルシトニン濃度を評価するためのラットを用いた 6 週間皮下投与毒性試験 (Module 2.6.7.10.D, 208456).....55

2.6.6.6 生殖発生毒性試験 56
2.6.6.6.1 ラットを用いた受胎能及び EFD 試験 58
2.6.6.6.1.1 ラットを用いた受胎能及び EFD 試験（予備試験） (Module 2.6.7.11, 206616) 58
2.6.6.6.1.2 雌性ラットを用いた受胎能及び EFD 試験（予備試験） (Module 2.6.7.11, 207359) 59
2.6.6.6.1.3 ラットを用いた受胎能及び EFD 試験 (Module 2.6.7.12, 207361) 61
2.6.6.6.2 ウサギを用いた EFD 試験 63
2.6.6.6.2.1 ウサギを用いた EFD 試験（予備 DRF 試験）(Module 2.6.7.11, 206536) 63
2.6.6.6.2.2 ウサギを用いた EFD 試験（予備試験）(Module 2.6.7.11, 207358) 64
2.6.6.6.2.3 ウサギを用いた EFD 試験 (Module 2.6.7.13.A, 207360) 66
2.6.6.6.3 カニクイザルを用いた EFD 及び PPND 試験 67
2.6.6.6.3.1 カニクイザルを用いた EFD 試験（予備試験）(Module 2.6.7.11, 208477) 68
2.6.6.6.3.2 カニクイザルを用いた EFD 試験 (Module 2.6.7.13.B, 208486) 69
2.6.6.6.3.3 カニクイザルを用いた EFD 及び PPND 試験 (Module 2.6.7.14.A, 210061) 71
2.6.6.6.4 幼若動物を用いた試験 73
2.6.6.6.4.1 幼若ラットを用いた皮下投与による DRF 試験 (Module 2.6.7.15, 214276) 73
2.6.6.6.4.2 幼若ラットを用いた皮下投与による 11 週間毒性試験及び 4 週間回復性試験 (Module 2.6.7.15, 214479) 76
2.6.6.7 局所刺激性試験 79
2.6.6.7.1 ウサギを用いた筋肉内、動脈内及び静脈内投与による局所刺激性試験 (Module 2.6.7.16, 212073) 80
2.6.6.7.2 ブタを用いた皮下投与による局所毒性試験 (Module 2.6.7.16, 206664) 80
2.6.6.8 その他の毒性試験 81
2.6.6.8.1 免疫原性 81
2.6.6.8.2 免疫毒性 82
2.6.6.8.3 依存性 82
2.6.6.8.4 代謝物 82
2.6.6.8.5 不純物及び溶出物 83
2.6.6.8.5.1 目的物質由来不純物の評価 83
2.6.6.8.5.2 不純物の品質確認用に実施した試験 84
2.6.6.8.5.3 製造直後及び強制劣化セマグルチド：SD 系ラットを用いた 4 週間反復皮下投与比較毒性試験及び 2 週間回復性試験 (Module 2.6.7.17.E, 209159) 85
2.6.6.8.5.4 [redacted]及び遺伝子組換えセマグルチド：SD 系ラットを用いた 13 週間反復皮下投与比較毒性試験 (Module 2.6.7.17.E, 210195) 86
2.6.6.8.5.5 容器施栓系からの溶出物の評価 87

2.6.6.8.6 セマグルチドの臨床試験用製剤に含まれる添加物の評価 88
2.6.6.8.7 その他 89
2.6.6.8.7.1 メカニズム試験 89
2.6.6.8.7.1.1 ラットを用いた EFD に及ぼす影響の探索試験 89
2.6.6.8.7.1.2 カニクイザル卵黄嚢における GLP-1 受容体発現に関する検討試験 (Module 2.6.7.17.G, JHES150306) 89
2.6.6.8.7.2 EFD 試験に用いる第 3 の動物種の選択を裏付ける試験 90
2.6.6.8.7.2.1 非妊娠ミニブタにおける MTD 及び 3 週間 DRF 試験 (Module 2.6.7.17.G, 208404) 90
2.6.6.9 日本人 MRHD である 1 mg/週での日本人の曝露量との比較 91
2.6.6.10 考察及び結論 93
2.6.6.10.1 一般毒性及びがん原性 93
2.6.6.10.2 生殖発生毒性 95
2.6.6.10.3 幼若毒性 97
2.6.6.10.4 局所刺激性 97
2.6.6.10.5 結論 98
参考文献 99

表目次

ページ

表 2.6.6-1 重要な毒性試験の概要 10
表 2.6.6-2 単回投与試験の概要 18
表 2.6.6-3 マウスを用いた単回皮下投与試験（206524）－投与群、用量及び動物数 18
表 2.6.6-4 マウスを用いた単回静脈内投与試験（207117）－投与群、用量及び動物数 19
表 2.6.6-5 ラットを用いた単回皮下投与試験（206523）－投与群、用量及び動物数 20
表 2.6.6-6 ラットを用いた単回静脈内投与試験（207114）－投与群、用量及び動物数 21
表 2.6.6-7 皮下投与による重要な反復毒性試験の概要 23
表 2.6.6-8 マウスを用いた DRF 皮下投与試験（207029）－投与群、用量及び動物数 24
表 2.6.6-9 マウスを用いた 2 週間皮下投与試験（206447）－投与群、用量及び動物数 25
表 2.6.6-10 マウスを用いた 13 週間皮下投与試験（206663）－投与群、用量及び動物数 26
表 2.6.6-11 ラットを用いた用量設定 DRF 皮下投与試験（206062）－投与群、用量及び動物数 29
表 2.6.6-12 ラットを用いた 2 週間皮下投与試験（206448）－投与群、用量及び動物数 30
表 2.6.6-13 ラットを用いた 13 週間皮下投与試験（206662）－投与群、用量及び動物数 31
表 2.6.6-14 ラットを用いた 26 週間皮下投与試験（207377）－投与群、用量及び動物数 33
表 2.6.6-15 カニクイザルを用いた用量設定 DRF 皮下投与試験（206059）－投与群、用量及び動物数 36
表 2.6.6-16 カニクイザルを用いた 2 週間反復皮下投与毒性試験（206449）－投与群、用量及び動物数 38
表 2.6.6-17 カニクイザルを用いた 13 週間反復皮下投与毒性試験（206450）－投与群、用量及び動物数 39
表 2.6.6-18 カニクイザルを用いた 52 週間反復皮下投与毒性試験（207288）－投与群、用量及び動物数 41
表 2.6.6-19 がん原性試験の概要 47
表 2.6.6-20 マウスを用いた 104 週間皮下投与試験（207362）－投与群、用量及び動物数 48
表 2.6.6-21 ラットを用いた 104 週間皮下投与試験（207363）－投与群、用量及び動物数 50
表 2.6.6-22 マウスを用いた単回投与試験（208422）－投与群、用量及び動物数 54
表 2.6.6-23 マウスを用いた単回投与試験（213448）－投与群、用量及び動物数 55
表 2.6.6-24 ラットを用いた 6 週間皮下投与試験（208456）－投与群、用量及び動物数 56
表 2.6.6-25 重要な生殖発生毒性試験の概要 57
表 2.6.6-26 ラットを用いた受胎能及び EFD 試験（予備試験）（206616）－投与群、用量及び動物数 58

表 2.6.6-27　ラットを用いた受胎能及び EFD 試験（予備試験）（207359）－投与群、用量及び動物数 59
表 2.6.6-28　ラットを用いた受胎能及び EFD 試験（207361）－投与群、用量及び動物数 61
表 2.6.6-29　ウサギを用いた DRF 及び EFD 試験（206536）－投与群、用量及び動物数 63
表 2.6.6-30　EFD 試験（予備試験）（207358）－投与群、用量及び動物数 65
表 2.6.6-31　EFD 試験（207360）－投与群、用量及び動物数 66
表 2.6.6-32　カニクイザルを用いた EFD 試験（予備試験）（208477）－投与群、用量及び動物数 68
表 2.6.6-33　カニクイザルを用いた EFD 試験（208486）－投与群、用量及び動物数 69
表 2.6.6-34　カニクイザルを用いた EFD 及び PPND 試験（210061）－投与群、用量及び動物数 71
表 2.6.6-35　幼若ラットを用いた皮下投与による DRF 試験（214276）－投与群、用量及び動物数 74
表 2.6.6-36　幼若ラットを用いた皮下投与による 11 週間毒性試験（214479）－投与群、用量及び動物数 76
表 2.6.6-37　ウサギを用いた局所刺激性試験（212073）－投与群、用量及び動物数 80
表 2.6.6-38　ブタを用いた局所刺激性試験（206664）－投与群、用量及び動物数 81
表 2.6.6-39　ラット 4 週間毒性試験（209159）で評価した不純物レベル及び提案する製品使用時の評価基準 84
表 2.6.6-40　製造直後及び強制劣化セマグルチドの比較試験（209159）－投与群、用量及び動物数 85
表 2.6.6-41　[redacted]及び遺伝子組換えセマグルチドの比較試験（210195）－投与群、用量及び動物数 86
表 2.6.6-42　1.5mL カートリッジからの溶出物（5°C で 35 箇月間保存に続き 30°C で 8 週間保存）に対する臨床曝露量比 88
表 2.6.6-43　ミニブタを用いた皮下投与による MTD 及び 3 週間 DRF 試験（208404）－投与群、用量及び動物数 90
表 2.6.6-44　重要な毒性試験における動物とヒトとの曝露量比 92

略語一覧

ALP	:	Alkaline phosphatase（アルカリホスファターゼ）
APTT	:	Activated partial thromboplastin time（活性化部分トロンボプラスチン時間）
AUC	:	Area under the plasma drug concentration-time curve（濃度－時間曲線下面積）
cAMP	:	Cyclic adenosine monophosphate （環状アデノシン一リン酸）
$C_{average}$	:	Average drug concentration observed in plasma （平均血漿中薬物濃度）
C_{max}	:	Maximum drug concentration observed in plasma（最高血漿中薬物濃度）
CPK	:	Creatine phosphokinase activity （クレアチンホスホキナーゼ活性）
DRF	:	Dose range finding（用量範囲設定）
ECG	:	Electrocardiogram（心電図）
EFD	:	Embryo-foetal development（胚・胎児発生）
EMA	:	European Medicines Agency（欧州医薬品庁）
F	:	Female（雌）
GD	:	Gestation Day（妊娠日）
GI	:	Gastro-intestinal（消化管）
GLP	:	Good Laboratory Practice（医薬品の安全性試験の実施の基準）
GLP-1	:	Glucagon-like peptide-1（グルカゴン様ペプチド-1）
HED	:	Human equivalent dose（ヒト等価用量）
HMWP	:	High molecular weight protein（高分子量タンパク質）
i.a.	:	Intra-arterial（動脈内）
ICH	:	International Conference on Harmonisation（日米 EU 医薬品規制調和国際会議）
IHC	:	Immunohistochemistry（免疫組織化学）
i.m.	:	Intramuscular（筋肉内）
ISH	:	*In situ* hybridisation（*in situ* ハイブリダイゼーション）
i.v.	:	Intravenous（静脈内）
JP	:	Japanese Pharmacopoeia（日本薬局方）
LLOQ	:	Lower limit of quantification（定量下限値）
M	:	Male（雄）
MCH	:	Mean cell haemoglobin（平均赤血球ヘモグロビン量）
MCHC	:	Mean cell haemoglobin concentration（平均赤血球ヘモグロビン濃度）
MRHD	:	Maximum recommended human dose（最大臨床用量）
mRNA	:	Messenger ribonucleic acid（メッセンジャーリボ核酸）
MRSD	:	Maximum recommended starting dose（最大臨床開始用量）
MTD	:	Maximum tolerated dose（最大耐用量）
NOAEL	:	No observed adverse effect level（無毒性量）
NNC0113-0217	:	Semaglutide（セマグルチドの化合物コード番号）
PCE	:	Polychromatic erythrocytes（多染性赤血球）
Ph. Eur.	:	European Pharmacopoeia（欧州薬局方）
PPND	:	Pre- and postnatal development（出生前及び出生後の発生）
R	:	Recovery（回復性）
RT-PCR	:	Reverse transcription polymerase chain reaction（逆転写ポリメラーゼ連鎖反応）

s.c.	:	Subcutaneous（皮下）
T2D	:	Type 2 diabetes mellitus（2 型糖尿病）
tau	:	Dosing interval（投与間隔）
TK	:	Toxicokinetic（トキシコキネティクス）
$t_{1/2}$	:	Terminal plasma half-life（終末相血漿中半減期）
US FDA	:	United States Food and Drug Administration（米国食品医薬品局）
USP	:	United States Pharmacopoeia（米国薬局方）
WEC	:	Whole embryo culture（全胚培養）

2.6.6.1 まとめ

2.6.6.1.1 毒性プログラム

セマグルチドの毒性プログラムは、2 型糖尿病（T2D）患者への長期投与を支持するため、新医薬品用の ICH M3[1]及び ICH S6[2]ガイドラインに準拠し計画した。重要な試験一覧を表 2.6.6-1 に示す。重要な試験はいずれも医薬品の安全性試験の実施の基準（GLP）に準拠して実施した。重要な試験に加え、げっ歯類において認められた甲状腺 C 細胞の変化に関連する一連の事象を確認することと、ラットを用いた胚・胎児発生（EFD）試験で認められた影響を検討するためにメカニズム試験を実施した。

表 2.6.6-1 重要な毒性試験の概要

Study type and duration	Route of administration	Species
Single dose toxicity	s.c., i.v.	Mouse and rat
Repeat dose toxicity		
2 weeks	s.c.	Mouse, rat, and cynomolgus monkey
13 weeks	s.c.	Mouse
13 weeks with 4 weeks recovery	s.c.	Rat and cynomolgus monkey
26 weeks with 4 weeks recovery	s.c.	Rat
52 weeks with 4 weeks recovery	s.c.	Cynomolgus monkey
Genotoxicity		
Ames test, *in vitro*	N/A	N/A
Chromosome aberration in human lymphocytes, *in vitro*	N/A	N/A
Micronucleus induction, *in vivo*	s.c.	Rat
Carcinogenicity		
2 years	s.c.	Mouse and rat
Reproductive and developmental toxicity		
Combined fertility and embryo-foetal development	s.c.	Rat
Embryo-foetal development	s.c.	Rabbit and cynomolgus monkey
Pre- and postnatal development	s.c.	Cynomolgus monkey
Juvenile toxicity		
11 weeks	s.c.	Rat
Local tolerance		
Subcutaneous injection	s.c.	Pig
Unintended injection routes	i.m., i.v., i.a.	Rabbit
Impurities		
4 weeks comparing fresh and aged semaglutide, with 2 weeks recovery	s.c.	Rat
13 weeks comparing synthetic and recombinant semaglutide	s.c.	Rat

Abbreviations: s.c.: subcutaneous, i.a.: intraarterial; i.v.: intravenous; i.m.: intramuscular; N/A: not applicable.

GLP-1 受容体作動薬の安全性評価に薬理反応の観点からげっ歯類及び非げっ歯類の動物種としてこれまでに汎用されてきたラット及びカニクイザルを、安全性薬理試験及び一般毒性試験の最適動物種として選択した。さらに、セマグルチドの代謝はラット、サル及びヒトで同様である。ICH S1B[3]ガイドラインでは、2 種類のげっ歯類を使用することが推奨されていることに準拠し、マウス及びラットを用いてがん原性試験を実施した。ICH S5[4]ガイドラインでは、一般的な生殖発生毒性試験で通常汎用される動物種が推奨されることに準拠し、当初ラット及びウサギを用いて生殖発生毒性試験を実施した。その後、ウサギでは母動物の忍容性が低く本動物種とヒトとの安全マージンの設定ができないこと、及びラットで認められた胚・胎児毒性の結果を評価するために、ヒトとの関連性が高い胎盤構造及び機能を有する動物種での評価が必要であったことから、カニクイザルを用いて出生前及び出生後の発生（PPND）試験を実施した。幼若動物に対する毒性試験は、ラットを用いて実施した。セマグルチド単回皮下投与時の局所刺激性はブタを用いて評価し、臨床投与経路でない経路によるセマグルチド投与時の局所刺激性はウサギを用いて評価した。反復投与時のセマグルチドの局所刺激性評価は、反復投与毒性試験に組み入れて実施した。

臨床投与経路は皮下であることから、重要な毒性試験ではすべて投与経路を皮下（s.c.）とした。上市予定製剤と類似の溶媒を用いてセマグルチドを動物に投与した。

開発期間中、セマグルチドの製法を[redacted]法から遺伝子組換え法に変更した。試験の大部分は[redacted]法により製造されたセマグルチドを用いて実施した。重要な毒性試験のうち、幼若動物を用いた毒性試験のみ、遺伝子組換え法で製造されたセマグルチドを用いて実施した。不純物プロファイルの変更と、それに伴う製造法変更に関して、ラットを用いた 13 週間比較毒性試験にて評価した。さらに、遺伝子組換え法で製造されたセマグルチドを用いて、2 種類の *in vitro* 遺伝毒性試験を実施した。有効期限を迎えた製剤の不純物プロファイルの適格性を確認するため、ラットを用いた 4 週間比較毒性試験を実施し、[redacted]法により製造した強制劣化（強制分解）製剤と製造直後製剤とを比較した。

重要な毒性試験にはいずれもトキシコキネティクス（TK）評価を含め、慢性毒性、がん原性及び生殖発生毒性試験における無毒性量（NOAEL）での曝露量と、日本人における最大臨床用量（MRHD）である 1 mg/週での曝露量とを比較することを目的とした。

2.6.6.1.2　結果

セマグルチドの毒性プログラムでは、主な影響として GLP-1 受容体の活性化を介したセマグルチドによる薬理作用、すなわち、摂餌量及び体重に及ぼす直接的又は二次的影響と考えられる影響が認められた。想定された摂餌量減少及び投与初期の一過性の体重減少に伴う体重増加抑制は全ての動物種において用量制限因子であり、最大耐用量（MTD）を超えた場合に、数例では有害と考えられる一般

状態変化を示したことから、安楽死処置した。セマグルチドに対する忍容性は、段階的な用量漸増法により改善された。

2.6.6.1.2.1　一般毒性及びがん原性

複数の有害でない臨床病理変化が観察され、これらは摂餌量及び体重に及ぼすセマグルチドの二次的影響と考えられたが、大部分はげっ歯類における血漿中トリグリセリド濃度の減少と矛盾しないものであった。

体重に及ぼすセマグルチドの二次的影響と考えられる臓器重量変化がすべての動物種で認められたが、特にげっ歯類で顕著であった。肝重量は概して低かった。また、摂餌量の減少に起因すると考えられる、肝細胞グリコーゲン沈着の減少を示唆する肝細胞の非染色部位（rarefaction）の減少を伴う例も認められた。

マウスを用いたがん原性試験において、十二指腸におけるブルンナー腺の内腔拡張が認められた。ラットでは、投与 4 週以降にブルンナー腺の肥大が認められた。ブルンナー腺は、上部消化管における酵素液として重炭酸を含むアルカリ性の粘液分泌に関与し、酸性の胃内腔消化物から上部消化管を保護する。ブルンナー腺では GLP-1 受容体が高発現しており、内腔拡張及び肥大は GLP-1 受容体の活性化に関連するものと考えられた。ブルンナー腺で認められた所見は、ブルンナー腺又は消化管粘膜の炎症又は細胞障害のいずれにも関連するものではなかったこと、休薬により回復性が認められたこと、及びがん原性試験で過形成又は腫瘍性病変へ進展しなかったことから、有害ではないものと考えられた。ブルンナー腺における投与の影響はカニクイザルでは認められなかった。したがって、げっ歯類において認められた変化は、ヒトにおける安全性上の懸念とは考えられなかった。

マウスを用いたすべての重要な反復毒性試験において、甲状腺 C 細胞の過形成が認められたことから、マウスの試験からは NOAEL を設定することができなかった。ラットでは、有害性変化が全く認められなかったことから、高用量である 0.6 mg/kg/日が反復試験における NOAEL と考えられ、これは日本人における MRHD である 1 mg/週の 21 倍高い曝露量であった。予想どおり、マウス及びラットを用いたがん原性試験で甲状腺 C 細胞の過形成、腺腫及び腺癌が認められ、がん原性試験では NOAEL を設定することができなかった。げっ歯類における増殖性 C 細胞の変化は GLP-1 受容体の活性化に伴う既知の作用であり、リラグルチド、エキセナチド（徐放製剤）、リキシセナチド及びデュラグルチドのげっ歯類を用いたがん原性試験でも、本変化はげっ歯類における GLP-1 受容体作動薬のクラス効果であることが報告されている。マウス及びラットでセマグルチドにより誘発された C 細胞の変化は、非遺伝毒性的な機序による、げっ歯類で高感受性の GLP-1 受容体を介した特異的メカニズムによるものであり、ヒト甲状腺髄様癌でよくみられるがん原遺伝子である RET の活性化には関与しない。甲状腺 C 細胞における GLP-1 受容体の活性化亢進を示唆するバイオマーカーと考えられている血漿中カル

シトニン濃度測定により、マウス及びラットの両方でC細胞過形成又は腫瘍性病変が最初に認められる前にカルシトニン濃度が上昇したことが確認された。一方、サルでは日本人MRHDである1 mg/週の最大22倍の曝露量で52週間投与したが、カルシトニン濃度の上昇もC細胞の変化も認められなかった。このことは、正常なサルの甲状腺C細胞ではGLP-1受容体の発現が認められないことと一致する。公表データによれば、GLP-1受容体は健康なヒトの甲状腺では発現していないことが示されている。データの総合性に基づくと、げっ歯類におけるGLP-1受容体を介したC細胞の変化がヒトで生じる可能性は低いと考えられる。

[redacted]セマグルチドと遺伝子組換えセマグルチドを比較するためのラットを用いた13週間毒性試験において、膵外分泌腺における限局性腺房細胞萎縮及び単核性炎症細胞が認められた。当該所見は、ラットで通常認められる自然発生所見であること、及び1試験でしか認められなかったことから、総合的にみて投与との関連性はないものと考えられた。サルを用いた52週間反復投与毒性試験において膵臓重量の低値が、サルを用いた用量範囲設定（DRF）試験において膵外分泌腺における腺房細胞の脱顆粒がそれぞれ認められたが、いずれも有害ではなく、摂餌量の減少に伴う二次的変化と考えられた。

サルを用いた52週間毒性試験において、心電図（ECG）計測の結果、高用量群（日本人MRHDである1 mg/週の22倍高い曝露量に相当）の雌1例で投与第13週に2回の洞頻脈エピソードを示す二段脈（bigeminy rhythm）が、その後26及び52週目には連続性の左脚ブロック波形が認められた。心臓ブロックはサル及びヒトで時折認められ、大半はその他の根本的な心疾患の結果として生じるものである。しかしながら、試験中に変化が進行したことから、投与との関連性を否定できなかった。追加でECGを測定したが、異常なECGが計測されたのは1例のみであることが確認された。この1例では剖検により右心室心外膜側における蒼白が認められたが、病理組織学的検査では関連した変化は認められなかった。ECGで認められた所見が動物の一般状態に影響を及ぼすことを示唆する臨床兆候は認められなかったものの、本所見は有害であると考えられた。したがって、1例で認められたECGの異常所見の他に有害性変化が認められなかったことから、本試験におけるNOAELは中用量である0.06 mg/kgの週2回投与と考えられ、これは日本人MRHDである1 mg/週での臨床曝露量の3.6倍に相当した。

2.6.6.1.2.2　生殖発生毒性

セマグルチドにより、ラットでは性周期が延長し、黄体数減少に伴う着床数及び同腹児数への影響が誘発された。これらの影響は摂餌量及び体重に及ぼすセマグルチドの薬理作用による二次的な適応反応と考えられ、有害でないものと考えられた。幼若ラットを用いた試験では、同様の所見は認められなかった。

セマグルチドはラットにおいて、日本人 MRHD である 1 mg/週での臨床曝露量以下（0.3 倍）に相当する 0.03 mg/kg/日以上の用量で、胚・胎児の死亡、生育遅延、軽微／重大な骨格及び内臓異常を含む胚毒性を誘発した。メカニズム試験により、セマグルチドのラットにおける胚毒性の影響は、反転卵黄嚢胎盤がラット胚の栄養供給に必須である器官形成期に誘発されたことが明らかとなった。ラット卵黄嚢では器官形成期に GLP-1 受容体が機能的に発現することが明らかになっており、GLP-1 受容体特異的阻害剤を加えると、セマグルチドの影響は抑制された。この 2 つの試験結果から、GLP-1 受容体の関与が支持された。さらに、セマグルチドは反転卵黄嚢胎盤に達し、卵黄嚢細胞の飲小胞形成不全を誘発することで反転卵黄嚢細胞の母体から胚への栄養輸送を阻害することが明らかとなった。卵黄嚢の解剖学的構造及び機能に種差があること、カニクイザルでは GLP-1 受容体の発現が認められないことから、このメカニズムは、ヒトに当てはまる可能性は低いと考えられるが、ラットに胚毒性を誘発するその他のメカニズムを否定することはできない。

ウサギでは、早期妊娠損失及び軽微な胎児異常の発生頻度増加が中用量及び高用量群で認められた。ウサギにおける胎児異常はラットで認められた所見と異なるものであった。ウサギで認められた影響は、母動物への顕著な影響に伴う二次的なものと考えられたが、セマグルチドの直接的な影響を否定することができなかった。以上より、NOAEL は低用量群である 0.001 mg/kg/日と考えられ、これは日本人 MRHD である 1 mg/週での臨床曝露用量以下（0.03 倍）に相当した。

サルを用いた PPND 試験において、早期妊娠損失が中用量及び高用量群で認められたが、同用量で実施した 2 つの EFD 試験では認められなかった。さらに、主要な EFD 毒性試験において、散発的な胎児異常が中用量及び高用量でわずかに認められたものの、PPND 試験では認められなかった。EFD 毒性試験で認められた骨格及び内臓奇形は、早期妊娠損失を誘発しないものと考えられた。サルで認められた胎児異常はラットの所見とは異なるものであった。本所見は母動物の顕著な体重減少と一致した。試験間の整合性が認められず、胎児異常の性質に共通性が認められなかったことから、サルで認められた所見は偶発的か、あるいは母動物へのストレス又は体重減少に関連する変化のいずれかを示唆するものと考えられた。しかしながら、利用可能な背景データが限られており、母動物への顕著な体重減少を伴うカニクイザルの試験経験がこれまでないことから、早期妊娠損失及び胎児異常が投与の影響による可能性を否定できなかった。したがって、カニクイザルの総合的な発生毒性に関する NOAEL は、低用量である 0.015 mg/kg（3 日に 1 回投与）であり、これは日本人 MRHD の 1 mg/週での臨床曝露量に概ね相当（0.8 倍）すると結論された。

メカニズムデータから、卵黄嚢に関連したラットの胚毒性について、ヒトとの関連性はないものと考えられるものの、その他のメカニズムが関与する可能性を完全には否定できない。ウサギ及びサルで認められた妊娠損失及び胎児異常は偶発的であるか、母動物への顕著な体重減少に関連したもののいずれかと考えられる。しかしながら、これらの所見のいずれも、ヒトとの関連性を完全には否定で

きない。ラット、ウサギ及びサルで認められた影響評価に関して不明点があり、ヒトのリスクを評価する際にはこの点を考慮すべきである。

2.6.6.1.2.3　幼若毒性

セマグルチドを幼若ラットに 11 週間投与したところ、摂餌量の減少及び体重増加抑制が認められ、セマグルチドによる体重増加抑制の程度は、ペアフィード試験デザインにより実証された制限給餌による影響よりも大きかった。セマグルチドは雌雄に対して性成熟の遅延を誘発し、性成熟到達時の体重はペアフィード対照群よりも高値であった。しかしながら、雌の性周期の規則性、雌雄の生殖器官重量又は顕微鏡的病理検査、発情行動、雌雄の繁殖能又は受胎能、妊娠中期までの雌の妊娠維持能に及ぼす影響はいずれも認められなかった。したがって、性成熟の到達遅延は有害ではないものと考えられた。

2.6.6.1.2.4　局所刺激性

反復投与毒性試験における局所刺激性評価から、溶媒又は皮下投与方法に関連した軽度の投与部位反応が時折認められたのみであった。同様の所見は局所刺激性試験〔ブタへの皮下投与及びウサギへの臨床投与経路でない経路（筋肉内、動脈内及び静脈内投与）〕でも認められた。すべての毒性試験において同一溶媒、すなわち、pH を 7.4 に調整した注射用水にリン酸水素二ナトリウム（1.42 mg/mL）、プロピレングリコール（14.0 mg/mL）及びフェノール（5.50 mg/mL）を使用し、溶媒組成は臨床試験に用いる製剤の溶媒組成と同様であった。結論として、セマグルチド製剤投与時に時折認められた組織反応は軽度であり、ヒトにおける安全性上の懸念にはならないものと考えられた。

2.6.6.1.2.5　不純物

遺伝子組換え法と[redacted]法により製造したセマグルチドとの比較試験、及び製造後強制劣化させたセマグルチドと製造直後のセマグルチドとの比較試験を実施したが、異なる製造方法又は異なる不純物プロファイルを有するセマグルチドとの間に、毒性学的差異は認められなかった。

2.6.6.1.3　結論

セマグルチドの毒性プログラムで認められた主な影響は、想定されたものであり、かつ用量制限因子となる摂餌量及び体重量に及ぼすセマグルチドの薬理作用を介した直接的又は二次的影響と考えられるものであった。

GLP-1 受容体作動薬クラスに属する他の化合物での所見と同様に、セマグルチドはマウス及びラットにおいて甲状腺 C 細胞過形成及び腫瘍性病変を誘発した。C 細胞の変化は非遺伝毒性的な機序による、げっ歯類で高感受性の GLP-1 受容体を介した特異的メカニズムにより生じる。さらに、最近のデ

ータによれば、GLP-1 受容体は健康なヒトの甲状腺では発現していないことが示されている。したがって、げっ歯類における C 細胞の変化がヒトで生じる可能性は低いと考えられる。

セマグルチドは、ラット胚が栄養供給を卵黄嚢胎盤に完全に依存する器官形成期に、GLP-1 受容体を介した反転卵黄嚢胎盤の機能不全を誘発することにより、ラットの EFD に有害影響を与えた。卵黄嚢の解剖学的構造及び機能に種差があること、サルの卵黄嚢では GLP-1 受容体の発現が認められないことから、このメカニズムは、おそらくヒトに当てはまる可能性は低いものと考えられるが、その他のメカニズムの関与を完全には否定できない。ウサギ及びサルでは、妊娠損失の増加及び胎児異常の発現頻度の軽微な増加が認められ、ラットとは異なる所見であった。これらの所見は偶発的であるか、母動物の顕著な体重減少に関連した可能性が考えられるが、当該所見のいずれについてもヒトとの関連性を完全には否定できない。ラット、ウサギ及びサルで認められた影響評価に関して不明点があり、ヒトのリスクを評価する際にはこの点を考慮すべきである。

2.6.6.1.4 試験概要の概論

Module 2.6.6 及び Module 2.6.7 に示されたすべての試験に関して、セマグルチド投与による影響があったと考えられる項目のみを記述、考察した。投与に関連した変化の記述で特に明記しない限り、値は対照群と比較して統計学的有意差があるとした。Module 2.6.7 では統計学的有意差が明らかにされている。

有害でない、毒性学的意義のない又は毒性学的関連のない（同義として使用）と考えられた変化に関して、本概要文では用量や、どの性で認められた所見かといった詳細情報を提供しない場合がある。詳細は Module 2.6.7 を参照のこと。

すべての重要な毒性試験は複数のガイドラインに準拠して実施したことから、投与群及び評価項目は概要文に簡潔に記述するにとどめることとする。結果の解釈が重要でない限り試験デザインの詳細は記載しない。試験デザインや評価項目に関する詳細は、個別の試験報告書を参照すること。

生殖発生毒性試験を除く重要な試験の概要文では、被験物質の最初の投与日を「第 1 日」と起算した。各試験報告書の大部分はこの書式と一致するが、すべてではない。最初の投与日を「第 0 日」と起算した試験報告書に関しては、本概要文では投与日を調整して記載している。

特に明記しない限り、対照群にはセマグルチド投与で用いられるものと同じ溶媒を投与した。溶媒組成はリン酸水素二ナトリウム（1.42 mg/mL）、プロピレングリコール（14.0 mg/mL）、フェノール（5.50 mg/mL）及び注射用水で、pH は 7.4 であった。一般的に溶媒対照を使用したので、反復投与毒性試験においてセマグルチド原薬の局所性刺激性評価を実施したが、同試験において製剤の局所刺激性評価は実施しなかった。製剤に関しては、生理食塩水対照群を含めた局所刺激性試験を実施した。

すべての重要な試験において、曝露の確認、TK 評価とともに製剤中濃度分析を実施した。特に明記しない限り、セマグルチド投与動物では曝露が確認され、対照動物ではセマグルチド曝露は検出できなかった。TK に関する情報は、特定の所見を評価した結果、投与との関連が考えられた場合にのみ本概要文に含めることとする。セマグルチドの TK に関する詳細は、Module 2.6.7、Module 2.6.4 及び Module 2.6.5 を参照のこと。

毒性試験では、忍容性に基づき高用量を選択した。すべての試験で認められた用量制限影響は、時に臨床兆候を伴う摂餌量及び体重に及ぼす GLP-1 受容体作動薬の想定される薬理作用と一致するものであった。摂餌量の減少及び体重低下は概して想定されており、実臨床において有用な影響と考えられたことから、これらの影響は毒性試験では有害とみなさなかった。

げっ歯類及びウサギでは、サル及びヒトと比較してセマグルチドの終末相血漿中半減期（t1/2）が短いことが確認されていることから、げっ歯類及びウサギでは投与頻度を概して 1 日 1 回とした。サルでは、当該動物種の $t_{1/2}$ に相当する、週 2～3 回の投与とした。

生殖発生毒性試験では、「異常（abnormality）」は胎児病理における「奇形（malformation）」と「変異（variation）」の両方を包含する用語として用いている。「変異」は出生後の生存機能に影響を及ぼすことのない、背景集団で生じる胎児異常（abnormality）としており、新生児の生存機能又は生存能に悪影響を及ぼすことが予想される所見である「奇形」とは区別している。また、セマグルチドの生殖発生毒性試験は 2 試験施設で実施されており、試験施設間で用語の統一はなされていないが、CTD の概要書と試験報告書全体にわたるトレーサビリティを保証するため、試験報告書で使用された用語と同一用語を使用した。

2.6.6.2 単回投与毒性試験

現行の ICH M3 ガイドライン[1]に準拠して、マウス及びラットの 2 動物種を用いた単回皮下投与毒性試験により、セマグルチドの急性毒性を評価した。さらに、マウス及びラットを用いた単回静脈内投与試験を実施した。単回投与試験の概要を表 2.6.6-2 に示す。

表 2.6.6-2　　単回投与試験の概要

Species	Administration route	Nominal dose levels (mg/kg)	MTD (mg/kg)	LD (mg/kg)	Effects defining MTD	Study ID
Mouse	Subcutaneous	0.1, 0.3, 0.6, 2.4, 12	12	>12	Body weight loss and reduced food consumption	206524
Mouse	Intravenous	6, 9	9	>9	Body weight loss and clinical signs	207117
Rat	Subcutaneous	0.1, 0.3, 0.6, 1.2, 7.5	7.5	>7.5	Body weight loss, reduced food consumption, and clinical signs	206523
Rat	Intravenous	3.75, 5	5	>5	Body weight loss and clinical signs	207114

* Lethal Dose has not been evaluated, numbers are based on data on MTD for both males and females.

2.6.6.2.1　　マウスを用いた試験

2.6.6.2.1.1　　マウスを用いた単回皮下投与毒性試験 (Module 2.6.7.5, 206524)

本試験の目的は、CD-1 マウスにセマグルチドを単回皮下投与した際の毒性を評価し、セマグルチドの MTD を確立することであった。投与群、用量、各群における動物数を表 2.6.6-3 に示す。対照群は本試験では含めなかった。

表 2.6.6-3　　マウスを用いた単回皮下投与試験（206524）－投与群、用量及び動物数

Group	Treatment	Nominal dose (mg/kg)	Number of animals	
			Males	Females
1	Semaglutide	0.1	0	3
2	Semaglutide	0.3	0	3
3	Semaglutide	0.6	0	3
4	Semaglutide	12	3	0
5	Semaglutide	2.4	0	3
6	Semaglutide	12	0	3

投与後 14 日間にわたり、生存数及び一般状態を観察した。体重、摂餌量及び摂水量を毎日測定し、全動物について第 15 日に剖検に供した。

死亡例は認められず、一般状態変化も観察されなかった。投与前と比較して、摂餌量の低下が全群で認められ、大部分の動物では投与初期の体重減少を伴っていた。12 mg/kg 投与群では、体重が投与前と比較して 11～17%の低下と、その影響は最も強かったものの、明らかな用量関連性は認められなかった。12 mg/kg 投与群では、第 5～6 日までにほとんどすべての動物で摂餌量が通常に戻り、体重は

投与前に回復した。0.6 及び 12 mg/kg 投与群の雌で摂水量の低下が認められたが、第 3 日までに投与前に回復した。剖検では異常は認められなかった。

結論として、体重低下及び摂餌量減少の程度から、セマグルチドを CD-1 マウスに単回皮下投与時の MTD は 12 mg/kg であることが示された。

2.6.6.2.1.2　　マウスを用いた単回静脈内投与毒性試験 (Module 2.6.7.5, 207117)

本試験の目的は、CD-1 マウスにセマグルチドを尾静脈から単回静脈内投与（bolus）した際の毒性を評価し、セマグルチドの MTD を確立することであった。投与群、用量、各群における動物数を表 2.6.6-4 に示す。対照群は本試験では含めなかった。

表 2.6.6-4　　マウスを用いた単回静脈内投与試験（207117）－投与群、用量及び動物数

Phase of study	Treatment	Nominal dose (mg/kg)	Number of animals	
			Males	Females
Preliminary	Semaglutide	6	1	1
Preliminary	Semaglutide	9	1	1
Main	Semaglutide	9	5	5

投与後 7 日間（予備試験）又は 14 日間（主試験）にわたり、生存数及び一般状態を観察した。体重は第 1 日～8 日まで毎日、主試験では第 15 日にも測定した。全動物について、予備試験では第 8 日に、主試験では第 15 日に剖検に供した。

死亡は認められなかった。一般状態変化として、6 及び 9 mg/kg 投与群の全動物で、投与後直ちに活動性亢進、振戦、頻呼吸が認められた。さらに、主試験では、尾の黒斑化、啼鳴、立毛が数例で認められた。予備試験では、投与後約 20 分後には回復した一方、主試験では、第 2 日までに回復した。体重減少が全動物で認められ、投与前と比較して 12～18%の減少であった。体重値はいずれの群も第 4～7 日までに投与前に回復した。剖検では異常は認められなかった。

結論として、体重低下及び観察された一般状態の程度から、セマグルチドを CD-1 マウスに単回静脈内投与時の MTD は 9 mg/kg であることが示された。

2.6.6.2.2　　ラットを用いた試験

2.6.6.2.2.1　　ラットを用いた単回皮下投与毒性試験 (Module 2.6.7.5, 206523)

本試験の目的は、SD 系ラットにセマグルチドを単回皮下投与した際の毒性を評価し、セマグルチドの MTD を確立することであった。投与群、用量、各群における動物数を表 2.6.6-5 に示す。対照群は本試験では含めなかった。

表 2.6.6-5　　ラットを用いた単回皮下投与試験（206523）－投与群、用量及び動物数

Group	Treatment	Nominal dose (mg/kg)	Number of animals	
			Males	Females
1	Semaglutide	0.1	0	3
2	Semaglutide	0.3	0	3
3	Semaglutide	0.6	0	3
4	Semaglutide	7.5	3	0
5	Semaglutide	1.2	0	3
6	Semaglutide	7.5	0	3

投与後 14 日間にわたり、生存数及び一般状態を観察した。体重、摂餌量及び摂水量を毎日測定し、全動物について第 15 日に剖検に供した。

試験期間中に死亡例は認められなかった。一般状態変化として、全群で円背位、鎮静、立毛、赤色鼻汁及び紅涙が認められた。一般状態変化の頻度及び程度に関して用量関連性は認められなかったが、雌の最高用量群では回復が緩徐傾向であった。投与前と比較して、当初初期の体重減少を伴う摂餌量の低下が全例で認められた。7.5 mg/kg 投与群では、体重が投与前と比較して雄で 10～15%、雌で 15～18%それぞれ低下し、その影響は最も強かったものの、体重減少に明らかな用量関連性は認められなかった。概して、体重は第 5～6 日までに回復したが、7.5 mg/kg 投与群の雌では、観察期間の最終日まで体重が回復しなかった。投与前と比較して、0.1 mg/kg 投与群では投与日に、0.1 mg/kg 投与群以外の全群では、第 1 日及び 2 日に摂水量の減少が認められた。概して、摂水量は投与前と比較して、第 3～6 日に高かった。剖検では異常は認められなかった。

結論として、体重低下、摂餌量の減少及び観察された一般状態の程度から、セマグルチドを SD 系ラットに単回皮下投与時の MTD は 7.5 mg/kg であることが示された。

2.6.6.2.2.2　　ラットを用いた単回静脈内投与毒性試験 (Module 2.6.7.5, 207114)

本試験の目的は、SD 系ラットにセマグルチドを尾静脈から単回静脈内投与（bolus）した際の毒性を評価し、セマグルチドの MTD を確立することであった。投与群、用量、各群における動物数を表 2.6.6-6 に示す。対照群は本試験では含めなかった。

表 2.6.6-6　　ラットを用いた単回静脈内投与試験（207114）－投与群、用量及び動物数

Phase of study	Treatment	Nominal dose (mg/kg)	Number of animals	
			Males	Females
Preliminary	Semaglutide	3.75	1	1
Preliminary	Semaglutide	5	1	1
Main	Semaglutide	5	5	5

投与後 7 日間（予備試験）又は 14 日間（主試験）にわたり、生存数及び一般状態を観察した。体重は第 1 日～8 日まで毎日、主試験では第 15 日にも測定した。全動物について、予備試験では第 8 日に、主試験では第 15 日に剖検に供した。

死亡は認められなかった。一般状態変化として、3.75 及び 5 mg/kg 投与群の数例で、投与後直ちに活動性低下、振戦、頻呼吸、立毛、尿による性器周囲の汚れ、尾の黒斑化、歩行異常及び鼻口部の褐色汚れのいずれかが数例で認められた。各群 1 例でさらに円背位、軟便、顔部及び前趾の赤色又は褐色汚れが認められた。これら一般状態は、第 2～5 日までに回復した。体重減少が全動物で認められ、投与前と比較して 13～20%の減少であった。体重値はいずれも第 5～6 日に投与前に回復した。剖検では異常は認められなかった。

結論として、体重低下及び観察された一般状態の程度から、セマグルチドを SD 系ラットに単回静脈内投与時の MTD は 5 mg/kg であることが示された。

2.6.6.3 反復投与毒性試験

反復投与毒性試験はマウス、ラット及びカニクイザルを用いた DRF 試験（GLP 非適用）及び重要な 2 週間及び 13 週間反復投与毒性試験、ラットを用いた 26 週間反復投与毒性試験、カニクイザルを用いた 52 週間反復投与毒性試験で構成される。ラット及びサルを用いた試験を実施してセマグルチドの一般毒性を評価した一方、マウスを用いた試験はがん原性試験の用量設定を支持するために実施した。

大部分の重要な反復投与毒性試験では、セマグルチドに対する忍容性を改善し、より高用量に達するために、目標とする用量期間の前に一般的に 2 週間の用量漸増期間を含めた。重要な試験の概要には、負の数となる用量漸増週日、すなわち第-1 週／第-1 日は目標とする用量期間等の前の週／日を割付した。主試験の週／日、すなわち目標とする用量での試験では、いずれも正の数を割付した。回復期間は「第 Rx 週」と記載し、例えば回復期間の第 4 週は「第 R4 週」とする。

重要な反復投与毒性試験の概要を表 2.6.6-7 に示す。

表 2.6.6-7　　皮下投与による重要な反復毒性試験の概要

Species	Duration	Nominal dose levels (mg/kg[a])	NOAEL (mg/kg[a])	Effect(s) defining NOAEL	Study ID
Mouse	2 weeks	0, 0.03, 0.09, 0.45, 2.25	Not established	A NOAEL could not be established due to thyroid C-cell hyperplasia and adrenal subcapsular cell hyperplasia at all dose levels[b]	206447
Mouse	13 weeks	0, 1, 3, 10	Not established	A NOAEL could not be established due to thyroid C-cell hyperplasia at all dose levels	206663
Rat	2 weeks	0, 0.01, 0.05, 0.21, 0.86	0.86	No treatment related adverse changes	206448
Rat	13 weeks	0, 0.01, 0.1, 0.86	0.86	No treatment related adverse changes	206662
Rat	26 weeks	0, 0.03, 0.13, 0.6	0.6	No treatment related adverse changes	207377
Cynomolgus monkey	2 weeks	0, 0.01, 0.06, 0.21, 0.75	0.75	No treatment related adverse changes	206449
Cynomolgus monkey	13 weeks	0, 0.01, 0.1, 1.0/0.5	0.1	Poor food consumption, body weight loss and dehydration leading to reduction of the high dose level and premature termination of two high dose females	206450
Cynomolgus monkey	52 weeks	0, 0.01, 0.06, 0.36	0.06	ECG abnormalities observed in one animal at the high dose level	207288

[a] Dose frequency for mouse and rat was once-daily and for cynomolgus monkey it was twice-weekly
[b] In the overall evaluation of all the studies, the observed adrenal subcapsular cell hyperplasia in the 2-week mouse study was considered unlikely to be treatment related since it was an isolated finding.

2.6.6.3.1　　マウスを用いた試験

2.6.6.3.1.1　　マウスを用いた皮下投与 DRF 試験 (Module 2.6.7.6, 207029)

本試験の目的は、CD-1 マウスにセマグルチドを 1 日 1 回、18 日間反復皮下投与し、以降に予定する 13 週間反復投与毒性試験及びがん原性試験に用いるセマグルチドの用量範囲を確立することであった。先に実施した 2 週間毒性試験（206447）において、体重に及ぼす影響が予想よりも低かったことから、

本試験を実施した。忍容性に対する影響を評価するため 2 群に用量漸増を含めた。投与群、用量、各群における動物数を表 2.6.6-8 に示す。対照群は本試験では含めなかった。

表 2.6.6-8　　マウスを用いた DRF 皮下投与試験（207029）－投与群、用量及び動物数

Group	Treatment	Day	Nominal dose (mg/kg/day)	Number of animals	
				Males	Females
1	Semaglutide	1-5	5	3	3
		6-10	10		
		11-18	20		
2	Semaglutide	1-5	10	3	3
		6-13	20		
3	Semaglutide	1-8	20	3	3

試験中、下記に示す項目を評価した：生存数、一般状態、体重、摂餌量。全例を安楽死後、剖検は実施せずに廃棄した。

死亡例は認められなかった。一般状態変化として、20 mg/kg/日投与群でのみ円背位が認められた。円背位は 3 群すべてで認められたが、用量漸増期間が長くなるにつれ、動物数及び頻度は低くなった。全群で投与開始日に一過性の体重減少が認められた。5 mg/kg/日投与群では、9～15%の減少であり、10 又は 20 mg/kg/日投与群での 13～20%の減少と比較すると、影響は軽微であった。10 及び 20 mg/kg/日への用量漸増時には、更なる体重低下は認められなかった。投与初期又は用量漸増時に摂餌量の減少が認められたが、体重の推移は概して摂餌量を反映するものであった。

結論として、円背位を呈した動物の頻度から 20 mg/kg/日は以降の試験には使用しないこととした。一方、10 mg/kg/日は用量漸増の有無に関わらず MTD であり、次の 13 週間反復投与毒性試験における高用量として適切であると考えられた。

2.6.6.3.1.2　　マウスを用いた 2 週間反復皮下投与毒性試験 (Module 2.6.7.7.A, 206447)

本試験の目的は、CD-1 マウスにセマグルチドを 1 日 1 回、2 週間皮下投与した際のセマグルチドの毒性及び TK を評価することであった。3 週間までの用量漸増期間を含めた。投与群、用量、各群における動物数を表 2.6.6-9 に示す。SD 系ラットを用いた 2 週間反復投与毒性試験（206448）、SD 系ラット及び CD-1 マウスを用いた単回投与毒性試験（206523 及び 206524）で得られた情報に基づき、用量設定を行った。

表 2.6.6-9　　マウスを用いた 2 週間皮下投与試験（206447）－投与群、用量及び動物数

Group	Treatment	Nominal Dose (mg/kg/day)				Number of Animals			
		Week -3	Week -2	Week -1	Week 1-2	Main Study		Satellite Study*	
						Males	Females	Males	Females
1	Control (Vehicle)	0	0	0	0	10	10	26	26
2	Semaglutide	0	0	0	0.03	10	10	26	26
3	Semaglutide	0	0	0.03	0.09	10	10	26	26
4	Semaglutide	0	0.03	0.09	0.45	10	10	26	26
5	Semaglutide	0.03	0.09	0.45	2.25	10	10	26	26

*For toxicokinetics

試験中又は試験終了時に、下記に示す項目を評価した：生存数、一般状態、体重、摂餌量、摂水量、眼科学的検査、血液学的検査、血液生化学的検査、TK、臓器重量、肉眼的病理検査、病理組織学的検査。

セマグルチドを投与したが、忍容性は概して良好であった。雌の 1 例で 2.25 mg/kg/日に用量漸増後、歩行異常、回転歩行、興奮、立毛、鎮静、円背位等の一般状態変化が認められたことから、第 4 日に安楽死させた。剖検では異常所見は認められず、一般状態の原因を特定することはできなかった。2.25 mg/kg/日群における別の雌の 1 例で、第 9～14 日に円背位が認められたが、同様の症状を示す動物がいなかったことから、本所見を確実に投与の影響とすることはできなかった。体重に及ぼす投与の明らかな影響は認められなかった。摂餌量は概して投与初日又はより高用量への漸増を行った日に減少した。

血液生化学的検査から、0.45 及び 2.25 mg/kg/日投与群の雌で、血漿中アラニンアミノトランスフェラーゼ濃度の軽微な低値が示され、全投与群の雌雄で同様の傾向が認められた。トランスアミナーゼを含む酵素活性の減少は通常有害ではないものと考えられている[5]。さらに、一貫性があるが、統計学的に有意差のないトリグリセリド濃度の減少が全投与群で認められた。明らかな用量反応性はないものの、本影響は摂餌量に及ぼすセマグルチドの予見される薬理作用による二次的影響であり、本変化は有害ではないものと考えられた。

2.25 mg/kg/日投与群の雌で、肝絶対重量及び相対重量の減少が認められ、摂餌量及び体重に及ぼすセマグルチドの薬理作用による二次的影響と考えられた。肝臓の病理組織学的変化が認められなかったことから、本所見は有害ではないものと考えられた。

病理検査の結果、軽微～軽度の限局性甲状腺 C 細胞の過形成及び軽度の副腎被膜下細胞の過形成が、全セマグルチド投与群で認められた。いずれの所見も明らかな用量反応は認められなかった。C 細胞の過形成は若齢 CD-1 マウスでは通常認められないが[6,7]、げっ歯類では GLP-1 アナログのクラス効果であ

ることはよく知られている[8]。したがって、C 細胞の過形成はセマグルチド投与に関連すると考えられ、前がん病変性変化であることから、本所見は有害であるものと考えられた。副腎被膜下細胞の過形成は、マウスでは加齢に伴う変化としてよく知られている[9,10]。試験実施時には、副腎被膜下細胞の過形成の投与との関連性は不明であり、前がん病変の可能性があるため、本所見は有害所見と考えられた。しかしながら、副腎被膜下細胞の過形成は本試験でしか認められなかったことから、総合的に評価すると、本所見は偶発的であり、セマグルチド投与とは関連のないものと考えられた。

結論として、CD-1 マウスにセマグルチドを 1 日 1 回、14 日間皮下投与時の忍容性は良好であった。甲状腺 C 細胞の過形成が全投与群で認められたことから、NOAEL を設定することはできなかった。

2.6.6.3.1.3 マウスを用いた 13 週間反復皮下投与毒性試験 (Module 2.6.7.7.B, 206663)

本試験の目的は、CD-1 マウスにセマグルチドを 1 日 1 回、13 週間皮下投与した際のセマグルチドの毒性及び TK を評価し、以降に予定するがん原性試験に用いる適切な用量範囲を確立することであった。投与群、用量、各群における動物数を表 2.6.6-10 に示す。CD-1 マウスを用いた 2 週間反復投与毒性試験（206447）では、体重に及ぼす影響が予想よりも低かったことから、CD-1 マウスを用いた予備毒性試験（207029）で得られた情報に基づき、用量設定を行った。

表 2.6.6-10 マウスを用いた 13 週間皮下投与試験（206663）ー投与群、用量及び動物数

Group	Treatment	Nominal Dose (mg/kg/day) Week 1-13	Number of Animals					
			Main Study		Satellite Study*		Antibody Study	
			Males	Females	Males	Females	Males	Females
1	Control (Vehicle)	0	10	10	15	15	15	15
2	Semaglutide	1	10	10	15	15	5	5
3	Semaglutide	3	10	10	15	15	5	5
4	Semaglutide	10	10	10	15	15	5	5

*For toxicokinetics

試験中又は試験終了時に、下記に示す項目を評価した：生存数、一般状態、体重、摂餌量、摂水量、眼科学的検査、血液学的検査、血液生化学的検査、尿検査、TK、抗体産生、臓器重量、肉眼的病理検査、病理組織学的検査。主試験で用いた動物の甲状腺を用いて、カルシトニン染色による追加の病理組織学的検査を実施し、抗体試験で用いた動物を最終投与 8 日後に安楽死処置した。さらに、甲状腺 C 細胞の活性化を評価するため、第 11 週の投与前、投与 1、2、4、8、12 及び 24 時間後に血漿中カルシトニン濃度を測定した。

第 1 日に対照群から得た血漿試料に、定量可能なセマグルチド濃度（LLOQ として 0.571 nmol/L の 2～30 倍）が含まれていたことから、対照群の動物が第 1 日に誤ってセマグルチドに曝露されていたことが明らかとなった。このことは、調剤濃度分析で対照群に低濃度のセマグルチドが認められたことと一致するものであった。対照群で認められた高血中濃度は、1 mg/kg/日群の投与 24 時間後の血中濃度の約 10 倍低く、調剤濃度は 1 mg/kg/日群の 50 倍低かった。第 11～13 週に約 1 週間分調製した調剤濃度には、定量可能な濃度のセマグルチドは含まれておらず、第 13 週に対照群から得られた血漿にも含まれていなかった。したがって、本所見は例外的に認められたものであり、試験結果の完全性に影響を及ぼすものではないと考えられた。

試験期間中、サテライト試験で 1 例が死亡し、主試験で 2 例が麻酔中に死亡し、1 例を安楽死させた。低用量群である 1 mg/kg/日投与群の雄 2 例（No.15 及び 20）が第 72 日の麻酔投与により死亡した。剖検／病理検査において死因は特定できなかったが、麻酔に関連したげっ歯類の死亡は時折認められている。高用量群では同様の所見が認められなかったことから、低用量群の雄で認められた死亡はセマグルチドではなく、麻酔操作に関連したものと考えられた。

頸部の損傷がみられたことから、3 mg/kg/日投与群の雄 1 例（No.30）を第 5 日に安楽死させた。頸部の損傷に関して、病理組織学的検査の結果、中等度の潰瘍性皮膚炎と診断された。一般的な皮膚又は投与部位にセマグルチド投与に関連した影響は認められなかったことから、中用量群の No.30 の雄の安楽死に起因する皮膚の損傷は投与に関連したものではなく、偶発的所見と考えられた。

10 mg/kg/日投与群の雌 1 例（No.196）は第 69 日に死亡しているのが見つかったが、サテライト試験であったことから本動物の死亡に関して限られた情報しか得られなかった。剖検の結果、自己融解しており、腸間膜が赤色化し、舌の共食いが認められた。サテライト試験の動物に対しては病理組織学的検査を実施しなかったことから、本動物の死因を特定することはできなかったが、本試験及びその他の試験で類似の突然死が認められていないことから、死亡はセマグルチド投与によるものではないと考えられた。

投与に関連する一般状態変化として、3 及び 10 mg/kg/日投与群において円背位が認められ、雄では立毛も認められた。投与初期の体重減少及び体重増加抑制が雄の 3 mg/kg/日以上及び雌の全投与群で認められ、体重増加は高用量群の雄で 21%、雌で 29%抑制された。全群で初回投与後に摂餌量が減少し、3 及び 10 mg/kg/日投与群では、13 週間にわたり摂餌量の低下傾向がみられたことから、体重の推移は概して摂餌量を反映するものであった。

血液生化学的検査から、概ね用量関連性のある血漿中トリグリセリド濃度の減少が雌雄で認められたが、統計学的有意差は中用量の雌でのみ認められた。トリグリセリド濃度の減少は、予見される摂餌量及び体重に及ぼす薬理作用による二次的影響であり、有害ではないものと考えられた。

10 mg/kg/日投与群の雄で軽微な肝絶対及び相対重量の減少が認められ、同群の雄の 6/10 例で肝グリコーゲン含量の減少が認められたことと一致した。肝重量の減少及び肝グリコーゲン含量の減少は、摂餌量に及ぼすセマグルチドの薬理作用による二次的影響と考えられた。

高用量群の雄の 4/10 例で、対照群（0/10 例）と比較して軽微な小葉中心性肝細胞肥大が認められた。10 mg/kg/日という非常に高い投与用量（AUC に基づく臨床曝露量である 1 mg/週の 138 倍に相当）は、セマグルチドの高負荷による肝細胞肥大の所見と一致するものであり、本剤投与との関連性は否定できない。肝重量の増加を伴わずに軽微な肝細胞肥大が認められたのみであった。肝細胞障害の兆候は認められず、測定した血液生化学的検査項目で肝障害を示唆する変化は認められなかった。したがって、肝細胞肥大は有害ではないものと考えられた。

カルシトニン染色の使用により、投与に関連した軽微～軽度の限局性甲状腺 C 細胞の過形成がセマグルチド投与全群で認められた。対照群と比較して、全投与群の雌で軽微～軽度の鰓後腺管の拡張について発現頻度の増加が認められた。さらに、C 細胞集簇（5～10 個の C 細胞が限局的に蓄積したもの）の発現頻度の増加が 10 mg/kg/日投与群の雄で認められ、雌では 1 mg/kg/日投与群で C 細胞集簇の発現頻度が最も高かった。第 11 週に得られた血漿試料分析から、セマグルチド投与動物の全例でカルシトニンが認められ、対照群と比較して、概して非常に高濃度であった。C 細胞の過形成は、げっ歯類では GLP-1 受容体作動薬のクラス効果であることがよく知られており、前がん病変的な変化であることから、本所見は有害であると考えられた。

結論として、CD-1 マウスにセマグルチドを 1 日 1 回、13 週間皮下投与した結果、セマグルチドの薬理作用によると考えられる想定した影響である体重増加抑制及び摂餌量の減少が認められた。甲状腺 C 細胞の過形成が全投与群で認められたことから、NOAEL を設定することはできなかった。

2.6.6.3.2 ラットを用いた試験

最初に実施した皮下投与による DRF 試験を除くすべてのラット試験では、市販中又は開発中の他の GLP-1 受容体作動薬と直接比較するため、Sprague Dawley（SD）系ラットを用いた。

2.6.6.3.2.1 ラットを用いた皮下投与用量設定 DRF 試験 (Module 2.6.7.6, 206062)

本試験の目的は、以降に予定する重要な毒性試験に用いるため、セマグルチドの毒性を評価し適切な用量範囲を確立することであった。Wistar 系ラットに週 3 回、5 週間にわたりセマグルチドを皮下投与した。忍容性に対する影響を評価するため 2 群に用量漸増を含めた。投与群、用量、各群における動物数を表 2.6.6-11 に示す。

表 2.6.6-11　　ラットを用いた用量設定 DRF 皮下投与試験（206062）－投与群、用量及び動物数

Group	Treatment	Nominal dose (mg/kg three times per week)						Number of animals	
		Week 1	Week 2	Week 3	Week 4	Week 5	Week 6	Males	Females
1	Control (Vehicle#)	0	0	0	0	0	0	5	5
2	Semaglutide	0.01	0.01	ND	ND	ND	ND	5	5
3	Semaglutide	ND	0.1[b]	0.1	ND	ND	ND	5	5
4	Semaglutide	ND	ND	0.03	0.1	0.1 Day 35: 1.17[c]	ND	5	5
5	Semaglutide	ND	0.03	0.1	0.5	1.0	2.0	5	5

ND Not dosed
[a] Phosphate buffered saline was used as vehicle in this study
[b] Animals were not dosed on Day 9
[c] The animals were not dosed any further due to lack of test substance.

試験中又は試験終了時に、下記に示す項目を評価した：生存数、一般状態、体重、血液学的検査、血液生化学的検査、TK、臓器重量（心臓、腎臓、肝臓、第 1、4、5 群のみ）、肉眼的病理検査、選択臓器／組織の病理組織学的検査（異常が認められた臓器／組織、心臓、投与部位、腎臓、肝臓、膵臓、甲状腺）。

投与用量のセマグルチドに対する忍容性は良好であった。死亡例は認められず、投与に関連した一般状態変化も観察されなかった。0.01 mg/kg を除く全投与群で、投与開始時又は用量漸増実施時に一過性の体重減少（投与前値と比較して最大 15%の減少）、及び試験期間を通じて体重増加抑制が認められた。体重増加抑制の程度から、追加の用量漸増は実施しなかった。投与初期の体重減少は、0.1 mg/kg 投与を最初に実施した群で最も顕著であった。

血液生化学的検査から、セマグルチド投与群の雄でトリグリセリド濃度の軽微な低下が認められた。5 週間投与時の動物（第 5 群）では、肝絶対及び相対重量の軽微な減少が認められた。これらの影響は、摂餌量及び体重に及ぼすセマグルチドの薬理作用による二次的影響と考えられた。

検討した臓器について、肉眼的検査及び病理組織学的検査を実施したが、投与に関連した所見は認められなかった。

結論として、セマグルチドを適切に用量漸増後、週 3 回、最大 2 mg/kg まで投与時の忍容性は良好であった。予見したとおり体重減少／体重増加抑制が認められ、二次的影響と考えられた。体重増加抑制の程度から、週 3 回の 2 mg/kg 以上の用量漸増は使用しないこととした。

2.6.6.3.2.2　　ラットを用いた 2 週間反復皮下投与毒性試験 (Module 2.6.7.7.C, 206448)

本試験の目的は、以降に予定する重要な毒性試験に用いるため、セマグルチドを SD 系ラットに 1 日 1 回、2 週間皮下投与時の毒性及び TK を評価することであった。最大 3 週間の用量漸増期間を含めた。投与群、用量、各群における動物数を表 2.6.6-12 に示す。以前に実施した Wistar 系ラットを用いた DRF 試験（206062）で得られた情報に基づき、用量設定を行った。

表 2.6.6-12　　ラットを用いた 2 週間皮下投与試験（206448）ー投与群、用量及び動物数

Group	Treatment	Nominal Dose (mg/kg/day)				Number of Animals	
		Week -3	Week -2	Week -1	Week 1-2	Males	Females
1	Control (Vehicle)	0	0	0	0	10	10
2	Semaglutide	0	0	0	0.01	10	10
3	Semaglutide	0	0	0.01	0.05	10	10
4	Semaglutide	0	0.01	0.05	0.21	10	10
5	Semaglutide	0.01	0.05	0.21	0.86	10	10

試験中又は試験終了時に、下記に示す項目を評価した：生存数、一般状態、体重、摂餌量、摂水量、眼科学的検査、血液学的検査、血液生化学的検査、尿検査、TK、臓器重量、肉眼的病理検査、病理組織学的検査。

試験用量のセマグルチドに対する忍容性は良好であった。投与に関連した死亡又は一般状態変化は認められなかった。実験上の手技のミスにより、雌の 1 例が死亡した。全投与群で、初回投与時又は用量漸増実施時に、投与初期における一過性の体重減少、及び試験期間を通じて体重増加抑制が認められた。目標用量を 2 週間投与時の体重増加抑制は、雄で最大 59%、雌で最大 73%であったが、完全な用量依存性が認められたわけではなかった。全投与群で初回投与時に摂餌量が減少したこと、及び目標用量を 2 週間投与時には全体的に摂餌量の減少傾向が認められたことから、体重の推移は概して摂餌量を反映するものであった。

血液学的検査の結果、統計学的に有意ではないものの、用量関連性のある白血球及びリンパ球数の減少が雄で認められた。しかしながら、変化の程度が小さいこと、及び雌では同様の変化が認められなかったことから、投与との関連性は不明であり、本変化は有害でないものと考えられた。血液生化学的検査では、アルカリホスファターゼ（ALP）の軽微な増加傾向が雌雄で認められたが、統計学的有意差は、雌の高用量群（0.86 mg/kg/日）でのみ認められた。ラットでは、小腸性及び骨性アイソザイムが血漿中 ALP の主要構成成分であり[11]、これらの組織では投与に関連した変化が認められなかったことから、ALP の増加は有害ではないものと考えられた。SD 系ラットでは、食餌制限により ALP が増加することが示されている[12]。さらに、トリグリセリド及びクレアチニンの軽微な減少が雌雄の主に高

用量群で認められたが、全群で統計学的有意差は認められなかった。トリグリセリドの変化は、摂餌量及び体重に及ぼすセマグルチドの薬理作用による二次的影響と考えられ、クレアチニンもおそらく同様の二次的影響と考えられた。血液生化学的検査で認められた変化の程度が小さかったこと、対応する病理組織学的変化が認められなかったことから、本変化は有害ではないものと考えられた。

複数の臓器（脳、心臓、腎臓、肝臓、肺、脾臓及び精巣）重量について、セマグルチド投与による影響が認められた。臓器絶対重量が減少したが臓器相対重量は変化がなかった例、又は臓器絶対重量には変化がなかったが臓器相対重量が増加した例のいずれかが認められたことから、臓器重量に及ぼす影響は体重に対するセマグルチドの薬理作用を介した二次的影響を示すものであった。例外として対照群と比較して雄の肝絶対及び相対重量の減少が認められたが、対応する病理組織学的変化が認められなかったことから、肝重量の減少は有害ではないものと考えられた。

臓器及び組織の肉眼的病理検査及び病理組織学的検査では、投与に関連した変化は認められなかった。

結論として、セマグルチドを 1 日 1 回、2 週間にわたり SD 系ラットに皮下投与したところ、セマグルチドの想定される薬理作用に関連した体重増加抑制及び摂餌量の減少が認められた。有害性変化が認められなかったことから、NOAEL は高用量である 0.86 mg/kg/日と考えられた。

2.6.6.3.2.3 ラットを用いた 13 週間反復皮下投与毒性及び 4 週間回復性試験(Module 2.6.7.7.D, 206662)

本試験の目的は、セマグルチドを SD 系ラットに 1 日 1 回、13 週間皮下投与時の毒性及び TK を評価することであった。最大 2 週間の用量漸増期間を含めた。投与群、用量、各群における動物数を表 2.6.6-13 に示す。以前に実施した DRF 試験（206062）及び 2 週間反復投与毒性試験（206448）で得られた情報に基づき、用量設定を行った。4 週間の回復期間中及び終了時に、投与に関連した変化の回復性を評価した。

表 2.6.6-13 ラットを用いた 13 週間皮下投与試験（206662）ー投与群、用量及び動物数

Group	Treatment	Nominal Dose (mg/kg/day)			Number of Animals			
		Week -2	Week -1	Week 1-13	Main Study		Recovery Study	
					Males	Females	Males	Females
1	Control (Vehicle)	0	0	0	10	10	6	6
2	Semaglutide	0	0	0.01	10	10	6	6
3	Semaglutide	0	0.01	0.1	10	10	6	6
4	Semaglutide	0.01	0.1	0.86	10	10	6	6

試験中又は試験終了時及び回復期間終了時に、下記に示す項目を評価した：生存数、一般状態、体重、摂餌量、摂水量、眼科学的検査、血液学的検査、血液生化学的検査、尿検査、TK、抗体産生、臓器重量、肉眼的病理検査、病理組織学的検査。

試験期間中に死亡例は認められなかった。一般状態変化として、高用量群の数例で、主に投与期間の最後 5 週間で円背位が認められたが、忍容性は良好であった。全投与群で顕著な体重増加抑制が認められた。目標用量を 13 週間投与時の体重増加は、雄で最大 44%、雌で最大 50%抑制された。用量漸増時に高用量の 2 群で明らかな一過性の摂餌量の減少が認められたこと、目標用量を 13 週間投与時の摂餌量は全体的に減少傾向であったことから、体重の推移は概して摂餌量を反映するものであった。4 週間の回復期間中、低用量群（0.01 mg/kg/日）では統計学的有意差が認められなかったものの、対照群と比較して、全投与群で顕著な体重増加促進が認められたことから、体重に及ぼす影響からの回復性が認められた。個体別（ケージ）の摂餌量データから、0.1 及び 0.86 mg/kg/日のセマグルチド投与群において、特に回復第 1～2 週間で摂餌量の増加傾向が認められた。

血液生化学的検査の結果、セマグルチド投与群では軽微な変化（クレアチニン、カリウム、トリグリセリド及び総タンパク質の減少）が認められた。4 週間の回復期間終了時に、クレアチニン、カリウム及び総タンパク質の変化に回復性が認められた。一方、トリグリセリド濃度は、雄では正常に回復したが、雌では依然として軽微な低値を示した。変化の程度が小さいこと、摂餌量の減少との関連性が考えられること、及び関連する病理組織学的変化が認められなかったことから、血液生化学的検査で認められた変化は有害でないものと考えられた。

ほとんどすべての臓器重量がセマグルチド投与による影響を受けた。臓器絶対重量の減少又は臓器相対重量の増加が認められたことから、臓器重量に及ぼす影響は、体重に及ぼすセマグルチドの薬理作用を介した二次的影響であることが示された。雄では、肝絶対重量及び相対重量の減少が認められた。対応する病理組織学的所見が認められなかったことから、肝重量の減少は摂餌量に及ぼすセマグルチドの二次的影響によるものであり、有害ではないものと考えられた。4 週間の回復期間終了時に、対照群とセマグルチド投与群との間に臓器重量の明らかな違いは認められなかったことから、臓器重量に及ぼすセマグルチドの影響からの完全又は部分的な回復性が実証された。

臓器及び組織の肉眼的病理検査及び病理組織学的検査では、投与に関連した変化は認められなかった。

結論として、セマグルチドを 1 日 1 回、13 週間にわたり SD 系ラットに皮下投与したところ、セマグルチドの想定される薬理作用に関連した体重増加抑制及び摂餌量の減少が認められた。さらに、血液生化学的検査項目の軽微な変化及び臓器重量の変化が認められ、摂餌量及び体重に及ぼすセマグルチ

ドの二次的影響と考えられた。有害性変化が認められなかったことから、NOAEL は高用量である 0.86 mg/kg/日と考えられた。

2.6.6.3.2.4 ラットを用いた 26 週間反復皮下投与毒性及び 4 週間回復性試験 (Module 2.6.7.7.E, 207377)

本試験の目的は、セマグルチドを SD 系ラットに 1 日 1 回、26 週間皮下投与時の毒性及び TK を評価することであった。目標用量レベルでの 26 週投与期間の前に、2 週間の用量漸増期間を含めた。投与群、用量、各群における動物数を表 2.6.6-14 に示す。以前に実施した 13 週間反復投与毒性試験（206662）で得られた情報に基づき、用量設定を行った。13 週間反復投与毒性試験において、体重抑制に対する顕著な影響が認められたことから、最高用量は 13 週間反復投与毒性試験（0.86 mg/kg/日）よりも低め（0.6 mg/kg/日）に設定した。4 週間の回復期間中及び終了時に、投与に関連した変化の回復性を評価した。

表 2.6.6-14 ラットを用いた 26 週間皮下投与試験（207377）－投与群、用量及び動物数

Group	Treatment	Nominal Dose (mg/kg/day)[a]			Number of animals			
					Main study		Recovery study	
		Week -2	Week -1	Weeks 1-26	Males	Females	Males	Females
1	Control (Vehicle)	0	0	0	20	20	5	5
2	Semaglutide	0.03	0.03	0.03	20	20	5	5
3	Semaglutide	0.03	0.13	0.13	20	20	5	5
4	Semaglutide	0.03	0.13	0.6	20	20	5	5

[a] See section 2.6.6.9 for information about corresponding achieved exposures and ratios to MRHD in Japanese

試験中又は試験終了時及び回復期間終了時に、下記に示す項目を評価した：生存数、一般状態、体重、摂餌量、眼科学的検査、血液学的検査、血液生化学的検査、尿検査、TK、抗体産生、臓器重量、肉眼的病理検査、病理組織学的検査。

各投与群の数例でやせた個体が認められたものの、試験用量のセマグルチドに対する忍容性は概して良好であった。試験期間中に 1 例が死亡、1 例を安楽死させた。すなわち、第 15 週に低用量群の雄（No.39）が死亡し、回復期間の第 2 週には対照群の雄（No.23）を安楽死させた。対照群の雄は重度の呼吸不全がみられたことから安楽死させた。主な肉眼所見として胸部に大型で柔らかな暗白色様の集塊が認められたが、これは完全に胸腺と替わっており、心膜にもかかっていた。本所見は病理組織学的検査によりシュワン細胞腫であることが確認された。低用量群の雄（No.39）を病理組織学的検査に供したところ、死因はリンパ腫によるものであることが明らかとなった。本所見は低用量群でのみ認められた所見であること、及びリンパ腫は若齢 SD 系ラットで自然発生的に認められることから[13,14]、本所見は投与の影響ではないものと考えられた。

全投与群で投与に関連した体重増加抑制が認められた。目標用量を 26 週間投与時の体重増加は、対照群と比較して雄で最大 30%、雌で最大 44%抑制された。用量漸増時に高用量の 2 群で明らかな一過性の摂餌量の減少が認められたこと、及び 26 週間投与時の摂餌量は全体的に減少傾向であったことから、体重の推移は概して摂餌量を反映するものであった。4 週間の回復期間中、対照群と比較して、全投与群で顕著な体重増加促進が認められたことから、体重に及ぼす影響からの回復性が認められた。回復期間中、投与群の摂餌量は対照群と比較して増加した。

血液学的検査の結果、投与群の雌雄で網状赤血球数の軽微な減少、及び雌でヘマトクリット、ヘモグロビン及び赤血球数の軽微な増加が認められた。対照群との差異に関して必ずしも統計学的有意差が認められたわけではなかったものの、これら所見に明らかな用量反応性は認められなかった。摂餌量の減少により赤血球項目の増加及び網状赤血球の減少が誘発されることが示されている[15]。当該所見は、4 週間の回復期間後には認められなかったことから、摂餌量に及ぼすセマグルチドの薬理作用による二次的影響と考えられ、有害ではないものと考えられた。第 26 週時の雌で、活性化部分トロンボプラスチン時間（APTT）の軽微な延長が認められ、同様の傾向は雄でも認められたが統計学的有意差は認められなかった。4 週間の回復期間終了時には、特筆すべき差異は認められず、本所見の程度が小さいこと、及びその他の項目で凝固系に及ぼす影響が認められなかったことから、本所見は有害でないものと考えられた。

血液生化学的検査の結果、第 14 週時の雄及び第 26 週時の雌で ALP 活性の軽微な高値が認められたが、明らかな用量反応性は認められなかった。4 週間の回復期間終了時までに、対照群との差異は認められなくなった。ラットでは、小腸性及び骨性アイソザイムが血漿中 ALP の主要構成成分であり [11]、これらの組織では投与に関連した有害性変化が認められなかったことから、ALP の増加は有害ではないものと考えられた。

その他に軽微な血液生化学項目の変化（血漿中クレアチニン、総タンパク質、アルブミン及び α1 グロブリンの軽微な減少及び尿素濃度の軽微な増加）が認められた。顕著な変化として、血漿中トリグリセリド濃度の減少が認められた。一般的に、変化は部分的～完全に可逆性であった。血液生化学的変化は、摂餌量に及ぼすセマグルチドの薬理作用による二次的影響と考えられ、いずれの変化も有害ではないものと考えられた。

尿において、複数の項目が明らかにセマグルチド投与による影響を受けたが、概して用量反応性は認められなかった。尿中タンパク質濃度の減少、ナトリウム濃度の増加及びカリウム濃度の減少と共に尿量の増加が認められた。尿量及びナトリウム濃度の増加は、近位尿細管からのナトリウム再吸収に及ぼす GLP-1 の既知の抑制効果によるものと考えられ[16]、タンパク質レベルの減少は摂餌量減少によ

る二次的影響と考えられる。投与に関連した腎臓の病理組織学的変化が認められなかったことから、尿中項目の変化はいずれも有害ではないものと考えられた。

ほぼすべての臓器重量がセマグルチド投与による影響を受けた。臓器絶対重量の減少又は臓器相対重量の増加がほとんどの臓器で認められたことから、臓器重量に及ぼす影響は、概して体重に及ぼすセマグルチドの薬理作用を介した二次的影響によるものと考えられた。例外として肝絶対重量及び相対重量の減少が認められた。本所見は、可逆性の病理組織学的所見である肝細胞グリコーゲン沈着の減少を示唆する肝細胞の非染色部位（rarefaction）の減少と関連したことから、摂餌量の減少によるものであり、有害ではないものと考えられた。4 週間の回復期間終了時に、雄では肝重量が依然としてわずかに低かったが、雌では対照群と投与群との間に差異は認められなかった。統計学的有意差を伴う子宮相対重量の軽微な増加傾向が認められ、子宮絶対重量も同様の傾向であったが、統計学的有意差は認められなかった。子宮重量の増加は性周期ステージによる子宮の体液膨張と関連しており、投与群と対照群との差異は偶発的と考えられた。概して、4 週間の回復期間終了時にセマグルチドの影響からの完全又は部分的な回復性が認められた。肝臓以外に対応する病理組織学的変化が認められなかったことから、臓器重量の変化は体重に及ぼすセマグルチドの二次的影響であり、有害ではないと考えられた。

病理組織学的検査の結果、投与群の全例で投与に関連した軽微な十二指腸ブルンナー腺の肥大が認められたが、全例とも変化の程度は軽微であったことから、重症度に用量反応性は認められなかった。4 週間の回復期間後、ブルンナー腺の肥大は認められなかったことから、本変化は完全に可逆性であることが実証された。ブルンナー腺は、上部消化管における酵素液として重炭酸を含むアルカリ性の粘液分泌に関与し、酸性の胃内腔消化物から上部消化管を保護する。ブルンナー腺では GLP-1 受容体が高発現しており[17,18]、肥大はセマグルチドによる GLP-1 受容体の活性化に関連するものと考えられた。ブルンナー腺で認められた所見は、ブルンナー腺又は消化管粘膜の炎症又は細胞障害のいずれにも関連するものではなかったこと、休薬後に完全な回復性が認められたことから、本所見は有害ではないものと考えられた。

結論として、セマグルチドを 1 日 1 回、26 週間にわたり SD 系ラットに皮下投与したところ、セマグルチドの想定される薬理作用に関連した体重増加抑制及び摂餌量の減少が認められた。臨床検査項目の軽微な変化及び臓器重量の変化が認められたが、摂餌量及び体重に及ぼすセマグルチドの二次的影響と考えられた。さらに、有害でない薬理作用を介した尿中項目の変化及び十二指腸ブルンナー腺の肥大が認められた。有害性変化が認められなかったことから、NOAEL は高用量である 0.6 mg/kg/日と考えられた。

2.6.6.3.3　　サルを用いた試験

2.6.6.3.3.1　　カニクイザルを用いた皮下投与用量設定 DRF 試験 (Module 2.6.7.6, 206059)

本試験の目的は、以降に予定する重要な毒性試験に用いるため、セマグルチドの毒性を評価し適切な用量範囲を確立することであった。カニクイザルに約週 3 回、7 週間にわたりセマグルチドを皮下投与した。忍容性に対する影響を評価するため全群に用量漸増を含めた。投与群、用量、各群における動物数を表 2.6.6-15 に示す。対照群は本試験では含めなかった。

表 2.6.6-15　　カニクイザルを用いた用量設定 DRF 皮下投与試験（206059）ー投与群、用量及び動物数

Group	Treatment#	Day	Nominal dose (mg/kg)	Number of animals	
				Males	Females
1	Semaglutide	1*	0.1	1	1
		9, 11, 13	0.01		
		15, 17, 20	0.03		
		22, 24, 27	0.1		
		29, 31, 34, 36, 38, 41	0.3		
		43, 50**	1.0		
2	Semaglutide	7, 9, 11	0.01	1	1
		13, 15, 17	0.03		
		20, 22, 24	0.1		
		27, 29, 31, 34, 36, 38, 41	0.3		
3	Semaglutide	15, 17, 20	0.03	2	2
		22, 24, 27, 29, 31, 34***	0.1		

*Animals only dosed on Day 1 due to adverse clinical signs
**Both animals dosed on Day 43, but due to adverse clinical signs they were taken off dose and only the male was dosed again on Day 50. The female was euthanised on Day 50 and the male subsequently on Day 52
*** One male and one female were euthanised on Day 29
# Phosphate buffered saline was used as vehicle in this study

試験中又は試験終了時に、下記に示す項目を評価した：生存数、一般状態、体重、摂餌量、血液学的検査、血液生化学的検査〔投与前、投与後第 3 日（第 1 群）、第 52 日（第 1 群の雄）、第 29 日（第 3 群の雄 1 例及び雌 1 例）〕、TK、臓器重量、肉眼的病理検査、病理組織学的検査。

開始用量として 0.1 mg/kg/日を投与（第 1 群）したところ、第 1 日の投与約 8.5 時間後に雌で嘔吐が認められた。第 3 日の雌で軽度の脱水症状が認められ、雌雄とも食餌をほとんどとらず、投与前値と比較して約 10%の体重減少が認められた。以上より、この 2 例の投与を第 9 日まで延期し、投与レベルを 0.01 mg/kg の週 3 回投与に減らした。0.01 mg/kg の週 3 回投与又は 0.03、0.1、0.3 mg/kg の週 3 回投与による用量漸増では、体重減少又は一般状態変化は認められなかった。0.01 mg/kg の週 3 回投与群

（第 2 群）の 2 例に関して、0.1 及び 0.3 mg/kg の週 3 回へ用量漸増した際に約 10%の段階的な体重減少が認められたものの、セマグルチド投与に関連した一般状態変化は認められなかった。

第 43 日に、第 1 群の 2 例に 1 mg/kg を投与した。投与直後の一般状態変化及び体重減少は認められなかったが、第 44 日の 2 例に軽度の脱水が認められたことから補水液を与えた。補水液の継続投与にも関わらず、雌では脱水が続き投与できる状態ではなかった。したがって、1 mg/kg の単回投与 7 日後、すなわち第 50 日に安楽死処置した。雄では 1 mg/kg の 2 回目の投与である第 50 日に一般状態が改善した。しかしながら、脱水があり食事をほとんどとらず、再度約 10%の体重減少が認められたことから、雄は第 52 日に安楽死処置した。したがって、1.0 mg/kg の投与量は MTD を超えており反復投与には適さないものと考えられた。

残り 4 例（うち雌雄各 1 例は、本試験の 5 週間前に薬物動態試験にて 0.008 mg/kg のセマグルチドを単回投与経験があった）にセマグルチドを 0.03 mg/kg の週 3 回、1 週間投与し、以降は 0.1 mg/kg に用量漸増した。薬剤投与経験がある 2 例では、セマグルチド投与に関連した一般状態変化は認められなかったが、0.1 mg/kg に用量漸増時に軽微な体重減少が認められた。一方、薬剤投与経験のない 2 例では、0.03 mg/kg の週 3 回投与時には一般状態変化は認められなかったが、0.1 mg/kg に用量漸増時に体重減少、脱水及び鎮静が認められたことから、2 週間投与後の第 29 日にこの 2 例を安楽死処置した。

全投与群で摂餌量が減少し、主として 0.1 mg/kg の週 3 回投与以上の群で認められた。血液生化学的検査の結果、第 1 群で第 3 日にビリルビン濃度の高値が認められたが、第 52 日、及び第 29 日に安楽死処置した第 3 群の 2 例では、同様の変化は認められなかった。対応する肝酵素の変化又は病理組織学的変化は認められなかった。セマグルチドを投与した 4/8 例で、膵外分泌腺におけるびまん性又は限局性の腺房細胞の脱顆粒が認められた。本所見は摂餌量の減少による二次的変化と考えられている[19,20]。

結論として、セマグルチドを適切に用量漸増後、最大 0.3 mg/kg の週 3 回投与時の忍容性は良好であった。想定した薬理作用を介した摂餌量及び体重に及ぼす影響及び二次的変化と考えられる影響が認められた。安楽死処置の原因となった脱水を含む一般状態変化、ならびに摂餌量減少及び体重減少が認められたことから、1.0 mg/kg の週 3 回投与は MTD を超えたことが示され、更なる用量漸増はできないと判断した。

2.6.6.3.3.2　カニクイザルを用いた 2 週間反復皮下投与毒性試験 (Module 2.6.7.7.F, 206449)

本試験の目的は、セマグルチドをカニクイザルに週 2 回、2 週間皮下投与時の毒性及び TK を評価することであった。最大 3 週間の用量漸増期間を含めた。投与群、用量、各群における動物数を表 2.6.6-16 に示す。以前に実施した DRF 試験（206059）で得られた情報に基づき、用量設定を行った。

表 2.6.6-16　　カニクイザルを用いた 2 週間反復皮下投与毒性試験（206449）－投与群、用量及び動物数

Group	Treatment	Nominal Dose (mg/kg twice-weekly)				Number of Animals	
		Week -3	Week -2	Week -1	Week 1-2	Males	Females
1	Control (Vehicle)	0	0	0	0	3	3
2	Semaglutide	0	0	0	0.01	3	3
3	Semaglutide	0	0	0.01	0.06	3	3
4	Semaglutide	0	0.01	0.06	0.21	3	3
5	Semaglutide	0.01	0.06	0.21	0.75	3	3

試験中又は試験終了時に、下記に示す項目を評価した：生存数、一般状態、体重、眼科学的検査、ECG、血液学的検査、血液生化学的検査、尿検査、TK、臓器重量、肉眼的病理検査、病理組織学的検査。

試験用量のセマグルチドに対する忍容性は良好であった。試験中に死亡は認められず、投与に関連した一般状態変化も認められなかった。

血液生化学的検査の結果、全投与群の雄でクレアチンホスホキナーゼ（CPK）活性が対照群よりも低値であった。しかしながら、1 例を除き CPK は投与前値よりも有意に増加した。したがって、本所見の投与との関係は不明であるが、対応する変化が認められなかったことから、本所見は有害ではないものと考えられた。

尿検査の結果、全投与群の雄で尿量が減少したが、用量反応性は認められず、統計学的有意差は 0.06 及び 0.75 mg/kg の週 2 回投与群でのみ認められた。雌では、主として高用量で尿中ナトリウム、カリウム及び塩素濃度の減少傾向がみられた（ナトリウム濃度のみ統計学的有意差あり）が、以上の項目に明らかな用量反応性は認められなかった。

検査した臓器及び組織において、投与に関連した肉眼的病理変化又は病理組織学的変化は認められなかった。

結論として、カニクイザルにセマグルチドを週 2 回、2 週間皮下投与時の忍容性は良好であり、体重増加に及ぼす影響も認められなかった。有害性変化が認められなかったことから、NOAEL は最高用量である 0.75 mg/kg の週 2 回投与と考えられた。

2.6.6.3.3.3 カニクイザルを用いた 13 週間反復皮下投与毒性及び 4 週間回復性試験 (Module 2.6.7.7.G, 206450)

本試験の目的は、セマグルチドをカニクイザルに週 2 回、13 週間皮下投与時の毒性及び TK を評価することであった。最大 2 週間の用量漸増期間を含めた。投与群、用量、各群における動物数を表 2.6.6-17 に示す。以前に実施した DRF 試験（206059）及び 2 週間反復投与毒性試験（206449）で得られた情報に基づき、用量設定を行った。2 週間反復投与毒性試験では明らかな影響が認められなかったことから、高用量を 2 週間反復投与毒性試験の 0.75 mg/kg の週 2 回投与から 1.0 mg/kg の週 2 回投与に上げた。4 週間の回復期間中及び終了時に、投与に関連した変化の回復性を評価した。

表 2.6.6-17 カニクイザルを用いた 13 週間反復皮下投与毒性試験（206450）－投与群、用量及び動物数

Group	Treatment	Nominal Dose (mg/kg twice-weekly)			Number of Animals			
		Week -2	Week -1	Week 1-13	Main Study		Recovery Study	
					Males	Females	Males	Females
1	Control (Vehicle)	0	0	0	4	4	2	2
2	Semaglutide	0	0	0.01	4	4	2	2
3	Semaglutide	0	0.01 and 0.03*	0.1	4	4	2	2
4	Semaglutide	0.01 and 0.03*	0.1 and 0.3*	1.0/0.5#	4	4	2	2

*Where two dose levels are mentioned for a week, the animals were dosed once with each dose that week
#Due to adverse effects, dose level was lowered from 1.0 to 0.5 mg/kg twice-weekly from Day 25 and Day 32 for females and males, respectively. See text for details.

試験中又は試験終了時に、下記に示す項目を評価した：生存数、一般状態、体重、眼科学的検査、ECG、血液学的検査、血液生化学的検査、尿検査、TK、抗体産生、臓器重量、肉眼的病理検査、病理組織学的検査。

高用量群（1.0 mg/kg の週 2 回投与）の雌 3 例で、低摂餌量及び体重減少に関連した脱水が継続したことから、高用量群の全例に対して第 18 日から投与を休止した。雄では第 22 日から 1.0 mg/kg の用量での投与を再開し、投与の影響がみられなかった雌では第 25 日から 0.5 mg/kg に用量を下げて投与を再開した。投与の影響がみられた雌 3 例は投与をさらに 4 日間休止し、補水液と電解質サプリメントを与え、第 29 日に 0.5 mg/kg の用量で投与を再開した。この雌 3 例は数日間やせた状態であった。高用量群の雄の 1 例では 10 日間脱水となったことから、第 32 日に高用量群の雄の投与量も 0.5 mg/kg に下げ、雌の 2 例では弛張性の脱水が生じたことから投与を再度休止した。休薬中に症状の明らかな回復が認められなかったことから、雌の 2 例を第 36 日に安楽死処置した。試験中、高用量群の雌雄ではさらに脱水を呈する個体が認められた。また、中用量群（0.1 mg/kg）で、第 32 日～41 日に雌の 2 例で脱水の発現が認められた。

投与第 1 週では、0.1 及び 1.0 mg/kg の週 2 回投与群の雌雄で明らかな体重減少効果が認められた。しかしながら、投与終了時の雄では、1 例が投与期間中に体重減少が認められたものの、全体として体重に及ぼす影響は認められなかった。雌では、投与期間全体をとおして体重減少が認められた。

血液生化学的検査の結果、第 6 週に尿素濃度の減少が認められたが、第 13 週では認められなかった。一過性の尿素濃度の減少は摂餌量減少の二次的影響であり、有害ではないものと考えられた。第 13 週では、雄で血漿中ナトリウム及び塩素濃度の軽微な増加が認められ、回復群の数例では 4 週間の回復期間終了時でも認められた。本変化の程度は軽微であることから、有害ではないものと考えられた。

高用量群の雌で尿量の低値が第 6 週に認められたが、第 13 週では認められなかった。高用量群で認められた尿量の減少は、同群では脱水の臨床兆候がみられたことから、投与に関連したものと考えられた。さらに、対照群と比較し、異なる時点で軽微な尿中カリウム濃度の変動が認められた。回復期間終了時までにセマグルチド投与群のカリウム濃度は対照群と同等となった。尿中項目の影響は脱水の二次的影響と考えられ、病理組織学的変化が認められなかったことから、有害ではないものと考えられた。

3 例（中用量群 2 例及び高用量群 1 例）に抗セマグルチド抗体が認められた。2 例の陽性試料において、抗体は内因性 GLP-1 と交叉反応性を示した。しかしながら、当該抗体は中和反応を示さず、抗体陽性を示した動物におけるセマグルチド曝露の影響は認められなかった。したがって、抗セマグルチド抗体は試験結果に影響を及ぼさないものと考えられた。

主試験群の解剖時において、対照群と比較し雌で心臓の絶対重量の低値が認められた。心臓の相対重量も同様の傾向がみられたが、統計学的有意差は認められなかった。4 週間の回復期間終了時までに、セマグルチド投与群の雌と対照群との差は認められなかった。高用量群の雄で肝臓の絶対重量の低値が認められた。雌では同様の傾向がみられたが、統計学的有意差は認められなかった。しかしながら、回復期間終了時までに投与の影響は認められず、肝臓の相対重量にも影響は認められなかった。したがって、肝臓の絶対重量の変化は体重に及ぼすセマグルチドの二次的影響と考えられた。対照群と比較して雄で甲状腺の絶対及び相対重量の低値が認められた。4 週間の回復期間終了時では同様の変化は認められず、雌では同様の傾向は認められなかった。心臓、肝臓及び甲状腺に関して、投与に関連した病理組織学的変化が認められなかったこと、又は対応するその他の変化が認められなかったことから、臓器重量変化は有害ではないものと考えられた。

臓器及び組織の肉眼的病理検査及び病理組織学的検査では、投与に関連した変化は認められなかった。

結論として、カニクイザルにセマグルチドを週 2 回、13 週間皮下投与した結果、摂餌量及び体重に及ぼす想定された薬理作用が認められ、一般状態変化として脱水が生じ、高用量群の雌 2 例では重度の脱水が生じたことから安楽死処置とした。より低用量群では有害性変化が認められなかったことから、NOAEL は中用量である 0.1 mg/kg の週 2 回投与と考えられた。

2.6.6.3.3.4 カニクイザルを用いた 52 週間反復皮下投与毒性及び 4 週間回復性試験 (Module 2.6.7.7.H, 207288)

本試験の目的は、セマグルチドをカニクイザルに週 2 回、52 週間皮下投与時の毒性及び TK を評価することであった。最大 2 週間の用量漸増期間を含めた。投与群、用量、各群における動物数を表 2.6.6-18 に示す。以前に実施した 13 週間反復投与毒性試験（206450）で得られた情報に基づき、用量設定を行った。13 週間反復投与毒性試験において 1.0 mg/kg 投与群の雌 2 例が脱水により安楽死処置となったこと、0.5 mg/kg に用量を下げた後にも脱水が認められたことから、13 週間反復投与毒性試験と比較し、中用量及び高用量をそれぞれ 0.06 及び 0.36 mg/kg の週 2 回投与に下げた。4 週間の回復期間中及び終了時に、投与に関連した変化の回復性を評価した。

表 2.6.6-18 カニクイザルを用いた 52 週間反復皮下投与毒性試験（207288）－投与群、用量及び動物数

Group	Treatment	Nominal Dose (mg/kg twice-weekly)[a]			Number of Animals			
		Week -2	Week -1	Week 1-52*	Main Study		Recovery Study	
					Males	Females	Males	Females
1	Control (Vehicle)	0	0	0	4	4	0	0
2	Semaglutide	0	0	0.01	4	4	2	2
3	Semaglutide	0	0.01	0.06	4	4	2	2
4	Semaglutide	0.01	0.06	0.36	4	4	2	2

[a] See section 2.6.6.9 for information about corresponding achieved exposures and ratios to MRHD in Japanese
*Due to body weight loss/reduced gain, and poor clinical condition, three animals were taken off dose as follows: one high dose male during Weeks 2 and 3, one high dose female during Weeks 3 and 4, and one intermediate dose male during Week 21.

試験中又は試験終了時に、下記に示す項目を評価した：生存数、一般状態、体重、摂餌量、眼科学的検査、ECG、血液学的検査、血液生化学的検査、尿検査、TK、血清カルシトニン、抗体産生、臓器重量、肉眼的病理検査、病理組織学的検査。甲状腺 C 細胞に対する追加の病理組織学的検査も実施した。この検査は甲状腺の C 細胞に富む領域を採取し連続切片を行い、免疫組織学的染色法によりカルシトニンの存在、ならびに C 細胞の同定を行うものであった。

試験用量のセマグルチドに対する忍容性は良好であった。試験中に死亡は認められず、投与に関連した一般状態変化がわずかに認められたのみであった。すなわち、高用量群の雄 2 例で 0.06 mg/kg の

週 2 回投与を実施した第-1 週（用量漸増期間の第 2 週）に、脱水を示す皮膚のたるみ（skin tenting）が試験初期に認められ、高用量である 0.36 mg/kg の週 2 回投与への用量漸増実施時（第 1～2 週）に、雌雄各 2 例で活動性低下を示す行動及び円背位がそれぞれ認められた。

用量漸増期間では、中用量及び高用量群で用量に関連した体重減少が認められた。目標用量を 52 週間投与時には、雄の全投与群及び雌の 0.06 mg/kg の週 2 回投与以上の投与群で体重増加抑制が認められたが、用量依存性又は統計学的有意差を常に伴うものではなかった。4 週間の回復期間中、セマグルチド投与群では顕著な体重増加が認められ、体重に及ぼすセマグルチドの影響に関して可逆性が示された。セマグルチドを投与した結果、主として試験初期に、概して用量に関連した摂餌量の減少が認められた。4 週間の回復期間中、高用量群の雌で摂餌量の増加傾向がみられたのみであった。

ECG 波形から、第 13 週に 2 回の洞頻脈を示す二段脈（bigeminy rhythm）が認められ、第 26 週及び第 52 週に高用量群の雌 1 例で持続性の左脚ブロック（Left-Branch-Bundle-Block）波形が認められた。心臓ブロックはサル及びヒトで時折認められる所見であり[21,22]、大半はその他の根本的な心疾患の結果として生じるものである[22]。しかしながら、試験中に変化が進行したことから、投与との関連性を否定できなかった。第 52 週から回復期間の第 4 週まで、対照群及び高用量群の全例で追加の ECG 計測を実施した。追加解析の結果、異常な ECG が計測されたのは、この 1 例のみであることが確認された。この 1 例では剖検により右心室心外膜側における蒼白が認められたが、病理組織学的検査では関連した変化は認められなかった。ECG で認められた変化が動物の一般状態に影響を及ぼすことを示唆する臨床兆候は認められなかったものの、本所見は有害であると考えられた。

血液学的検査の結果、中用量及び高用量群で用量に関連した軽微なヘマトクリット、ヘモグロビン濃度及び赤血球数の減少が認められたが、全投与群あるいは全投与時点で統計学的有意差が認められたわけではなかった。回復期間終了時まで、赤血球項目は全セマグルチド投与群で低値のままであった。変化の程度が小さいことから、いずれも有害ではないものと考えられた。

血液生化学的検査の結果、血漿中グルコースの減少が雌雄で、及びコレステロールの増加が雄で認められたが、統計学的有意差は散発的にしか認められなかったこと、明らかな用量反応性が認められず、投与前値と同様の傾向を示したことから、投与との関連性は不明であった。4 週間の回復期間終了時までに、同様の所見は認められなかった。第 26 及び 52 週に総タンパク質及びβグロブリン濃度の軽微な減少ならびに A/G 比の増加が中用量及び高用量群の雌で認められたが、いずれの群も統計学的有意差は認められなかった。雄では同様の所見は認められなかった。4 週間の回復期間終了時までに、βグロブリン濃度及び A/G 比に回復性が認められたものの、総タンパク質濃度は依然として軽微な低下が認められた。いずれも変化の程度は小さいこと、及び関連する所見が認められなかったことから、血液生化学的検査で認められた変化はいずれも有害ではないものと考えられた。

第 51 週の雌において、用量に関連した尿中ナトリウム及び塩素濃度の増加ならびに用量に関連しない尿中カリウム濃度の増加が認められた。尿中塩素及びカリウム濃度の増加に関して、統計学的有意差は認められなかったが、同様の傾向は第 12 週でもみられた。高用量群の雌の 1 例が特に影響を受けた。回復期間の第 4 週では、尿中ナトリウム及び塩素濃度は第 52 週と比較して減少したことから、回復性が示された。尿中カリウム濃度は第 52 週（対照群を含む）と比較して、依然として高かった。関連する腎臓の病理組織学的変化が認められなかったことから、尿中電解質濃度の変化は有害ではないものと考えられた。

複数の臓器重量の変化は体重に及ぼすセマグルチドの二次的影響であることが示された。しかしながら、統計学的有意差が認められたのは雌の心臓の絶対及び相対重量の減少のみであった。同様の傾向は雄でも認められたが、統計学的有意差はなかった。雌で認められた心臓重量の変化に関して明らかな用量関連性は認められず、低用量群の雌では心臓の相対重量の減少の程度は最も大きかった。さらに、対照群の雌の値が通常よりも高く、2 例の心臓重量が背景対照の範囲を超えており、他の 2 例では範囲の上部であった。したがって、投与との関連性は不明と考えられた。4 週間の回復期間終了時までに、低用量及び中用量群（高用量群は含まず）では、第 52 週の対照群の値と同程度であった。さらに、雄では統計学的有意差を伴わない膵臓及び胸腺の絶対及び相対重量の低値がみられたが、雌では膵臓及び胸腺の絶対重量への影響のみであった。雄の膵臓及び胸腺の相対重量の低下に関して用量反応性が認められないことから、セマグルチド投与との関連性は不明であった。4 週間の回復期間終了後、膵臓の相対重量は第 52 週の対照群の値と比較して、概して低かったが、胸腺の相対重量は 52 週の対照群の値と同程度であった。さらに、投与終了時に統計学的有意差を伴わない前立腺及び精巣の相対重量の増加が認められたが、これらの重量には大きなばらつきがみられ、群間差は 52 週の投与期間での動物の性成熟状態による差によるものと考えられた。雌では、甲状腺／副甲状腺の絶対及び相対重量の増加が認められた。統計学的に有意差は認められなかったものの、相対重量の変化に関して、用量関連性が認められた。雄では同様の所見はみられず、回復期間の終了時までに、甲状腺及び副甲状腺の相対重量は第 52 週の対照群の値と同程度であった。臓器重量の変化に関連するいずれの臓器に関して、有害な病理組織学的所見が認められなかったことから（1 例に心臓の病理組織学的変化がみられたが、重量の減少とは関連しない）、臓器重量の変化はいずれも有害でないものと考えられた。

肉眼的病理検査の結果、第 52 週のセマグルチド投与動物の数例に、胸腺の小型化が認められた。回復期間終了時までに、胸腺の小型化を呈した動物は認められなかった。胸腺の小型化の肉眼所見と一致して、病理組織学的検査において、軽微～軽度の胸腺の皮質退縮・退行の発現頻度の増加がセマグルチド投与群で認められた。以上の胸腺の変化は、変化に関連したストレスを示すものと考えられ[23]、有害ではないものと考えられた。回復期間終了時までに、本所見は低用量群の 2 例及び中用量群の 1 例で認められたが、高用量群では認められなかったことから、部分的な回復性が認められた。胸腺の

退縮は試験動物の加齢に基づくものと考えられることから[24]、胸腺所見の数例は自然発生的な加齢に伴う変化である可能性が考えられた。

病理組織学的検査の結果、さらに高用量群の雄 1 例で左心室にカリオメガリーを伴う軽微な多巣性の心筋空胞化及び変性が認められた。追加の検査を実施した結果、当該動物の心臓又は本試験に用いたその他の動物の心臓に関して、意義のある病理組織学的変化は認められなかった。本所見は対照群でも時折認められており[25,26]、セマグルチド投与との関連性はないものと考えられた。
カルシトニン染色を含む甲状腺の追加の病理組織学的検査を実施した結果、投与に関連した C 細胞の変化は認められず、セマグルチド投与との関連性が考えられる血清カルシトニン濃度の変化はみられなかった。

膵臓では、投与に関連した病理組織学的変化は認められなかった。

結論として、カニクイザルにセマグルチドを週 2 回、52 週間皮下投与した結果、摂餌量及び体重に及ぼすセマグルチドの薬理作用によると考えられる影響が認められ、また、臨床検査項目及び臓器重量において、いくつかの非有害性変化が認められた。高用量群の雌 1 例に認められた ECG 波形の異常に関して、投与との関連性を否定できなかったことから、NOAEL は中用量である 0.06 mg/kg の週 2 回投与と考えられた。

2.6.6.4 遺伝毒性試験

ICH S2A 及び S2B ガイドライン（現行のガイドラインである ICH S2[27]と同じ）に準拠し、[redacted]法により製造したセマグルチドを用いて標準的な組み合わせの遺伝毒性試験を実施した。これらの試験には、2 種の *in vitro* 試験及び 1 種の *in vivo* 試験が含まれる。セマグルチドの[redacted]法から遺伝子組換え法への製法変更を支持するため、遺伝子組換え法で製造したセマグルチドについても、2 種の *in vitro* 試験を実施した。すべての試験は GLP で実施した。試験を実施した結果、セマグルチドの遺伝毒性誘発性は認められなかった。

2.6.6.4.1 遺伝毒性 in vitro

2.6.6.4.1.1 [redacted]品：4 種のヒスチジン要求性株の *Salmonella thyphimurium* 及び 2 種のトリプトファン要求性株の *Eschericia coli* を用いた復帰突然変異試験 (Module 2.6.7.8.A, 206415)

4 種のヒスチジン要求性株である *Salmonella thyphimurium* （TA98、TA100、TA1535、TA1537）及び 2 種のトリプトファン要求性株である *Eschericia coli*（WP2 pKM101、WP2 uvrA pKM101）を用いて、ラット肝代謝酵素系（S-9）の存在下及び非存在下で、2 回の独立した実験から[redacted]セマグルチドの変異原性を評価した。被験物質の最大濃度は 5143 µg/plate であった。なお、WP2 pKM101 株の S-9 存在下においては、一貫して信頼性のある明らかな突然変異誘発反応（すなわち、代謝活性化により生じる

反応）を示すことが可能な pro-mutagen を特定できていなかったため、陽性対照物質を設定することができなかったことから、陽性対照の代わりに、S-9 非存在下での本菌株から得られた陽性対照データ、S-9 非存在下及び存在下での溶媒対照データ、及び S-9 存在下での大腸菌の代謝活性に関して、S-9 存在下での WP2 uvrA pKM101 陽性対照データを用いて確認することに基づき、菌株の正確性ならびに適切性、及び試験法の機能性を評価した。適切な陽性対照物質を設定できなかったことを踏まえて、WP2 pKM101 株の S-9 存在下の結果を参考データとした。

各実験において、試験したいずれの株でも細胞毒性は認められなかった。[redacted]セマグルチドは本試験の濃度範囲において、ラット肝 S-9 の有無に関わらず、4 種のヒスチジン要求性株である *Salmonella thyphimurium* 及び 2 種のトリプトファン要求性株である *Eschericia coli* に対して変異原性を誘発しなかった。

2.6.6.4.1.2 遺伝子組換え品：4 種のヒスチジン要求性株の *Salmonella thyphimurium* 及び 2 種のトリプトファン要求性株の *Eschericia coli* を用いた復帰突然変異試験 (Module 2.6.7.8.B, 210193)

4 種のヒスチジン要求性株である *Salmonella thyphimurium* （TA98、TA100、TA1535、TA1537）及び 2 種のトリプトファン要求性株である *Eschericia coli*（WP2 pKM101、WP2 uvrA pKM101）を用いて、ラット肝代謝酵素系（S-9）存在下及び非存在下で、2 回の独立した実験から遺伝子組換えセマグルチドの変異原性を評価した。被験物質の最大濃度は 5000 µg/plate であった。なお、WP2 pKM101 株の S-9 存在下においては、一貫して信頼性のある明らかな突然変異誘発反応（すなわち、代謝活性化により生じる反応）を示すことが可能な pro-mutagen を特定できていなかったため、陽性対照物質を設定することができなかったことから、陽性対照の代わりに、S-9 非存在下での本菌株から得られた陽性対照データ、S-9 非存在下及び存在下での溶媒対照データ、及び S-9 存在下での大腸菌の代謝活性に関して、S-9 存在下での WP2 uvrA pKM101 陽性対照データを用いて確認することに基づき、菌株の正確性ならびに適切性、及び試験法の機能性を評価した。適切な陽性対照物質を設定できなかったことを踏まえて、WP2 pKM101 株の S-9 存在下の結果を参考データとした。

各実験において、試験したいずれの株でも細胞毒性は認められなかった。遺伝子組換えセマグルチドは本試験の濃度範囲において、ラット肝 S-9 の有無に関わらず、4 種のヒスチジン要求性株である *Salmonella thyphimurium* 及び 2 種のトリプトファン要求性株である *Eschericia coli* に対して変異原性を誘発しなかった。

2.6.6.4.1.3 [redacted]品：ヒト末梢血リンパ球を用いた染色体異常試験 (Module 2.6.7.8.C, 206417)

3 名の女性ドナーから得られたヒトリンパ球を培養し、代謝活性化（S-9）の存在下及び非存在下で *in vitro* 染色体異常試験を実施し、2 回の独立した実験から[redacted]セマグルチドの染色体損傷性を検討した。

培養細胞に[redacted]セマグルチドを S-9 存在下又は非存在下で 3 時間処理後 17 時間の回復期間を設けた。また、培養細胞に S-9 非存在下で 20 時間処理するか、S-9 存在下で 3 時間処理後 17 時間の回復期間を設けた。被験物質の最大濃度は 5143 µg/mL であった。

細胞毒性は認められなかった。S-9 の存在下及び非存在下で[redacted]セマグルチドを培養細胞に処理し、2 回実験を行ったところ、構造異常及び数的異常を有する細胞の出現頻度は陰性対照と同程度であった。試験した培養細胞のギャップを含まない異常細胞数は、いずれも陰性対照の背景データの範囲内であった。

結論として、[redacted]セマグルチドは本試験の濃度範囲において、ラット肝 S-9 の有無に関わらず、ラット培養ヒト末梢血リンパ球に対して染色体異常誘発性を示さなかった。

2.6.6.4.1.4 遺伝子組換え品：ヒト末梢血リンパ球を用いた染色体異常試験 (Module 2.6.7.8.D, 210194)

3 名の男性ドナーから得られたヒトリンパ球を培養し、代謝活性化（S-9）の存在下及び非存在下で *in vitro* 染色体異常試験を実施し、2 回の独立した実験から遺伝子組換えセマグルチドの染色体損傷性を検討した。培養細胞に遺伝子組換えセマグルチドを S-9 存在下又は非存在下で 3 時間処理後 17 時間の回復期間を設けた。また、培養細胞に S-9 非存在下で 20 時間処理するか、S-9 存在下で 3 時間処理後 17 時間の回復期間を設けた。被験物質の最大濃度は 5000 µg/mL であった。

細胞毒性は認められなかった。S-9 の存在下及び非存在下で遺伝子組換えセマグルチドを培養細胞に処理し、2 回実験を行ったところ、構造異常を有する細胞の出現頻度は溶媒対照と同程度であった。試験した培養細胞のギャップを含まない異常細胞数は、いずれも正常の範囲内であった。実験 1 及び 2 で培養細胞に遺伝子組換えセマグルチドを処理したが、実験 1 での S-9 存在下、5000 µg/ mL 処理区の 1 反復を除き、同時処理対照及び正常範囲を上回る数的異常を有する細胞の出現頻度の増加は認められず、S-9 存在下での実験内又は実験間に再現性は認められなかったことから、生物学的な関連性はないものと考えられた。

結論として、遺伝子組換えセマグルチドは本試験の濃度範囲において、ラット肝 S-9 の有無に関わらず、ラット培養ヒト末梢血リンパ球に対して染色体異常誘発性を示さなかった。

2.6.6.4.2 遺伝毒性 in vivo

2.6.6.4.2.1 セマグルチド投与ラットの骨髄を用いた小核試験 (Module 2.6.7.9, 206409)

[redacted]セマグルチドを雄性ラットに単回皮下投与し、骨髄における多染性赤血球（PCE）中の小核誘発性を *in vivo* で評価した。雄性ラット（6 例/群）に[redacted]セマグルチドを 0、1.875、3.75 又は 7.5 mg/kg（MTD）の用量で単回皮下投与し、投与 24 又は 48 時間後に骨髄を採取した。

一般状態変化として、紅涙、嗜眠及び鼻部の赤色／褐色汚れが認められた。体重に及ぼすセマグルチドの想定される薬理作用を介した影響が認められ、群平均体重量は、高用量群の投与後 24 及び 48 時間の採取時点で、それぞれ 13 及び 12%の減少であった。

[redacted]セマグルチドを投与したラットは、いずれの投与群でも群平均%PCE は溶媒対照と比較して同等あるいはやや高かったが、溶媒対照の背景データの範囲内であった。以上のデータから、セマグルチドに関連した骨髄毒性を示す証拠は認められなかった。小核を有する PCE の群平均出現頻度に関して、全投与群と溶媒対照との間に統計学的有意差は認められなかった。全投与群における小核を有する PCE の個体別出現頻度は、いずれも溶媒対照の背景データの範囲内であり、溶媒対照の出現頻度と同程度であった。

結論として、[redacted]セマグルチドを 7.5 mg/kg の用量（MTD）まで投与した雄性ラット骨髄の PCE に対し小核を誘発しなかった。

2.6.6.5 がん原性試験

現行のガイドラインに準拠し、2 年間マウス及びラットがん原性試験によりセマグルチドのがん原性を評価した。試験開始前に、試験デザイン及び用量設定に関して米国 FDA と試験計画評価（Special Protocol Assessment）の相談を行った。用量設定の詳細は、下記に示す各試験概要を参照のこと。

がん原性試験の概要を表 2.6.6-19 に示す。

表 2.6.6-19 がん原性試験の概要

Species	Duration	Administration route	Nominal dose levels (mg/kg/day)	NOAEL (mg/kg/day)	Effect(s) defining NOAEL	Study ID
Mouse	104 weeks	Subcutaneous	Males: 0, 0.3, 1.0, 3.0 Females: 0, 0.1, 0.3, 1.0	Not established	A NOAEL could not be established due to thyroid C-cell hyperplasia and neoplasia at all dose levels	207362
Rat	104 weeks	Subcutaneous	0, 0.0025, 0.01, 0.025, 0.1	Not established	A NOAEL could not be established due to thyroid C-cell hyperplasia and neoplasia at all dose levels	207363

2.6.6.5.1　　マウスを用いた 104 週間反復皮下投与がん原性試験（Module 2.6.7.10.A, 207362）

本試験の目的は、CD-1 マウスにセマグルチドを 1 日 1 回、104 週間皮下投与時のセマグルチドのがん原性を評価することであった。

用量設定は ICH S1C ガイドライン[28]及び CD-1 マウスを用いた 13 週間反復投与毒性試験（206663）で得られた情報に基づき設定した。CD-1 マウスを用いた 13 週間反復投与毒性試験において、3 及び 10 mg/kg/日群で投与に関連した一般状態変化が認められた。雄の 3 mg/kg/日以上及び雌の全投与群で、投与初期の体重減少又は体重増加抑制が認められ、体重増加は最高用量群の雄で 21%、雌で 29%抑制された。

体重に及ぼす影響は、雄よりも雌で感受性が高かったことから、がん原性試験では雌雄で異なる用量を設定した。一般状態変化及び体重に及ぼす影響から、雄では 3 mg/kg/日が、雌では 1 mg/kg/日がそれぞれ MTD と考えられ（対照群と比較して 10%以上の体重増加抑制が認められないと想定される）、高用量とした。投与群、用量、各群における動物数を表 2.6.6-20 に示す。

表 2.6.6-20　　マウスを用いた 104 週間皮下投与試験（207362）ー投与群、用量及び動物数

Group	Treatment	Nominal Dose (mg/kg/day)[a]	Number of Animals			
		Week 1-104	Main Study		Satellite Study[b]	
			Males	Females	Males	Females
1	Control (Vehicle)	0	60	60	12	12
2	Semaglutide	0.1	-	60	-	12
3	Semaglutide	0.3	60	60	12	12
4	Semaglutide	1.0	60	60	12	12
5	Semaglutide	3.0	60	-	12	-

[a] See section 2.6.6.9 for information about corresponding achieved exposures and ratios to MRHD in Japanese
[b] Satellite animals included for TK and antibody assessments
- As MTD was different in males and females, no males were included at 0.1 mg/kg/day and no females were included at 3.0 mg/kg/day

試験中又は試験終了時に、下記に示す項目を評価した：生存数、一般状態（腫瘤の触診を含む）、体重、摂餌量、血液学的検査、TK、抗体産生、肉眼的病理検査、病理組織学的検査。

セマグルチド投与による忍容性は良好であった。また、生存に及ぼす悪影響は認められず、セマグルチドに関連した死因も認められなかった。試験第 52 週までに、雌でやせた個体の出現頻度の増加が

認められ、雌雄で体重増加抑制がみられたが、以降の 52 週間では体重増加に影響は認められないか、対照群よりもやや高かった。全体として、用量依存性及び統計学的有意差は認められなかったものの、投与期間中に投与群で僅かな体重増加抑制が認められた。投与第 1 週時に全投与群で摂餌量が顕著かつ用量依存的に減少した。低用量及び中用量群では統計学的有意差が認められなかったものの、試験を通じて摂餌量の減少が認められた。

104 週間終了時における血液学的検査の結果、全投与群で赤血球数の減少が認められた。用量依存性は認められず、低用量群の雌では統計学的有意差が認められなかった。本変化は軽微であり、摂餌量の減少及び体重増加抑制に対する二次的影響と考えられたことから、有害ではないものと考えられた。代償性の髄外造血を示す証拠は認められなかった。

セマグルチド投与動物の 2 試料で、抗セマグルチド抗体が認められ、1 例は高用量群の雌であり、もう 1 例は中用量群の雌であった。内因性 GLP-1 と交叉反応性を示した試料は認められなかった。セマグルチド投与動物の 2 例で抗体が認められたが、試験結果に影響を及ぼすものではないと考えられた。

肉眼的病理検査の結果、全投与群で胆嚢の膨満及び内容物の異常（蒼白又は黒色、時折粒子を含む）の発生頻度が増加したが、明らかな用量反応性は認められなかった。本変化に関連した病理組織学的変化又は胆汁の流出に関連する兆候は認められなかった。以上の変化は摂餌量の低下による二次的影響と考えられたことから[29,30]、胆汁の変化は有害ではないものと考えられた。

また、剖検時に全投与群で甲状腺の腫瘤又は腫大が認められ、その発生頻度は雌よりも雄で高かった。これは、全投与群の甲状腺における病理組織学的変化の発生頻度が高かったこと（明らかな用量反応性は認められなかったが、軽微～中等度の甲状腺 C 細胞過形成ならびに C 細胞腺腫及び腺癌）と一致した。さらに、数例では胸腺に異所性の甲状腺組織の C 細胞腺癌が認められ、数例では深頸リンパ節において C 細胞癌の転移が認められた。C 細胞過形成及び腫瘍は、GLP-1 受容体作動薬をげっ歯類に投与することで生じることがよく知られており、想定される影響である[8]。

さらに病理組織学的検査の結果、全投与群で十二指腸におけるブルンナー腺の変化（内腔拡張の発現頻度の増加）が認められた。本変化の重症度は軽微～中等度であり、明らかな用量反応性は認められなかった。ブルンナー腺の変化は、ブルンナー腺又は小腸粘膜における炎症又は細胞障害のいずれにも関連しなかったこと、ならびに腫瘍へ進行する兆候が認められなかったことから、本所見は有害ではないものと考えられた。

結論として、CD-1 マウスにセマグルチドを 1 日 1 回、2 年間皮下投与時の忍容性は良好であり、生存に及ぼす悪影響は認められなかったが、薬理作用を介した一連の影響、すなわち、体重増加抑制及び摂餌量の低下、非有害性である十二指腸のブルンナー腺の病理組織学的変化、及び想定された甲状

腺の腫瘍性 C 細胞変化が認められた。甲状腺 C 細胞の変化が全投与群で認められたことから、NOAEL を設定することはできなかった。

2.6.6.5.2 ラットを用いた 104 週間反復皮下投与がん原性試験 (Module 2.6.7.10.B, 207363)

本試験の目的は、SD 系ラットにセマグルチドを 1 日 1 回、104 週間皮下投与時のセマグルチドのがん原性を評価することであった。

用量設定は SD 系ラットを用いた 0.01、0.1 及び 0.86 mg/kg/日の用量による 13 週間反復投与毒性試験（206662）で得られた情報に基づき設定した。本試験では、高用量群の数例で、主に投与の最後 5 週間に円背位が認められた。さらに、全投与群で体重増加の顕著な抑制が認められ、13 週時までの体重増加は、中用量及び高用量群の雄でそれぞれ 42 及び 44%、雌でそれぞれ 36 及び 50%抑制された。体重増加に及ぼす影響が MTD を決定するものと考えられ、高用量を 0.1 mg/kg/日に設定した。最低用量は体重増加に有意な影響を及ぼさないものと予想されることから、最低用量を 0.0025 mg/kg/日とした。

投与群、用量、各群における動物数を表 2.6.6-21 に示す。

表 2.6.6-21 ラットを用いた 104 週間皮下投与試験（207363）－投与群、用量及び動物数

Group	Treatment	Nominal Dose (mg/kg/day)			Number of Animals	
		Week 1	Week 2	Week 3-104	Males	Females
1	Control (vehicle)	0	0	0	70	70
2	Semaglutide	0.0025	0.0025	0.0025	70	70
3	Semaglutide	0.01	0.01	0.01	70	70
4	Semaglutide	0.01	0.025	0.025	70	70
5	Semaglutide	0.01	0.025	0.1	70	70

[a] See section 2.6.6.9 for information about corresponding achieved exposures and ratios to MRHD in Japanese

試験中又は試験終了時に、下記に示す項目を評価した：生存数、一般状態（腫瘤の触診を含む）、体重、摂餌量、血液学的検査、血液生化学的検査、尿検査、TK、抗体産生、肉眼的病理検査、病理組織学的検査。

生存数に関してセマグルチド投与による影響は認められなかったが、高用量群では、対照群と比較して一般状態の悪化（雄の 3 mg/kg/日以上及び雌の全群でやせた個体、円背位及び活動性低下が認められた）により安楽死処置した個体の発現頻度が増加した。雄の 3 mg/kg/日以上及び雌の全投与群で用量に関連した体重増加抑制が投与期間を通じて認められたが、低用量群の雌では影響は軽微であり、統計学的有意差も認められなかった。雄では摂餌量に及ぼす影響が最も顕著であり、投与第 1 週における高用量投与の 2 群で摂餌量の顕著な低下が認められた。雄では、低用量群を除き、摂餌量に及ぼす影響が試験を通じて認められたが、雌では高用量群にのみ影響が認められた。

第 104 週時の血液学的検査の結果、一連の変化〔ヘモグロビンの増加、網状赤血球の減少、平均赤血球ヘモグロビン（MCH）及び平均赤血球ヘモグロビン濃度（MCHC）の増加、白血球、リンパ球及び単球の減少、血小板の増加及びプロトロンビン時間の延長〕が認められたが、変化は軽微であり、しばしば用量反応が認められず、又は片性でしかみられなかったことから、セマグルチド投与との関連性は不明と考えられた。変化の程度は小さいことから、以上の変化はいずれも有害ではないものと考えられた。

第 104 週時の血液生化学的検査の結果、概して用量関連性を伴うコレステロール及びトリグリセリド濃度の減少が認められ、摂餌量の減少による二次的影響と考えられた。さらに、対照群と比較して、カリウム、カルシウム及びリン濃度の減少が認められた。雄では、アルブミンの増加に伴う A/G 比の増加が認められたが、雌では総タンパク質及びアルブミン濃度が減少したことから、A/G 比に影響を及ぼさなかった。血液生化学的検査項目の変化はいずれも軽微であったことから、有害ではないものと考えられた。

104 週間の投与期間終了時の尿検査の結果、軽微な尿量の低値が認められた。尿中電解質濃度には影響を及ぼさなかったことから、尿量の減少に伴い、尿中電解質項目の総排泄量の減少が認められた。腎臓には投与に関連した有害な変化が認められなかったことから、尿中項目の変化は有害ではないものと考えられた。

肉眼的病理検査の結果、やせた個体の発現頻度に用量関連性のある増加が認められ、体重に及ぼす影響と一致した。投与に関連した変化として、概して用量関連性のある甲状腺の腫瘤の発現頻度の増加が認められ、深頸リンパ節の腫瘤の発現頻度の増加も伴っていた。さらに、高用量群では前胃の陥没の発現頻度の増加が認められ、投与の影響と考えられた。蒼白部を有する肺の発現頻度の増加が認められたが、用量相関性は認められず、投与との関連性は不明と考えられた。甲状腺、深頸リンパ節、胃及び肺における当該所見は、いずれも病理組織学的変化との相関性が認められた（下部に記載）。また、投与との関連性が不明であった肉眼的病理変化として、肝臓の暗色部の減少、下垂体（雄のみ）及び子宮の腫瘤の発現頻度の増加が認められたが、病理組織学的検査の結果、下垂体及び子宮における腫瘍性変化の発現頻度に統計学的有意差は認められなかった。

甲状腺の病理組織学的検査の結果、概して用量関連性のある C 細胞腺腫及び C 細胞癌の発現頻度の増加が認められたが、C 細胞癌に関して、低用量群の雄では投与の影響は認められず、統計学的有意差は高用量群の雌でのみ認められた。C 細胞癌がみられた個体の一部では、深頸リンパ節への転移が認められた。雄では、さらに全投与群で投与に関連した限局性 C 細胞過形成の増加が認められた。甲状腺の後鰓嚢胞の発現頻度の減少が認められた。高用量群でびまん性 C 細胞過形成の発現頻度の減少がみられたが、これは高用量群における腫瘍の発現頻度の増加、すなわち面積占有率の観点から、本変化

が生じる正常な甲状腺組織の量が減少したことと関連するものと考えられた。後鰓嚢胞の発現頻度の減少も同様の影響によるものと考えられた。すでに記載したとおり、C 細胞過形成及び腫瘍は、GLP-1 受容体作動薬のげっ歯類への投与により生じるよく知られた想定される影響である[8]。

胃の病理組織学的検査の結果、肉眼的病理所見で認められた前胃の陥没と関連した、無腺部の潰瘍及び上皮過形成の発現頻度の増加が認められた。雄では、本変化は 0.01 mg/kg/日以上の投与群で認められたが、雌では高用量群でのみ認められた。腺部の拡張の発現頻度が増加傾向であったが、雌雄で整合性がみられなかったことから、本変化の投与との関連性は不明であると考えられた。前胃の潰瘍はげっ歯類ではしばしば認められる自然発生性病変である。本試験で認められた胃の変化の原因に関しては不明であるが、近年公表された文献では、これらの病変に関して、食餌方法（例えばタンパク質制限及び絶食）及びストレスを含め、複数の要因との関連性が指摘されている[20,31]。したがって、本変化は摂餌量の低下と関連性があるものと考えられる。過形成は概して潰瘍との関連性がある反応プロセスであると考えられ、前がん病変とは異なるものである。このことは、過形成が腫瘍形成に進展しなかった事実から裏付けられており、本所見は有害ではないものと考えられる。ヒトでは、ラットの無腺胃に対応する部位は認められない。

0.01 mg/kg/日以上の投与群で、極微～軽微のブルンナー腺の肥大の用量関連的な発現頻度の増加が認められた。さらに、雌では低用量群を除き、ブルンナー腺の拡張の発現頻度の増加が認められた。ブルンナー腺の変化は、ブルンナー腺又は小腸粘膜における炎症又は細胞障害のいずれにも関連しなかったこと、ならびに腫瘍へ進行する兆候が認められなかったことから、本所見は有害ではないものと考えられた。

肺の病理組織学的検査の結果、雄の全投与群及び雌の 0.01 mg/kg/日以上の投与群で肺胞マクロファージの凝集の発現頻度又は程度の増加が認められ、肉眼的病理所見で認められた蒼白部を有する肺に相当するものであった。本所見はラットの背景所見として一般に認められており[32,33,34]、対照群においても認められた。対照群における平均発現率は雄及び雌でそれぞれ 9 及び 13%であり、投与群の雌雄における発現率は最大で 23%であり、用量依存性はなかった。投与群における発現率は、試験実施施設における平均発現率の背景データ（雄：平均 37%、範囲 13～74%、雌：平均 31%、範囲 13～66%）と比較し低かった。文献情報[34]によると、Sprague-Dawley 系ラットへの 2 年間投与後における発現率の背景データは最大で 80%であった。したがって、本所見は投与との関連性がない偶発的なものであると考えられた。その他にも変化（0.01 mg/kg/日投与群以上の雄で副腎皮質の嚢胞変性／出血性変性の発現頻度又は程度の増加）が認められたが、投与との関連性は不明であった。本所見はラットでは一般に加齢に関連する所見であることから[7]、投与との関連性及び毒性学的意義は不明であると考えられた。

病理組織学的変化として、対照群よりも投与群で発現頻度が低下した所見がいくつか認められた。これらは肝臓及び腎臓で認められ、有害ではないものと考えられた。肝臓では、雌雄又は片性で明細胞巣、嚢胞変性、小葉辺縁性の肝細胞空胞化及び胆管過形成の発現頻度の減少が認められた。腎臓では、雌雄又は片性で、慢性進行性腎障害、乳頭／腎盂上皮のミネラル化、髄質の尿細管拡張及び皮質の尿細管における好塩基性変化の発現頻度又は重症度の減少が認められた。腎皮質尿細管の好塩基性変化及び慢性進行性腎症の減少は、投与動物のタンパク質又はカロリー摂取の減少による二次的変化と考えられる[35,36]。

結論として、SD 系ラットにセマグルチドを 1 日 1 回、2 年間皮下投与した結果、生存に及ぼす影響は認められなかったが、主として薬理作用を介した一連の影響、すなわち、体重増加抑制及び摂餌量の低下が認められた。0.01 mg/kg/日以上の投与群で、非腫瘍性変化である十二指腸のブルンナー腺及び胃の無腺部の変化が認められたが、有害ではないものと考えられた。予想された甲状腺 C 細胞の過形成及び腫瘍性変化が全投与群で認められたことから、NOAEL を設定することはできなかった。

2.6.6.5.3　がん原性試験－その他の試験

2.6.6.5.3.1　げっ歯類の甲状腺 C 細胞の GLP-1 受容体の活性化に関する検討

げっ歯類の甲状腺 C 細胞における GLP-1 受容体は通常の薬理濃度の内因性 GLP-1 及び GLP-1 受容体作動薬で活性化され、速やかにカルシトニンが分泌されるが、慢性投与によりカルシトニン生合成が上昇し、C 細胞の容積が増加し、げっ歯類ではカルシトニンを生成する C 細胞に腫瘍が生じる。げっ歯類は C 細胞の影響に対する感受性が非常に高いが、サルやヒトでは低いと考えられる。ラットの甲状腺 C 細胞の GLP-1 受容体が、内因性 GLP-1、エキセナチド及びリラグルチドにより活性化することがすでに示されている[8]。したがって、ラットの甲状腺 C 細胞受容体に対するセマグルチドの活性化能を検討し、前述の化合物と比較した。

2.6.6.5.3.1.1　ラット甲状腺 C 細胞における GLP-1 受容体の活性化：セマグルチド、リラグルチド、エキセナチド及び GLP-1 の比較 (Module 2.6.7.10.C, LBKN150301)

本試験の目的は、ラット甲状腺 C 細胞培養株 MTC 6-23（ラット C 細胞癌から樹立した細胞株）を用いて環状アデノシン一リン酸（cAMP）の蓄積を測定し、内因性 GLP-1、エキセナチド、リラグルチド及びセマグルチドによる甲状腺 C 細胞の GLP-1 受容体活性化能を *in vitro* で比較検討することであった。

セマグルチドはラット甲状腺 C 細胞の GLP-1 受容体を活性化し、その活性化能はリラグルチドと同程度であった。リラグルチド及びセマグルチドのいずれも内因性 GLP-1 及びエキセナチドよりも受容体活性化能は低かった。すべての GLP-1 受容体作動薬による受容体の最大活性に差異は認められなかったが、力価（すなわち GLP-1 受容体の活性化能）にのみ差異が認められた。

2.6.6.5.3.2 げっ歯類のカルシトニン濃度に及ぼすセマグルチドの影響に関する探索試験

血漿中カルシトニン濃度の増加は、甲状腺 C 細胞における GLP-1 受容体の増加のマーカーと考えられている[8]。したがって、カルシトニン濃度の増加が、C 細胞過形成又は腫瘍性病変の初発よりも前の段階で生じるかどうかを評価するため、新たにげっ歯類の試験を実施して、血漿中カルシトニン濃度に及ぼすセマグルチドの影響を評価した。マウスで C 細胞の変化が認められた最も早い例は、投与 2 週間後であったことから（206447）、マウスにおける血漿中カルシトニン濃度の増加を確認するため、マウスを用いた単回投与試験を実施した。当初、2 週間反復投与毒性試験で用いた最高用量（10 mg/kg/日）で検討したが、がん原性試験終了後、C 細胞の腫瘍性病変がより低用量でも認められたことから、1 mg/kg/日の用量で試験を再実施した。ラットでは、C 細胞過形成及び腫瘍性病変の発現頻度の増加は 2 年間がん原性試験でのみ認められた。ラットでは、GLP-1 受容体作動薬は投与 1 箇月後に血漿中カルシトニン濃度の増加を誘導することがすでに示されていることから[8]、ラットにおける血漿中カルシトニン濃度に及ぼすセマグルチドの影響は、投与 6 週間後に評価した。

2.6.6.5.3.2.1 皮下投与時の血漿中カルシトニン濃度の評価のためのマウスを用いた単回投与試験 (Module 2.6.7.10.D, 208422)

本試験の目的は、セマグルチドを 10 mg/kg の用量で CD-1 マウスに単回皮下投与時の血漿中カルシトニン濃度に及ぼすセマグルチドの影響を評価することであった。投与群、用量、各群における動物数を表 2.6.6-22 に示す。

表 2.6.6-22 マウスを用いた単回投与試験（208422）－投与群、用量及び動物数

Group	Treatment	Nominal dose (mg/kg)	Number of animals	
			Males	Females
1	Control (Vehicle)	0	12	12
2	Semaglutide	10	12	12

試験中、生存数、一般状態及び投与部位反応を観察した。投与前、及び投与後 1、3、6、12 及び 24 時間に、血漿中カルシトニン及びセマグルチドの曝露を測定し、測定後は追加の測定を実施せずに動物を安楽死処置した。

投与用量のセマグルチドに対する忍容性は良好であり、一般状態変化も認められなかった。

2 群間の血漿中カルシトニン濃度は、セマグルチド投与前では概して同等であったが、セマグルチド投与群では、投与後 3 時間から最終試料採取時点である投与後 24 時間まで増加が認められた。

結論として、10 mg/kg の用量でセマグルチドをマウスに皮下投与した結果、血漿中カルシトニン濃度の有意な増加が投与後 3 時間以降認められ、最終試料採取時点である投与後 24 時間まで高値が維持された。

2.6.6.5.3.2.2 血漿中カルシトニン濃度の評価のためのマウスを用いた単回投与試験 (Module 2.6.7.10.D, 213448)

本試験の目的は、セマグルチドを 1 mg/kg の用量で CD-1 マウスに単回皮下投与時の血漿中カルシトニン濃度に及ぼすセマグルチドの影響を評価することであった。投与群、用量、各群における動物数を表 2.6.6-23 に示す。

表 2.6.6-23 マウスを用いた単回投与試験（213448）ー投与群、用量及び動物数

Group	Treatment	Nominal dose (mg/kg)	Number of animals	
			Males	Females
1	Control (Vehicle)	0	12	12
2	Semaglutide	1	12	12

試験中、生存数、一般状態及び投与部位反応を観察した。投与前、及び投与後 6、12 及び 24 時間に、血漿中カルシトニン及びセマグルチドの曝露を測定し、測定後は追加の測定を実施せずに動物を安楽死処置した。

投与用量のセマグルチドに対する忍容性は良好であり、一般状態変化も認められなかった。なお、セマグルチド投与群の 1 例では、セマグルチドの曝露が確認できなかった。

2 群間の血漿中カルシトニン濃度は、セマグルチド投与前及び投与 6 時間後では概して同等であったが、セマグルチド投与群では、投与後 12 及び 24 時間では増加が認められた。

結論として、1 mg/kg の用量でセマグルチドをマウスに皮下投与した結果、血漿中カルシトニン濃度の有意な増加が投与後 12 及び 24 時間で認められた。

2.6.6.5.3.2.3 血漿中カルシトニン濃度を評価するためのラットを用いた 6 週間皮下投与毒性試験 (Module 2.6.7.10.D, 208456)

本試験の目的は、セマグルチドを 1 日 1 回、6 週間 SD 系ラットに皮下投与時の血漿中カルシトニン濃度に及ぼすセマグルチドの影響を評価することであった。目標用量で 6 週間の投与前に 2 週間の用量漸増期間を含めた。投与群、用量、各群における動物数を表 2.6.6-24 に示す。

表 2.6.6-24　　ラットを用いた 6 週間皮下投与試験（208456）－投与群、用量及び動物数

Group	Treatment	Nominal Dose (mg/kg/day)			Number of Animals	
		Week -2	Week -1	Week 1-6	Males	Females
1	Control (vehicle)	0	0	0	12	12
2	Semaglutide	0	0	0.01	12	12
3	Semaglutide	0	0.01	0.1	12	12
4	Semaglutide	0.01	0.1	0.86	12	12

試験中又は試験終了時に、下記に示す項目を評価した：生存数、一般状態、体重、摂餌量、投与部位反応、最終時点の血漿中カルシトニン、セマグルチドの曝露、甲状腺の重量、肉眼的病理検査、甲状腺に対する追加の病理組織学的検査（カルシトニン染色を含む）。

投与用量のセマグルチドに対する忍容性は良好であり、投与に関連した一般状態変化も認められなかった。全投与群で投与期間を通じて投与に関連した体重増加抑制が認められ、体重の推移は概して摂餌量の減少を反映するものであった。

対照群の値と比較して、中用量及び高用量群で血漿中カルシトニン濃度が増加した。雌雄別に分析すると、この影響は雄で強く認められ、低用量群でも統計学的有意差が認められたが、雌で認められた増加に関して、統計学的有意差は全用量で認められなかった。甲状腺に対する追加の病理組織学的検査を実施したが、投与に関連した C 細胞の変化は認められなかった。

結論として、0.1 mg/kg/日以上の用量でセマグルチドを 1 日 1 回、6 週間 SD 系ラットに皮下投与した結果、投与に関連した C 細胞の変化が認められていない投与後第 6 週で、血漿中カルシトニン濃度の増加が認められた。

2.6.6.6 生殖発生毒性試験

ICH S5 ガイドライン[4]に準拠して、1 動物種（ラット）を用いて授受胎能に及ぼすセマグルチドの影響を検討し、当初、2 動物種（ラット、ウサギ）を用いて EFD に及ぼす影響を検討した。しかしながら、ラットで胚毒性が認められ、ウサギでは臨床曝露用量での母体に対する忍容性が悪く、安全性評価に適さないことが明らかとなったことから、胚・胎児毒性の評価に動物種を追加することが必要と考えられた。ミニブタを検討したが、ウサギと同様に母体に対する忍容性が悪かったことから、本動物種は胚・胎児毒性の評価には適さなかった。一般毒性試験では、カニクイザルが良好な忍容性を示したことから、発生毒性試験で非ヒト霊長類（NHP）を使用することに関して、ICH S6 ガイドライン[2]に準拠し、カニクイザルを EFD 試験及び PPND 試験に用いて、セマグルチドの影響を評価した。

重要な生殖発生毒性試験の概要を表 2.6.6-25 に示す。

表 2.6.6-25　　重要な生殖発生毒性試験の概要

Species	Study Type	Administration route	Nominal dose levels (mg/kg*)	NOAEL (mg/kg*)	Effect(s) defining NOAEL	Study ID
Rat	Combined fertility and EFD	Subcutaneous	0,0.01, 0.03, 0.09	Maternal toxicity: 0.09	No treatment related adverse changes	207361
				Reproductive performance and fertility: 0.09	No treatment related adverse changes	
				Embryofoetal development: 0.01	Major and minor visceral and skeletal foetal abnormalities at the high and intermediate dose levels	
Rabbit	EFD	Subcutaneous	0, 0.001, 0.0025, 0.0075	Maternal toxicity: 0.0075	No treatment related adverse changes	207360
				Embryofoetal development: 0.001	Incomplete ossification of foetal metacarpals/phalanges, and the minor skeletal and visceral abnormalities at the high and intermediate dose levels could not be excluded to be treatment related	
Cynomolgus monkey	EFD	Subcutaneous	0, 0.015, 0.075, 0.15	Maternal toxicity: 0.15	No treatment related adverse changes	208486
				Embryofoetal development: 0.015	Visceral and skeletal malformations at the high and intermediate dose levels could not be excluded to be treatment related	
Cynomolgus monkey	PPND	Subcutaneous	0, 0.015, 0.075, 0.15	Maternal toxicity: 0.15	No treatment related adverse changes	210061
				Embryofoetal development: 0.015	No developmental abnormalities, but an increase in early pregnancy losses at the high and intermediate dose levels could not be excluded to be treatment related	

Abbreviations: EFD: Embryo-foetal Development; PPND: Pre- and Postnatal Development
*Dose frequency for rat and rabbit was once-daily and for cynomolgus monkey it was every third day
NOAELs for maternal toxicity are the highest doses tested in all species although reduced food consumption and reduced body weight gain and/or body weight loss were observed in maternal animals dosed with semaglutide. These effects are considered to be due to the pharmacological effect of semaglutide, and to be non-adverse effects in relation to the maternal animals.

2.6.6.6.1　　ラットを用いた受胎能及び EFD 試験

ラットを用いた受胎能及び EFD の評価に関して、雌雄の交配 2 又は 4 週間前から妊娠終了時までの時期を含む試験により実施した。主試験の用量設定を最適化するため、主試験の前に予備試験を 2 試験実施した。

2.6.6.6.1.1　　ラットを用いた受胎能及び EFD 試験（予備試験） (Module 2.6.7.11, 206616)

本試験の目的は、主試験の適切用量を特定し、受胎能及び EFD に及ぼすセマグルチドの影響に関する予備情報を得ることであった。SD 系ラットに交配 4 週間前から（2 週間の漸増期間を含む）雌では妊娠第 19 日（GD19）まで、雄では計 9 週間まで、セマグルチドを 1 日 1 回皮下投与した。投与群、用量、各群における動物数を表 2.6.6-26 に示す。

表 2.6.6-26　　ラットを用いた受胎能及び EFD 試験（予備試験）（206616）－投与群、用量及び動物数

Group	Treatment	Nominal Dose (mg/kg/day)*			Number of Animals	
		Week -4	Week -3	Week -2 to Week 5 (males) or to GD19 (females)	Males	Females
1	Control (Vehicle)	0	0	0	8	8
2	Semaglutide	0	0	0.03	8	8
3	Semaglutide	0	0.03	0.21	8	8
4	Semaglutide	0.05	0.21	0.86	8	8

*The start of Week 1 is defined as the start of the mating period

試験中又は試験終了時に、下記に示す項目を評価した：生存数、一般状態、体重、摂餌量、性周期、交配能、授受胎能、妊娠成績、TK、雄の生殖器官重量、肉眼的病理検査ならびに胎児の重量、内臓及び骨格検査。

主として高用量群の雌で円背位が時折認められたものの、セマグルチドの忍容性は概して良好であった。投与初期の体重減少及び体重増加抑制が全投与群で認められた。高用量群の雌で投与最終週に認められた体重の恒常性に関しては、全胚の早期死亡を反映するものと考えられた（後述）。体重の推移は概して摂餌量との相関が認められた。

受胎能に影響は認められなかったが、高用量群ではすべての胚で早期胚死亡が認められたことから、高用量群では胎児検査を実施することができなかった。中用量群では早期胚死亡及び後期胚死亡、及び胎児重量の低値から成る生存着床胚数の顕著な減少が生じた。さらに、一連の外表異常、軽微な内臓異常（皮膚の浮腫／出血、精巣下降不全、左側臍動脈、曲尾端及び通常より小さい胎児）及び重大・軽微な骨格異常〔回転、欠損、短縮、弯曲（curved、kinked）、配列異常、部分癒合、位置異常（肩甲骨、長骨、肋骨、指、胸骨、椎骨及び頭蓋骨）及び不完全骨化〕が生存胎児に認められた。低用量群では、軽微な骨格変化がわずかに認められたのみであった。

雄では生殖器重量（精巣、前立腺、精巣上体及び精嚢）が減少したが、体重に及ぼす影響と関連しており、毒性学的意義はないものと考えられた。

結論として、セマグルチドを 1 日 1 回、SD 系ラットに皮下投与した結果、0.86 mg/kg/日の用量ですべての胚で早期胚死亡が認められた。0.21 mg/kg/日の用量では、生存着床胚数の顕著な減少が生じ、一連の重大及び軽微な骨格及び内臓異常が認められたが、0.03 mg/kg/日の用量では、軽微な骨格変化がわずかに認められたのみであった。以上から、0.21 及び 0.86 mg/kg/日は主要な受胎能及び EFD 試験に用いる用量として高すぎると考えられた。

2.6.6.6.1.2　雌性ラットを用いた受胎能及び EFD 試験（予備試験） (Module 2.6.7.11, 207359)

主試験の用量を最適化するため、雌性 SD 系ラットを用いた受胎能及び EFD 予備試験を追加で実施した。最初の試験（206616）よりも低用量のセマグルチドを 1 日 1 回皮下投与した。交配 4 週間前から投与を開始し（2 週間の漸増期間を含む）、GD17（標準）まで、又は GD20 まで（胎児曝露の評価用）投与した。雌を未投与の雄と交配させ、胎児検査のため GD20 に雌の全例を安楽死処置した。投与群、用量、各群における動物数を表 2.6.6-27 に示す。

表 2.6.6-27　ラットを用いた受胎能及び EFD 試験（予備試験）（207359）－投与群、用量及び動物数

Group	Treatment	Nominal Dose (mg/kg/day)*			Number of Animals	
		Week -4	Week -3	Week -2 to GD17 or GD20	Females treated until GD 17	Females treated until GD20
1	Control (Vehicle)	0	0	0	10	3
2	Semaglutide	0	0	0.05	10	3
3	Semaglutide	0	0.05	0.10	10	3
4	Semaglutide	0.05	0.10	0.15	10	3

*The start of Week 1 is defined as the start of the mating period

試験中又は試験終了時に、下記に示す項目を評価した：生存数、一般状態、体重、摂餌量、摂水量、血漿中カルシトニン（母動物）、血清グルコース（母動物）、性周期、交配能、授受胎能、妊娠成績、TK（胎児曝露を含む）、肉眼的病理検査ならびに胎児の重量、内臓及び骨格検査。

セマグルチドに対する忍容性は良好であった。全投与群で、投与初期の一過性の体重減少、及び体重増加抑制が認められ、体重の推移を反映する摂餌量の低下も伴っていた。投与期間中、軽微な一過性の摂水量の減少が認められた。

カルシトニン測定の結果、GD6 及び GD17 に、投与に関連した母動物の血漿中カルシトニン濃度の増加が認められたが、母動物の血清中グルコース濃度には明らかな影響は認められなかった。

性周期に関して、対照群では全例が 4 日周期を示したが、投与群では 4/5 日周期又は 5 日周期を有する雌の数がやや増加傾向を示した。用量反応性は明らかでなかったことから、性周期の延長に関して、投与との関連性は不明であった。全投与群で黄体数の軽微な減少及び着床数の減少が認められたが、用量反応性は認められなかった。SD 系ラットにおいて、食餌制限及び体重減少により性周期が延長し、黄体数が減少することが示されていることから[37]、性周期及び黄体数に及ぼす影響は、摂餌量及び体重に及ぼすセマグルチドの薬理作用を介したものと考えられた。

全投与群で、用量に関連した胚・胎児死亡数及び着床後胚損失数の増加（早期及び後期吸収）が認められた。中用量及び高用量では、胎盤重量、同腹児重量、雌雄別胎児重量及び全胎児重量は対照群よりも低く、用量反応性が認められた。低用量では同腹児数のみ影響を受け、二次的に同腹児重量も減少した。GD17 まで及び GD20 まで投与された雌に関して、意味のある差異は認められなかった。

胎児の病理検査の結果、以前に実施した予備試験と同様に、投与に関連した一連の軽微／重大な骨格異常〔回転、欠損、短縮、弯曲（curved、kinked）、配列異常、部分癒合、位置異常（肩甲骨、長骨、肋骨、指骨、椎骨及び頭蓋骨）及び不完全骨化〕及び内臓異常〔網膜襞、水頭症及び側脳室拡張、及び重要な血管壁の異常（食道後方部大動脈弓、右鎖骨下動脈ならびに大動脈弓、左側臍動脈及び短い腕頭動脈からなる鎖骨下動脈）〕の発現頻度の増加が認められた。

TK 測定の結果、全投与群で GD20 に胎児のセマグルチドに対する全身曝露が認められ、血漿中濃度は母動物の 3～4%であった。

結論として、セマグルチドを 1 日 1 回、SD 系ラットに皮下投与した結果、摂餌量及び体重に及ぼすセマグルチドの薬理作用を介したものと考えられる黄体数の減少が認められた。全投与群で用量反応性を伴う胚・胎児死亡及び一連の骨格及び内臓異常が認められた。0.1 mg/kg/日が主試験に適した用量と結論した。

2.6.6.6.1.3　　ラットを用いた受胎能及び EFD 試験 (Module 2.6.7.12, 207361)

本試験の目的は、セマグルチドを SD 系ラットに 1 日 1 回皮下投与時の受胎能及び EFD に及ぼすセマグルチドの影響を評価することであった。2 週間の用量漸増期間後、雌に対して目標用量を交配 2 週間前から GD17 まで投与し、GD0 を交配日とした。雄に対しては、目標用量を交配 4 週間前から雌の解剖時（GD20）まで投与した。母動物の血漿中及び臍帯血中カルシトニン測定用に衛星群を含めた。投与群、用量、各群における動物数を表 2.6.6-28 に示す。予備試験（207359）では、低用量（0.1 mg/kg/日）で重大な胎児異常が誘発されたことから、予備試験における低用量をわずかに下回る 0.09 mg/kg/日を高用量として設定した。

表 2.6.6-28　　ラットを用いた受胎能及び EFD 試験（207361）－投与群、用量及び動物数

Group	Treatment	Nominal Dose (mg/kg/day)[ab]			Number of Animals		
					Main Study		Satellite Study[d]
		Week -6 (males) or Week -4 (females)	Week -5 (males) or Week -3 (females)	Week -4 (males) or Week -2 (females) to GD17[c]	Males	Females	Females
1	Control (Vehicle)	0	0	0	22	22	5
2	Semaglutide	0	0	0.01	22	22	5
3	Semaglutide	0	0.01	0.03	22	22	5
4	Semaglutide	0.01	0.03	0.09	22	22	5

[a] See section 2.6.6.9 for information about corresponding achieved exposures and ratios to MRHD in Japanese. [b] The start of Week /Day 1 is defined as the start of the mating period. [c] Males were terminated after 72 or 73 days of dosing i.e. after the termination of the majority of the females (GD20). [d] Satellite animals received only one week of dose escalation (Week -1), all at 0.01 mg/kg/day, prior to mating. Hereafter they were dosed at the target dose levels (0, 0.01, 0.03 and 0.09 mg/kg/day) until GD20.

試験中又は試験終了時に、下記に示す項目を評価した：

母動物及び雄：生存数、一般状態、体重、摂餌量、摂水量、血漿中カルシトニン（母動物）、性周期、交配能、授受胎能、妊娠成績、TK（雌のみ）、雄の生殖器官重量、子宮重量、肉眼的病理検査。

胎児：血漿中カルシトニン、重量ならびに外表、内臓及び骨格検査。

雄及び母動物に対するセマグルチドの忍容性は良好であった。雄の 1 例で、明らかに投与とは無関係な上部胸背部の皮膚裂傷がみられたことから、試験途中で安楽死処置した。全投与群で体重増加抑制が認められ、摂餌量は概して体重の推移を反映した。雌では、主として用量漸増期から交配時まで体重増加抑制が認められたが、体重を妊娠子宮重量で調整すると、体重増加抑制は、全投与群の雌で妊娠期間中にのみ認められた。

雄では、生殖器官重量（精巣、前立腺及び精巣上体）の変化が認められたが、これは体重に及ぼす影響と関連しており、有害ではないものと考えられた。

2 回目の予備試験と同様に、投与群では、対照群と比較して 4/5 日周期又は 5 日周期を有する雌の数がやや増加したが、用量反応性は明らかでなかった。さらに、軽微ではあるが、用量依存的な黄体数の減少（低用量群では統計学的有意差は認められなかった）、着床数の減少、生存同腹児数の減少及び同腹児重量の低下が認められた。SD 系ラットにおいて、食餌制限及び体重減少により性周期が延長し、黄体数が減少することが示されていることから[37]、性周期及び黄体数に及ぼす影響は、摂餌量及び体重に及ぼすセマグルチドの薬理作用による二次的な適応反応と考えられた。以上に基づくと、当該所見の毒性学的意義はないものと考えられる。

高用量群では、妊娠子宮重量及び胎盤重量がわずかに減少した。このことは高用量群における同腹児に及ぼす影響及び妊娠雌性ラットの体重減少によるものであった。本試験の全用量群では、着床前及び着床後胚損失率に及ぼすセマグルチドの影響は認められなかった。

胎児の病理検査の結果、中用量群及び高用量群では、一連の重要又は軽微な異常（心血管異常、特に右鎖骨下動脈起始変異を有する胎児／同腹児の発現頻度の増加）が認められた。3 腹 3 胎児に重要な心血管系異常（食道後方部大動脈弓、重複大動脈弓及び膜様部心室中隔欠損）が認められた。軽微な内臓異常として脳室拡張が認められた。軽微な骨格異常及び骨格変異〔上顎と頬骨の架橋性骨化／部分癒合、肋軟骨、頸肋との癒合／部分癒合を有する肋骨の部分癒合、及び尾椎の配列異常（曲尾と一致）〕を有する胎児／同腹児の発現頻度の増加も認められた。これらの異常の大部分は高用量群で認められたものであり、中用量群では、重要な心血管系異常である食道後方部大動脈弓、ならびに軽微な異常として、軽微な骨格変異の増加を伴う右鎖骨下動脈起始変異が 1 例の胎児で認められたのみであった。低用量群では、投与に関連すると考えられた胎児異常は認められなかった。

セマグルチドを投与された母動物及び胎児のカルシトニンレベルは対照群と同様であった。

結論として、セマグルチドを 1 日 1 回、SD 系ラットに皮下投与した結果、性周期の延長及び黄体数の減少に伴い、着床数及び同腹児数に影響が認められた。以上の影響はいずれも摂餌量及び体重に及ぼすセマグルチドの薬理作用の二次的影響であり、有害ではないものと考えられた。したがって、繁殖能及び授受胎能に対する NOAEL は高用量である 0.09 mg/kg/日であった。中用量及び高用量群で胎児に内臓及び骨格異常が認められたことから、EFD に関する NOAEL は、投与による有害影響が認められなかった低用量の 0.01 mg/kg/日と考えられた。

ラットで認められた胚毒性の作用機序を解明するため、一連のメカニズム試験を包括的に実施した。試験結果及びヒトとの関連性に関する詳細は、Module 4.2.3.7.3 ‘Embryotoxicity findings in rats: Assessment of human relevance’に示す。評価の概要は 2.6.6.8.7.1 に示す。

2.6.6.6.2　　ウサギを用いた EFD 試験

ウサギを用いて EFD 試験を 3 試験実施した。最初の予備試験では、セマグルチドの母動物に対する忍容性が不良であったことから、主試験を実施する前に、2 回目の予備試験を行い、忍容性及び用量設定を確認する必要があった。

2.6.6.6.2.1　　ウサギを用いた EFD 試験（予備 DRF 試験）(Module 2.6.7.11, 206536)

本試験の目的は、主試験の適切用量を特定し、ウサギの EFD に関する予備情報を得るため、非妊娠雌性ニュージーランドホワイト種ウサギにおけるセマグルチドの MTD を評価することであった。MTD 試験群の投与群、用量、各群における動物数を表 2.6.6-29 に示す。交配試験群の雌に対して、GD6～GD19 に投与した。GD29 に安楽死処置し、検査に供した。

表 2.6.6-29　　ウサギを用いた DRF 及び EFD 試験（206536）－投与群、用量及び動物数

MTD 試験群

Group	Treatment	Day	Nominal Dose (mg/kg)	Number of Animals Females
1	Semaglutide	1-8 15-29 33-64	0.01 /day 0.01 twice-weekly 0.025 twice-weekly	3
2	Semaglutide	1-14 15-25 26-57	0.005 /day 0.005 twice-weekly 0.01 twice-weekly	3
3	Semaglutide	1-13	0.01/day	3

交配試験群

Group	Treatment	Nominal dose (mg/kg)	Number of Animals Females
4	Control (Vehicle)	0	6
5	Semaglutide	0.001 /day	6
6	Semaglutide	0.005 /day	6
7	Semaglutide	0.01 every second day	6
8	Semaglutide	0.01 /day	6

試験中又は試験終了時に、下記に示す項目を評価した：生存数、一般状態、体重、摂餌量、TK、抗体産生、肉眼的病理検査、妊娠成績（交配試験群のみ）ならびに胎児の重量、内臓及び骨格検査。

0.01 mg/kg/日投与群（第 1 群）では体重低下、体重増加抑制、摂餌量の低下及び糞排泄量の変化が認められたことから、MTD を超えたものと考えられた。週 2 回投与群（第 2 群）では忍容性が向上し、0.025 mg/kg の週 2 回投与まで用量を漸増したが、成功しなかったため、最終群（第 3 群）に対して忍容性が確認された用量である 0.01 mg/kg を、GD6～GD19 の 13 日間投与した。その間、用量漸増は実施しなかった。

交配試験群では、全投与群で投与方法に関係なく GD6～GD19 に体重減少が認められたが、0.001 mg/kg/日投与群では、体重増加抑制の割合は 66%であった。摂餌量は体重の推移を反映し、各投与群における摂餌量はそれぞれ対照群と比較して 25、82、84 及び 88%減少した。

妊娠成績に変動が認められたが、セマグルチドとの関連性を明確にできるような用量関連的な影響は認められなかった。最低用量群を除き、全投与群で投与方法に関係なく軽微及び重大な胎児異常の発現頻度が増加した。高用量群の雌で、骨格に影響を及ぼした特筆すべき重大な異常として、長骨の弯曲（上腕骨及び大腿骨）、下顎骨、尺骨及び腓骨の不完全骨化が認められた。群サイズが小さいことから、認められた異常とセマグルチド投与との関連性については不明と考えられた。2 腹 2 胎児に動脈弓の拡張が認められた。本所見は対照群でも時折認められており、主試験（207360）では同様の所見が認められなかったことから、投与との関連性はないものと考えられた。

結論として、セマグルチドにより母動物で体重減少、体重増加抑制及び摂餌量の減少が認められた。主試験であるウサギを用いた EFD 試験において、GD6～GD19 まで投与する場合、0.01 mg/kg/日の用量まで忍容性があるものと考えられた。

2.6.6.6.2.2　　ウサギを用いた EFD 試験（予備試験）(Module 2.6.7.11, 207358)

主試験の用量設定を最適化するため、雌性ニュージーランドホワイト種ウサギを用いて追加の EFD 試験を実施した。2 本目の予備 EFD 試験の目的は、セマグルチドを妊娠ニュージーランドホワイト種ウサギに対して 1 日 1 回皮下投与時の EFD に関する予備情報を得ること、及び主試験の適切用量を確立することであった。対照群を含む 4 群（第 1 群～第 4 群）に対して、GD6～GD19 に投与した。2 群（第 5 群及び第 6 群）に対しては、GD6 の着床時に定常状態となるよう、交配 7 日前から投与を開始し、GD19 まで投与した。残り 2 群（第 7 群及び第 8 群）に対しては、胎児曝露の評価用に臍帯血試料を採取するため、GD6～28 に投与した。第 6 群を除く全動物を GD29 に安楽死処置し、検査に供した。第 6 群の動物は、交配ができる状態ではなかったことから、投与 14 日後に安楽死処置し、検査に供した。投与群、用量、投与方法、各群における動物数を表 2.6.6-30 に示す。

表 2.6.6-30　　EFD 試験（予備試験）（207358）－投与群、用量及び動物数

Group	Treatment	Treatment days (GD)	Nominal Dose (mg/kg/day)	Number of Females
1	Control (Vehicle)	6 to 19	0	6
2	Semaglutide	6 to 19	0.001	6
3	Semaglutide	6 to 19	0.005	6
4	Semaglutide	6 to 19	0.0075	6
5	Semaglutide	-7 to 19	0.001	6
6	Semaglutide	1-14*	0.01	6
7	Semaglutide	6-28**	0.001	6
8	Semaglutide	6-28**	0.0075	6

GD=Gestation day. * Dosed on 14 consecutive days, animals not suitable for mating **Dosed to GD28 to provide umbilical blood for analysis

試験中又は試験終了時に、下記に示す項目を評価した：

母動物：生存数、一般状態、体重、摂餌量、摂水量、血液生化学的検査、血清中グルコース、血漿中カルシトニン、TK、肉眼的病理検査及び妊娠成績。

胎児：血漿中カルシトニン、胎児曝露、体重ならびに外表、内臓及び骨格検査。

セマグルチドの最高用量である 0.01 mg/kg/日投与群では、活動性低下、糞の排泄低下及び糞の形態異常、尿量の低下、接触時の体温低下及びやせた状態といった、投与に関連した一般状態変化が認められ、進行性の体重低下及び顕著な摂餌量の減少が認められた。以上より、本用量群は交配に適さないと考えられ、投与 14 日後に安楽死処置した。0.005 及び 0.0075 mg/kg/日投与群では、投与に関連した一般状態変化として、糞の排泄低下及び糞の形態異常のみが認められ、0.0075 mg/kg/日投与群では、GD6～GD28 にやせた状態も認められた。全投与群で投与初期の一過性の体重低下が概して認められ、0.0075 mg/kg/日投与群では GD6 と比較して GD19 でも依然として体重が低値であったことから、その影響は 0.0075 mg/kg/日投与群で最も顕著であった。摂餌量は体重の推移と一致し、0.005 mg/kg/日以上の投与群で顕著に減少した。同様に、主に 0.005 mg/kg/日以上の投与群で摂水量が減少した。血液生化学的検査の結果、0.005 mg/kg/日以上の投与群で、摂餌量の減少による二次的影響と考えられる血漿中尿素濃度の軽微な減少が認められた。

GD29 における対照群及び第 7 群（0.001 mg/kg/日）の胎児では、セマグルチド濃度は LLOQ 未満であった。第 8 群（0.0075 mg/kg/日）では、いずれの胎児からもセマグルチドが検出され、母動物の血漿中濃度の約 1～2%であった。

胎児の病理検査の結果、0.005 mg/kg/日投与群の 1 例に、重大な心血管系の異常（肺動脈収縮を伴う大動脈弓拡張）が認められた。本所見は対照群でも時折認められており、0.0075 mg/kg/日までの投与群を設けた主試験（207360）において、同様の所見が認められなかったことから、投与との関連性は不明と考えられた。この胎児では、筋性部／膜様部の心室中隔欠損も認められた。対照群を含む全群で一連の軽微な骨格異常（中手骨の不完全骨化、胸骨分節中心の追加／部分癒合）が認められた。発現頻度の増加は軽微であることから、以上の所見は投与とは関係のない変化と考えられた。

結論として、セマグルチドの 0.01 mg/kg/日投与群では、一般状態の変化及び顕著な進行性の体重減少が認められたことから、本用量は主試験では使用しないこととした。一方、GD6～GD19 に投与時の、ウサギを用いた EFD 試験（主試験）の忍容性は、最大 0.0075 mg/kg/日と考えられた。

2.6.6.6.2.3　ウサギを用いた EFD 試験 (Module 2.6.7.13.A, 207360)

本試験の目的は、ニュージーランドホワイト種ウサギの GD6～GD19 の器官形成期に、セマグルチドを 1 日 1 回皮下投与時の EFD に及ぼすセマグルチドの影響を評価することであった。予備試験の結果、用量漸増期間を設けても忍容性が改善されなかったことから、用量漸増期間は設けなかった。GD29 に全動物を安楽死処置し、検査に供した。投与群、用量、各群における動物数を表 2.6.6-31 に示す。

表 2.6.6-31　EFD 試験（207360）－投与群、用量及び動物数

Group	Treatment	Treatment days (GD)	Nominal Dose (mg/kg/day)[a]	Number of Females
1	Control (Vehicle)	6 to 19	0	22
2	Semaglutide	6 to 19	0.001	22
3	Semaglutide	6 to 19	0.0025	22
4	Semaglutide	6 to 19	0.0075	22

[a] See section 2.6.6.9 for information about corresponding achieved exposures and ratios to MRHD in Japanese

試験中又は試験終了時に、下記に示す項目を評価した：

母動物：生存数、一般状態、体重、摂餌量、摂水量、血清中グルコース、TK、肉眼的病理検査及び妊娠成績。

胎児：体重ならびに外表、内臓及び骨格検査。

母動物では、セマグルチド投与に関連した一般状態変化として、中用量及び高用量群で糞量の減少が数例で認められたのみであり、セマグルチドに対する忍容性は良好であった。同用量群では、投与開始時である GD6 に一過性の体重減少が認められた。全投与群で用量に関連した体重増加抑制が認められ、その影響は高用量群で最も顕著であり、GD6～GD19 まで体重は減少した。GD19 の投与終了後、

概して対照群よりも高い体重増加が認められた。体重の推移は摂餌量及び摂水量を反映した。すなわち、投与期間では用量に関連した摂餌量及び摂水量の減少が認められ、GD20～GD29 の休薬期間では回復性が認められた。

GD29 に対照群の雌の全例で妊娠が認められたが、低用量群の 2 例、中用量群の 1 例、高用量群の 1 例で妊娠しなかった。これら 4 例では、黄体が認められず、着床も観察されなかったことから、投与との関連性は不明であった。統計学的有意差はないが、用量依存性のある着床後胚損失率の増加が中用量及び高用量群でみられ、主として早期吸収の発現頻度の増加に伴う同腹児数の減少に起因するものであった。以上の変化は対照群の背景データの範囲内であったが、セマグルチド投与との関連性は否定できなかった。

胎児の病理検査の結果、セマグルチド投与群（主として中用量及び高用量群）では、軽微な骨格異常（頭蓋骨の縫合、裂溝／過剰縫合、胸骨分節中心の追加、胸骨分節の架橋性骨化／部分癒合／癒合、中指骨／指骨の不完全骨化／骨化欠損）の発現頻度の増加が認められた。頭蓋骨の異常を除き、高用量群における当該所見の発現頻度は背景データの範囲を超えていたことから、これらは投与に関連するものと考えられた。低用量群では、軽微な骨格異常の発現頻度は対照群とほぼ同様であった。2 つの軽微な内臓異常である腎盂拡張が高用量群で、前趾彎曲が高用量及び中用量群でそれぞれ認められ、発現頻度は対照群及び背景対照の範囲よりも高かった。したがって、投与との関連を否定できなかった。ウサギでは食餌制限により妊娠損失及び胎児異常の増加が生じることが報告されていることから[38,39]、着床後胚損失率の増加、ならびに軽微な骨格及び内臓異常は、摂餌量及び体重に及ぼす顕著な母体への二次的影響と考えられたものの、セマグルチドの EFD に及ぼす直接影響を否定することができなかった。

結論として、セマグルチドを妊娠ニュージーランドホワイト種ウサギに、GD6～GD19 の器官形成期に 1 日 1 回皮下投与した結果、母動物に対する顕著な体重減少及び摂餌量の減少が認められた。このことと一致して、着床後胚損失率の増加、胎児の中指骨／指骨の不完全骨化ならびに軽微な胎児の骨格及び内臓異常の発現頻度の増加が認められた。着床後胚損失率の増加及び胎児で認められた病理所見は、摂餌量及び体重に及ぼす顕著な母体への二次的影響と考えられたものの、セマグルチドの EFD に及ぼす直接影響を否定することができなかった。以上から、NOAEL は本試験の低用量である 0.001 mg/kg/日と考えられた。

2.6.6.6.3　カニクイザルを用いた EFD 及び PPND 試験

セマグルチドの EFD に及ぼす影響をさらに評価するため、初回のパイロット試験及びその後の主試験にカニクイザルを用いた。さらに、ラットにおいて、臨床用量で胚毒性が認められたことから、カニクイザルを用いた PPND 試験を実施した。

2.6.6.6.3.1　　カニクイザルを用いた EFD 試験（予備試験）(Module 2.6.7.11, 208477)

本試験の目的は、想定したとおり雌で体重減少が認められ、妊娠が維持できなくなるかどうかを評価すること、及び EFD に及ぼすセマグルチドの影響に関する予備情報を得ることであった。セマグルチドをカニクイザルの器官形成期に 3 日に 1 回皮下投与した。交配後の第 16 日に妊娠が認められた雌に対し、GD16 及び GD18 に用量漸増を実施して忍容性を確認し、器官形成期の開始日である GD20（器官形成期：GD20～GD50）に定常状態となるよう投与した。GD99～101 に雌を安楽死処置し、胎児検査を実施した。投与群、用量、各群における動物数を表 2.6.6-32 に示す。高用量群である 0.15 mg/kg（3 日に 1 回投与）は、母動物に対して薬理作用を介した顕著な体重増加抑制及び摂餌量の低下が予想され、MTD におけるヒト濃度－時間曲線下面積（AUC）の 10 倍の曝露量比とした。本試験では対照群を含めなかった。

表 2.6.6-32　　カニクイザルを用いた EFD 試験（予備試験）（208477）－投与群、用量及び動物数

Group	Treatment	Nominal Dose (mg/kg)			Number of pregnant females
		GD16	GD18	GD20-50*	
1	Semaglutide	0.014	0.014	0.075	6
2	Semaglutide	0.014	0.075	0.15	6

*Dose administered every third day

試験中又は試験終了時に、下記に示す項目を評価した：

雌動物：生存数、一般状態、体重、血清中グルコース、妊娠兆候観察、TK、肉眼的病理検査。

胎児：体重、身体測定、臓器重量ならびに外表、内臓及び骨格検査。

雌の全例について、投与期間を通じて体重低下が認められ、低用量及び高用量群では、それぞれ平均 12%及び 18%低下した。このことと一致して、食餌回数が減少し、脱水を呈する個体も時折認められたことから、試験期間中に栄養食及び経口補水液を適宜投与した。

GD44 及び GD47 に超音波検査を実施した結果、低用量群の 1 例に妊娠損失が認められた。GD31～GD50 の妊娠損失は 1/12 例であったが、背景対照データの範囲内であった。GD99～GD101 に残り 11 例を検査したが、対照群と比較して、胎盤重量、胎児重量及び身体測定、又は胎児の臓器重量に顕著な影響は認められなかった。

胎児の肉眼的病理検査において、低用量群の 1 例に右脚及び尾部を含む右体側下部の赤色化が認められた。内臓検査では、右卵巣、右副腎及び子宮右側の赤色化も認められた。試験実施時には、皮膚

の赤色化は試験施設の背景データでこれまで認められていなかったことから、投与との関係は不明であったが、この変化は子宮における胎児の位置異常によるものと考えられていた。試験実施以降、同一試験施設で溶媒対照動物において皮膚の赤色化が確認されている。

結論として、想定したとおり薬理作用を介した摂餌量及び体重に及ぼすセマグルチドの影響が認められた。投与期間中に顕著な体重減少が認められ、一般状態変化として脱水が時折認められたことから、母動物の MTD は 0.15 mg/kg（3 日に 1 回投与）と考えられた。

2.6.6.6.3.2　　カニクイザルを用いた EFD 試験 (Module 2.6.7.13.B, 208486)

本試験の目的は、カニクイザルの器官形成期（GD20～GD50）に 3 日に 1 回皮下投与時の、カニクイザルの EFD に及ぼすセマグルチドの影響を評価することであった。交配後の第 16 日に妊娠が認められた雌に対し、GD16 及び GD18 に用量漸増を実施して忍容性を確認し、GD20 に定常状態となるようにした。GD99～101 に雌を安楽死処置し、胎児検査を実施した。投与群、用量、各群における動物数を表 2.6.6-33 に示す。本試験では、妊娠雌をケージあたり 2 頭飼育した。高用量である 0.15 mg/kg（3 日に 1 回投与）は、以前に実施したパイロット試験（208477）に基づくと、MTD であると考えられた。

表 2.6.6-33　　カニクイザルを用いた EFD 試験（208486）－投与群、用量及び動物数

Group	Treatment	Nominal Dose (mg/kg)[a]			Number of pregnant females
		GD16	GD18	GD20-50[b]	
1	Control (Vehicle)	0	0	0	16
2	Semaglutide	0.015	0.015	0.015	16
3	Semaglutide	0.015	0.075	0.075	16
4	Semaglutide	0.015	0.075	0.15	16

[a] See section 2.6.6.9 for information about corresponding achieved exposures and ratios to MRHD in Japanese
[b] Dose administered every third day

試験中又は試験終了時に、下記に示す項目を評価した：

雌動物：生存数、一般状態、体重、妊娠兆候観察、TK、肉眼的病理検査。

胎児：体重、身体測定、臓器重量ならびに外表、内臓及び骨格検査、異常部位の病理組織学的検査。

GD16～GD50 の投与期間中に認められた一般状態変化は、明らかな投与との関連性がみられなかったものの、数例でセマグルチドの薬理作用と一致した一般状態変化（中用量及び高用量群でやせた状態、悪液質、脱水又は活動性低下）が認められた。投与群では概して摂餌量の低下がみられ、投与期間中の全投与動物で、このことと一致した用量関連性のある体重低下が認められた。GD15～GD50 の

平均体重減少率は、それぞれ低用量群で 12%、中用量群で 14%、高用量群で 18%であったが、対照群では同期間中に 10%の体重増加が認められた。

GD26~GD60 に対照群の雌 1/16 例に妊娠損失が認められ、投与群では 2/16 例であったが、この妊娠期間の胚・胎児損失に関する背景データの範囲内であった。胎児の体重、身体測定、臓器重量又は胎盤重量に関して、投与に関連した変化は認められなかった。

胎児の肉眼的及び病理組織学的検査を実施したが、胎児の心臓の形態学又は主要な血管組織に及ぼす影響は認められなかった。胎児で認められた変異の大部分は背景対照の範囲内であった。しかしながら、中用量及び高用量群の数例では、試験実施施設でこれまでに認められたことのない異常（全身性又は限局性の皮膚の赤色化、右大脳半球奇形を生じる頭蓋骨における血液貯留、癒合腎、肝嚢胞、頸胸椎境界部での椎骨／肋骨／第 1 腰椎の配列移動）が観察された。複合異常が認められたのは 1 例のみであった。低用量群の胎児では、身体左部の広範囲に顕著な皮膚の赤色化がみられ、病理組織学的検査で自己融解が認められた。しかしながら、この動物は帝王切開で生まれた個体であり、さらに、手首の捻れ及び硬化が認められたものの骨格異常はみられなかった。左腕部のサイズ及び形状と一致した左胸部の領域に、赤色化は認められなかった。手首の硬化と赤色化の原因は、子宮における胎児の位置によるものと考えられる。試験実施時には、皮膚の赤色化は試験施設でこれまで認められていなかったが、試験実施以降、同一試験施設で溶媒対照動物において皮膚の赤色化が認められていることから、投与との関係はないものと考えられた。対照群と同様に、その他の投与群では重度の皮膚の赤色化は認められなかった。ある場合には、胎児を母体から取り出す際に皮膚は正常であったが、胎児をバルビタールにより安楽死処置する際には赤色化がみられた。皮膚の赤色化について病理組織学的検査を実施した結果、関連する病理変化として、概して真皮及び皮下組織における極微～軽微な多発性のうっ血又は極微～軽微な多発性の出血が認められた。本試験では、対照群を含む全群で皮膚の赤色化が認められたが、以降のカニクイザルを用いた PPND 試験（210061）では、皮膚の赤色化は認められなかったことから、総合的に皮膚の赤色化は偶発的であるか、安楽死処置の操作に関連すると考えられた。

高用量群の胎児に認められた、奇形に分類される右大脳半球奇形は、硬膜と脳の間に血液が貯留することで生じたものである。本所見は GD71 の超音波検査によりはじめて認められたが、胎児は生存し、GD100 の帝王切開時では正常状態であった。本所見は試験施設の対照サルでこれまでに認められていなかった。その他の内臓奇形として、中用量群の胎児に癒合腎が認められた。腎臓は腎門部の頭蓋側及び尾側が結合し、皮質がひと続きに癒合しており、髄質層の一部も癒合していた。全体的な胎児発生に関して、腎臓の機能不全は認められなかった。本所見は試験施設の対照サルでこれまでに認められていなかった。対照サルではまれな内臓異常（変異）として、中用量群の胎児に肝嚢胞が認められた。

高用量群及び中用量群でそれぞれ 1 例の胎児に、骨格奇形として頸胸椎境界部での椎骨／肋骨／胸骨分節の配列移動が認められた。以上の所見は、対照群のサルでこれまでに認められていなかった。

全体的に、本試験で認められた胎児の病理所見は自然発生的にみられなかったものの、投与群での上記所見の発生頻度は対照群及び背景データ（データは少ないが）を上回ったことから、投与との関連性を否定することはできなかった。

結論として、セマグルチドをカニクイザルに対して器官形成期（GD20～GD50）に 3 日に 1 回皮下投与した結果、想定したとおり薬理作用を介した母動物の体重減少が投与期間中に認められた。中用量及び高用量群では、このことと一致した胎児の異常が散発的に認められ、セマグルチド投与との関連性を否定できなかった。低用量群では、投与に関連した所見が認められなかったことから、NOAEL は 0.015 mg/kg（3 日に 1 回投与）と考えられた。

2.6.6.6.3.3　カニクイザルを用いた EFD 及び PPND 試験 (Module 2.6.7.14.A, 210061)

本試験の目的は、母動物の妊娠、出産、授乳期、及び EFD、新生児の生存及び PPND に及ぼすセマグルチドの影響を評価することであった。妊娠カニクイザルの GD20～GD140 に、セマグルチドを 3 日に 1 回皮下投与した。交配後の第 16 日に妊娠が認められた雌に対し、GD16 及び GD18 に用量漸増を実施して忍容性を確認し、GD20 に定常状態となるよう投与した。以降は GD140 まで反復投与した。出産及び授乳時に体重減少のみられた母動物に対しては、ストレスを軽減させるために以降の投与を中止した。したがって、本試験では新生児の PPND 評価を実施できたが、出生後の母動物の機能評価は実施できなかった。妊娠後第 181 日に全動物（母動物及び新生児）を安楽死処置し、検査を実施した。投与群、用量、各群における動物数を表 2.6.6-34 に示す。本試験では、妊娠雌を群飼育（3 匹／ケージ）した。

表 2.6.6-34　カニクイザルを用いた EFD 及び PPND 試験（210061）－投与群、用量及び動物数

Group	Treatment	Nominal Dose (mg/kg)[a]			Number of pregnant females
		GD16	GD18	GD20-140*	
1	Control (Vehicle)	0	0	0	24
2	Semaglutide	0.015	0.015	0.015	24
3	Semaglutide	0.015	0.075	0.075	24
4	Semaglutide	0.015	0.075	0.15	24

a See section 2.6.6.9 for information about corresponding achieved exposures and ratios to MRHD in Japanese
*Dose administered every third day

試験中又は試験終了時に、下記に示す項目を評価した：

雌動物：生存数、一般状態、体重、妊娠兆候観察、妊娠成績、TK、臓器重量、肉眼的病理検査。

新生児：生存数、一般状態、体重、神経行動学的成績、握力、身体測定、血液学的検査、血液生化学的検査、外表異常検査、骨格の発育検査（X 線検査）、臓器重量、肉眼的病理検査、病理組織学的検査。

セマグルチド投与に関連した一般状態変化は認められなかった。試験中に妊娠雌 2 例（対照群の 1 例を GD120 に、中用量群の 1 例を GD142 に）を安楽死処置した。両例とも安楽死処置までは特に異常は認められなかったが、一般状態が悪く、超音波検査により胎児の死亡が認められた。剖検の結果、いずれの胎児も自己融解が認められた。本所見は対照群及び中用量群の 1 例でのみ認められたことから、中用量群の胎児で認められた死亡について、投与との関連性はないものと考えられた。

セマグルチド投与群の全例で投与初期（GD16～GD50）に体重減少が認められた。体重減少率の平均は、低用量群で 6%、中用量群で 15%、高用量群で 16%であり、EFD 試験（208486）で認められた体重減少とほぼ同様であった。残りの投与期間である GD50～GD140 では、体重増加は概して対照群と同様であった。最終的に、投与終了時である GD140 では、セマグルチド投与群の体重は対照群よりも低かったが、低用量群では統計学的有意差は認められなかった。投与終了後投与群の体重は回復傾向がみられ、試験終了時までに、GD16～出産後第 175 日における体重増加量は、低用量及び中用量群では対照群と同様であったが、高用量群ではわずかに低いままであった。

対照群及び背景対照の範囲と比較して、中用量群及び高用量群では、早期妊娠損失率の増加（GD16～GD50）が認められた。カニクイザルでは胚の子宮壁への着床が浅く[40]、本動物種では妊娠早期にストレスに関連した妊娠損失の影響を受けやすい。さらに個体別の母動物の体重データから、投与開始時の母動物の低体重が妊娠損失の要因となり得ることが示唆された。したがって、本試験で中用量群及び高用量群で認められた早期妊娠損失率の増加は、セマグルチドの直接影響によるものというよりは、むしろ母動物の体重減少に関連したものと考えられた。しかしながら、利用可能な背景データが限られていること、及び母動物への顕著な体重減少を伴うカニクイザルの試験経験がこれまでないことから、早期妊娠損失が投与の影響であり、有害影響であることは否定できない。

セマグルチド投与群では、出生後の死亡の発現頻度が対照群よりも高かった。しかしながら、その発現頻度は背景対照の範囲内であり、本試験における対照群の新生児の死亡が背景データと比較して非常に低かったことによるものと考えられた。投与に関連した一般的な原因又は一般状態変化も認められず、母動物へのセマグルチド投与との関連性が考えられる新生児について、肉眼的及び病理組織学的変化は認められなかった。したがって、出生後の死亡の増加が認められたが、投与に関連した変化ではないものと考えられた。

中用量及び高用量群では、出産後第 1 日における新生児の体重は対照群よりも低かった。しかしながら、母動物及び出生児のいずれにも投与が行われていない授乳期では、同投与群の母動物又は新生児のいずれかの体重増加量は対照群よりも高い傾向がみられ、剖検時である出産後第 180～182 日では、群間差は認められなかった。同投与群ではこのことと一致して、軽微であり、必ず統計学的有意差がみられるわけではなかったが、出産後の身体測定（頂踵長、胸囲、上肢長及び下肢長）の低値が認められた。一方、体重に関しては、剖検時では対照群と同様であった。投与に関連すると考えられる外表異常又は病理組織学的所見は認められなかった。

結論として、妊娠カニクイザルに GD16～GD140 にセマグルチドを 3 日に 1 回皮下投与した結果、中用量及び高用量群で母動物の顕著な体重減少及び早期妊娠損失の増加が認められ、通常よりもやや小さい新生児を出産した。早期妊娠損失が母動物の体重減少による二次的変化であるという解釈を支持する背景データがなかったことから、NOAEL は低用量である 0.015 mg/kg（3 日に 1 回投与）と考えられた。

2.6.6.6.4　　幼若動物を用いた試験

幼若動物を用いた試験は、現行のガイダンス[41,42]に準拠して実施した。セマグルチドの小児に対する開発計画に関して、規制当局（PDCO/EMA、FDA）との協議に基づき、ラットを用いて幼若動物の毒性試験を実施し、性成熟時期、神経学的行動及び学習評価項目、及び発達中の膵臓に対する安全性評価項目に焦点をあてた。セマグルチドは薬理作用を介して体重減少に引き続き体重増加抑制を生じることが知られている。ラットでは、摂餌量の減少は性成熟遅延を誘発することが知られていることから[43]、体重に及ぼす影響を排除するため、高用量群の摂餌量に対し対照群、低用量群及び中用量群の摂餌量を調整したペアフィード法を用いて幼若動物の毒性試験を実施した。さらに、ペアフィード法による影響を評価するため、自由摂餌とした対照群も設けた。

2.6.6.6.4.1　　幼若ラットを用いた皮下投与による DRF 試験 (Module 2.6.7.15, 214276)

本試験の目的は、セマグルチドを幼若 SD 系ラットに 1 日 1 回、21 日～55 日齢に皮下投与時の毒性及び TK を評価し、主試験に用いる適切用量を確立することであった。1 週間の用量漸増期間を含めた。投与群、用量、各群における動物数を表 2.6.6-35 に示す。対照群を 2 群設け、1 群はペアフィードによる群、もう 1 群は自由摂餌群とした。ペアフィード対照群に加え、セマグルチド低用量及び中用量群も、高用量群の摂餌量に対してペアフィードとした。自由摂餌対照群及び高用量群に対しては、その他の群よりも 1 週前に投与を実施し、高用量群の摂餌量を測定してその他の群にペアフィードを行った。

表 2.6.6-35　　幼若ラットを用いた皮下投与による DRF 試験（214276）ー投与群、用量及び動物数

Group	Treatment	Feeding Regimen[a]	Nominal Dose (mg/kg/day)			Number of Animals	
			Day 21-24 of age	Day 25-27 of age	Day 28-55 of age	Males	Females
1	Control	Pair-fed	0	0	0	10	10
2	Semaglutide	Pair-fed	0.03	0.03	0.03	10	10
3	Semaglutide	Pair-fed	0.03	0.13	0.13	10	10
4	Semaglutide	*Ad libitum* fed	0.03	0.13	0.6	10	10
5	Control	*Ad libitum* fed	0	0	0	10	10

[a]Groups 1, 2 and 3 were pair-fed to the food consumption of the high dose semaglutide treated group (Gr. 4).

試験中又は試験終了時及び回復期間終了時に、下記に示す項目を評価した：生存数、一般状態（身体状態スコアを含む）、体重、摂餌量、性成熟、血液学的検査、血液生化学的検査（リパーゼ及びアミラーゼを含む）、尿検査、TK、臓器重量、肉眼的病理検査、病理組織学的検査（一部の臓器に対して実施）。

用量依存的な状態の悪化を示す個体数が増加したものの、試験用量のセマグルチドに対する忍容性は良好であった。高用量群の雄の 1 例では、顕著な体重増加減少ならびに円背位及び立毛といった一般状態変化を呈したことから、26 日齢時に安楽死処置した。病理組織学的検査の結果、一般状態の悪化に関連する所見は認められなかったものの、セマグルチド投与との関連性を否定できなかった。

想定したとおり、自由摂餌高用量群の摂餌量は、自由摂餌対照群と比較して顕著に減少した。低用量群及び中用量群では、高用量群及びペアフィード対照群よりも軽微な摂餌量の低下傾向がみられた。全投与群及びペアフィード対照群では、自由摂餌対照群と比較して顕著な体重増加抑制が認められた。しかしながら、セマグルチド投与群ではペアフィードにも関わらずペアフィード対照群よりも体重増加抑制が認められたことから、用量反応性はみられないものの、雄におけるセマグルチドの体重に及ぼす影響は、制限給餌による影響よりも強いことが示された。雌では、低用量及び中用量群で摂餌量がやや低かったことと一致して、体重増加抑制は最も顕著であったものの、体重増加抑制はセマグルチド投与群とペアフィード対照群とで本質的に同様であった。

雌では、自由摂餌対照群と比較してペアフィード対照群の体重が低く、膣開口の日齢を指標とした性成熟遅延を反映するものであった。これら 2 群の膣開口時の体重は同様であった。セマグルチド投

与群の雌では、ペアフィード対照群と比較して膣開口遅延が認められ、体重はペアフィード対照群よりも大きかった。この影響は中用量群で最も顕著であったことから、用量反応性は認められなかった。

雄では、統計学的有意差は認められなかったものの、自由摂餌対照群と比較してペアフィード対照群の体重減少が認められ、亀頭包皮分離の開始～終了日齢を指標とした軽微な性成熟の遅延が認められた。しかしながら、自由摂餌対照群よりもペアフィード対照群の体重が低い時に亀頭包皮分離が認められ、このことは、文献の報告と一致する[43]。セマグルチド投与群の雄では、体重はペアフィード対照群よりもさらに低く、ペアフィード対照群と比較して亀頭包皮分離の遅延が認められた。しかしながら、ペアフィード対照群と同じ体重で性成熟が認められた。一方、自由摂餌対照群と比較してペアフィード対照群では体重減少が認められたが、性成熟の遅延に関して統計学的有意差はみられなかった。

血液学的検査の結果、自由摂餌対照群と比較してペアフィード対照群における赤血球項目への軽微な影響（ヘマトクリット、ヘモグロビン及び赤血球数の軽微な低下）が認められた。同様の影響はセマグルチド投与群では認められてなかった、もしくは極微であった。ペアフィード対照群では、自由摂餌対照群と比較して網状赤血球の増加が認められ、変化の程度は小さく用量反応性もみられなかったものの、同様の傾向はセマグルチド投与群でも認められた。

血液生化学的検査の結果、ペアフィード対照群と比較してセマグルチド投与群では、主として軽微な変化〔ALP、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（AST）、尿素及びリンの増加、クレアチン及びトリグリセリドの減少〕が、主として高用量群で認められた。これらの変化は摂餌量の減少又は体重増加抑制と明らかに関連性があるものではなく、関連する病理組織学的変化も認められなかった。検討した用量ではいずれもリパーゼ又はアミラーゼに及ぼすセマグルチドの影響は認められなかった。

セマグルチド投与群の雄では、尿量の軽微な高値及び尿比重の軽微な低値が認められ、雌では統計学的有意差はなかったものの、同様の傾向がみられた。尿中評価項目の変化に関連した病理組織学的変化は認められなかった。

ほぼすべての臓器重量にセマグルチド投与の影響が認められた。これらの影響は体重に及ぼす薬理作用を介したセマグルチドの二次的影響と考えられ、関連する病理組織学的変化が認められなかったことから、セマグルチド投与の有害影響ではないものと考えられた。

セマグルチド投与群では、投与部位で表皮上部の痂皮の発現頻度／重症度の増加が認められた。本所見は投与部位での刺激（表皮における潰瘍及び過形成、皮下における炎症、線維化及び出血）により誘発された溶媒の影響がセマグルチドにより増強されたものと考えられた。

結論として、セマグルチドを 1 日 1 回、21～55 日齢の SD 系ラットに皮下投与した結果、忍容性は良好であり、薬理作用を介した顕著な体重増加抑制が雌雄で認められた。ペアフィードにも関わらず、セマグルチド投与群の雄ではペアフィード対照群よりも低い体重増加抑制が認められたことから、雄におけるセマグルチドの体重に及ぼす影響は、制限給餌による影響よりも強いことが示された。膣開口及び亀頭包皮分離を指標とした性成熟遅延が全投与群で認められ、用量依存性はみられなかった。雌では、性成熟はペアフィード対照群よりも高い体重量時に認められた。

2.6.6.6.4.2 幼若ラットを用いた皮下投与による 11 週間毒性試験及び 4 週間回復性試験 (Module 2.6.7.15, 214479)

本試験の目的は、セマグルチドを幼若 SD 系ラットに 1 日 1 回、21 日～97 日齢に皮下投与時の毒性及び TK を評価することであった。1 週間の用量漸増期間を含めた。投与群、用量、各群における動物数を表 2.6.6-36 に示す。対照群を 2 群設け、1 群はペアフィードによる群、もう 1 群は自由摂餌群とした。ペアフィード対照群に加え、セマグルチド低用量及び中用量群も、高用量群の自由摂取による摂餌量に対してペアフィードとした。自由摂餌対照群及び高用量群に対しては、その他の群より 3 日前に投与を実施し、高用量群の摂餌量を測定してその他の群にペアフィードを行った。幼若ラットを用いたセマグルチドの毒性試験（DRF 試験、214276）に基づき、用量設定を行った。主試験群に投与後、4 週間の休薬期間を設ける回復試験群／交配試験群を別途設け、投与後の幼若動物の繁殖能及び回復性を評価した。繁殖能を評価するため、対照群の雄雌、投与群の雄と未投与の雌、投与群の雌と試験施設でストックされていた雄と交配させた。雌の全例を交配後第 14 日（妊娠中期）に安楽死処置し、子宮検査に供した。

表 2.6.6-36 幼若ラットを用いた皮下投与による 11 週間毒性試験（214479）－投与群、用量及び動物数

Group	Treatment	Feeding Regimen[a]	Dose (mg/kg/day)			Number of animals			
			Day 21-24 of age	Day 25-27 of age	Day 28-97 of age	Main phase		Recovery/ Reproductive phase[ϕ]	
						Males	Females	Males	Females
1	Control	*Ad libitum* fed	0	0	0	10	10	20	20
2	Control	Pair-fed	0	0	0	10	10	20	20
3	Semaglutide	Pair-fed	0.02	0.02	0.02	10	10	20	20
4	Semaglutide	Pair-fed	0.02	0.13	0.13	10	10	20	20
5	Semaglutide	*Ad libitum* fed	0.02	0.13	0.6	10	10	20	20

[ϕ] Mating trial conducted after a minimum of 4 weeks recovery

[a] Groups 2, 3 and 4 were pair-fed to the food consumption of the high dose semaglutide treated group (Gr. 5).

試験中又は試験終了時及び回復期間終了時に、下記に示す項目を評価した：生存数、一般状態、体重、摂餌量、血液学的検査、血液生化学的検査、尿検査、TK、性成熟、神経学的行動、性周期、四肢測定、臓器重量、肉眼的病理検査、病理組織学的検査。さらに、回復期間に交配能及び授受胎能を評価した。

試験用量のセマグルチドに対する忍容性は良好であり、投与に関連した死亡も認められなかった。低用量群の雄の 1 例で、落下事故による外傷のため、58 日齢時に安楽死処置した。2 つの対照群と比較して、セマグルチド投与群では主として皮膚の痂皮形成の発現頻度増加が認められた。

想定したとおり、自由摂餌高用量群の摂餌量は、自由摂餌対照群と比較して顕著に減少した。高用量群の雌では、本変化は主として試験第 1～4 週（第 28～55 日齢）で認められた。低用量群及び中用量群では、高用量群よりも軽微な摂餌量の低下傾向がみられ、ペアフィード対照群では時折みられた。全投与群及びペアフィード対照群では、自由摂餌対照群と比較して顕著な体重増加抑制が認められた。セマグルチド投与群ではペアフィードにも関わらずペアフィード対照群よりも体重増加抑制が認められ、セマグルチドの体重に及ぼす影響は、制限給餌による影響よりも強いことが示された。体重増加に関して、雌では低用量及び中用量群では摂餌量の減少は軽微であり、用量反応性はみられなかった。体重増加抑制に及ぼす影響が強かったことの理由として、セマグルチドがげっ歯類のエネルギー消費量に影響を及ぼすものと推測できる。しかしながら、セマグルチドに関してこの仮説を確認するデータは得られていない。4 週間の回復期間中、摂餌量及び体重に及ぼす影響からの回復性が認められ、特に回復期間の第 1 週時に、自由摂餌対照群と比較して、全セマグルチド投与群で摂餌量及び体重増加が認められた。

投与開始後 2 週間では、自由摂餌対照群と比較して高用量群及び対照群を含むペアフィード群で摂餌量の減少が認められたことから、摂餌量減少の二次的影響と考えられる軽微な尺骨の発育抑制傾向がみられた。第 21 日～91 日齢の投与期間では、尺骨の発育に影響は認められなかった。

雌では、統計学的有意差は認められなかったものの、自由摂餌対照群と比較してペアフィード対照群の体重が減少したことにより、軽微な性成熟の遅延及び膣開口時の軽微な低体重が認められた。セマグルチド投与群の雌では、ペアフィード対照群と比較して膣開口の遅延が認められ、ペアフィード対照群よりも高体重で性成熟が認められた。この影響は中用量群で最も顕著であったことから、用量反応性は認められなかった。

雄では、自由摂餌対照群と比較してペアフィード対照群で体重減少が認められたが、亀頭包皮分離の開始及び完了を指標とした性成熟の遅延は生じなかった。結果として、自由摂餌対照群よりもペアフィード対照群で低体重時に亀頭包皮分離が生じ、このことは文献の報告と一致する[43]。ペアフィード対照群における亀頭包皮分離開始時齢の体重はセマグルチド投与群と類似したものの、高用量群で

は亀頭包皮分離の開始遅延が認められ、高用量群における亀頭包皮分離開始時の体重はペアフィード対照群よりも高かった。ペアフィード対照群と比較して全投与群で亀頭包皮分離完了の遅延が認められ、亀頭包皮分離完了時の体重はペアフィード対照群よりも高かった。

セマグルチドにより性成熟の遅延が認められたが、雌雄における性周期の規則性、交尾所要日数、交尾成績及び授受胎能には影響を及ぼさなかった。また、平均黄体数、着床部位、胚吸収、生存胚、着床前及び着床後胚損失率を含む同腹児データにも影響は認められなかった。

セマグルチド投与は投与第 8～9 週時の動物の行動又は条件反応（触診又はアリーナでの観察、自発運動量又はモーリス迷水路における記憶学習能）に影響を及ぼさなかった。

血液学的検査の結果、自由摂餌対照群及びペアフィード対照群と比較して、高用量群の雄で軽微なヘマトクリット及びヘモグロビンの増加が認められ、高用量群の雌ではヘモグロビン及び赤血球数の増加傾向がみられた。これらの所見に加え、自由摂餌対照群と比較して、セマグルチド投与群では平均赤血球ヘモグロビン濃度の軽微な増加傾向もみられた。4 週間の回復期間では、投与の影響を受けた血液学的検査項目は自由摂餌対照群と同様であった。血液学的検査項目の変化は軽微であり、関連する病理所見も認められなかったことから、有害ではないものと考えられた。

血液生化学的検査の結果、自由摂餌対照群及びペアフィード対照群と比較して、セマグルチド投与群では、AST の軽微な増加ならびにグルコース、トリグリセリド、総タンパク質及びアルブミンの減少傾向がみられた。トリグリセリドを除く変化はいずれも軽微であった。雄では、トリグリセリドの減少がペアフィード対照群でも認められたが、セマグルチド投与群ではより顕著であった。変化の程度及び関連する所見が認められなかったことを考慮すると、血液生化学的検査で認められた変化はいずれも有害でないと考えられ、上記の影響からの完全な回復性が認められた。

ペアフィード対照群及びセマグルチド投与群では、ほぼすべての臓器重量に影響がみられた。臓器絶対重量の減少又は臓器相対重量の増加がペアフィード対照群を含む大部分のケースで認められ、臓器重量に及ぼす影響は体重に及ぼすセマグルチドの薬理作用を介した二次的影響と考えられた。自由摂餌対照群と比較して、ペアフィード対照群の雄では心臓の絶対重量の軽微な減少が認められ、雌では同様の傾向が認められたが、2 つの対照群における心臓の相対重量は同様であった。セマグルチド投与群では、心臓の絶対及び相対重量が軽微に減少し、その影響は解剖日当日の体重減少による影響以上であった。減少の程度が軽微であったこと、及び関連する病理変化が認められなかったことから、心臓重量の減少は有害ではないものと考えられた。

肉眼的病理検査の結果、高用量群動物の約半数に、肩甲骨部の皮膚に痂皮が認められた。当該部の病理組織学的検査により、これは表皮における潰瘍及び過形成、真皮における線維化、真皮及び皮下混合部における炎症性細胞浸潤、及び組織筋の変性／再生／壊死（1 例のみ発現）に相当するものであ

った。肩甲骨部は投与部位ではなく、肩甲骨の所見は主として表層（表皮及び真皮）で認められた。したがって、肩甲骨部の皮膚で認められた所見の投与との関連性は不明であった。

病理組織学的検査の結果、投与に関連した極微～軽微な十二指腸ブルンナー腺の肥大が全投与群で認められた。回復期間終了後、ブルンナー腺の極微な肥大の発現頻度は 2 例のみであったことから、本変化は可逆性であると考えられた。ブルンナー腺で認められた所見はブルンナー腺又は小腸の炎症又は細胞障害のいずれにも関連するものではなかったこと、及び投与後の回復性が認められたことから、本所見は有害ではないものと考えられた。

結論として、セマグルチドを 1 日 1 回、21～97 日齢まで 11 週間 SD 系ラットに皮下投与した結果、ペアフィード対照群と比較して摂餌量の減少及び体重増加抑制が認められたことから、セマグルチドの体重に及ぼす影響は制限給餌による影響よりも強いことが示された。セマグルチドは雌雄で性成熟の遅延を誘発し、性成熟到達時の体重はペアフィード対照群よりも高値であった。しかしながら、雌の性周期の規則性、雌雄の顕微鏡的病理検査、発情行動、雌雄の生殖能又は受胎能、妊娠中期までの雌の妊娠維持能に及ぼす影響はいずれも認められなかった。したがって、性成熟の到達遅延は有害ではないものと考えられた。有害性変化が認められなかったことから、NOAEL は高用量である 0.6 mg/kg/日と考えられた。

2.6.6.7 局所刺激性試験

ICH M3 ガイドライン [1]に従い、セマグルチドの局所刺激性はマウス、ラット及びサルを用いた反復投与毒性試験の一部として評価している。概して溶媒対照を用いたため、反復投与毒性試験によりセマグルチド単体の局所刺激性を評価可能であったが、投与製剤の局所刺激性は、ブタを用いた局所刺激性試験を別途実施して評価した。当該試験では、セマグルチド濃度を市販予定の臨床製剤の約 7 倍高くし、さらに生理食塩水対照群を設けた。反復投与毒性試験の結果から、セマグルチドに関連すると考えられた投与部位変化は認められなかった。時折認められた軽度の変化が対照群を含む全群でみられたことから、投与製剤（溶媒）又は皮下への投与操作自体のいずれかに関連するものと考えられた（2.6.6.3）

ウサギにおける臨床投与経路でない経路（筋肉内、動脈内及び静脈内投与）での投与時のセマグルチドの局所刺激性を、市販予定製剤を用いて検討した。

すべての反復投与毒性試験及び局所刺激性／毒性試験において同じ投与製剤／溶媒、すなわち、リン酸水素二ナトリウム（1.42 mg/mL）、プロピレングリコール（14.0 mg/mL）及びフェノール（5.50 mg/mL）及び pH を 7.4 に調整した注射用水を使用した (Module 3.2.P.1)。

2.6.6.7.1 ウサギを用いた筋肉内、動脈内及び静脈内投与による局所刺激性試験 (Module 2.6.7.16, 212073)

本試験の目的は、雄性ニュージーランドホワイト種ウサギにおける単回筋肉内、動脈内及び静脈内投与 4 日後のセマグルチドの局所刺激性を、市販予定製剤を用いて評価することであった。すべての投与経路に関して、ウサギの右側にセマグルチドを、左側に溶媒を投与し、したがって、同一個体を対照として比較した。筋肉内投与経路は大腿部にて評価し、静脈内及び動脈内投与系は耳部にて評価した。投与量は 0.06 mL/動物であり、セマグルチド濃度は 1.35 mg/mL であった。投与群、用量、各群における動物数を表 2.6.6-37 に示す。

表 2.6.6-37 ウサギを用いた局所刺激性試験（212073）－投与群、用量及び動物数

Group	Administration Route	Treatment Right Side	Conc. Right Side (mg/mL)	Treatment Left Side	Conc. Left Side (mg/mL)	Number of Male Animals
1	Intramuscular	Semaglutide	1.35	Vehicle (Control)	0	4
2	Intravenous	Semaglutide	1.35	Vehicle (Control)	0	4
3	Intra-arterial	Semaglutide	1.35	Vehicle (Control)	0	4

試験中又は試験終了時及び回復期間終了時に、下記に示す項目を評価した：生存数、一般状態、体重、摂餌量、投与部位反応、ならびに投与部位の肉眼的病理検査及び病理組織学的検査。

セマグルチド投与後の一般状態変化は認められなかったが、全群で第 1 日～第 5 日の平均体重が 6～8%低下し、特に投与開始後 1～2 日における摂餌量の顕著な減少と一致した。

投与部位の臨床観察検査、又は肉眼的及び病理組織学的検査では、セマグルチドに関連した変化は認められなかった。観察された変化として、極微又は軽微な炎症性細胞反応、血管周囲又は血管の壊死、血管内膜の増生及び出血が認められたが、溶媒投与組織でも同様に認められた。したがって、以上の軽度の変化は溶媒に関連するものであるか、又は皮下投与時に生じると考えられる投与操作に関連するものであった。

結論として、セマグルチドの市販予定製剤をウサギにそれぞれ単回筋肉内、静脈内及び動脈内投与したが、セマグルチドに関連した投与部位反応は認められず、溶媒又は投与操作のいずれかによるものと考えられる軽度の変化が認められた。

2.6.6.7.2 ブタを用いた皮下投与による局所毒性試験 (Module 2.6.7.16, 206664)

本試験の目的は、雌性 SPF ブタにセマグルチド製剤 10 mg/mL を単回皮下投与時のセマグルチドの局所毒性を、溶媒、Insulatard®（NPH インスリン）及び生理食塩水と比較して評価することであった。投与量はいずれも 0.2 mL/動物とした。全例を第 1 日に異なる部位に 4 回投与し、第 4 日に再度異なる部

位に投与した。第 6 日（投与後 2 日及び 5 日）に動物を安楽死処置した。投与群、用量、各群における動物数を表 2.6.6-38 に示す。

表 2.6.6-38　　ブタを用いた局所刺激性試験（206664）－投与群、用量及び動物数

Group	Treatment on Day 1 and Day 4 (0.2 mL/injection site), on separate injection sites				Number of Female Animals
	A	B	C	D	
1	Semaglutide, 10 mg/mL, in vehicle* for semaglutide	Vehicle* for semaglutide	Insulatard® (100 U/mL)	Saline, 0.9%	5 **

* 1.42 mg/mL disodium hydrogen phosphate dihydrate, 14.0 mg/mL propylene glycol, 5.5 mg/mL phenol and water for injection, pH 7.4
**Each animal was dosed at four injection sites with the four different treatments on each dosing day

試験中又は試験終了時及び回復期間終了時に、下記に示す項目を評価した：生存数、一般状態、体重、摂餌量、投与部位反応、ならびに投与部位の肉眼的病理検査及び病理組織学的検査。

3 例では第 3 日に活動性が低下し、摂餌行動が低下したが、1 例を除く全例で第 1 日～第 6 日で体重が増加し、摂餌量に及ぼす影響は認められなかった。投与時に、全投与群で投与部位の数か所から出血が認められたが、生理食塩水投与部位ではその発現頻度が低い傾向がみられた。

肉眼的病理検査を実施したが、投与部位反応は認められなかった。投与後 2 及び 5 日における病理組織学的検査の結果、セマグルチド製剤と溶媒の影響は非常に類似し、反応性が認められなかったか、又は極微～軽微な炎症反応のいずれかであった。変化の頻度及び重症度は Insulatard®対照群よりもやや軽度であったが、生理食塩水対照群の投与部位反応は最も弱く、ほとんどの投与部位で組織反応が認められなかった。

結論として、セマグルチド製剤 10 mg/mL をブタに単回投与した結果、組織反応が認められないか、又は投与部位での極微～軽度の炎症性反応のいずれかが認められた。本変化は Insulatard®で誘発された変化よりもやや軽度であった。

2.6.6.8 その他の毒性試験

2.6.6.8.1　　免疫原性

免疫原性の評価は、重要な反復投与毒性試験に組み込まれている。ペプチド医薬品に対する抗体産生により、薬剤の曝露量が減少し、毒性試験の評価を妨げる可能性がある。したがって、13 週間以上のすべての反復投与毒性試験において、抗セマグルチド抗体産生を検討した。大部分の毒性試験でセ

マグルチドに対する抗体は検出されなかった。サルを用いた 13 週間反復投与毒性試験（Module 2.6.7.7.G, 206450）、マウスを用いた 104 週間がん原性試験（Module 2.6.7.10.A, 207362）及びラットを用いた 13 週間比較試験（Module 2.6.7.17.E, 210195）において、数例で抗セマグルチド抗体が検出された。以上の試験では、セマグルチドを投与されたサル 3/36 例、マウス 2/60 例、ラット 3/30 例で抗セマグルチド抗体産生が報告された。サルでは内因性 GLP-1 との交叉反応性（抗体陽性を示した 2/3 例）が認められたが、マウス及びラット試験では認められなかった。サル及びラット試験では、*in vitro* 中和活性は検出されなかった。マウス試験では、検討に必要な試料が十分になかったことから、*in vitro* 中和活性は分析しなかった。

抗セマグルチド抗体の影響を受けた動物はごくわずかであること、想定された体重に及ぼす薬理作用がみられたこと、及び TK 分析により毒性試験ではセマグルチドの曝露が確認されていることから、全体として、抗セマグルチド抗体産生は毒性試験結果に影響を及ぼさないものと考えられた。

2.6.6.8.2　免疫毒性

免疫毒性試験は実施していない。血液学的評価項目、血漿グロブリン、免疫臓器の重量及び病理組織学といった標準的な免疫毒性評価項目を重要な反復毒性試験に含めた。投与に関連した免疫毒性兆候は特定されなかった。

2.6.6.8.3　依存性

セマグルチドの化学構造及び基礎薬理学から、乱用性／依存性薬物との類似性はみられない。さらに、乱用性／依存性に関連した神経伝達物質システム受容体／トランスポーターとセマグルチドとの結合性は示されていない。以上のこと及び心血管系作用、体温及び自然発生活動に関する非臨床試験に基づくと、セマグルチドは乱用性／依存性に関連しないものと考えられる。さらに、乱用性／依存性は市販の GLP-1 受容体作動薬では知られていない。したがって、セマグルチドの非臨床薬物乱用性／依存性試験による評価は実施していない。

2.6.6.8.4　代謝物

セマグルチドはペプチド骨格のタンパク質分解と、脂肪酸側鎖の連続的β酸化により代謝される。ヒト血漿中のセマグルチド代謝物プロファイルはラット及びサルのものと同様であった。したがって、代謝物の安全性を評価する毒性試験を実施することは適当でないものと考えられた。

2.6.6.8.5　　不純物及び溶出物

2.6.6.8.5.1　　目的物質由来不純物の評価

セマグルチドの製剤規格には、以下の不純物〔親水性不純物、疎水性不純物 1、疎水性不純物 2 及び高分子量タンパク質（HMWP）〕が含まれる。セマグルチドの目的物質由来不純物については Module 3.2.P.5.5 に記載する。提案する製品使用時の評価基準（proposed in-use acceptance criteria）は Module 3.2.P.8.3 に示す。提案する製品使用時の評価基準は有効期間内規格（shelf-life specification limits）よりも広いため、提案する製品使用時の評価基準は安全性評価により考慮されている。

開発期間中、セマグルチドを第 2 相臨床試験まで[redacted]法により製造した。第 3 相臨床試験開始前に製法を変更し、セマグルチドのペプチド骨格を *Saccharomyces cerevisiae* 種による遺伝子組換え DNA 技術により製造した。セマグルチドの製剤開発の概要を Module 2.3.P.2 に記載する。概して、[redacted]法で製造したセマグルチドを用いて非臨床安全性試験を実施した。非臨床試験で使用したセマグルチドのバッチの概要は Module 2.6.7.4 に記載されている。

製品使用時の評価基準を確認するため、[redacted]法により得られた製造直後のセマグルチド及び 37°C で 3 箇月間保管した強制劣化セマグルチドのいずれかを投与する、ラット 4 週間比較毒性試験（209159）を実施した。本試験では、投与に関連した所見の範囲及び程度は製造直後及び強制劣化セマグルチドで同様であった。有害性変化は認められず、軽微な違いが数箇所みられたものの、いずれも毒性学的意義はないものと考えられた。したがって、試験用量である 0.86 mg/kg/日が製品使用時の評価基準の品質確認の NOAEL と考えられた。さらに、遺伝子組換え法により生じる不純物プロファイルの品質を確認するために、2 種類の製造法により製造されたセマグルチドを投与する、ラット 13 週間比較毒性試験を実施した（210195）。本試験では、投与用量である 0.45 mg/kg/日の用量では、[redacted]法及び遺伝子組換え法により製造されたセマグルチドの毒性に差異は認められなかった。詳細を次項に記載する。2 種類の製造法により製造したセマグルチドを 5°C 及び 25°C で 12 箇月間保管後の不純物プロファイルの同等性を評価するため、同等性／同質性試験を実施した（Module 3.2.P.5.5）。その結果、25°C で保存した場合には、[redacted]法又は遺伝子組換え法で得られたセマグルチド製剤中に同一分解物が増加すると結論された。したがって、[redacted]法で得られた強制劣化セマグルチドを投与するラット 4 週間反復投与毒性試験（209159）に基づいたセマグルチドの目的物質由来不純物の評価は、同様に遺伝子組換え法により製造されたセマグルチドの評価にも適用可能と考えられる。

不純物の遺伝毒性試験は実施していない。セマグルチドは遺伝毒性を有さないことが示されており（2.6.6.4）、不純物は構造的にセマグルチドと類似することから、変異原性誘発性はないものと考えられる。

強制劣化製剤及び製品使用時の評価基準に関して、4 週間反復投与毒性試験（209159）で試験した不純物レベルの比較を表 2.6.6-39 に示す。

表 2.6.6-39　　ラット 4 週間毒性試験（209159）で評価した不純物レベル及び提案する製品使用時の評価基準

Impurity group	In-use acceptance criteria [a] (%)	Impurity level tested in 4-week rat toxicity study (%)	Impurity dose at NOAEL in rat [b] (mg/kg/week)	Impurity dose at NOAEL converted to HED [c] (mg/kg/week)	Human impurity dose [d] (mg/kg/ week)	Animal to human ratio (fold)
Hydrophilic impurities	≤6.0	5.8	0.35	0.070	≤0.001	70
Hydrophobic impurities 1	≤5.4	6.9	0.42	0.083	≤0.0009	92
Hydrophobic impurities 2	≤2.0	1.7	0.10	0.021	≤0.00033	63
HMWP	≤3.2	2.3	0.14	0.028	≤0.00053	53

Abbreviations: HED: Human equivalent dose; HMWP: High Molecular Weight Protein; NOAEL: No Observed Adverse Effect Level
[a] Acceptance criteria includes the proposed shelf-life limits
[b] NOAEL in toxicity study (ID 209159): 0.86 mg/kg/day. Impurity dose: 0.86 mg/kg/day * impurity level / 7 days/week
[c] Conversion to HED by dividing rat dose with 5 in accordance with ICH Q3C ([46])
[d] Calculated as: 1 mg/week * in-use impurity limit / 60 kg

セマグルチド製剤から同定された不純物について、提案する製品使用時の評価基準と類似の濃度での非臨床試験が実施されている。強制劣化製剤を用いた 4 週間反復投与毒性試験では、NOAEL での動物への不純物としての投与量は、すべての不純物で想定されるヒトでの投与量の 53～92 倍高かった。したがって、セマグルチド製剤から同定された不純物は、非臨床試験で安全性が確認されているものと考えられ、提案する製品使用時の評価基準は妥当と考えられる。有効期間内規格は提案する製品使用時の評価基準よりも低値であることから、有効期間内規格も妥当と考えられる。

2.6.6.8.5.2　　不純物の品質確認用に実施した試験

セマグルチドの有効期限を確認するため、ラットを用いた 4 週間反復投与毒性試験を実施し、強制劣化製剤と製造直後の製剤とを比較した。

セマグルチド原薬は開発初期に[redacted]法で製造され、大部分の毒性試験は[redacted]法で製造された原薬を用いて実施されている。第 3 相臨床試験開始前に、製造方法をセマグルチドのペプチド骨格が酵母発酵により生産される遺伝子組換え法に変更した。新規遺伝子組換え法に関連した不純物プロファイルを確認するため、[redacted]及び遺伝子組換えセマグルチドを用いたラット 13 週比較毒性試験を実施した。

2.6.6.8.5.3 製造直後及び強制劣化セマグルチド：SD 系ラットを用いた 4 週間反復皮下投与比較毒性試験及び 2 週間回復性試験 (Module 2.6.7.17.E, 209159)

本試験の目的は、[redacted]法により製造された、製造直後及び強制劣化セマグルチドの毒性及び TK を評価することであった。セマグルチドの強制劣化は、37°C で 3 箇月間保管する加速条件下で実施した。本操作により、セマグルチドの純度は製造直後バッチの 95.83%から、強制劣化バッチでは 85.55%に下がった。セマグルチドを SD 系ラットに 1 日 1 回、4 週間皮下投与した。目標用量レベルでの 4 週投与期間の前に、2 週間の用量漸増期間を含めた。2 週間の回復期間で投与の影響からの回復性を評価した。投与群、用量、各群における動物数を表 2.6.6-40 に示す。製造直後及び強制劣化セマグルチド用に選択された投与用量は、13 週間反復投与毒性試験（206662）における高用量と同様とした。

表 2.6.6-40 製造直後及び強制劣化セマグルチドの比較試験（209159）ー投与群、用量及び動物数

Group	Treatment	Nominal Dose (mg/kg/day)			Number of Animals			
		Week -2	Week -1	Week 1-4	Main Study		Recovery Study	
					Males	Females	Males	Females
1	Control (Vehicle)	0	0	0	12	12	6	6
2	Aged semaglutide	0.01	0.1	0.86	12	12	6	6
3	Fresh semaglutide	0.01	0.1	0.86	12	12	6	6

試験中又は試験終了時に、下記に示す項目を評価した：生存数、一般状態、体重、摂餌量、眼科学的検査、血液学的検査、血液生化学的検査、尿検査、TK、血漿中カルシトニン（製造直後のセマグルチドと対照群との比較のみ）、抗体産生、臓器重量、肉眼的病理検査、病理組織学的検査。

ラットを用いた重要な一般毒性試験でみられたものと同様に、予想どおりの薬理学的作用を介した影響が、製造直後及び強制劣化セマグルチドでも認められ、一般状態、体重、摂餌量、血液学的検査、血液生化学的検査、尿検査、臓器重量、肉眼的病理検査及び病理組織学的検査を含む影響が認められた項目に関して、2 種類のセマグルチド投与群間に毒性学的差異は認められなかった。

投与に関連したブルンナー腺の肥大が、両セマグルチド投与群で同程度の頻度で認められた。2 週間の回復期間終了時に、部分的な回復性が認められた。ブルンナー腺で認められた所見は、ブルンナー腺又は消化管粘膜の炎症又は細胞障害のいずれにも関連するものではなかったこと、休薬後に完全な回復性が認められたことから、本所見は有害ではないものと考えられた。

血漿中カルシトニン分析の結果、製造直後のセマグルチド投与群では、対照群と比較して予想どおり第 21 日及び第 35 日にカルシトニン濃度の増加が認められた。強制劣化セマグルチド群ではカルシトニン分析用に採取しておらず、2 種類のセマグルチド間の差異は評価していない。

結論として、投与に関連した所見の範囲及び程度は、製造直後及び強制劣化セマグルチドで概して同様であり、有害性変化は認められなかったことから、軽微な差異がいくつかみられたものの、毒性学的意義はないものと考えられた。

2.6.6.8.5.4 [redacted]及び遺伝子組換えセマグルチド：SD 系ラットを用いた 13 週間反復皮下投与比較毒性試験 (Module 2.6.7.17.E, 210195)

本試験の目的は、[redacted]法及び遺伝子組換え法により製造されたセマグルチドを、それぞれ SD 系ラットに 1 日 1 回、13 週間皮下投与時の毒性及び TK を評価することであった。目標用量レベルでの 13 週投与期間の前に、2 週間の用量漸増期間を含めた。2 週間の回復期間で投与の影響からの回復性を評価した。投与群、用量、各群における動物数を表 2.6.6-41 に示す。2 種類のセマグルチド用に同一用量を選択し、この用量は 26 週間反復投与毒性試験（207377）における高用量と概ね同様であった。理論用量は含量のわずかな違いにより軽微な差異があった。しかしながら、用量は 2 種類のセマグルチド間で非常に近似しており、TK の結果、曝露に有意差は認められなかったことから、本試験の目的は達成されたものと考えられた。

表 2.6.6-41 [redacted]及び遺伝子組換えセマグルチドの比較試験（210195）－投与群、用量及び動物数

Group	Treatment	Nominal Dose (mg/kg/day)			Number of Animals			
		Week -2	Week -1	Week 1-13	Main Study		Antibody Study	
					Males	Females	Males	Females
1	Control (Vehicle)	0	0	0	10	10	5	5
2	Synthetic semaglutide	0.008	0.08	0.48	10	10	5	5
3	Recombinant semaglutide	0.0075	0.075	0.45	10	10	5	5

試験中又は試験終了時に、下記に示す項目を評価した：生存数、一般状態、体重、摂餌量、眼科学的検査、血液学的検査、血液生化学的検査、尿検査、TK、抗体産生、臓器重量、肉眼的病理検査、病理組織学的検査。

ラットを用いた重要な一般毒性試験でみられたものと同様に、予想どおりの薬理学的作用を介した影響が、2 種類のセマグルチドでも認められ、一般状態、体重、摂餌量、血液学的検査、血液生化学的

検査、尿検査、臓器重量、肉眼的病理検査及び病理組織学的検査を含む影響が認められた項目に関して、2 種類のセマグルチド投与群間に毒性学的差異は認められなかった。

投与に関連したブルンナー腺の肥大が、両セマグルチド投与群で同程度の頻度で認められた。両セマグルチド投与群では、膵外分泌腺における限局性腺房細胞萎縮及び単核性炎症細胞が認められたが、発現頻度及び重症度は概ね同程度であった。同様の変化は対照群の数例でも認められたものの、発現頻度はわずかに低かった。膵外分泌腺における限局性腺房細胞萎縮及び単核性炎症細胞は、ラットで通常よく認められる自然発生所見である[20,33]。膵外分泌腺における変化が本試験でしか認められなかったことから、これらの所見は投与との関連性はないものと考えられた。

遺伝子組換えセマグルチド投与群の 2 例で、非常に低レベルの抗セマグルチド抗体が形成されたが、[redacted]セマグルチド投与群では、抗セマグルチド抗体産生は認められなかった。抗体は内因性 GLP-1 と交叉反応性を示さず、中和作用を有さなかった。このように 2 種類のセマグルチド投与群間で抗体産生の発現頻度に僅かな差異がみられたが、[redacted]法及び遺伝子組換え法により製造されたセマグルチドに実質的な差異はないものと考えられる。

結論として、投与に関連した所見の範囲及び程度は、[redacted]及び遺伝子組換えセマグルチドで概して同様であり、軽微な差異がいくつかみられたものの、毒性学的意義はないものと考えられた。

2.6.6.8.5.5　容器施栓系からの溶出物の評価

セマグルチド製剤の容器施栓系は、施栓系としてラバーディスク及びラバープランジャーでラミネートした 1.5 mL ガラス製カートリッジから構成される。ラミネートラバーディスクは 1.5mL カートリッジの先端部を、ラバープランジャーは底辺部を密封する。詳細は Module 3.2.P.2.4 を参照のこと。

5°C で 35 箇月に続き 30°C で 8 週間保存後の長期溶出物分析により、セマグルチド製剤中に 2 種類の有機系溶出物が検出された。抽出性試験でカートリッジに使用されたラバーラミネート及びプランジャーの両方から認められた化合物の 1 つは 2,6-di-tert-butyl-4-methylphenol（Butyl Hydroxy Toluene 又は BHT としても知られる）であった。BHT の他にも、溶出物として 2,4-dichlorbenzoic acid（DCBA）が報告された。しかしながら、DCBA は参照試料を含む全試料で検出されたことから、本化合物は容器施栓系に由来しなかった。したがって、DCBA は溶出物とは考えられず、更なる評価は行わないこととした。

BHT に関して臨床曝露量と一日許容曝露量（PDE）との曝露量比を算出し、表 2.6.6-42 に示した。

表 2.6.6-42　1.5mL カートリッジからの溶出物（5°C で 35 箇月間保存に続き 30°C で 8 週間保存）に対する臨床曝露量比

Compound	CAS no.	Maximal concentration of leachables[a] (µg/mL)	Clinical exposure (µg/person /day)[b]	PDE[c] (mg/person /day)	Fold to PDE	Fold to TTC (TTC= 1.5 µg/person/day)
2,6-Di-tert-butyl-4-methylphenol (BHT) [44,45]	128-37-0	0.1	0.011	2.5 [b]	227,000	136

[a]Long-term leachable analysis (Module 3.2.P.2.4).

[b]The clinical exposure is based on a maximum daily dose volume of 0.11 mL/person/day.

[c]The PDE is calculated based on toxicological data from scientific literature applying same principle as in ICH Q3C ([46]) i.e. PDE= NOAEL × 50 kg bw./ (F1 × F2 × F3 × F4 × F5). The PDE is based on a NOAEL of 25 mg/kg/day derived from a reproductive and developmental toxicity study in rats. This NOAEL was the lowest observed NOAEL including assessment of carcinogenicity [44,45]. F1 = 5 (extrapolation from rat to human being), F2 = 10 (variation between individuals), F3 = 1 (safety factor for a reproduction and developmental toxicity study covering the complete period of organogenesis), F4 = 10 (safety factor for reproduction toxicity encountered), F5 = 1 (NOAEL has been used).

NA=not applicable

BHT の PDE は ICH Q3C[46]ガイドラインに概要が示されている。BHT の臨床曝露量は日本人の MRHD である 1 mg/週（0.14 mg/日の 1 日 1 回投与量に相当）を基に算出した。1 日あたりの最大臨床投与容量は約 0.11 mL/日〔1 (mg/週) / 7 (日/週) / 1.34 (mg/mL) 〕である。

検出された BHT レベルは、算出された PDE（2.5 mg/日）の 22 万 7000 倍以下であった（表 2.6.6-42）。したがって、1.5 mL カートリッジの溶出物である BHT は、上記の指定温度で長期保存後に検出されたレベルでは安全性上の懸念を有さないと考えられる。

2.6.6.8.6　セマグルチドの臨床試験用製剤に含まれる添加物の評価

セマグルチド製剤は、pH 調整用としてリン酸緩衝液（1.42 mg/mL リン酸水素二ナトリウム）、保存剤としてフェノール（5.50 mg/mL）、等張剤としてプロピレングリコール（14.0 mg/mL）及び注射用水から成る溶媒組成である（Module 3.2.P.1）。

上記添加物は、市販の長期皮下投与用医薬品で使用されていることがよく知られており、主要国の薬局方〔欧州薬局方（Ph. Eur.）、米国薬局方（USP）及び日本薬局方（JP）〕に収載されている。さらに、いずれの添加物も FDA の皮下投与用データベース“Inactive Ingredient Search for Approved Drug Products”にも収載されている。また、セマグルチドの製剤組成は、世界各国で承認されている 1 日 1 回皮下投与用 GLP-1 受容体作動薬であるリラグルチド（ビクトーザ®）の製剤組成と類似する[47]。いずれの添加物も、臨床用製剤と類似の濃度で非臨床試験に組み込まれており、投与部位における無反応～軽度の反応を示したのみであり、忍容性は良好であった。セマグルチドの最大臨床容量は約 0.75 mL/週となる。週 1 回に基づき、本容量、及び各添加物の投与量はリラグルチド（ビクトーザ®）よりも低

い。したがって、セマグルチド製剤に含まれる添加物は、ヒトに対して長期間皮下投与された時の安全性が適切に確認されたものと考えられる。

2.6.6.8.7　その他

2.6.6.8.7.1　メカニズム試験

2.6.6.8.7.1.1　ラットを用いた EFD に及ぼす影響の探索試験

申請用に実施したラットを用いた EFD 試験において、セマグルチドは胚毒性を誘発した。作用機序を特定するため、一連のメカニズム試験を実施した。試験の詳細は Module 4.2.3.7.3 'Embryotoxicity findings in rats: Assessment of human relevance'に記載する。概要として、検討の結果、ラットで認められたセマグルチドの胚毒性影響は、反転卵黄嚢胎盤がラット胚の栄養供給に必須である GD9～GD13 の器官形成期に誘発されたことが示された。ラット卵黄嚢組織では GD11.5 に GLP-1 受容体の発現が明らかとなった。ラット卵黄嚢で発現した GLP-1 受容体は cAMP の増加により受容体の活性が示されたように機能活性を有した。この効果は特異的 GLP-1 受容体拮抗薬（exendin 9-39）を添加することで阻害された。このことは、認められた胚毒性の作用機序において GLP-1 受容体が関与することを支持するものである。妊娠ラットにセマグルチドを投与すると、セマグルチドは反転卵黄嚢胎盤に達することが示された。細胞レベルで、セマグルチドにより卵黄嚢細胞の飲小胞形成不全が誘発された。

作用機序の評価に基づき、セマグルチドは GLP-1 受容体を介したメカニズムにより妊娠ラットにおいて胚毒性を誘発すると結論された。この影響は、反転卵黄嚢細胞の母体から胚への飲小胞による栄養輸送を阻害することによるものと考えられた。

メカニズム試験の結果を Module 2.6.7.17.G にまとめた。

ラットにおける GLP-1 受容体発現と比較するため、カニクイザルの卵黄嚢における GLP-1 受容体の発現を評価する試験を別途実施した。

2.6.6.8.7.1.2　カニクイザル卵黄嚢における GLP-1 受容体発現に関する検討試験 (Module 2.6.7.17.G, JHES150306)

本試験の目的は、カニクイザル卵黄嚢における GLP-1 受容体の発現を提示することであった。

4 例の器官形成初期（GD34～42）のカニクイザルより卵黄嚢を単離した。各卵黄嚢の半分を免疫組織化学（IHC）及び *in situ* ハイブリダイゼーション（ISH）用に固定し、残り半分を逆転写ポリメラーゼ連鎖反応（RT-PCR）用とした。3 試験法のいずれも卵黄嚢における GLP-1 受容体発現の有無をみるために実施した。

検査した 4 例の卵黄嚢に GLP-1 受容体タンパク質は検出されなかった。ISH では、3 例の卵黄嚢では GLP-1 受容体のメッセンジャーリボ核酸（mRNA）は検出されなかったが、1 例の卵黄嚢では、膜の内胚葉層に弱いシグナルが認められた。RT-PCR では、GLP-1 受容体の発現は検出されなかった。いずれの測定法も、陽性対照として用いた母動物の膵臓及び腎臓では GLP-1 受容体の発現が検出された。

結論として、IHC、ISH 及び RT-PCR を用いて測定したが、カニクイザルの卵黄嚢に GLP-1 受容体の発現は認められなかった。

2.6.6.8.7.2 EFD 試験に用いる第 3 の動物種の選択を裏付ける試験

2.6.6.8.7.2.1 非妊娠ミニブタにおける MTD 及び 3 週間 DRF 試験 (Module 2.6.7.17.G, 208404)

本試験の目的は、ミニブタが EFD 試験に用いる第 3 の動物種として適切かどうか評価するため、セマグルチドを雌性ミニブタに週 2 回皮下投与時の忍容性及び毒性を評価することであった。本試験では MTD を特定する試験群と、以降に固定用量で 3 週間までセマグルチドの影響を評価する DRF 試験群の 2 試験に分けた。忍容性に及ぼす影響を評価するため、一部の群（第 1 群及び第 4 群）に関して用量漸増期間を含めた。投与群、用量、各群における動物数を表 2.6.6-43 に示す。本試験では対照群は含めなかった。

表 2.6.6-43 ミニブタを用いた皮下投与による MTD 及び 3 週間 DRF 試験（208404）ー投与群、用量及び動物数

Group	Treatment#	Phase	Day	Nominal dose (mg/kg)	Number of Females
1	Semaglutide	MTD	1, 5	0.01	2
			8, 12	0.05	
			15, 19	0.15	
			22, 26	0.5	
		DRF	43, 47	0.01	
			50, 54	0.05	
			57, 61, 64, 68, 71, 75	0.15	
2	Semaglutide	MTD	29#	0.15	2
3	Semaglutide	MTD	34*	0.05	2
4	Semaglutide	DRF	43, 47	0.01	4
			50, 54	0.05	
			57, 61, 64, 68, 71, 75	0.15	

#Animals were euthanised on Day 30 due to adverse clinical signs.
*Animas were not dosed on Day 37 and were terminated on Day 42 due to adverse clinical signs.

試験中又は試験終了時に、下記に示す項目を評価した：生存数、一般状態、体重、摂餌量、血液学的検査、血液生化学的検査、TK、肉眼的病理検査。

セマグルチドを 0.01 mg/kg から用量漸増を開始し、週 2 回、最大 0.15 mg/kg まで投与時の忍容性が認められた。想定された摂餌量及び体重に及ぼす影響が認められた。0.5 mg/kg（2 回投与/週）では、摂餌量の低下と体重減少に加え、一般状態変化も認められたことから更なる用量漸増は実施せず、本用量は MTD を超えることが示された。0.15 mg/kg（2 回投与/週）は今後ミニブタを用いた EFD 試験を実施する際の適切用量と考えられた。しかしながら、本動物種で忍容性が認められた曝露量が低かったことから、EFD の評価において、よりセマグルチドの曝露が高いと考えられるカニクイザルを第 3 の動物種として使用すべきと考えられた。

2.6.6.9 日本人 MRHD である 1 mg/週での日本人の曝露量との比較

表 2.6.6-44 に、重要な毒性試験の試験終了時に測定された全用量におけるセマグルチドの曝露量を示し、日本人 MRHD である 1 mg/週と比較した。ヒトにおける曝露量は、2 型糖尿病患者を組み入れた第 3 相臨床試験の日本人患者の母集団 PK モデル解析により推定した。動物とヒトとの曝露量比の算出に関して、各動物種の $C_{average}$（$C_{average} = AUC_{tau}/tau$）を用いて動物種間での投与間隔（τ）の差異（ラット及びマウスで 24 時間、サルで 72 時間及びヒトで 168 時間）を補正した。

表 2.6.6-44　　重要な毒性試験における動物とヒトとの曝露量比

Species, Study type and Dose	C_{max}	$AUC_{tau,steady\ state}$ (h * nmol/L)	$C_{average}$ [a] (nmol/L)	Exposure multiple [b]
Human (Japanese, type 2 diabetes) - 1 mg/week	n/a[c]	5930 [c]	35.3	-
Repeated Dose Toxicity				
Rat, 26-week (207377)				
0.60 mg/kg/day (NOAEL)	964	18100	754	21
0.13 mg/kg/day	211	3855	161	4.6
0.03 mg/kg/day	48	902	38	1.1
Monkey, 52-week (207288)				
0.36 mg/kg/twice-weekly	1115	54700	760	22
0.06 mg/kg/twice-weekly (NOAEL)	169	9235	128	3.6
0.01 mg/kg/twice-weekly	27	1460	20	0.6
Carcinogenicity				
Mouse, 2-year (207362)				
3.0 mg/kg/day (males only)	3450	39500	1646	47
1.0 mg/kg/day	882	11435	476	13
0.3 mg/kg/day	235	3085	129	3.7
0.1 mg/kg/day (females only)	84	1110	46	1.3
Rat, 2-year (207363)				
0.1 mg/kg/day	184	3815	159	4.5
0.025 mg/kg/day	28	641	27	0.8
0.01 mg/kg/day	18	293	12	0.3
0.0025 mg/kg/day	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
Reproductive and development toxicity				
Rat, Embryo-Foetal Development (207361) [d]				
0.09 mg/kg/day	48.5	735	31	0.9
0.03 mg/kg/day	15.4	247	10	0.3
0.01 mg/kg/day (NOAEL)	6.6	82.9	3.5	0.1
Rabbit, Embryo-Foetal Development (207360) [e]				
0.0075 mg/kg/day	73.6	1530	64	1.8
0.0025 mg/kg/day	9.9	208	9	0.3
0.0010 mg/kg/day (NOAEL)	1.5	20.2	1	0.03
Monkey, Embryo-Foetal Development (208486) [f]				
0.15 mg/kg/twice-weekly	625	30000	417	12
0.075 mg/kg/twice-weekly	224	10400	144	4.1
0.015 mg/kg/twice-weekly (NOAEL)	42.1	2000	28	0.8
Monkey, Pre- and Postnatal Development (210061) [g]				
0.15 mg/kg/twice-weekly	349	14400	200	5.7
0.075 mg/kg/twice-weekly	166	6720	93	2.6
0.015 mg/kg/twice-weekly (NOAEL)	29	1320	18	0.5
Rat, Juvenile Toxicity (214479)				
0.6 mg/kg/day (NOAEL)	770	15000	625	18
0.13 mg/kg/day	191	3610	150	4.2
0.02 mg/kg/day	27	456	19	0.5

Species, Study type and Dose	C_{max}	$AUC_{tau,steady\ state}$ (h * nmol/L)	$C_{average}$ [a] (nmol/L)	Exposure multiple [b]

Abbreviations: BLQ: Below limit of quantification, NOAEL: No observed adverse effect level; n/a: Not available from the PopPK model. [a] $C_{average} = AUC_{tau}/tau$ e.g. $AUC_{0\text{-}168h}/168h$ in humans
[b] Exposure multiples calculated as: $C_{average}$ in animals/$C_{average}$ in humans at steady state
[c] Geometric mean AUC_{tau} ($AUC_{0\text{-}168h}$) at steady state after 1.0 mg semaglutide/week in Japanese T2D[Japanese Modelling Report [M 5.3.3.5].
[d] Average exposure of Gestation Day 6 (GD6) and GD17 (animals in steady state from GD6 and onwards)
[e] Exposure on GD19, [f] Exposure on GD 50, [g] Exposure on GD 140.

2.6.6.10 考察及び結論

ICH M3 ガイドライン [1]に準拠して設計されたセマグルチドの毒性プログラムの結果、主として GLP-1 受容体の活性化という薬理作用を介したものと考えられる、摂餌量及び体重に及ぼす直接的又は二次的影響が認められた。

想定されるセマグルチドの薬理作用である摂餌量減少、体重減少又は体重増加抑制は、全ての試験動物種において用量制限因子であった。数例ではさらに有害な一般状態変化が認められ、MTD を超えた時点で動物を安楽死処置した。概して、体重に及ぼす影響は試験初期に認められた一過性の体重減少及び体重増加抑制であった。用量漸増を実施することでセマグルチドに対する忍容性は概して改善されたことから、設定用量で投与を直接開始するよりも高い用量が投与可能であった。

2.6.6.10.1 一般毒性及びがん原性

有害でない臨床病理変化が認められ、これは摂餌量及び体重に及ぼすセマグルチドの二次的影響と考えられた。最も一貫して認められた影響として、げっ歯類における血漿中トリグリセリド濃度の減少が認められた。その他の変化はいずれも軽微であり、1 動物種又は 1 試験でのみでみられた変化であった。ラットを用いた 26 週間反復投与毒性試験で尿中検査項目に及ぼすセマグルチドの影響（尿量及びナトリウム濃度の増加）が認められた。これらの影響は既知の GLP-1 によるナトリウムの腎近位尿細管からの再吸収阻害と一致する [16]。いずれの試験でも、投与に関連した腎臓の変化が認められなかったことから、尿中評価項目で認められた変化の毒性学的意義はないものと考えられた。

体重に及ぼすセマグルチドの二次的影響と考えられる、一連の有害でない臓器重量変化が認められた。肝重量は概して低く、一部では摂餌量の減少に起因すると考えられる、肝細胞グリコーゲン沈着の減少を示唆する肝細胞の非染色部位（rarefaction）の減少が認められた。

マウスを用いたがん原性試験において、十二指腸におけるブルンナー腺の内腔拡張が認められた。ラットでは、投与 4 週以降にブルンナー腺の肥大が認められた。ブルンナー腺は、上部消化管におけ

る酵素液として重炭酸を含むアルカリ性の粘液分泌に関与し、酸性の胃内腔消化物から上部消化管を保護する。ブルンナー腺ではGLP-1受容体が高発現しており[17,18]、内腔拡張及び肥大はGLP-1受容体の活性化に関連するものと考えられた。ブルンナー腺で認められた所見は、ブルンナー腺又は消化管粘膜の炎症又は細胞障害のいずれにも関連するものではなかったこと、休薬により回復性が認められたこと、及びがん原性試験で過形成又は腫瘍性病変へ進展しなかったことから、有害ではないものと考えられた。カニクイザルでは、ブルンナー腺における投与の影響は認められなかった。全体として、げっ歯類において認められた変化は、ヒトにおける安全性上の懸念とは考えられなかった。

マウスを用いた2週及び13週間反復投与毒性試験において、甲状腺C細胞の過形成が認められたことから、マウスの反復投与毒性試験からはNOAELを設定することができなかった。ラットでは、有害性変化が認められなかったことから、高用量である0.6 mg/kg/日が反復投与毒性試験におけるNOAELと考えられ、これはヒトにおける日本人MRHDである1 mg/週の21倍高い曝露量であった。想定どおり、マウス及びラットを用いたがん原性試験で甲状腺C細胞過形成、腺腫及び腺癌が認められ（日本人MRHDとの曝露比については2.6.6.9を参照）、増殖性C細胞の変化がみられたことからがん原性試験ではNOAELを設定することができなかった。げっ歯類における増殖性C細胞の変化はGLP-1受容体作動薬によるGLP-1受容体の活性化に伴う既知の作用であり[8]、リラグルチド[47]、エキセナチド（徐放製剤）[48]、リキシセナチド[49]及びデュラグルチド[50]のげっ歯類を用いたがん原性試験でも、同様のクラス効果であることが報告されている。マウス及びラットでセマグルチドにより誘発されたC細胞の変化は、非遺伝毒性的な機序による、げっ歯類で高感受性のGLP-1受容体を介した特異的メカニズムによるものと考えられ[8]、ヒトにおける甲状腺髄様癌のがん原遺伝子であるRETには関与しない[51]。甲状腺C細胞におけるGLP-1受容体の活性化亢進マーカーと考えられている血漿中カルシトニン濃度測定により、げっ歯類におけるC細胞過形成又は腫瘍性病変の初発よりも前の段階でカルシトニン濃度が上昇したことが確認された。一方、サルでは日本人MRHDである1 mg/週の最大22倍の曝露量で52週間投与したが、C細胞の変化もカルシトニン濃度の上昇も認められなかった。このことは、正常なサルの甲状腺C細胞ではGLP-1受容体の発現が認められないことと一致する[18]。最近公開されたデータ[52]によれば、GLP-1 受容体は健康なヒトの甲状腺では発現していないことが示されている。したがって、げっ歯類におけるGLP-1受容体を介したC細胞の変化がヒトで生じる可能性は低いと考えられる。

ラットでは、がん原性試験において、すべての用量で無腺胃の潰瘍及び上皮過形成が認められた。これらの病変に関して、食餌方法及びストレスを含め、複数の要因との関連性が考えられている[20,31]。過形成は概して潰瘍との関連性があり、摂餌量の低下と関連するものと考えられる。このことに基づくと、本所見は有害ではないものと考えられた。ヒトでは、ラットの無腺胃に対応する部位は認められない。ラットを用いたがん原性試験では、さらに雄の0.01 mg/kg/日以上の投与群で、副腎皮質の嚢胞変性／出血性変性の発現頻度又は程度の増加が認められたが、本所見はラットでは一般に加齢に関連する所見であることから[7]、投与との関連性及び毒性学的意義は不明であると考えられた。

[redacted]法及び遺伝子組換え法で製造したセマグルチドを比較した、ラットを用いた 13 週間比較毒性試験において、膵外分泌腺における限局性腺房細胞萎縮及び単核性炎症細胞の発現が認められた。当該所見は、ラットで通常よく認められる自然発生所見であること[20,33]、及びこの 1 試験でしか認められなかったことから、これらの所見は総合的にみて投与との関連性は低いものと考えられた。サルを用いた 52 週間反復投与毒性試験において膵臓重量の低値が、サルを用いた DRF 試験において膵外分泌腺における腺房細胞の脱顆粒がそれぞれ認められたが、いずれも摂餌量の減少に伴う二次的変化であり、有害でないものと考えられた。

サルを用いた 52 週間毒性試験において、ECG 計測の結果、高用量群（日本人 MRHD である 1 mg/週の 22 倍高い曝露量に相当）の雌 1 例で投与第 13 週に 2 回の洞頻脈エピソードを示す二段脈（bigeminy rhythm）が、その後 26 及び 52 週目には連続性の左脚ブロック様波形が認められた。心臓ブロックはサル及びヒトで時折認められ[21,22]、大半はその他の根本的な心疾患の結果として生じるものである[22]。しかしながら、試験中に変化が進行したことから、投与との関連性を否定できなかった。第 52 週及び 4 週間の回復期間中に追加で ECG を測定した。追加の検討では更なる ECG 所見は認められず、異常な ECG が計測されたのは、この 1 例のみであることが確認された。この 1 例では剖検により右心室心外膜側における蒼白が認められたが、病理組織学的検査では関連した変化は認められなかった。ECG で認められた所見が動物の一般状態に影響を及ぼすことを示唆する臨床兆候は認められなかったものの、本所見は有害であると考えられた。

サルを用いた 52 週間毒性試験において、高用量群の雄 1 例で左心室にカリオメガリーを伴う軽微な多巣性の心筋空胞化及び変性が認められた。追加の検査を実施した結果、本動物の心臓又は本試験におけるその他の動物の心臓に関して、意義のある病理組織学的変化は認められなかった。本所見は対照群でも時折認められており[25]、セマグルチド投与との関連性はないものと考えられた。以上のこと及び、1 例で認められた ECG の異常所見の他に有害性変化が認められなかったことから、サル慢性毒性試験における NOAEL は中用量である 0.06 mg/kg の週 2 回投与と考えられ、これは日本人 MRHD である 1 mg/週の 3.6 倍に相当した。

2.6.6.10.2　生殖発生毒性

セマグルチドにより、ラットでは性周期がわずかに延長し、軽微な黄体数減少に伴う着床数及び同腹児数への影響が誘発された。これらの影響は摂餌量及び体重といったセマグルチドの薬理作用による二次的な適応反応であり、有害でないと考えられた[37]。幼若ラットを用いた毒性試験では、同様の所見は認められなかった。

セマグルチドはラットにおいて、0.03 mg/kg/日以上の用量〔日本人 MRHD である 1 mg/週以下（0.3 倍）に相当〕で、胚・胎児の死亡、生育遅延、軽微／重大な骨格及び内臓異常を含む胚毒性を誘発し

た。ラットで認められた胚毒性の作用機序を解明するため、包括的な一連のメカニズム試験を実施した。当該試験は Module 2.6.7.17.G 及び詳細は Module 4.2.3.7.3 'Embryotoxicity findings in rats: Assessment of human relevance'を参照のこと。メカニズム試験により、セマグルチドのラットにおける胚毒性の影響は、反転卵黄嚢胎盤がラット胚の栄養供給に必須である器官形成期に誘発されたことが明らかとなった。ラット卵黄嚢では器官形成期に機能的 GLP-1 受容体が発現することが明らかになっており、GLP-1 受容体特異的拮抗薬を加えると、セマグルチドの影響は抑制された。この 2 つの試験結果から、GLP-1 受容体の関与が支持された。さらに、セマグルチドは反転卵黄嚢胎盤に達し、卵黄嚢細胞の飲小胞形成不全を誘発することで反転卵黄嚢細胞の母体から胚への栄養輸送を阻害する可能性が高いことが明らかとなった。

ヒトを含む霊長類では胎盤が確立される前に、卵黄嚢が反転し子宮壁に接合することで早期胎盤が形成されることがない。さらに、霊長類の卵黄嚢はラットのように反転して完全に胚を覆うことがない。以上の解剖学的構造から、ラット胚は、漿尿膜胎盤が形成されるまでは栄養供給を受ける反転卵黄嚢の機能性に高度に依存するようになることから、反転卵黄嚢の栄養機能不全に感受性が高い。一方、霊長類では妊娠早期に卵黄嚢から栄養供給にはほとんど依存せず、胚への栄養供給に関しては別の様式の利用が考えられている。さらに、ラットを用いたメカニズム試験から、カニクイザルの卵黄嚢では GLP-1 受容体の発現が認められなかったことから、ラットにおける胚毒性メカニズムはヒトを含む霊長類には当てはまる可能性は低いと考えられる。しかしながら、当該所見に関し、ラットに胚毒性を誘発するその他のメカニズムを完全には否定できない。

ウサギでは、早期妊娠損失及び軽微な胎児異常の発生頻度増加が中用量及び高用量群で認められた。ウサギにおける胎児異常はラットで認められた所見と異なるものであった。ウサギでは、食餌制限により妊娠損失及び胎児異常の増加が誘発されることが示されていることから [38,39]、ウサギで認められた影響は、母体重に及ぼす顕著な影響による二次的なものと考えられた。しかしながら、ウサギの胚・胎児発生に及ぼすセマグルチドの直接影響を否定できなかった。以上より、ウサギの EFD に関する NOAEL は低用量群である 0.001 mg/kg/日と考えられ、これは日本人 MRHD である 1 mg/週での臨床曝露量を下回る曝露量（0.03 倍）に相当した。

サルを用いた PPND 試験において、早期妊娠損失が中用量及び高用量群で認められたが、その他のサル EFD 試験の 2 試験では認められず、3 試験中 1 試験でのみ認められた。さらに、主要な EFD 毒性試験において、散発的な胎児異常が中用量及び高用量でわずかに認められたものの、PPND 試験では認められなかった。EFD 毒性試験では、骨格及び内臓奇形は認められたが、早期妊娠損失は認められなかった。したがって、サルで認められた胎児異常はラットの所見とは異なるものであった。本所見は母動物の顕著な体重減少と一致した。試験間の整合性が認められず、胎児異常に共通性が認められなかったことから、サルで認められた所見は偶発的か、あるいは母動物へのストレス又は体重減少に関

連する変化のいずれかを示唆するものと考えられた。しかしながら、利用可能な背景データが限られており、母動物への顕著な体重減少を伴うカニクイザルの試験経験がこれまでないことから、早期妊娠損失及び胎児異常が投与の影響による可能性を否定できなかった。したがって、カニクイザルの総合的な発生毒性に関する NOAEL は、低用量である 0.015 mg/kg（3 日に 1 回投与）であり、これはヒトの MRHD である 1.0 mg/週での曝露量に概ね相当（0.8 倍）すると結論された。

標準的な生殖発生毒性試験及びメカニズム試験から得られたデータを用いてヒトとの関連性を評価した。データから、ラットの卵黄嚢に関連した胚毒性について、ヒトとの関連性は低いものと考えられるものの、その他のメカニズムが関与する可能性を完全には否定できない。ウサギ及びサルで認められた妊娠損失及び胎児異常は偶発的であるか、母動物への顕著な体重減少に関連したもののいずれかと考えられる。しかしながら、これらの所見のいずれも、ヒトとの関連性を完全には否定できない。ラット、ウサギ及びサルで認められた影響評価に関して上記の不明点があり、妊娠時投与に関連したヒトへのリスク評価実施時に考慮すべきである。

現在市販されている GLP-1 受容体作動薬は動物試験で生殖毒性が示されており、一般に妊娠時の使用は推奨されていない[49,53,54,55,56,57]。概して、認められた影響は胎児発育の遅延及び骨格／骨化に及ぼす影響であった。さらに、市販の GLP-1 受容体作動薬では、動物試験で胚・胎児死亡及び胎児異常が認められている。

2.6.6.10.3　幼若毒性

セマグルチドを幼若ラットに 11 週間投与したところ、摂餌量の減少及び体重増加抑制が認められ、ペアフィード対照群との比較に基づくと、セマグルチドの体重に及ぼす影響は制限給餌による影響よりも強かった。セマグルチドは雌雄に対して性成熟の遅延を誘発し、性成熟到達時の体重はペアフィード対照群よりも高値であった。しかしながら、雌の性周期の規則性、雌雄の生殖器官重量又は顕微鏡的病理検査、発情行動、雌雄の繁殖能又は受胎能、妊娠中期までの雌の妊娠維持能に及ぼす影響はいずれも認められなかった。以上から、性成熟の到達遅延は有害ではないものと考えられた。したがって、NOAEL は試験における最高用量である 0.6 mg/kg/日と考えられ、これは日本人 MRHD である 1 mg/週での曝露量の 18 倍に相当した。

2.6.6.10.4　局所刺激性

反復毒性試験における局所刺激性評価から、溶媒又は皮下投与方法に関連した軽度の投与部位反応が時折認められたのみであり、同様の所見は局所刺激性試験〔ブタへの皮下投与及びウサギへの臨床投与経路でない経路（筋肉内、動脈内及び静脈内投与）〕でも認められた。ブタを用いた皮下投与試験において、投与部位あたりの投与量は 2 mg とし、製剤濃度は 10 mg/mL とした。なお、臨床における最大用量は 1.34 mg/mL のセマグルチド製剤を、投与部位あたり 1 mg 投与する予定である。すべての

毒性試験において同じ溶媒、すなわち、pH を 7.4 に調整した注射用水にリン酸水素二ナトリウム（1.42 mg/mL）、プロピレングリコール（14.0 mg/mL）及びフェノール（5.50 mg/mL）を使用した。この溶媒組成は臨床試験に用いた製剤の一つと同様であった。結論として、セマグルチド製剤投与時に時折認められた組織反応は軽度であり、ヒトにおける安全性上の懸念にはならないものと考えられた。

2.6.6.10.5　結論

セマグルチドの毒性プログラムで認められた主な影響は、想定されたものであり、かつ用量制限因子となる摂餌量及び体重量に及ぼすセマグルチドの薬理作用を介した直接的又は二次的影響と考えられるものであった。

他の GLP-1 受容体作動薬での所見と同様に、セマグルチドはマウス及びラットにおいて甲状腺 C 細胞過形成及び腫瘍性病変を誘発した。C 細胞の変化は非遺伝毒性的な機序による、げっ歯類で高感受性の GLP-1 受容体を介した特異的メカニズムにより生じる。健康なサルの甲状腺 C 細胞では GLP-1 受容体が発現していないことと一致し、C 細胞の変化はサルでは認められなかった。さらに、最近公開されたデータによれば、GLP-1 受容体は健康なヒトの甲状腺では発現していないことが示されている。したがって、げっ歯類における C 細胞の変化がヒトで生じる可能性は低いと考えられる。

セマグルチドは、ラット胚が栄養供給を卵黄嚢胎盤に完全に依存する器官形成期に、GLP-1 受容体を介した反転卵黄嚢胎盤の機能不全により、ラットの EFD に有害影響を与えた。卵黄嚢の解剖学的構造及び機能に種差があること、サルの卵黄嚢では GLP-1 受容体の発現が認められないことから、このメカニズムは、おそらくヒトに当てはまる可能性は低いものと考えられるが、その他のメカニズムの関与を完全には否定できない。ウサギ及びサルでは、妊娠損失の増加及び胎児異常の発現頻度の軽微な増加が認められ、ラットとは異なる所見であった。これらの所見は偶発的であるか、母動物の顕著な体重減少に関連した可能性が考えられるが、当該所見のいずれについてもヒトとの関連性を完全には否定できない。ラット、ウサギ及びサルで認められた影響評価に関して不明点があり、妊娠時投与に関連したヒトへのリスクを評価する際にはこの点を考慮すべきである。

参考文献

[1] ICH M3(R2). Guidance on Nonclinical Safety Studies for the Conduct of Human Clinical Trials and Marketing Authorization for Pharmaceuticals. M3(R2). Current Step 4 version dated 11 June 2009.

[2] ICH S6(R1). Preclinical Safety Evaluation of Biotechnology-Derived Pharmaceuticals. S6(R1). Parent Guideline dated 16 July 1997. Current Step 4 version. Addendum dated 12 June 2011 incorporated at the end of June 2011.

[3] ICH S1B. Testing for Carcinogenicity of Pharmaceuticals. S1B. Current Step 4 version dated 16 July 1997.

[4] ICH S5(R2). Detection of Toxicity to Reproduction for Medicinal Products & Toxicity to Male Fertility. S5(R2). Current Step 4 version. Parent Guideline dated 24 June 1993 (Addendum dated 9 November 2000 incorporated in November 2005).

[5] Lewis RW, Billington R, Debryune E, Gamer A, Lang B, Carpanini F. Recognition of Adverse and Nonadverse Effects in Toxicity Studies., Tox. Path. 2002;30(1):66-74.

[6] Taylor I. Mouse. Background Lesions in Laboratory Animals. A Color Atlas. McInnes EF ed. Edinburgh: Elsevier; 2012. p. 45-72 (specifically: p. 59-61).

[7] Chandra S, Hoenerhoff MJ, Peterson R (2013). Endocrine glands. In: In: Sahota PS, Popp JA, Hardisty JF, Gopinath C (Eds.). Toxicologic Pathology. Nonclinical Safety Assessment. New York: CRC Press; 2013. p. 655-716 (specifically: p. 662-72,684-5).

[8] Knudsen LB, Madsen LW, Andersen S, Almholt K, de Boer AS, Drucker DJ, et al. Glucagon-Like Peptide-1 Receptor Agonists Activate Rodent Thyroid C-Cells Causing Calcitonin Release and C-Cell Proliferation. Endocr. 2010;151(4):1473-86.

[9] Nyska A, Maronpot RR. Adrenal gland. In: Maronpot RR, Boorman G, Gaul B Editors. Pathology of the mouse. Cache River Press: 1999. p. 509-36 (specifically: p. 517-20).

[10] Yoshida A, Maita K, Shirasu Y. Subcapsular Cell Hyperplasia in the Mouse Adrenal Glands. Jpn J Vet Sci. 1986;48(4):719-28.

[11] Evans GO. Animal Clinical Chemistry, A Practical Handbook for Toxicologists and Biomedical Researchers. 2nd ed. London: CRC Press; 2009. p. 17-36 (specifically: p. 24).

[12] Levin S, Selmer D, Ruben Z. Effects of Two Weeks of Feed Restriction on Some Common Toxicologic Parameters in Sprague-Dawley Rats. Toxicol Pathol. 1993;21(1):1-14.

[13] Son WC, Gopinath C. Early occurrence of spontaneous tumors in CD-1 mice and Sprague-Dawley rats. Toxicol Pathol. 2004;32(4):371-4.

[14] Ikezaki S, Takagi M, Tamura K. Natural Occurrence of Neoplastic Lesions in Young Sprague-Dawley Rats. J Toxicol Pathol. 2011;24(1):37–40.

[15] Moriyama T, Tsujioka S, Ohira T, Nonaka S, Ikeda H, Sugiuura H, et al. Effects of reduced food intake on toxicity study parameters in rats. J Toxicol Sci. 2008;33(5):537-47.

16 Moreno C, Mistry M, Roman RJ. Renal effects of glucagon-like peptide in rats. Eur J Pharmacol. 2002;434:163-7.

17 Körner M, Stöckli M, Waser B, Reubi JC. GLP-1 receptor expression in human tumors and human normal tissues: Potential for in vivo targeting. J Nucl Med. 2007;48(5):736-43.

18 Pyke C, Heller RS, Kirk RK, Ørskov C, Reedtz-Runge S, Kaastrup P, et al. GLP-1 Receptor Localization in Monkey and Human Tissue: Novel Distribution Revealed With Extensively Validated Monoclonal Antibody. Endocr. 2014;155:1280-90.

19 Cullen JM. Liver, Biliary System, and Exocrine Pancreas, Diseases of the exocrine pancreas. In: Mcgavin MD, Zachary JF, editors. Pathologic Basis of Veterinary Disease. 4th ed. Mosby Elsevier; 2007: 393-461 (specifically: p. 456).

20 Gopinath C, Mowat V. Atlas of Toxicological Pathology. New York: Springer; 2014: 77-107 (specifically: p. 84-89, 100).

21 Bristow JD, Malinow MR. Spontaneous Bundle Branch Blocks in Rhesus Monkeys. Circ Res. 1965;16:210-20.

22 Francia P, Balla C, Paneni F and Volpe M. Left Bundle-Branch Block – Pathophysiology, Prognosis and Clinical Management. Clin. Cardiol. 2007,30:110-5.

23 Everds NE, Snyder PW, Bailey KL, Bolon B, Creasy DM, Foley GL, et al. Interpreting Stress Responses during Routine Toxicity Studies: A Review of the Biology, Impact, and Assessment. Toxicol Pathol. 2013;41(4):560-614.

24 Spoor MS, Radi ZA, Dunstan RW. Characterization of age- and gender-related changes in the spleen and thymus from control cynomolgus macaques used in toxicity studies. Toxicol Pathol. 2008;36(5):695-704.

25 Chamanza R, Marxfeld HA, Blanco AI, Naylor SW, Bradley AE. Incidences and Range of Spontaneous Findings in Control Cynomolgus Monkeys (Macaca fascicularis) Used in Toxicity Studies. Toxicol Pathol. 2010;38:642-57.

26 Chamanza R. Non-human primates: cynomolgus (Macaca fascicularis) and rhesus (Macaca mulatta) macaques and the common marmoset (Callithrix jacchus). McInnes EF ed. Background Lesions in Laboratory Animals. A Color Atlas. Edinburgh: Elsevier; 2012. p. 1-15.

27 ICH S2(R1). Guidance on Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended for Human Use. S2(R1). Current Step 4 version dated 9 November 2011.

28 ICH S1C(R2). Dose Selection for Carcinogenicity Studies of Pharmaceuticals. S1C(R2). Current Step 4 version. Parent Guideline dated 27 October 1994 (Addendum on a Limit Dose dated 17 July 1997 and incorporated in November 2005). Revised on 11 March 2008.

29 Cattley RC, Cullen JM. Liver and Gall Bladder. In: Haschek WM, Rousseaux CG, Wallig MA, Bolon B, Ochoa R, Mahler BW (Eds.). Haschek and Rousseaux's Handbook of Toxicologic Pathology. 3rd edition. Elsevier, Academic Press, Amsterdam; 2013. p. 1509-66.

30 Greaves P. Histopathology of Preclinical Toxicity Studies 4th ed. Amsterdam: Elsevier Science: 2012.p 433-535 (specifically: p. 487-89).

31 Greaves P. Histopathology of Preclinical Toxicity Studies 4th ed. Amsterdam: Elsevier Science: 2012.p 325-431 (specifically: p. 343-4).

32 Greaves P. Histopathology of Preclinical Toxicity Studies 4th ed. Amsterdam: Elsevier Science: 2012.p 207-61 (specifically: p. 230).

33 McInnes EF. Wistar and Sprague-Dawley rats. In McInnes ed. Background Lesions in Laboratory Animals. A Color Atlas. Edinburgh: Elsevier Ltd; 2012.p.17-36.

34 Laast VA, Larsen T, Allison N, Hoenerhoff MJ, Boorman GA. Distinguishing Cystic Degeneration from Other Aging Lesions in the Adrenal Cortex of Sprague-Dawley Rats. Toxicologic Pathology. 2014;42:823-9.

35 Frazier KS, Seely JC. Urinary System. In: Sahota PS, Popp JA, Hardisty JF, Gopinath C (Eds.). Toxicologic Pathology. Nonclinical Safety Assessment. New York: CRC Press; 2013. p. 421-84 (specifically: p. 449-50).

36 Hard GC, Banton MI, Bretzlaff RS, Dekant W, Fowles JR, Mallett AK, et al. Consideration of Rat Chronic Progressive Nephropathy in Regulatory Evaluations for Carcinogenicity. Toxicol Sci. 2013;132(2):268–75.

37 Terry KK, Chatman LA, Foley GL, Kadyszewski E, Fleeman TI, Hurtt ME, Chapin RE. Effects on Feed Restriction on Fertility in Female Rats. Birth Defects Res Part B. 2005;74(5):431-41.

38 Cappon GD, Fleeman TL, Chapin RE, Hurtt ME. Effects of feed restriction during organogenesis on embryo-fetal development in rabbit. Birth Defects Res (Part B). 2005;74:424-30.

39 Clark RL, Robertson RT, Peter CP, Bland JA, Nolan TE, Oppenheimer L, et al. Association between adverse maternal and embryo-fetal effects in norfloxacin-treated and food-deprived rabbits. Fund Appl Toxicol. Aug 1986;7(2):272-86.

40 DeSesso JM. Comparative Gestational Milestones in Vertebrate Development. In: Developmental and Reproductive Toxicology: A Practical Approach, 3rd Ed., Hood RD, editor, Informa Healthcare, New York; 2012. p. 93-138 (specifically: p. 93-100).

41 FDA. Guidance for Industry Nonclinical Safety Evaluation of Pediatric Drug Products. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration. Center for Drug Evaluation and Research (CDER). February 2006. Pharmacology and Toxicology.

42 EMEA. Guideline on the Need for Non-Clinical Testing in Juvenile Animals of Pharmaceuticals for Paediatric Indications. EMEA/CHMP/SWP/169215/2005. 24 January 2008.

43 Carney EW, Zablotny CL, Marty MS, Crissman JW, Anderson P, Woolhiser M, Holsapple M. The effects of feed restriction during in utero and postnatal development in rats, Tox Sci. 2004;82:237-49.

44 WHO Food Additives Series 35.World Health Organisation (WHO) (1996): 833. Butylated hydroxytoluene. Toxicological evaluation of certain food additives and contaminants in food. Prepared by the forty-fourth meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA).

45 European Food Safety Authority (EFSA). Scientific Opinion on the re-evaluation of butylated hydroxytoluene BHT (E 321) as a food additive. EFSA J 2012;10(3):2588-630.

46 ICH Q3C(R5). Impurities: Guideline for Residual Solvents. Q3C(R5). Current Step 4 version dated 4 February 2011. Parent Guideline dated 17 July 1997 (Revised PDE for THF and NMP dated September 2002 and October 2002 incorporated in core Guideline in November 2005 and revised PDE for Cumene incorporated in core Guideline in February 2011).

47 Federal Drug Administration, USA. Victoza® Prescribing Information, 2010.

48 Federal Drug Administration, USA. Exenatide extended-release (Bydureon®), FDA pharmacology review 2011.

49 European Medicines Agency. Summary of Product Characteristics for lixisenatide (Lyxumia®), 2016.

50 Byrd RA, Sorden SD, Ryan T, Pienkowski T, LaRock R, Quander R, et al. Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies of the Long-Acting GLP-1 Receptor Agonist Dulaglutide in Rodents. Endocr. 2015;156:2417-28.

51 Madsen LW, Knauf JA, Gotfredsen C, Pilling A, Sjögren I, Andersen S, et al. GLP-1 receptor agonists and the thyroid: C-cell effects in mice are mediated via the GLP-1 receptor and not associated with RET activation. Endocr. 2012;153(3):1538-47.

52 Waser B, Blank A, Karamitopoulou E, Perren A, Reubi JC. Glucagon-like-peptide-1 receptor expression in normal and diseased human thyroid and pancreas. Mod Pathol. 2015;28:391-402.

53 European Medicines Agency. Summary of Product Characteristics for Exenatide immediate-release (Byetta®), 2016.

54 European Medicines Agency. Summary of Product Characteristics for Exenatide prolonged-release (Bydeureon®), 2016.

55 European Medicines Agency. Summary of Product Characteristics for Liraglutide (Victoza®), 2016.

56 European Medicines Agency. Summary of Product Characteristics for Albiglutide (Eperzan®), 2016.

57 European Medicines Agency. Summary of Product Characteristics for Dulaglutide (Trulicity®), 2016.

オゼンピック皮下注 2mg

2.6.7 毒性試験の概要表

ノボ ノルディスク ファーマ株式会社

目次

ページ

目次 2
2.6.7.1 毒性試験の概括評価 4
2.6.7.2 トキシコキネティクスの概括評価 16
2.6.7.3 トキシコキネティクスデータの概括評価 20
2.6.7.4 毒性試験に用いた原薬及び製剤 25
2.6.7.5 単回投与毒性試験 28
2.6.7.6 重要でない反復投与毒性試験 30
2.6.7.7 重要な反復投与毒性試験 32
2.6.7.7.A マウスを用いた 2 週間反復皮下投与毒性試験 32
2.6.7.7.B マウスを用いた 13 週間反復皮下投与毒性試験 35
2.6.7.7.C ラットを用いた 2 週間反復皮下投与毒性試験 38
2.6.7.7.D ラットを用いた 13 週間反復皮下投与毒性試験及び 4 週間回復性試験 42
2.6.7.7.E ラットを用いた 26 週間反復皮下投与毒性試験及び 4 週間回復性試験 48
2.6.7.7.F カニクイザルを用いた 2 週間反復皮下投与毒性試験 57
2.6.7.7.G カニクイザルを用いた 13 週間反復皮下投与毒性試験及び 4 週間回復性試験 59
2.6.7.7.H カニクイザルを用いた 52 週間反復皮下投与毒性試験及び 4 週間回復性試験 63
2.6.7.8 遺伝毒性 *in vitro* 71
2.6.7.8.A [redacted]品：4 種のヒスチジン要求性株の *Salmonella typhimurium* 及び 2 種のトリプトファン要求性株の *Escherichia coli* を用いた復帰突然変異試験 71
2.6.7.8.B 遺伝子組換え品：4 種のヒスチジン要求性株の *Salmonella typhimurium* 及び 2 種のトリプトファン要求性株の *Escherichia coli* を用いた復帰突然変異試験 74
2.6.7.8.C [redacted]品：ヒト末梢血リンパ球を用いた染色体異常試験 77
2.6.7.8.D 遺伝子組換え品：ヒト末梢血リンパ球を用いた染色体異常試験 82
2.6.7.9 遺伝毒性 *in vivo* 87
2.6.7.10 がん原性試験 89
2.6.7.10.A マウスを用いた 104 週間反復皮下投与がん原性試験 89
2.6.7.10.B ラットを用いた 104 週間反復皮下投与がん原性試験 107
2.6.7.10.C げっ歯類の甲状腺 C 細胞の GLP-1R の活性化に関する検討 125
2.6.7.10.D げっ歯類のカルシトニン濃度に及ぼすセマグルチドの影響に関する探索試験 126
2.6.7.11 重要でない生殖発生毒性試験 128
2.6.7.12 ラットを用いた受胎能及び胚・胎児の発生（EFD）に関する試験 131
2.6.7.13 生殖発生毒性：EFD 試験 136

2.6.7.13.A　ウサギを用いた EFD 試験 136
2.6.7.13.B　カニクイザルを用いた EFD 試験 139
2.6.7.14　生殖発生毒性：母体の機能ならびに出生前及び出生後の発生（PPND）に関する試験 143
2.6.7.14.A　カニクイザルを用いた EFD 及び PPND 試験 143
2.6.7.15　幼若動物を用いた試験 147
2.6.7.16　局所刺激性 154
2.6.7.17　その他の試験 155
2.6.7.17.A　免疫原性 155
2.6.7.17.B　免疫毒性 155
2.6.7.17.C　依存性 155
2.6.7.17.D　代謝物 155
2.6.7.17.E　不純物及び溶出物 156
不純物の品質確認用に実施した試験 156
2.6.7.17.F　添加物 156
2.6.7.17.G　メカニズム試験 157
ラットを用いた EFD に及ぼす影響の検討 157
EFD 試験に用いる第 3 の動物種の選択を裏付ける試験 162

2.6.7.1 毒性試験の概括評価

Test Article: Semaglutide

Type of Study	Species and Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Nominal Dose [a] (mg/kg)	GLP Compliance	Testing Facility	Study ID	Location in CTD
Single Dose Toxicity	Mouse/CD-1	Subcutaneous	Single dose	0.1 0.3 0.6 2.4 12	Yes	Charles River Laboratories	206524	4.2.3.1-1
	Mouse/CD-1	Intravenous	Single dose	6 9	Yes	Huntingdon Life Sciences	207117	4.2.3.1-2
	Rat/Sprague Dawley	Subcutaneous	Single dose	0.1 0.3 0.6 1.2 7.5	Yes	Charles River Laboratories	206523	4.2.3.1-3
	Rat/Sprague Dawley	Intravenous	Single dose	3.75 5	Yes	Huntingdon Life Sciences	207114	4.2.3.1-4
Repeat Dose Toxicity	Mouse/CD-1	Subcutaneous	8-18 days DRF with dose escalation	5 10 20	No	Charles River Laboratories	207029	4.2.3.2-1
	Mouse/CD-1	Subcutaneous	2 weeks (+ 0-3 weeks dose escalation)	0 0.03 0.09 0.45 2.25	Yes	Charles River Laboratories	206447	4.2.3.2-2

Type of Study	Species and Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Nominal Dose [a] (mg/kg)	GLP Compliance	Testing Facility	Study ID	Location in CTD
	Mouse/CD-1	Subcutaneous	13 weeks	0 1 3 10	Yes	Charles River Laboratories	206663	4.2.3.2-3
	Rat/Sprague Dawley	Subcutaneous	14-35 days DRF with dose escalation	0 0.01 0.03 0.1 0.5 1.0 1.17 2.0	No	Charles River Laboratories	206062	4.2.3.2-4
	Rat/Sprague Dawley	Subcutaneous	2 weeks (+ 0-3 weeks dose escalation)	0 0.01 0.05 0.21 0.86	Yes	Charles River Laboratories	206448	4.2.3.2-5
	Rat/Sprague Dawley	Subcutaneous	13 weeks (+ 0-2 weeks dose escalation)	0 0.01 0.1 0.86	Yes	Charles River Laboratories	206662	4.2.3.2-6
	Rat/Sprague Dawley	Subcutaneous	26 weeks (+ 2 weeks dose escalation)	0 0.03 0.13 0.60	Yes	Huntingdon Life Sciences	207377	4.2.3.2-7
	Cynomolgus monkey	Subcutaneous	20-50 days DRF with dose escalation	0.01 0.03 0.1 0.3 1.0 Approx. 3 times/week	Yes	Charles River Laboratories	206059	4.2.3.2-8

Type of Study	Species and Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Nominal Dose [a] (mg/kg)	GLP Compliance	Testing Facility	Study ID	Location in CTD
	Cynomolgus monkey	Subcutaneous	2 weeks (+ 0-3 weeks dose escalation)	0 0.01 0.06 0.21 0.75 Twice-weekly	Yes	Charles River Laboratories	206449	4.2.3.2-9
	Cynomolgus monkey	Subcutaneous	13 weeks (+ 0-2 weeks dose escalation)	0 0.01 0.1 1.0/0.5 [b] Twice-weekly	Yes	Charles River Laboratories	206450	4.2.3.2-10
	Cynomolgus monkey	Subcutaneous	52 weeks (+ 0- 2 weeks dose escalation)	0 0.01 0.06 0.36 Twice-weekly	Yes	Huntingdon Life Sciences	207288	4.2.3.2-11
Genotoxicity – *in vitro*[c]	*Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*	*In vitro* assay	NA	Up to 5143 µg/plate	Yes	Covance Laboratories Ltd	206415	4.2.3.3.1-1

Type of Study	Species and Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Nominal Dose [a] (mg/kg)	GLP Compliance	Testing Facility	Study ID	Location in CTD
	Salmonella typhimurium and *Escherichia coli*	*In vitro* assay	NA	Up to 5000 µg/plate	Yes	Covance Laboratories Ltd	210193	4.2.3.3.1-2
	Cultured human peripheral blood lymphocytes	*In vitro* assay	N/A	Up to 5143 µg/mL	Yes	Covance Laboratories Ltd	206417	4.2.3.3.1-3
	Cultured human peripheral blood lymphocytes	*In vitro* assay	NA	Up to 5000 µg/ml	Yes	Covance Laboratories Ltd	210194	4.2.3.3.1-4
Genotoxicity – *in vivo*	Induction of micronuclei in the bone marrow of treated rats	Subcutaneous	Single dose	1.875 3.75 7.5	Yes	Covance Laboratories Ltd	206409	4.2.3.3.2-1
Carcinogenicity	Mouse/CD-1	Subcutaneous	104 weeks	F: 0 0.1 0.3 1 M: 0 0.3 1 3	Yes	Huntingdon Life Sciences	207362	4.2.3.4.1-1
	Rat/Sprague Dawley	Subcutaneous	104 weeks (incl. 0-2 weeks dose escalation)	0 0.0025 0.01 0.025 0.1	Yes	Huntingdon Life Sciences	207363	4.2.3.4.1-2

Type of Study	Species and Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Nominal Dose [a] (mg/kg)	GLP Compliance	Testing Facility	Study ID	Location in CTD
Carcinogenicity – other studies								
Activation of GLP-1R in rat thyroid C-cell line	NA	*In vitro* assay	NA	NA	No	Novo Nordisk A/S	LBKN150301	4.2.3.4.3-1
Calcitonin release following a single dose	Mouse/CD1	Subcutaneous	Single dose	0 10	Yes	Novo Nordisk A/S	208422	4.2.3.4.3-2
Calcitonin release following a single dose	Mouse/CD1	Subcutaneous	Single dose	0 1	Yes	Huntingdon Life Sciences	213448	4.2.3.4.3-3
Calcitonin release and C-cell proliferation following 6 weeks dosing	Rat/Sprague Dawley	Subcutaneous	6 weeks	0 0.01 0.1 0.86	Yes	Novo Nordisk A/S	208456	4.2.3.4.3-4

Type of Study	Species and Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Nominal Dose [a] (mg/kg)	GLP Compliance	Testing Facility	Study ID	Location in CTD
Reproductive and Developmental toxicity	Rat/Sprague Dawley	Subcutaneous	Females: from 2 weeks before paring (+ 0-2 weeks dose escalation) to GD19 Males: from 4 weeks before pairing (+ 0-2 weeks dose escalation) to 5 weeks after pairing	0 0.03 0.21 0.86	Yes	Charles River Laboratories	206616	4.2.3.5.1-1
	Rat/Sprague Dawley	Subcutaneous	Females: from 2 weeks before paring (+ 0-2 weeks dose escalation) to GD17 or GD20 Males not dosed	0 0.05 0.10 0.15	Yes	Huntingdon Life Sciences	207359	4.2.3.5.1-2

Type of Study	Species and Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Nominal Dose [a] (mg/kg)	GLP Compliance	Testing Facility	Study ID	Location in CTD
	Rat/Sprague Dawley	Subcutaneous	Females: from 2 weeks before paring (+ 0-2 weeks dose escalation) to GD17 Males: from 4 weeks before pairing (+ 0-2 weeks dose escalation) to approx. 6 weeks after pairing	0 0.01 0.03 0.09	Yes	Huntingdon Life Sciences	207361	4.2.3.5.1-3
	Rabbit/New Zealand white	Subcutaneous	MTD phase: 13, 55 or 57 days Mated phase: GD6-18	MTD phase: 0.01, 0.01 twice-weekly, 0.025 twice-weekly, 0.05, 0.05 twice-weekly Mated phase, 0.001, 0.005, 0.01 and 0.01 every second day	Yes	Charles River Laboratories	206536	4.2.3.5.2-1

Type of Study	Species and Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Nominal Dose [a] (mg/kg)	GLP Compliance	Testing Facility	Study ID	Location in CTD
	Rabbit/New Zealand white	Subcutaneous	From Day -7 or GD6 to GD19 or GD28. One group only dosed for 14 consecutive days and was not mated due to poor condition	0 0.001 0.005 0.0075 0.01	Yes	Huntingdon Life Sciences	207358	4.2.3.5.2-2
	Rabbit/New Zealand white	Subcutaneous	GD6-19	0 0.001 0.0025 0.0075	Yes	Huntingdon Life Sciences	207360	4.2.3.5.2-3
	Cynomolgus monkey	Subcutaneous	GD 16-50	0.075 0.15 mg/kg/3 days	Yes	Covance Munster	208477	4.2.3.5.2-4
	Cynomolgus monkey	Subcutaneous	GD 16-50	0 0.015 0.075 0.15 mg/kg/3 days	Yes	Covance Munster	208486	4.2.3.5.2-5
	Cynomolgus monkey	Subcutaneous	GD 16-140	0 0.015 0.075 0.15 mg/kg/3 days	Yes	Covance Munster	210061	4.2.3.5.3-1
Juvenile Toxicity								
	Rat/Sprague Dawley	Subcutaneous	35 days	0 0.03 0.13 0.6	No	Huntingdon Life Sciences	214276	4.2.3.5.4-1

Type of Study	Species and Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Nominal Dose [a] (mg/kg)	GLP Compliance	Testing Facility	Study ID	Location in CTD
Local Tolerance	Rat/Sprague Dawley	Subcutaneous	10 weeks + 1 week dose escalation	0 0.02 0.13 0.6	Yes	Envigo	214479	4.2.3.5.4-2
	Rabbit/New Zealand white	Intravenous, intra-arterial, intramuscular	Single dose	1.35 mg/mL and 0.06 mL/injection	Yes	CiToxLAB Scantox A/S	212073	4.2.3.6-1
	Pig	Subcutaneous	Single dose injection 2 and 5 days before necropsy	10 mg/mL and 0.2 mL/injection	Yes	Scantox A/S	206664	4.2.3.6-2
Other Toxicity Studies *Impurities*								
	Rat/Sprague Dawley	Subcutaneous	4 (+ 2 weeks dose escalation)	0 0.86	Yes	Huntingdon Life Sciences	209159	4.2.3.7.6-1
	Rat/Sprague Dawley	Subcutaneous	13 weeks (+ 2 weeks dose escalation)	0 0.48 0.45	Yes	Huntingdon Life Sciences	210195	4.2.3.7.6-2
Mechanistic Studies Comparison between whole embryo culture (WEC) and *in vivo* embryonic effects	Rat/Sprague Dawley	Subcutaneous or *in vitro*	Females: 2 weeks prior to pairing until Day 17 after mating	0; 0.2; 0.4 mg/kg	No	Huntingdon Life Sciences	209213	4.2.3.7.3-1
WEC dose range finding study with semaglutide	Rat/Sprague Dawley	*In vitro*	48 h *in vitro*	0, 0.85, 2.7, 8.5, 27, 85, 125, 575 and 1000 µmol/L	No	Huntingdon Life Sciences	210019	4.2.3.7.3-2

Type of Study	Species and Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Nominal Dose [a] (mg/kg)	GLP Compliance	Testing Facility	Study ID	Location in CTD
WEC study with semaglutide and GLP-1 receptor antagonist	Rat/Sprague Dawley	*In vitro*	48 h *in vitro*	0, 8.5, 85 and 850 nmol/L, and a 10-fold molar concentration of the GLP-1 receptor antagonist	No	Huntingdon Life Sciences	211213	4.2.3.7.3-3
WEC study with the semaglutide peptide without acyl side chain (NNC 0113-0236) and GLP-1 receptor antagonist	Rat/Sprague Dawley	*In vitro*	48 h *in vitro*	50, 500 and 5000 nmol/L and a 10-fold molar concentration of the GLP-1 receptor antagonist	No	Huntingdon Life Sciences	211341	4.2.3.7.3-4
WEC study with native GLP-1 and GLP-1 receptor antagonist	Rat/Sprague Dawley	*In vitro* study of native GLP-1 NNC 0113-0007	48 h *in vitro*	10, 100 and 1000 nmol/L and a 10-fold molar concentration of the GLP-1 receptor antagonist	No	Huntingdon Life Sciences	211342	4.2.3.7.3-5
Investigation of GLP-1 receptor expression in yolk sac	Rat/Sprague Dawley	*N/A*	N/A	N/A	No	Huntingdon Life Sciences	211238	4.2.3.7.3-6
Investigation of GLP-1 receptor expression in yolk sac	Rat/Sprague Dawley	*N/A*	N/A	N/A	No	Novo Nordisk A/S	212301	4.2.3.7.3-7

Type of Study	Species and Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Nominal Dose [a] (mg/kg)	GLP Compliance	Testing Facility	Study ID	Location in CTD
Embryo culture study with sampling of yolk sac for assessment of pinocytotic activity and GLP-1 receptor activation	Rat/Sprague Dawley	*In vitro*	48 h *in vitro*	850 nmol/L	No	Huntingdon Life Sciences	211489	4.2.3.7.3-8
Pinocytotic transport in Ussing diffusion chamber	Rat/Sprague Dawley	*In vitro*	N/A	850 nmol/L	No	Novo Nordisk A/S	212241	4.2.3.7.3-9
GLP-1 receptor expression in Cynomolgus monkeys yolk sac	Cynomolgus monkey	*In vitro*	N/A	N/A	No	Novo Nordisk A/S	JHES150306	4.2.3.7.3-10
GLP-1 receptor expression, cAMP release, Pinocytotic activity, digital embryo imaging and evaluation	Rat/Sprague Dawley	Subcutaneous	2 weeks prior to pairing until Day 17 after mating	0; 0.1; 0.25 mg/kg/day	No	CiToxLAB Scantox A/S	212080	4.2.3.7.3-11
In vivo embryo-foetal developmental study to investigate maternal effects	Rat/Sprague Dawley	Subcutaneous	Females: up to 47 days	0.03 0.15	Yes	Huntingdon Life Sciences	208485	4.2.3.7.3-12
Embryo-foetal developmental range finding study with semaglutide peptide without acyl side chain (NNC 0113-0236)	Rat/Sprague Dawley	Intravenous infusion	11 days prior to pairing until Day 17 after mating	Group 1: 0 Group 2: 240 Group 3: 1200 Group 4: 2400 Group 5: 4800 [nmol/kg/day]	Yes	Huntingdon Life Sciences	211411	4.2.3.7.3-13

Type of Study	Species and Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Nominal Dose [a] (mg/kg)	GLP Compliance	Testing Facility	Study ID	Location in CTD
Embryo-foetal developmental study with semaglutide peptide without acyl side chain (NNC 0113-0236) investigating time dependency of effects	Rat/Sprague Dawley	Intravenous infusion	From 10 days before paring until termination on following days after pairing Gr. 1: GD17 Gr. 2: GD8 Gr. 3: GD13 Gr. 4: GD17	Gr. 1 received 0 and all other groups received 2160 nmol/kg/day during the dosing period following an up titration phase	Yes	Huntingdon Life Sciences	211412	4.2.3.7.3-14
Other								
	Minipig	Subcutaneous	Up to 5 weeks	0.01 0.05 0.15 0.5	No	LAB Research (Scantox)	208404	4.2.3.7.7-1

[a] Nominal dose in mg/kg/day, once-daily, unless otherwise stated

[b] Dose reduced during study due to clinical signs of intolerance.

[c] *In vitro* genotoxicity studies conducted with both synthetic and recombinant semaglutide, hence two studies of each.

DRF Dose Range Finding

2.6.7.2 トキシコキネティクスの概括評価

Test Article: Semaglutide

Type of Study	Test System	Method of Administration	Nominal Doses (mg/kg)	GLP Compliance	Study ID	Location in CTD
2-Week Toxicity	Mouse/CD-1	Subcutaneous	0.03 0.09 0.45 2.25	Yes	206447	4.2.3.2-2
13-Week Toxicity	Mouse/CD-1	Subcutaneous	1 3 10	Yes	206663	4.2.3.2-3
Carcinogenicity	Mouse/ CD1	Subcutaneous	0.1 0.3 1.0 3.0	Yes	207362	4.2.3.4.1-1
Dose Range Finding	Rat/Sprague Dawley	Subcutaneous	0 0.01 0.03 0.1 0.5 1.0 1.17 2.0	No	206062	4.2.3.2-4
2-Week Toxicity	Rat/Sprague Dawley	Subcutaneous	0.01 0.05 0.21 0.86	Yes	206448	4.2.3.2-5
4-Week Comparative Toxicity	Rat/Sprague Dawley	Subcutaneous	0.86 (aged) 0.86 (fresh)	Yes	209159	4.2.3.7.6-1

Type of Study	Test System	Method of Administration	Nominal Doses (mg/kg)	GLP Compliance	Study ID	Location in CTD
13- Week Toxicity	Rat/Sprague Dawley	Subcutaneous	0.01 0.1 0.86	Yes	206662	4.2.3.2-6
13-Week Comparative Toxicity	Rat/Sprague Dawley	Subcutaneous	0.48 0.45	Yes	210195	4.2.3.7.6-2
26-Week Toxicity	Rat/Sprague Dawley	Subcutaneous	0.03 0.13 0.60	Yes	207377	4.2.3.2-7
Carcinogenicity	Rat/Sprague Dawley	Subcutaneous	0.0025 0.01 0.025 0.1	Yes	207363	4.2.3.4.1-2
Preliminary Combined Fertility and Embryo-foetal Development	Rat/Sprague Dawley	Subcutaneous	0.03 0.21 0.86	Yes	206616	4.2.3.5.1-1
Preliminary Combined Fertility and Embryo-Foetal Development	Rat/Sprague Dawley	Subcutaneous	0.05 0.10 0.15	Yes	207359	4.2.3.5.1-2
Combined Fertility and Embryo-Foetal Development	Rat/Sprague Dawley	Subcutaneous	0.01 0.03 0.09	Yes	207361	4.2.3.5.1-3
Juvenile Dose Range Finding	Rat/Sprague Dawley	Subcutaneous	0 0.03 0.13 0.6	No	214276	4.2.3.5.4-1

Type of Study	Test System	Method of Administration	Nominal Doses (mg/kg)	GLP Compliance	Study ID	Location in CTD
Juvenile Toxicity	Rat/ Sprague Dawley	Subcutaneous	0 0.02 0.13 0.6	Yes	214479	4.2.3.5.4-2
Preliminary Dose Range Finding and Embryo-foetal Development	Rabbit/New Zealand White	Subcutaneous	Mated phase: 0.001, 0.005, 0.01 daily, 0.01 every second day	Yes	206536	4.2.3.5.2-1
Preliminary Embryo-Foetal Development	Rabbit/New Zealand white	Subcutaneous	0; 0.001; 0.005; 0.0075; 0.001; 0.01; 0.001 & 0.0075	Yes	207358	4.2.3.5.2-2
Embryo-Foetal Development	Rabbit/New Zealand white	Subcutaneous	0.001 0.0025 0.0075	Yes	207360	4.2.3.5.2-3
MTD and DRF study	Minipig	Subcutaneous	Escalation 0.01 0.05 0.15 0.5 Fixed dose 0.01 0.05 0.15	No	208404	4.2.3.7.7-1
2-Week Toxicity	Cynomolgus monkey	Subcutaneous	0.01 0.06 0.21 0.75 Twice-weekly	Yes	206449	4.2.3.2-9

Type of Study	Test System	Method of Administration	Nominal Doses (mg/kg)	GLP Compliance	Study ID	Location in CTD
13-Week Toxicity	Cynomolgus monkey	Subcutaneous	0.01 0.1 1.0/0.5 [a] Twice-weekly	Yes	206450	4.2.3.2-10
52-Week Toxicity	Cynomolgus monkey	Subcutaneous	0.01 0.06 0.36 Twice-weekly	Yes	207288	4.2.3.2-11
Preliminary Embryo-foetal Development	Cynomolgus monkey	Subcutaneous	0.075 0.15	Yes	208477	4.2.3.5.2-4
Embryo-foetal toxicity	Cynomolgus monkey	Subcutaneous	0.015 0.075 0.15	Yes	208486	4.2.3.5.2-5
Pre- and postnatal development	Cynomolgus monkey	Subcutaneous	0.015 0.075 0.15	Yes	210061	4.2.3.5.3-1

[a] Dose reduced during study due to clinical signs of intolerance.

2.6.7.3 トキシコキネティクスデータの概括評価

Test Article: Semaglutide

Type of Study	Test System	Method of Administration	Sex and No./group	Study ID	Nominal Doses (mg/kg)	AUC_{tau} (nM×h) [c] Male	AUC_{tau} (nM×h) [c] Female
2-Week Toxicity	Mouse/CD-1	Subcutaneous	14 M + 14 F per dose group, mean value of 2 M + 2 F per time point	206447		**Day 1 / Week 2**	**Day 1 / Week 2**
					0.03	315 / 479	250 / 323
					0.09	927 / 1416	936 / 1080
					0.45	4840 / 5716	5086 / 5154
					2.25	26848 / 23589	27591 / 18427
13-Week Toxicity	Mouse/CD-1	Subcutaneous	14 M + 14 F per dose group, mean value of 2 M + 2 F per time point	206663		**Day 1 / Week 13**	**Day 1 / Week 13**
					1	11100 / 12100	11100 / 10700
					3	26500 / 39800	31600 / 36900
					10	112000 / 116000	115000 / 117000
Carcinogenicity	Mouse/CD1	Subcutaneous	12 F+12 M per dose group, mean value of 2 M+2 F per time-point	207362		**Day 1 / Week 105**	**Day 1 /Week 105**
					0.1 (F)	Not applicable	750 / 1110
					0.3 (M+F)	2490 / 3080	3020 / 3090
					1 (F+M)	7290 / 13900	6920 / 8970
					3 (M)	11000 / 39500	Not applicable
Dose range finding	Rat/Sprague Dawley	Subcutaneous	5 M+5 F per dose group, mean value of 1 M+1 F per time-point	206062		**Day1/2-5 week**	**Day1/2-5 week**
					0.01	131/172	145/194
					0.03	413/No TK	430/No TK
					0.1	2070/2500	2270/2580
					0.5	14400/No TK	16000/No TK
					1.0	No TK	No TK
					1.17	NR	NR
					2.0	No TK/45100	No TK/58100

Type of Study	Test System	Method of Administration	Sex and No./group	Study ID	Nominal Doses (mg/kg)	AUC_{tau} (nM×h) [c] Male	AUC_{tau} (nM×h) [c] Female
2-Week Toxicity	Rat/Sprague Dawley	Subcutaneous	10 M + 10 F per dose group, mean value of 2 M + 2 F per time point	206448		**Day 1 / Week 2**	**Day 1 / Week 2**
					0.01	46.7 / 103.0	72.62 / 96.11
					0.05	361.8 / 446.6	365.0 / 624.6
					0.21	2445 / 2503	3305 / 3261
					0.86	12506 / 18469	12219 / 19456
4-Week Comparative Toxicity	Rat/Sprague Dawley	Subcutaneous	12 M + 12 F per dose group, mean value of 2-3 animals per time point	209159		**Day 1 /Week 4**	**Day 1 / Week 4**
					0.86 (aged)	20330 / 20590	15250 / 16530
					0.86 (fresh)	17890 / 21370	14670 / 19300
13-Week Toxicity	Rat/Sprague Dawley	Subcutaneous	10 M + 10 F per dose group, mean value of 2 M + 2 F per time point	206662		**Day 1 / Week 13**	**Day 1 / Week 13**
					0.01	NC / 68.4	NR / 78.1
					0.1	1120 / 1120	1450 / 1290
					0.86	8570 / 9310	9860 / 9490
13-Week Comparative Toxicity	Rat/Sprague Dawley	Subcutaneous	15 M + 15 F per dose group, mean value of 3 M + 3 F per time point	210195		**Day 1 / Week 13**	**Day 1 / Week 13**
					0.48 (synthetic)	8280/14100	8990/15600
					0.45(recombinant)	7420/13700	8220/15400
26-Week Toxicity	Rat/Sprague Dawley	Subcutaneous	18 M+18 F per dose group, mean value of 3 animals per sex per time-point.	207377	0	**Day 1 / Week 26**	**Day 1 / Week 26**
					0.03	325/815	115/989
					0.13	1680/4090	1890/3620
					0.6	6480/17770	11300/18500
Carcinogenicity	Rat/ Sprague Dawley	Subcutaneous	12 M+12 F per dose group, mean value of 2 M+2 F per time-point	207363		**Day 1 / Week 104**	**Day 1 /Week 104**
					0.0025	NR / NR	NR / NR
					0.01	NR / 264	NR / 321
					0.025	NR / 673	244 / 609
					0.1	1270 / 3410	1060 / 4220

Type of Study	Test System	Method of Administration	Sex and No./group	Study ID	Nominal Doses (mg/kg)	AUC_{tau} (nM×h) [c] Male	AUC_{tau} (nM×h) [c] Female
Preliminary Combined Fertility and Embryo-foetal Development	Rat/Sprague Dawley	Subcutaneous	8 F per dose group, mean value of 2 F per time-point	206616	0.03 0.21 0.86	**Not applicable**	**Day 6 / Day 16** 242 / 205 2360 / 2050 8100 / 9510
Preliminary Combined Fertility and Embryo-Foetal Development	Rat/Sprague Dawley	Subcutaneous	10 F per dose group, mean value of 2 F per time-point	207359	0.05 0.10 0.15	**Not applicable**	**Day 6 / Day 17** 811 / 555 1660 / 1370 1530 / 1440
Combined Fertility and Embryo-Foetal Toxicity	Rat/Sprague Dawley	Subcutaneous	10 F per dose group, mean value of 2 F per time-point	207361	0.01 0.03 0.09	**Not applicable**	**Day 6 / Day 17** 94.1 / 71.6 286 / 208 880 / 590
Juvenile Dose Range Finding	Rat/Sprague Dawley	Subcutaneous	9 M + 9 F per dose group, mean value of 3 M + 3 F per time-point	214276	0 0.03 0.13 0.6	**Week 5** 468 2520 10300	**Week 5** 514 2810 10400
Juvenile Toxicity	Rat/Sprague Dawley	Subcutaneous	9 M + 9 F per dose group, mean value of 3 M + 3 F per time-point	214479	0 0.02 0.13 0.6	**Week 5/Week 11** 313/439 2290/3560 11100/13900	**Week 5/Week 11** 344/472 2400/3660 11200/16100
Preliminary Dose Range Finding and Embryo-foetal Development	Rabbit/New Zealand White	Subcutaneous	Group 1-3: n=3 Group 5-8: n=6	206536	Mated phase: 0.001 daily, 0.005 daily, 0.01 daily, 0.01 every second day	**Not applicable**	**Day 6 / Day 18** 12.8 / 42.0 61.4 / 771 114 / 1480 135 / 795

Type of Study	Test System	Method of Administration	Sex and No./group	Study ID	Nominal Doses (mg/kg)	AUC_{tau} (nM×h) [c] Male	AUC_{tau} (nM×h) [c] Female
Preliminary Embryo-Foetal Development	Rabbit/New Zealand white	Subcutaneous	Group 1-5: n=6 Group 7-8: n=6	207358	 0.001 0.005 0.0075 0.001 0.01 0.001 0.0075	**Not applicable**	**Day 6 / Day 19** - / 33,5 76,5 / 481 112 / 917 6,86 / 36,5 156/1430* - / 52,4 142 / 977
Embryo-Foetal Development	Rabbit/New Zealand white	Subcutaneous	Group 2-4: n=3	207360	 0.001 0.0025 0.0075	**Not applicable**	**Day 6 / Day 19** - / 20,2 9,22 / 208 145 / 1530
MTD and DRF study	Minipig	Subcutaneous	2 F (escalation phase) 6 F (fixed dose phase)	208404	Escalation 0.01 0.05 0.15 0.5 Fixed dose 0.01 0.05 0.15	**Not applicable**	**Day 1 of dosing** 574 3650 11200 43000 NR NR 11400
2-Week Toxicity	Cynomolgus monkey	Subcutaneous	3 M + 3 F	206449	 0.01 0.06 0.21 0.75 Twice-weekly	**Day 1 / Week 2** 692 / 853 5933 / 8238 17686 / 27550 87383 / 90070	**Day 1 / Week 2** 629 / 751 5411 / 7705 16584 / 23395 70826 / 9984

Type of Study	Test System	Method of Administration	Sex and No./group	Study ID	Nominal Doses (mg/kg)	AUC_{tau} (nM×h) [c] Male	AUC_{tau} (nM×h) [c] Female
13-Week Toxicity	Cynomolgus monkey	Subcutaneous	6 M + 6 F	206450		**Day 1 / Week 13**	**Day 1 / Week 13**
					0.01	618 / 821	586 / 785
					0.1	8370 / 12800	8370 / 12500
					1.0/0.5 [a]	80100 / 61600	95900 / 68400
					Twice-weekly[a]		
52-week Toxicity	Cynomolgus monkey	Subcutaneous	6 M+6 F per dose group	207288		**Day 1 / Week 52**	**Day 1 / Week 13**
					0.01	764/1380	751/1540
					0.06	4570/9260	5320/9210
					0.36	36400/52500	38400/56900
Embryo-foetal Development	Cynomolgus monkey	Subcutaneous	6 F per dose group	208477	Every 72 h	**Not applicable**	**GD 20 / GD 50**
					0.075		9150 / 12300
					0.15		23200 / 28000
Embryo-foetal Development	Cynomolgus monkey	Subcutaneous	16 F per dose group	208486	Every 72 h	**Not applicable**	**Day 1 / GD 50**
					0.015		1270[#] / 2000
					0.075		7310[#] / 10400
					0.15		24000 / 30000
Pre- and postnatal Development	Cynomolgus monkey	Subcutaneous	24 F per dose group	210061	Every 72 h	**Not applicable**	**Day 1 / GD 140**
					0.015		1290[#] / 1320
					0.075		8140[#] / 6720
					0.15		24500 / 14400

[a] Dose reduced during study due to clinical signs of intolerance. The doses were 1.0 mg/kg on Day 1 and 0.5 mg/kg in Week 13; [c]: AUC_{tau} is AUC in dosing interval tau (h). For mouse and rat studies tau is 24 h. For rabbit study tau is 24 h. For monkey studies tau is 72 h. [#] Tau is 48 h; NR = Not Reportable; NC = Not Calculable; *Day -7 and Day 14, respectively. Animals not mated

2.6.7.4 毒性試験に用いた原薬及び製剤

Test Article: Semaglutide

Drug Substance			Drug Product			Study ID	Type of Study
Batch Number (S) Synthetic (R) Recombinant	**Purity (%)**	**HMWP (%)**	**Nominal Concentration (mg/mL)**	**Batch Number**	**Purity (%)**		
BGi06003 (S)	88	-	-	-	-	206062	S.C. DRF Study in Rats
						206059	S.C. DRF Study in Monkeys
OWGLP106101C (S)	91.9	0.5	-	-	-	207029	S.C. DRF Study in Mice
						206663	13-Week S.C: Toxicity Study in Mice
						206662	13-Week S.C: Toxicity Study in Rats
						206450	13-Week S.C: Toxicity Study in Monkeys
						206415	Ames test, *in vitro*
						206417	Induction of Chromosome Aberrations, *in vitro*
						206616	Preliminary Combined Fertility and EFD Study in Rats
						206536	Preliminary DRF and EFD Study in Rabbits
			1	412_N06313	92.49	206524	Single Dose S.C. Toxicity Study in Mice
			10	412_N06314	92.21	206447	2-Week S.C: Toxicity Study in Mice
						206523	Single Dose S.C. Toxicity Study in Rats
						206448	2-Week S.C: Toxicity Study in Rats
						206449	2-Week S.C: Toxicity Study in Monkeys
						206409	Induction of Micronuclei in Rats
			10	412_N06540	92.24	206664	S:C: Injection Local Toxicity Study in Pigs
PP0217G1T01 (S)	88.0	3.56	-	412_G07011	89.07	207117	Single Dose I.V. Toxicity Study in Mice
			-	412_G07011	89.07	207114	Single Dose I.V. Toxicity Study in Rats
LP0217G1T02 (S)	92.9	1.4	-	-	-	207288	52-Week S.C. Toxicity Study in Cynomolgus Monkeys

Drug Substance			Drug Product			Study ID	Type of Study
Batch Number (S) Synthetic (R) Recombinant	**Purity (%)**	**HMWP (%)**	**Nominal Concentration (mg/mL)**	**Batch Number**	**Purity (%)**		
LP0217G1T01 (S)	93.6	0.8	-	-	-	207377	26-Week S.C. Toxicity Study in Rats
						207362	104-Week S.C. Carcinogenicity Study in Mice
						207363	104-Week S.C. Carcinogenicity Study in Rats
						207359	Prelim. Combined Fertility and EFD Study in Rats
						207361	Combined Fertility and EFD Study in Rats
						207358	Preliminary EFD Study in Rabbits
			-	-	-	207360	EFD Study in Rabbits
			10	VLDP003	93	208422	Single Dose Study to Assess Plasma Calcitonin in Mice
						208456[a]	6-Week Toxicity Study to Assess Plasma Calcitonin in Rats
LP0217G1V04 (S)	92.4	0.1	-	-	-	207362	104-Week S.C. Carcinogenicity Study in Mice
						207363	104-Week S.C. Carcinogenicity Study in Rats
						208477	Preliminary EFD Study in Cynomolgus Monkeys
						208486	EFD Study in Cynomolgus Monkeys
						208485	Investigative Combined Fert. and EFD Study in Female Rats
						209213	Whole Embryo Culture / *In Vivo* EFD Study
LP0217G1V06 (S)	89.7	0.1	-	-	-	207362	104-Week S.C. Carcinogenicity Study in Mice
LP0217G1V01 (S)	93.1	0.1	-	-	-	208404	MTD and DRF Study in Minipigs
LP0217K2X01 (S) &	95.7	<0.1	3	412_N09051	95.83	209159	4-Week Comparative Study with Aged vs. Fresh Semaglutide in Rats
LP0217K2X02 (S)	96.3	<0.1	3	412_N09051A	85.55		
LP0217K2X07 (S)	95.9[b]	<0.2		412_N10565	95.92	210061	EFD and Pre- and Postnatal Development in Cyno. Monkey
			10	412_N10565	95.92	211213	Whole Embryo Culture Main Study
			10	412_N10565	95.92	211489	Whole Embryo Culture Study (TEM and cAMP)
			10	412_N10565	95.92	212080	*In Vivo* Study with Sampling for Ussing Study, GLP-1R Presence, cAMP and Embryo Imaging
LP0217K2X09 (S)	96.7[b]	<0.2	10	412_N10151	-	210061	EFD and Pre- and Postnatal Development in Cyno. Monkey
			-	-	-	210019	Whole Embryo Culture DRF Study
LP0217K2X12 (S)	96.1[b]	<0.2	-	-	-	210195	13-week Comparative Study with Synthetic and Recombinant Semaglutide in Rats

Drug Substance			Drug Product			Study ID	Type of Study
Batch Number (S) Synthetic (R) Recombinant	**Purity (%)**	**HMWP (%)**	**Nominal Concentration (mg/mL)**	**Batch Number**	**Purity (%)**		
MP0217SDY002 (R)	90.4[b]	<0.1	-	-	-	210195	13-week Comparative Study with Synthetic and Recombinant Semaglutide in Rats
						210193	Ames test, *in vitro*
						210194	Induction of Chromosome Aberrations, *in vitro*
PP0217K5A01 (R)	94.5	0	1.35	412_N12081	94.3	212073	Local Tolerance Study in Rabbits with I.M., I.V. and I.A. Injection
XXhK7B0201	95.7[b]	<0.1	1	412_N13525	95.5	213448	Single Dose Study to Assess Plasma Calcitonin in Mice
XXhK7C0303	96.0[b]	<0.1	1	412_N14309	96.3	214276	S.C. DRF Study in Juvenile Rats
			1	412_N14309	96.3	214479	11-Week S.C. Toxicity Study in Juvenile Rats
			1	412_N15050	95.8[b]		

DRF Dose Range Finding; EFD Embryo-Foetal Development; HMWP High Molecular Weight Protein;

S.C. Subcutaneous; I.V. Intravenous; I.M. Intramuscular; I.A. Intra-arterial

- : Test item supplied as Drug Substance and consequently no Drug Product information

[a] The Drug Product batches for this study were all prepared by dilution from Drug Product batch VLDP003. The following batch numbers were used:
0.02 mg/mL (412_N08666, 412_N08721, 412_N08731, 412_N08733, 412_N08738), 0.2 mg/mL (412_N08665, 412_N08720, 412_N08732 412_N08734, 412_N08739), 1.72 mg/mL (412_N08664, 412_N09001)

[b] Purity calculated as 100% - 'Sum of impurities'

2.6.7.5 単回投与毒性試験

Test Article: Semaglutide

Species/ Strain	Route of Administration	Nominal Doses (mg/kg)	Gender and No. per Group	Observed Maximum Tolerated Dose (mg/kg)	Noteworthy Findings	Study ID
Mouse/ CD-1	Subcutaneous	0.1 0.3 0.6 2.4 12	3 F 3 F 3 F 3 F 3 M & 3 F	12	Initial reduction of food consumption and loss of up to 17% body weight returned to pre-dose levels by Day 5–6. Reduced water consumption in females at 0.6 and 12 mg/kg. The magnitude of the body weight loss and the reduced food consumption indicated that the maximum tolerated dose (MTD) was 12 mg/kg.	206524
Mouse / CD-1	Intravenous bolus	6 (prelim) 9 (prelim) 9 (main)	1 M & 1 F 1 M & 1 F 5 M & 5 F	9	Clinical signs occurred immediately after dosing at both 6 and 9 mg/kg, and comprised hyperactivity, tremors and fast breathing. In addition, dark patches on the tail, vocalisation and piloerection were observed in some of the animals. Recovery was complete within 20 minutes or on the day after dosing. Body weight losses of up to18% returned to pre-dose levels by Day 4–7. The magnitude of the body weight loss and the observed clinical signs indicated that the MTD was 9 mg/kg.	207117

Species/ Strain	Route of Administration	Nominal Doses (mg/kg)	Gender and No. per Group	Observed Maximum Tolerated Dose (mg/kg)	Noteworthy Findings	Study ID
Rat/ Sprague Dawley	Subcutaneous	0.1 0.3 0.6 1.2 7.5	3 F 3 F 3 F 3 F 3 M & 3 F	7.5	Hunched posture, subdued behaviour, piloerection and red discharge from the nose and eyes were seen, with a tendency towards slower recovery at 7.5 mg/kg. An initial reduction of food consumption correlated with a loss of body weight of up to18%. Generally, body weights had recovered by Day 5–6. Water consumption was reduced the first one or two days after dosing. The magnitude of the body weight loss, the reduction in food consumption and the observed clinical signs indicated that the MTD was 7.5 mg/kg.	206523
Rat/ Sprague Dawley	Intravenous bolus	3.75 (prelim.) 5 (prelim.) 5 (main)	1 M & 1 F 1 M & 1 F 5 M & 5 F	5	Clinical signs were observed from immediately after dosing at both dose levels and comprised underactivity, tremors, fast breathing, piloerection, urine staining of the perigenital area, dark patches on the tail, unsteady gait and brown staining on muzzle. The clinical signs resolved by Day 2-5. Body weight losses were observed in all animals, by 13–20% and returned to pre-dose levels around Day 5–6. The magnitude of the body weight loss and the observed clinical signs indicated that the MTD was 5 mg/kg.	207114

2.6.7.6 重要でない反復投与毒性試験

Test Article: Semaglutide

Species/ Strain	Route of Administration	Duration of Dosing	Nominal Doses	Gender and No. per Group	Maximum Tolerated Dose	Noteworthy Findings	Study ID
Mouse/CD-1	Subcutaneous	8-18 days	5, 10 and 20 mg/kg/day 10 and 20 mg/kg/day 20 mg/kg/day	3 M & 3 F 3 M & 3 F 3 M & 3 F	10 mg/kg/day	Hunched posture was observed at 20 mg/kg/day in all groups, but number of affected animals and incidences were lower with dose escalation. An initial transient loss of body weight was observed during the first days after dosing start for all groups. Animals receiving a dose of 5 mg/kg/day initially were slightly less affected, compared to animals receiving a higher starting dose, which had a body weight loss in the range of 13-20%. Body weight performance generally reflected the food consumption. The incidence of animals exhibiting hunched posture at 20 mg/kg/day defined the MTD to be 10 mg/kg/day.	207029
Rat/Wistar	Subcutaneous	2–5 weeks	0 mg/kg 3 times/week 0.01 mg/kg 3 times/week 0.1 mg/kg 3 times/week 0.03, 0.1 and 1.17 mg/kg 3 times/week 0.03, 0.1, 0.5, 1 and 2 mg/kg 3 times/week	5 M & 5 F 5 M & 5 F 5 M & 5 F 5 M & 5 F 5 M & 5 F	2 mg/kg 3 times/week	Well tolerated with an initial and transient reduction in body weight (up to 15%) and a reduction of body weight gain throughout the dosing period except at 0.01 mg/kg. The initial body weight loss was most marked in the group starting at 0.1 mg/kg. Slightly decreased levels of triglycerides were seen in treated males. Liver weights were slightly low in the males treated for 5 weeks (0.03-2 mg/kg). The magnitude of the body weight reduction precluded	206062

Species/ Strain	Route of Administration	Duration of Dosing	Nominal Doses	Gender and No. per Group	Maximum Tolerated Dose	Noteworthy Findings	Study ID
						escalation of the dose beyond 2 mg/kg.	
Monkey/ cynomolgus	Subcutaneous	5-7 weeks	0.1, 0.01, 0.03, 0.1, 0.3 and 1.0 mg/kg approx. 3 times/week 0.01, 0.03, 0.1 and 0.3 mg/kg approx. 3 times/week 0.03 and 0.1 mg/kg approx. 3 times/week	1 M & 1 F 1 M & 1 F 2 M & 2 F	0.3 mg/kg 3 times/week	Vomiting and dehydration at 0.1 mg/kg without dose escalation. With dose escalation, dose levels up to 0.3 mg/kg were tolerated. After dose escalation to 1 mg/kg both animals became dehydrated and were euthanised. The remaining four animals were dosed with 0.03 mg/kg for one week and thereafter escalated to 0.1 mg/kg. Two of the animals became dehydrated and were euthanised. In 4/8 animals, diffuse or localised acinar cell degranulation of the exocrine pancreas was observed. 0.3 mg/kg was considered to be the MTD after appropriate dose escalation whereas 1.0 mg/kg was demonstrated to exceed MTD.	206059

2.6.7.7 重要な反復投与毒性試験

Test Article: Semaglutide

2.6.7.7.A　マウスを用いた２週間反復皮下投与毒性試験		**Study ID: 206447**
Species/Strain: Mouse/CD-1	**Duration of Dosing:** 2 weeks (preceded by 1-3 weeks dose escalation)	**Location in CTD: 4.2.3.2-2**
Initial Age: Approx. 7 weeks at dosing start	**Duration of Postdose:** N/A	**GLP Compliance:** Yes
Date of First Dose: November 2006	**Method of Administration:** Subcutaneous injection	
Nominal Dose Levels: 0, 0.03, 0.09, 0.45 and 2.25 mg/kg/day	**Vehicle/Formulation:** 1.42 mg/mL disodium hydrogen phosphate dihydrate,14.0 mg/mL propylene glycol, 5.5 mg/mL phenol and water for injection, pH 7.4	
Parameters collected: Viability, Clinical Condition, Body Weight, Food Consumption, Water Consumption, Ophthalmoscopy, Haematology, Clinical Chemistry, Toxicokinetics, Organ Weights, Macropathology, Histopathology		
Special Features: A 1-3 weeks dose escalation phase to ensure tolerability at the target dose levels		
No Observed Adverse Effect Level: Not established		
Brief conclusion: Semaglutide was generally well tolerated. No clear effects of treatment on body weight except, in the high dose females, but food consumption was generally decreased either following the first dose administration or following escalation of the dose. Changes in clinical chemistry and organ weights were observed but considered non-adverse. Minimal to mild focal C-cell hyperplasia of the thyroid, and subcapsular cell hyperplasia of the adrenals (which was considered of uncertain relationship to treatment at the time of study conduct) were observed in all groups and were considered to be adverse due to the pre-neoplastic nature of these changes. However, as the adrenal hyperplasia was only observed in this isolated study, the overall assessment is that it is considered incidental and not related to semaglutide. Due to the C-cell changes at all dose levels, a No Observed Adverse Effect Level (NOAEL) could not be established.		

Nominal Dose (mg/kg/day)	**0 (Control)**	**0.03**	**0.09**	**0.45**	**2.25**	**0 (Control)**	**0.03**	**0.09**	**0.45**	**2.25**
Initial Number of Animals **Main** **Satellite**	**M: 10** **M: 26**	**M: 10** **M: 26**	**M: 10** **M: 26**	**M: 10** **M: 26**	**M: 10** **M: 26**	**F: 10** **F: 26**	**F: 10** **F: 26**	**F: 10** **F: 26**	**F: 10** **F: 26**	**F: 10** **F: 26**
Toxicokinetics (AUC_{0-24h} (nmol*h/L))										
Day 1	N/A	315	927	4840	26848	N/A	250	936	5086	27591
Day 14	N/A	479	1416	5716	23589	N/A	323	1080	5154	18427
Noteworthy Findings										
Died or euthanised/terminated prematurely	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1[a]
Clinical signs (main study animals)[b]										
Hunched posture	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
Body weight (main study animals)										
Terminal body weight (g)	34.5	36.6	35.9	36.5	36.7	28.6	30.6	30.1	30.3	28.1
Body weight gain (main study animals)										
Day 1-15 (g)	0.8	2.1	2.0	1.3	1.5	0.7	1.4	1.5	1.3	0.3
Day 1-15 (% difference from control)	0.8	+163	+150	+63	+88	0.7	+100	+114	+86	-57
Clinical chemistry (main study animals)										
Alanine aminotransferase (iu/L)	63	43	44	46	48	42	34	37	28**	28**
Triglycerides (mmol/L)	1.28	1.01	1.11	1.12	1.07	1.10	0.97	1.00	0.85	0.85
Organ weights (main study animals)										
Liver										
Absolute weight (g)	1.90	1.87	1.88	1.89	1.95	1.50	1.57	1.44	1.52	1.28*
% of body weight	5.79	5.43	5.54	5.58	5.64	5.58	5.36	5.17	5.33	4.92*
Histopathology (main study animals)										
Thyroid gland (number examined)	10	10	10	10	10	9	10	10	10	9
Focal C-cell hyperplasia, minimal	0	1	4	3	1	0	0	1	3	1

Nominal Dose (mg/kg/day)	**0 (Control)**	**0.03**	**0.09**	**0.45**	**2.25**	**0 (Control)**	**0.03**	**0.09**	**0.45**	**2.25**
Focal C-cell hyperplasia, mild	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
Focal C-cell hyperplasia, total	0	1	5*	3	1	0	0	1	3	1
Adrenal gland										
Subcapsular cell hyperplasia, minimal	0	0	1	0	1	0	3	0	6*	2
Subcapsular cell hyperplasia, mild	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
Subcapsular cell hyperplasia, total	0	0	1	0	1	0	4	0	6	2
Site of treatment/injection[c]										
Injection/treatment site (number examined)	10	0	0	0	10	10	0	0	0	10
Myositis, focal	1	N/A	N/A	N/A	0	2	N/A	N/A	N/A	1
Regeneration, myofibre, focal	1	N/A	N/A	N/A	3	0	N/A	N/A	N/A	2
Foreign body reaction, subcutaneous, focal	0	N/A	N/A	N/A	0	0	N/A	N/A	N/A	2
Inflammation, subcutaneous	0	N/A	N/A	N/A	1	2	N/A	N/A	N/A	1
Inflammatory cell infiltration, subcutaneous	1	N/A	N/A	N/A	0	4	N/A	N/A	N/A	0
Dermatitis	0	N/A	N/A	N/A	1	1	N/A	N/A	N/A	2
Pustule, focal	1	N/A	N/A	N/A	0	0	N/A	N/A	N/A	0
Haematoma, subcutaneous	0	N/A	N/A	N/A	0	1	N/A	N/A	N/A	0

[a] Animal euthanised due to clinical signs which comprised limping, rolling gait, agitation, piloerection, subdued behaviour and hunched posture. There were no abnormal findings at necropsy and the cause of the clinical condition could not be established.

[b] Number of animals with clinical sign

[c] Injection site findings are all considered unrelated to treatment with semaglutide.

* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$ vs. control (pairwise test)

N/A Not applicable

2.6.7.7.B マウスを用いた 13 週間反復皮下投与毒性試験		**Study No.: 206663**
Species/Strain: Mouse/CD-1	**Duration of Dosing:** 13 weeks	**Location in CTD: 4.2.3.2-3**
Initial Age: Approx. 7 weeks at dosing start	**Duration of Postdose:** N/A	**GLP Compliance:** Yes
Date of First Dose: Approx. 20 March 2007	**Method of Administration:** Subcutaneous injection	
Nominal Dose Levels: 0, 1, 3 and 10 mg/kg/day	**Vehicle/Formulation:** 1.42 mg/mL disodium hydrogen phosphate dihydrate,14.0 mg/mL propylene glycol, 5.5 mg/mL phenol and water for injection, pH 7.4	

Parameters collected: Viability, Clinical Condition, Body Weight, Food Consumption, Water Consumption, Ophthalmoscopy, Haematology, Clinical Chemistry, Urinalysis, Plasma Calcitonin, Toxicokinetics, Organ Weights, Macropathology, Histopathology, including extended thyroid evaluation, and Antibody Assessment (8 days after last dose).

No Observed Adverse-Effect Level: Not established

Brief conclusion: Clinical signs comprised hunched posture and piloerection. Initial body weight loss or reduced body weight gain was observed and generally reflected the food consumption. Clinical chemistry revealed a non-adverse decrease of plasma triglyceride levels. Reduced liver weights were observed in high dose males and histology revealed decreased glycogen content of the liver. The reduced liver weights and the decreased glycogen content were considered to be secondary to the pharmacological effect of semaglutide on food consumption and body weight and were considered non-adverse. Increased incidence of minimal centrilobular hypertrophy was observed in the high dose males but in the absence of any associated changes it was considered non-adverse. No similar finding was made in the 2-year carcinogenicity study at 3 mg/kg/day, indicating that the centrilobular hypertrophy might be an incidental finding. C-cell hyperplasia and increased incidences of dilated ultimobranchial ducts were observed at all dose levels and plasma calcitonin was generally higher in all treated animals than in the controls. As a pre-neoplastic change, the C-cell hyperplasia was considered to be adverse. Consequently, a No Observed Adverse Effect Level (NOAEL) could not be established.

Nominal Dose (mg/kg/day)	**0 (Control)**	**1**	**3**	**10**	**0 (Control)**	**1**	**3**	**10**
Initial Number of Animals								
Main	M: 10	M: 10	M: 10	M: 10	F: 10	F: 10	F: 10	F: 10
Satellite	M: 15	M: 15	M: 15	M: 15	F: 15	F: 15	F: 15	F: 15
Antibody	M: 15	M: 5	M: 5	M: 5	F: 15	F: 5	F: 5	F: 5
Toxicokinetics (AUC_{0-24h} (nmol*h/L))								
Day 1	N/A[d]	11100	26500	112000	N/A[d]	11100	31600	115000
Week 13	N/A	12100	39800	116000	N/A	10700	36900	117000
Noteworthy Findings								
Died or euthanised/terminated prematurely[a]	0	2	1	0	0	0	0	1

Nominal Dose (mg/kg/day)	**0 (Control)**	**1**	**3**	**10**	**0 (Control)**	**1**	**3**	**10**
Clinical signs (main study animals)[b]								
Hunched posture	0	0	2	6	0	0	0	2
Piloerection	0	2	2	6	0	0	0	0
Body weight (main study animals)								
Terminal body weight (g)	38.8	39.6	38.2	36.3	34.5	32.8	31.0	30.8
Body weight gain (main study animals)								
Week 1-13 (g)	7.1	7.5	6.3	5.6	8.9	7.8	6.5	6.3
Week 1-13 (% difference from control)	-	+6	-11	-21	-	-12	-27	-29
Food consumption (main study animals)								
Day 1 (g/animal/day)	5.3	4.1***	3.6***	3.3***	4.2	2.9***	2.5***	2.2***
Mean Week 1-13 (g/animal/day)	5.5	5.5	5.1	5.2	5.0	4.8	4.3	4.0
Clinical chemistry (main study animals)								
Triglycerides Week (mmol/L)	1.49	1.44	1.34	1.12	1.56	1.07	0.99*	1.02
Calcitonin (main and antibody animals[c])								
Week 11: AUC_{0-24} (pmol*h/L)	457	4190	4310	4580	1510	4470	3830	5310
Organ weight (main study animals)								
Liver								
Absolute weight (g)	2.03	2.06	1.96	1.72*	1.86	1.61	1.61	1.59
% of body weight	5.53[†]	5.41	5.42	4.93	5.78	5.36	5.52	5.45
Histopathology (main study animals)								
Liver (number examined)	10	2	1	10	10	0	0	10
Centrilobular hypertrophy, minimal	0	0	0	4	0	-	-	0
Glycogen decreased	0	0	0	6*	0	-	-	1

Nominal Dose (mg/kg/day)	**0 (Control)**	**1**	**3**	**10**	**0 (Control)**	**1**	**3**	**10**
Thyroid gland (number examined)	15	15	15	15	15	15	15	15
Focal C-cell hyperplasia, minimal	0	2	2	2	0	3	1	6*
Focal C-cell hyperplasia, mild	0	0	0	0	0	0	0	1
Focal C-cell hyperplasia, total	0	2	2	2	0	3	1	7**
C-cell nests	1	1	2	5	0	6*	3	0
Ultimobranchial duct, dilated, minimal	4	8	5	6	5	6	10	9
Ultimobranchial duct, dilated, mild	2	2	3	3	1	7*	3	4
Ultimobranchial duct, dilated, moderate	0	0	0	1	0	0	0	0
Ultimobranchial duct, dilated, total	6	10	8	10	6	13*	13*	13*
Site of treatment/injection[e]								
Injection/treatment site (number examined)	10	2	1	10	10	0	0	10
Epidermal hyperplasia, focal	1	0	0	0	1	N/A	N/A	0
Dermatitis, focal	2	0	0	0	0	N/A	N/A	0
Inflammation, granulomatous	1	0	0	1	0	N/A	N/A	0
Inflammation, subacute, subcutaneous	0	0	0	0	5	N/A	N/A	3
Fibroplasia, focal	0	0	0	0	1	N/A	N/A	0
Myofibre degeneration, focal	3	0	0	3	5	N/A	N/A	1
Inflammatory cell infiltration, subcutaneous, focal	1	0	0	3	1	N/A	N/A	1
Crusting	0	0	0	0	0	N/A	N/A	1
Pigmented macrophages	2	0	0	2	1	N/A	N/A	0
Haemorrhage, subcutaneous	0	0	0	0	0	N/A	N/A	1

* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$ vs. control (pairwise test)

[a] Two low dose males died during anaesthesia, and one intermediate dose male was euthanised due to a lesion in the dorsal neck region. A satellite high dose female was found dead on Day 69, autolysed and cannibalised. None of these deaths were considered to be related to semaglutide.

[b] Number of animals with clinical sign

[c] 10 male and 10 female antibody animals were sampled for antibody assessment and terminated prior to the first dosing occasion. The remaining 5 male and 5 female antibody animals of each group were sampled for calcitonin assessment in Week 11, terminated 8 days after the last dose and sampled for antibody assessment and histologic examination of the thyroid gland i.e. in total, the thyroid was examined in 15 males and 15 females of each group.

[d] Control plasma samples from Day 1 contained quantifiable concentrations of semaglutide which were 2-30-fold greater than the LLOQ. This was not considered to affect the integrity or outcome of the study. For further information, please see Written Summary (Module 2.6.6.3.1) or the study report (Module 4.2.3.2, 206663).

[e] Injection site findings are all considered unrelated to treatment with semaglutide.

- Not examined, N/A Not applicable

2.6.7.7.C ラットを用いた２週間反復皮下投与毒性試験		**Study ID**: **206448**
Species/Strain: Rat/ Sprague Dawley	**Duration of Dosing:** 2 weeks (preceded by 0-3 weeks dose escalation)	**Location in CTD: 4.2.3.2-5**
Initial Age: Approx. 7 weeks at dosing start	**Duration of Postdose:** N/A	**GLP Compliance:** Yes
Date of First Dose: 01 November 2006	**Method of Administration:** Subcutaneous	
Nominal Dose Levels: 0, 0.01, 0.05, 0.21 and 0.86 mg/kg/day	**Vehicle/Formulation:** 1.42 mg/mL disodium hydrogen phosphate dihydrate,14.0 mg/mL propylene glycol, 5.5 mg/mL phenol and water for injection, pH 7.4	
Parameters collected: Viability, Clinical Condition, Body Weight, Food Consumption, Water Consumption, Ophthalmoscopy, Haematology, Clinical Chemistry, Urinalysis, Toxicokinetics, Organ Weights, Macropathology, Histopathology		
Special Features: A 0-3 weeks dose escalation phase to ensure tolerability at the target dose levels		
No Observed Adverse-Effect Level: 0.86 mg/kg/day		
Brief conclusion: Semaglutide was well tolerated. Initial and transient reductions in bodyweight and reductions in body weight gain throughout the dosing period were observed. Body weight performance generally reflected the food consumption. Minor treatment-related changes in clinical pathology parameters were observed. Due to the small magnitude of these changes and the absence of correlating histopathological changes, these were considered to be non-adverse. A range of organ weight changes, secondary to the pharmacological effect of semaglutide on bodyweight, were observed and considered non-adverse. In the absence of any adverse changes, the NOAEL was considered to be the highest dose tested, 0.86 mg/kg/day.		

Nominal Dose (mg/kg/day)	**0 (Control)**	**0.01**	**0.05**	**0.21**	**0.86**	**0 (Control)**	**0.01**	**0.05**	**0.21**	**0.86**
Initial Number of Animals	**M: 10**	**M: 10**	**M: 10**	**M: 10**	**M: 10**	**F: 10**	**F: 10**	**F: 10**	**F: 10**	**F: 10**
Toxicokinetics: ($AUC_{0\text{-}24h}$ (nmol*h/L))										
Day 1	N/A	46.7	362	2445	12506	N/A	72.6	365	3305	12219
Day 14	N/A	103	447	2503	18469	N/A	96.1	625	3261	19456
Noteworthy Findings										
Died or euthanised/terminated prematurely	0	0	0	0	0	0	0	0	1[a]	0
Body weight										
Terminal body weight (g)	465	422	420	383**	383**	282	254	262	232**	228**
Body weight gain										
Day 1-14 (g)	49	33***	27***	20***	24***	22	18	7***	6***	11**
Day 1-14 (% difference from control)	-	-33	-45	-59	-51	-	-18	-68	-73	-50
Food consumption										
Day 1 (g/animal/day)	23.7	21.3	16.3*	14.9**	19.6	18.7	13.6***	10.8***	8.2***	13.6***
Mean Day 1-14 (g/animal/day)	29.4	26.4	24.8	23.3	24.4	19.9	18.0	16.7	16.1	18.1
Haematology										
White Blood Cells (*10^9/L)	15.50	15.72	14.89	12.81	12.68	11.58	12.40	11.78	13.59	12.27
Lymphocytes (*10^9/L)	12.20	12.70	11.69	10.42	9.63	9.60	10.12	10.16	11.15	10.30
Clinical chemistry										
Alkaline Phosphatase (iu/L)	158	156	172	169	175	104	108	109	119	131***
Triglycerides (mmol/L)	1.69	1.22	0.94	0.85**	0.82**	0.99	0.93	0.66	0.73	0.59
Creatinine (µmol/L)	30	26	27	24***	24***	32	30	28	30	27**
Organ weights										
Brain										
Absolute weight (g)	2.10	2.04	2.05	2.03	2.04	1.93	1.85	1.88	1.89	1.92
% of body weight	0.457	0.466	0.507*	0.533***	0.541***	0.727	0.738	0.767	0.827**	0.824**
Heart										
Absolute weight (g)	1.50	1.42	1.29**	1.21***	1.20***	1.04	0.85***	0.88***	0.79***	0.85***

Nominal Dose (mg/kg/day)	0 (Control)	0.01	0.05	0.21	0.86	0 (Control)	0.01	0.05	0.21	0.86
% of body weight	0.325	0.323	0.318	0.318	0.318	0.393	0.340***	0.358*	0.345**	0.362
Kidney										
Absolute weight (g)	3.17	3.34	3.08	3.16	3.09	2.05	1.94	2.00	1.79**	1.96
% of body weight	0.688	0.759*	0.756*	0.830***	0.814***	0.770	0.775	0.814	0.782	0.836*
Liver										
Absolute weight (g)	17.18	16.22	15.00**	13.77***	13.32***	9.96	9.64	9.52	8.69	8.97
% of body weight	3.722	3.689	3.680	3.614	3.513	3.737	3.837	3.848	3.793	3.821
Lung										
Absolute weight (g)	1.63	1.63	1.54	1.50	1.53	1.33	1.35	1.22	1.27	1.24
% of body weight	0.354	0.372	0.379	0.394*	0.404**	0.499	0.536	0.494	0.556	0.527
Spleen										
Absolute weight (g)	0.81	0.74	0.65***	0.59***	0.63***	0.54	0.49	0.46**	0.48	0.45**
% of body weight	0.176	0.168	0.158	0.156	0.166	0.204	0.198	0.188	0.208	0.194
Testes										
Absolute weight (g)	3.49	3.62	3.38	3.51	3.48	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
% of body weight	0.759	0.829	0.834	0.925***	0.920**	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Histopathology										
Site of treatment/injection[b]										
Injection site 1 (number examined)	10	10	10	10	10	10	10	10	9	10
Myofibre degeneration, panniculus muscle, focal	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1
Inflammatory cell infiltration, subcutaneous, chronic	2	5	3	2	5	1	0	1	2	1
Injection site 2 (number examined)	10	10	10	10	10	10	10	10	9	10
Myofibre degeneration, panniculus muscle, focal	0	0	0	0	0	0	0	2	0	1
Inflammatory cell infiltration, subcutaneous, chronic	0	2	3	1	0	0	1	3	1	2
Injection site 3 (number examined)	10	10	10	10	10	10	10	10	9	10
Myofibre degeneration, panniculus muscle, focal	0	0	1	1	2	0	2	0	0	0
Inflammatory cell infiltration, panniculus muscle, focal	2	1	3	1	4	0	2	1	4*	3

Nominal Dose (mg/kg/day)	**0 (Control)**	**0.01**	**0.05**	**0.21**	**0.86**	**0 (Control)**	**0.01**	**0.05**	**0.21**	**0.86**
Crusting, focal	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
Injection site 4 (number examined)	10	9	10	10	10	10	10	10	9	10
Myofibre degeneration, panniculus muscle, focal	2	0	0	0	1	0	0	0	0	0
Inflammatory cell infiltration, subcutaneous, chronic	3	2	0	2	2	0	4	2	0	1
Crusting, focal	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0

* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, ***$p \leq 0.001$ vs. control (pairwise test)

[a] Accidental death, due to technical error, not related to treatment.

[b] Injection site findings are all considered unrelated to treatment with semaglutide.

N/A Not Applicable

2.6.7.7.D ラットを用いた 13 週間反復皮下投与毒性試験及び 4 週間回復性試験 **Study ID: 206662**

Species/Strain: Rat/Sprague Dawley	**Duration of Dosing:** 13 weeks (preceded by 0-2 weeks dose escalation)	**Location in CTD: 4.2.3.2-6**
Initial Age: Approx. 7 weeks at dosing start	**Duration of Postdose:** 4 weeks	**GLP Compliance:** Yes
Date of First Dose: February 2007	**Method of Administration:** Subcutaneous	
Nominal Dose Levels: 0, 0.01, 0.1 and 0.86 mg/kg/day	**Vehicle/Formulation:** 1.42 mg/mL disodium hydrogen phosphate dihydrate,14.0 mg/mL propylene glycol, 5.5 mg/mL phenol and water for injection, pH 7.4	

Parameters collected: Viability, Clinical Condition, Body Weight, Food Consumption, Water Consumption, Ophthalmoscopy, Haematology, Clinical Chemistry, Urinalysis, Toxicokinetics, Organ Weights, Antibody formation, Macropathology, Histopathology

Special Features: A 0-2 weeks dose escalation phase to ensure tolerability at the target dose levels

No Observed Adverse-Effect Level: 0.86 mg/kg/day.

Brief conclusion: Semaglutide was generally well tolerated, although hunched posture was noted, mainly at the end of the dosing period. Reduced body weight gain was observed and reflected the reduced food consumption. Clinical chemistry changes observed were considered non-adverse, given the minor magnitude of the changes, the possibility that the changes were secondary to the reduced food consumption, and the lack of histopathological correlates. A range of organ weight changes, secondary to the pharmacological effect of semaglutide on bodyweight, were observed and considered non-adverse, also in the absence of any histopathological correlates. In the absence of adverse changes at any dose level, the NOAEL was considered to be the highest dose tested, 0.86 mg/kg/day.

Nominal Dose (mg/kg/day)	**0 (Control)**	**0.01**	**0.1**	**0.86**	**0 (Control)**	**0.01**	**0.1**	**0.86**
Initial Number of Animals								
Main	**M: 10**	**M: 10**	**M: 10**	**M: 10**	**F: 10**	**F: 10**	**F: 10**	**F: 10**
Recovery	**M: 6**	**M: 6**	**M: 6**	**M: 6**	**F: 6**	**F: 6**	**F: 6**	**F: 6**
Toxicokinetics ($AUC_{0\text{-}24h}$ (nmol*h/L))								
Day 1	N/A	NC	1120	8570	N/A	NR	1450	9860
Week 13	N/A	68.4	1120	9310	N/A	78.1	1290	9490
Noteworthy Findings								
Clinical signs[a]								
Hunched posture	0	0	0	3	0	0	0	5

Nominal Dose (mg/kg/day)	**0 (Control)**	**0.01**	**0.1**	**0.86**	**0 (Control)**	**0.01**	**0.1**	**0.86**
Initial Number of Animals **Main** **Recovery**	**M: 10** **M: 6**	**M: 10** **M: 6**	**M: 10** **M: 6**	**M: 10** **M: 6**	**F: 10** **F: 6**	**F: 10** **F: 6**	**F: 10** **F: 6**	**F: 10** **F: 6**
Body weight (main and recovery animals)								
Terminal body weight at Dosing period (g)	529	505	456**	419***	291	275	260**	242**
Terminal body weight at Recovery period (g)	524	581	569	534	300	280	283	300
Body weight gain (main and recovery animals)								
Day 1-Week 13 (g)	193	153*	112***	108***	66	56	42***	33***
Day 1-Week 13 (% difference from control)	-	-21	-42	-44	-	-15	-36	-50
Recovery period, R1-R4 (g)	27	48	88***	108***	5	11	23***	40***
Recovery period, R1-R4 (% difference from control)	-	+78	+226	+300	-	+120	+360	+700
Food consumption (main and recovery animals)[b]								
Week 1 (g/animal)	26.0	23.5*	18.1***	19.3***	18.5	16.5*	12.6***	12.9***
Mean Week 1-13 (g/animal/week)	26.5	25.3	24.0	23.2	18.0	17.6	16.7	15.6
Clinical chemistry								
Creatinine (µmol/L)								
Week 13	38	36	33*	33*	41	39	34	38
Week R4	30	33	30	30	38	38	38	36
Potassium (mmol/L)								
Week 13	4.8	4.5	4.2***	4.3**	4.1	4.1	4.1	4.0
Week R4	4.8	4.6	4.9	4.7	4.0	4.0	3.9	4.1
Triglycerides (mmol/L)								
Week 13	1.60	1.06**	0.84***	0.86***	1.35	0.96	0.63***	0.57***
Week R4	1.58	1.83	2.23	1.80	1.23	0.80	0.75	0.93
Total protein (g/L)								
Week 13	71	72	69	68	76	72	70*	69*
Week R4	69	69	67	68	74	77	78	75
Organ Weights (main study animals)[c]								
Adrenal glands								

Nominal Dose (mg/kg/day)	**0 (Control)**	**0.01**	**0.1**	**0.86**	**0 (Control)**	**0.01**	**0.1**	**0.86**
Initial Number of Animals **Main** **Recovery**	**M: 10** **M: 6**	**M: 10** **M: 6**	**M: 10** **M: 6**	**M: 10** **M: 6**	**F: 10** **F: 6**	**F: 10** **F: 6**	**F: 10** **F: 6**	**F: 10** **F: 6**
Absolute weight (g)	0.0547#	0.0526	0.0482	0.0450	0.0595	0.0601	0.0641	0.0592
% of body weight	0.01003	0.01093	0.01119	0.01097	0.02069	0.02192	0.02517**	0.02560**
Brain								
Absolute weight (g)	2.19	2.11	2.11	2.09	1.90	1.93	1.91	1.86
% of body weight	0.406	0.439	0.488***	0.516***	0.666	0.712	0.758*	0.828***
Epididymides								
Absolute weight (g)	1.3117	1.3786	1.2863	1.2369	N/A	N/A	N/A	N/A
% of body weight	0.24287	0.28807*	0.29876**	0.30401**	N/A	N/A	N/A	N/A
Heart								
Absolute weight (g)	1.70	1.44**	1.41***	1.36***	1.08	0.94*	0.84***	0.82***
% of body weight	0.314	0.301	0.324	0.335	0.377	0.346	0.333*	0.359
Kidneys								
Absolute weight (g)	3.59	3.43	3.14	3.10	1.83	2.03	1.93	1.79
% of body weight	0.664	0.707	0.723	0.755**	0.638	0.744***	0.760***	0.788***
Liver								
Absolute weight (g)	22.55	17.90***	15.36***	14.76***	10.23	9.89	8.95	7.89**
% of body weight	4.147	3.701***	3.512***	3.590***	3.557	3.636	3.511	3.465
Lungs								
Absolute weight (g)	1.75	1.74	1.61	1.62	1.25	1.26	1.26	1.17
% of body weight	0.323	0.361	0.379*	0.399***	0.441	0.461	0.491*	0.517***
Ovaries								
Absolute weight (g)	N/A	N/A	N/A	N/A	0.086#	0.084	0.092	0.071
% of body weight	N/A	N/A	N/A	N/A	0.0293	0.0308	0.0362	0.0314
Pituitary gland								
Absolute weight (g)	0.013	0.011*	0.010*	0.010**	0.013	0.014	0.013	0.012
% of body weight	0.0025	0.0022	0.0024	0.0024	0.0046	0.0051	0.0050	0.0055
Prostate								

Nominal Dose (mg/kg/day)	**0 (Control)**	**0.01**	**0.1**	**0.86**	**0 (Control)**	**0.01**	**0.1**	**0.86**
Initial Number of Animals **Main** **Recovery**	**M: 10** **M: 6**	**M: 10** **M: 6**	**M: 10** **M: 6**	**M: 10** **M: 6**	**F: 10** **F: 6**	**F: 10** **F: 6**	**F: 10** **F: 6**	**F: 10** **F: 6**
Absolute weight (g)	0.725	0.656	0.614	0.688	N/A	N/A	N/A	N/A
% of body weight	0.1336#	0.1376	0.1410	0.1690	N/A	N/A	N/A	N/A

Nominal Dose (mg/kg/day)	**0 (Control)**	**0.01**	**0.1**	**0.86**	**0 (Control)**	**0.01**	**0.1**	**0.86**
Initial Number of Animals **Main** **Recovery**	**M: 10** **M: 6**	**M: 10** **M: 6**	**M: 10** **M: 6**	**M: 10** **M: 6**	**F: 10** **F: 6**	**F: 10** **F: 6**	**F: 10** **F: 6**	**F: 10** **F: 6**
Spleen								
Absolute weight (g)	0.83	0.72	0.62**	0.61***	0.50#	0.52	0.47	0.43
% of body weight	0.153	0.149	0.143	0.149	0.176	0.191	0.185	0.189
Salivary glands								
Absolute weight (g)	0.7139	0.6630	0.6065**	0.6034**	0.4472	0.4502	0.4207	0.4026
% of body weight	0.13184#	0.13820	0.13996	0.14834	0.15704#	0.16631	0.16542	0.17800
Testes								
Absolute weight (g)	3.50	3.55	3.60	3.33	N/A	N/A	N/A	N/A
% of body weight	0.650	0.740	0.835***	0.818***	N/A	N/A	N/A	N/A
Thyroid gland								
Absolute weight (g)	0.0230#	0.0218	0.0206	0.0181	0.0173	0.0237*	0.0126	0.0143
% of body weight	0.00423	0.00453	0.00488	0.00441	0.00603	0.00864**	0.00501	0.00629
Uterus								
Absolute weight (g)	N/A	N/A	N/A	N/A	0.66	0.79	0.68	0.84
% of body weight	N/A	N/A	N/A	N/A	0.233	0.287	0.269	0.379**
Histopathology (main study animals**)**								
Site of treatment/injection[d]								
Injection/treatment site (number examined)	10	0	0	10	10	0	0	10
Muscle necrosis, focal	0	N/A	N/A	0	0	N/A	N/A	1
Dermatitis, ulcerative, focal	0	N/A	N/A	0	0	N/A	N/A	1
Inflammatory cell infiltration	5	N/A	N/A	3	4	N/A	N/A	4
Haemorrhage	0	N/A	N/A	2	1	N/A	N/A	1

* $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$ vs. control ; (pairwise test)

# $p<0.05$, linear dose response test, no pairwise test

NC Not calculable; NR Not reported; N/A Not applicable

[a] Number of animals with clinical sign

[b] Individual cage food consumption data for the recovery period showed a trend towards an increase in food consumption, especially during the first couple of weeks of the recovery period, in animals previously dosed with semaglutide at 0.1 and 0.86 mg/kg/day

[c] After the 4-week recovery period, no notable differences were observed between controls and groups previously treated with semaglutide, demonstrating that full or partial recovery from the effects of semaglutide on organ weights had occurred (data not shown).
[d] Injection site findings are all considered unrelated to treatment with semaglutide.

2.6.7.7.E ラットを用いた 26 週間反復皮下投与毒性試験及び 4 週間回復性試験 **Study ID: 207377**

Species/Strain: Rat/Sprague Dawley	**Duration of Dosing:** 26 weeks (preceded by 2 weeks dose escalation)	**Location in CTD: 4.2.3.2-7**
Initial Age: 47 to 54 days at dosing start	**Duration of Post-dose:** 4 weeks	
Date of First Dose: 2 June 2008	**Method of Administration:** Subcutaneous	**GLP Compliance:** Yes
Nominal Dose Levels: 0, 0.03, 0.13 and 0.6 mg/kg/day	**Vehicle/Formulation:** 1.42 mg/mL disodium hydrogen phosphate dihydrate,14.0 mg/mL propylene glycol, 5.5 mg/mL phenol and water for injection, pH 7.4	

Parameters collected: Viability, Clinical Condition, Body Weight, Food Consumption, Ophthalmoscopy, Haematology, Clinical Chemistry, Urinalysis, Toxicokinetics, Antibody Formation, Organ Weights, Macropathology, and Histopathology

Special Features: A 2 weeks dose escalation phase to ensure tolerability at the target dose levels

No Observed Adverse Effect Level: 0.6 mg/kg/day

Brief Conclusion: Semaglutide was generally well tolerated, although a few treated animals were reported to be thin. Reduced body weight gain was observed at all dose levels and generally reflected the reduced food consumption. A range of clinical pathology changes were observed, but due to the small magnitude, the possibility that some of the changes were secondary to the reduced food consumption, and/or the lack of adverse histopathological correlates, these were considered non-adverse. Several urinary parameters were affected by treatment. Some of the changes were likely to be due to the inhibitory effects of GLP-1 receptor agonists on sodium reabsorption from the proximal tubules, whereas the decreased protein levels could be secondary to the reduced food consumption. In the absence of any treatment related histopathological changes in the kidneys, all changes in urinary parameters were considered non-adverse. Almost all organ weights were affected by treatment but in most cases this was secondary to the effect on body weight. In the absence of any histopathological correlates, except in the liver, the organ weight changes were considered to be non-adverse. In the liver, a correlating histopathology finding of decreased hepatocyte rarefaction was suggestive of reduced deposition of hepatocytic glycogen, most likely due to the reduced food consumption, and was considered non-adverse. Minimal hypertrophy of Brunner's glands in the duodenum was observed in all groups and was considered to be due to activation of the GLP-1 receptor. Since the finding in the Brunner's glands was not associated with inflammation or cellular damage neither in the Brunner's glands nor in the intestinal mucosa and as full recovery occurred, the finding was not considered to be adverse. In the absence of any adverse changes, the NOAEL was considered to be the highest dose tested, 0.6 mg/kg/day.

Nominal Dose (mg/kg/day)	**0 (Control)**	**0.03**	**0.13**	**0.6**	**0 (Control)**	**0.03**	**0.13**	**0.6**
Initial Number of Animals								
Main	M: 20	M: 20	M: 20	M: 20	F: 20	F: 20	F: 20	F: 20
Satellite	M: 5	M: 5	M: 5	M: 5	F: 5	F: 5	F: 5	F: 5
Toxicokinetics (AUC_{0-24h} (nmol*h/L)								
Day 1[a]	N/A	325	1680	6480	N/A	115[b]	1890	11300
Week 26	N/A	815	4090	17700	N/A	989	3620	18500
Noteworthy Findings								
Died or euthanised/terminated prematurely	1	1[e]	0	0	0	0	0	0
Clinical signs[c]								
Thin build	0	1	1	1	0	1	5	3
Bodyweight (main and recovery animals)								
Terminal body weight at Dosing period (g)	657	577	536	517	332	291	276	272
Terminal body weight at Recovery period (g)	652	655	634	625	331	307	299	323
Bodyweight gain (main and recovery animals)								
Day 1- Week 26(g)	328	269***	244***	229***	117	77***	73***	65***
Day 1- Week 26(% difference from control)	-	-18	-26	-30	-	-34	-38	-44
Recovery period, Day 1 of recovery- Week R4(g)	21	51*	87*	84*	5	27*	35*	44*
Recovery period, Day 1 of recovery- Week R4(% difference from control)	-	+143	+314	+300	-	+440	+600	+780
Food consumption (main and recovery animals)								
Week 1 (g/animal/week)	202	201	186	164	139	131	122	112
Mean Week -2-26 (g/animal/day)	200	198	190	185	136	131	129	125
Recovery, Mean Week R1-R4 (g/animal/day)	196	222	233	225	140	137	143	159
Haematology (main study animals)								
Haematocrit (L/L)								
Week 14	0.446	0.442	0.446	0.453	0.406	0.418	0.420*	0.415
Week 26	0.438	0.423*	0.432	0.444	0.407	0.423**	0.425**	0.415
Week R4	0.425	0.433	0.435	0.421	0.388	0.397	0.416	0.403

Nominal Dose (mg/kg/day)	**0 (Control)**	**0.03**	**0.13**	**0.6**	**0 (Control)**	**0.03**	**0.13**	**0.6**
Initial Number of Animals								
Main	M: 20	M: 20	M: 20	M: 20	F: 20	F: 20	F: 20	F: 20
Satellite	M: 5	M: 5	M: 5	M: 5	F: 5	F: 5	F: 5	F: 5
Haemoglobin (g/dL)								
Week 14	15.3	15.2	15.3	15.5	14.6	15.1*	15.2**	15.1*
Week 26	15.2	14.8	15.0	15.4	14.3	14.7	14.8*	14.7
Week R4	14.7	15.1	15.3	15.0	14.2	14.3	14.9	14.7
Red Blood Cells (*10^{12}/L)								
Week 14	8.53	8.58	8.44	8.64	7.60	7.87*	7.92*	7.97**
Week 26	8.59	8.33	8.27	8.58	7.61	7.88	7.87	7.87
Week R4	8.96	8.60	8.37*	8.23**	7.22	7.28	7.75*	7.50
Reticulocyte count (%)								
Week 14	2.35	1.94*	1.99*	1.99*	2.25	1.88	2.05	1.90
Week 26	2.15	1.87	1.79*	1.79*	1.87	1.67	1.56*	1.58*
Week R4	2.20	2.04	2.04	2.18	1.55	1.61	1.46	1.50
Activated partial thromboplastin time (sec)								
Week 26	17.3	18.3	18.3	19.1	14.2	16.8**	16.9**	17.2**
Week R4	14.1	17.8	15.5	17.6	17.2	15.7	16.1	15.3
Clinical chemistry								
Alkaline phosphatase (U/L)								
Week 14	71.1	80.1	91.2***	89.6***	47.0	57.3	53.9	55.6
Week 26	62.0	63.5	68.2	69.5	26.8	38.9***	32.9	37.3**
Week R4	75.8	57.0	59.4	53.8	24.4	27.6	26.4	31.4
Urea (mmol/L)								
Week 26	4.87	5.38	5.71**	5.74**	5.89	5.47	6.02	5.69
Week R4	4.30	5.31	5.23	5.27	5.77	6.68	5.85	6.49
Creatinine (µmol/L)								
Week 14	34.6	35.3	32.2	32.2	42.0	37.7**	37.5**	34.1***
Week 26	45.8	41.8**	47.5	48.2	47.7	46.1	48.4	44.3*

Nominal Dose (mg/kg/day)	0 (Control)	0.03	0.13	0.6	0 (Control)	0.03	0.13	0.6
Initial Number of Animals								
Main	M: 20	M: 20	M: 20	M: 20	F: 20	F: 20	F: 20	F: 20
Satellite	M: 5	M: 5	M: 5	M: 5	F: 5	F: 5	F: 5	F: 5
Triglycerides (mmol/L)								
Week 14	0.790	0.428***	0.379***	0.298***	0.773	0.500***	0.490***	0.464***
Week 26	1.095	0.591***	0.541***	0.470***	0.905	0.526***	0.515***	0.446***
Week R4	1.14	1.01	1.21	1.20	1.04	0.75	0.97	0.83
Total protein (g/L)								
Week 14	69.7	68.4	68.5	66.6**	75.0	72.0*	71.7**	70.7***
Week 26	68.7	68.3	69.5	69.4	76.6	73.7*	73.7*	72.4**
Week R4	72.5	71.4	71.0	70.0	77.8	74.2	74.4	75.4
Albumin (g/L)								
Week 14	31.3	31.0	31.4	30.2**	38.7	35.5**	34.7***	35.3***
Week 26	30.2	30.3	30.6	30.5	40.1	38.4	37.3**	36.6***
Week R4	31.3	29.8	30.8	30.0	41.2	39.0	40.0	39.2
α1 globulin (g/L)								
Week 14	13.0	12.2	11.4**	11.5**	11.5	11.3	11.5	10.8
Week 26	13.2	12.8	12.3	12.9	11.8	10.8*	10.9*	10.4***
Week R4	13.3	14.6	13.4	14.2	12.4	11.2	10.8	12.0
Urinalysis								
Volume (mL)								
Week 25	8.79	11.66**	9.43	10.89*	4.22	5.71*	5.55	6.19**
Week R3	9.75	9.50	7.96	10.10	4.72	3.48	5.10	3.98
Protein (g/L)								
Week 12	0.851	0.737	0.704*	0.634***	0.202	0.165	0.150**	0.137***
Week 25	0.878	0.676**	0.752	0.659***	0.279	0.151*	0.149*	0.143**
Week R3	0.988	1.182	1.262	1.030	0.138	0.158	0.138	0.160
Sodium (mmol/L)								
Week 12	68.9	78.1	75.3	88.9***	68.2	82.2	88.9*	83.9
Week 25	64.6	64.1	55.0	72.3	51.3	80.9***	75.0**	78.8**
Week R3	69.0	63.6	89.8	62.8	42.8	60.2	44.6	65.0

Nominal Dose (mg/kg/day)	**0 (Control)**	**0.03**	**0.13**	**0.6**	**0 (Control)**	**0.03**	**0.13**	**0.6**
Initial Number of Animals								
Main	M: 20	M: 20	M: 20	M: 20	F: 20	F: 20	F: 20	F: 20
Satellite	M: 5	M: 5	M: 5	M: 5	F: 5	F: 5	F: 5	F: 5
Potassium (mmol/L)								
Week 12	162	132*	135*	121***	163	123***	120***	127**
Week 25	156	111***	142	124	200	154*	140**	140**
Week R3	140	161	184	173	156	185	155	194
Organ Weights (main study animals)[d]								
Adrenal glands								
Absolute weight (g)	0.054	0.052	0.050	0.049	0.06	0.059	0.060	0.054
% of body weight	0.0081	0.0091*	0.0095**	0.0095**	0.0185	0.0202	0.0218***	0.0206*
Brain								
Absolute weight (g)	2.340	2.250**	2.292	2.265*	2.042	2.064	2.039	2.032
% of body weight	0.356	0.399**	0.432***	0.445***	0.632	0.712***	0.747***	0.775***
Epididymides								
Absolute weight (g)	1.481	1.345***	1.327***	1.309***	N/A	N/A	N/A	N/A
% of body weight	0.225	0.239	0.250*	0.257***	N/A	N/A	N/A	N/A
Heart								
Absolute weight (g)	1.819	1.496***	1.452***	1.414***	1.057	0.915***	0.906***	0.868***
% of body weight	0.276	0.264	0.272	0.276	0.324	0.314	0.330	0.330
Kidneys								
Absolute weight (g)	3.780	3.431*	3.411*	3.362*	1.957	1.968	1.926	1.859
% of body weight	0.572	0.603	0.636**	0.656***	0.600	0.675***	0.703***	0.706***
Liver								
Absolute weight (g)	24.500	17.367***	16.929***	16.333***	11.417	10.418	9.755**	9.131***
% of body weight	3.67	3.04**	3.16*	3.17*	3.49	3.58	3.56	3.47
Liver, end of recovery period								
Absolute weight (g)	26.041	18.870**	20.963*	19.523**	11.340	9.371*	9.516	11.138
% of body weight	4.07	2.90***	3.33*	3.15**	3.47	3.10	3.21	3.47

Nominal Dose (mg/kg/day)	**0 (Control)**	**0.03**	**0.13**	**0.6**	**0 (Control)**	**0.03**	**0.13**	**0.6**
Initial Number of Animals								
Main	M: 20	M: 20	M: 20	M: 20	F: 20	F: 20	F: 20	F: 20
Satellite	M: 5	M: 5	M: 5	M: 5	F: 5	F: 5	F: 5	F: 5
Lungs and bronchi								
Absolute weight (g)	2.239	2.004**	1.938***	1.914***	1.438	1.441	1.396	1.448
% of body weight	0.337	0.357	0.364*	0.373**	0.449	0.495**	0.510***	0.551***
Pituitary								
Absolute weight (g)	0.015	0.013	0.013	0.013	0.020	0.018	0.018	0.017
% of body weight	0.0022	0.0023	0.0025*	0.0026**	0.0061	0.0062	0.0066	0.0064
Prostate								
Absolute weight (g)	1.270	1.127	1.162	1.025**	N/A	N/A	N/A	N/A
% of body weight	0.194	0.200	0.217	0.201	N/A	N/A	N/A	N/A
Salivary glands								
Absolute weight (g)	0.750	0.657**	0.647**	0.623***	0.444	0.410	0.388**	0.378***
% of body weight	0.114	0.116	0.122	0.122	0.137	0.141	0.141	0.143
Seminal vesicles								
Absolute weight (g)	2.301	2.028*	2.057	2.037*	N/A	N/A	N/A	N/A
% of body weight	0.350	0.362	0.387	0.397	N/A	N/A	N/A	N/A
Spleen								
Absolute weight (g)	1.039	0.809***	0.841***	0.823***	0.525	0.469*	0.455*	0.452**
% of body weight	0.157	0.142*	0.157	0.160	0.161	0.161	0.166	0.172
Testes								
Absolute weight (g)	4.022	3.915	3.863	3.782	N/A	N/A	N/A	N/A
% of body weight	0.612	0.691**	0.728***	0.741***	N/A	N/A	N/A	N/A
Thymus								
Absolute weight (g)	0.162	0.147	0.116**	0.120**	0.141	0.126	0.109**	0.123
% of body weight	0.0248	0.0258	0.0220	0.0236	0.0435	0.0433	0.0398	0.0464
Uterus and cervix								
Absolute weight (g)	N/A	N/A	N/A	N/A	0.882	0.902	1.001	1.129
% of body weight	N/A	N/A	N/A	N/A	0.270	0.314	0.368	0.432**

Nominal Dose (mg/kg/day)	**0 (Control)**	**0.03**	**0.13**	**0.6**	**0 (Control)**	**0.03**	**0.13**	**0.6**
Initial Number of Animals								
Main	M: 20	M: 20	M: 20	M: 20	F: 20	F: 20	F: 20	F: 20
Satellite	M: 5	M: 5	M: 5	M: 5	F: 5	F: 5	F: 5	F: 5
Macropathology (number examined)[d]	20	19	20	20	20	20	20	20
Thin appearance	0	0	0	0	0	0	2	2
Histopathology								
Liver, main study (number examined)	20	19	20	20	20	20	20	20
Hepatocyte rarefaction, minimal	12	6	4	5	7	8	7	4
Hepatocyte rarefaction, slight	5	0	2	1	1	1	1	1
Hepatocyte rarefaction, total	17	6	6	6	8	9	8	5
Liver, recovery study (number examined)	4	5	5	5	5	5	5	5
Hepatocyte rarefaction, minimal	4	1	3	4	1	1	2	2
Duodenum, main study (number with Brunner's glands examined)	17	19	20	18	18	20	20	18
Hypertrophy of Brunner's glands, minimal	0	19	20	18	0	20	20	18
Duodenum, recovery study (number with Brunner's glands examined)	4	4	5	4	5	5	5	5
Hypertrophy of Brunner's glands, minimal	0	0	0	0	0	0	0	0
Injection/treatment site, main study[f]								
Left upper flank (number examined)	20	1	0	20	20	7	10	20
Epidermis-Hyperplasia	0	0	N/A	0	0	0	1	0
Panniculus Muscle-Degeneration	0	0	N/A	0	1	2	3	1
Panniculus Muscle-Inflammatory Cells	0	0	N/A	0	3	3	3	3
Scab(s)	0	0	N/A	0	0	0	1	0
Subcutis-Haemorrhage	0	0	N/A	0	4	2	1	1
Subcutis-Inflammatory Cells	1	0	N/A	1	2	2	2	2
Right upper flank (number examined)	20	2	1	20	20	6	4	20
Panniculus Muscle-Degeneration	0	0	0	0	2	0	2	1
Panniculus Muscle-Inflammatory Cells	0	0	0	0	3	0	3	1

Nominal Dose (mg/kg/day)	0 (Control)	0.03	0.13	0.6	0 (Control)	0.03	0.13	0.6
Initial Number of Animals								
Main	M: 20	M: 20	M: 20	M: 20	F: 20	F: 20	F: 20	F: 20
Satellite	M: 5	M: 5	M: 5	M: 5	F: 5	F: 5	F: 5	F: 5
Subcutis-Haemorrhage	0	1	0	0	1	3	1	1
Subcutis-Inflammatory Cells	1	0	0	0	0	1	0	0
Left lower flank (number examined)	20	4	1	20	20	3	2	20
Epidermis-Hyperkeratosis	1	0	0	0	0	0	0	0
Epidermis-Ulceration	0	0	0	0	0	0	0	1
Necrotic Needle Tract with Neovascularization	0	0	0	1	0	0	0	0
Panniculus Muscle-Degeneration	0	0	0	0	2	1	0	0
Panniculus Muscle-Inflammatory Cells	0	0	0	0	2	1	0	0
Scab(s)	0	0	0	0	0	0	0	1
Subcutis-Haemorrhage	1	3	0	2	1	1	2	0
Subcutis-Inflammatory Cells	0	0	0	1	0	1	1	0
Right lower flank (number examined)	20	4	3	20	20	0	2	20
Epidermis-Ulceration	0	0	0	0	1	0	0	0
Panniculus Muscle-Degeneration	2	3	0	0	2	0	0	0
Panniculus Muscle-Inflammatory Cells	3	2	0	0	2	0	0	0
Subcutis-Fibrosis	0	0	1	0	0	0	0	0
Subcutis-Haemorrhage	4	4	1	1	1	0	1	0
Subcutis-Inflammatory Cells	3	3	0	0	1	0	1	0

N/A: Not applicable. * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$ vs. control ; (pairwise test))

[a] On the first day at the target dose level for the low and intermediate dose groups i.e. on Day -14 and -7, respectively.

[b] $AUC_{0\text{-}12h}$ as no. quantifiable concentration of semaglutide beyond this time point.

[c] Number of animals with clinical sign

[d] After the 4-week recovery period, no notable differences, except for liver weights in males, were observed between controls and groups previously treated with semaglutide, demonstrating that full or partial recovery from the effects of semaglutide had occurred (data not shown), except from the effects on liver weights in males (recovery liver weights shown).

[e] One low dose male died prematurely in Week 15 due to a lymphoma. As this was an isolated finding and due to the distribution in the low dose group, the lymphoma was not considered treatment related
[f] Injection site findings are all considered unrelated to treatment with semaglutide.

2.6.7.7.F カニクイザルを用いた２週間反復皮下投与毒性試験 **Study ID: 206449**

Species/Strain: Cynomolgus monkey	**Duration of Dosing:** 2 weeks (preceded by 0-3 weeks dose escalation)	**Location in CTD: 4.2.3.2-9**
Initial Age: 17-25 months at dosing start	**Duration of Postdose:** None	**GLP Compliance:** Yes
Date of First Dose: 30 October 2006	**Method of Administration:** Subcutaneous	
Nominal Dose Levels: 0, 0.01, 0.06, 0.21 and 0.75 mg/kg twice-weekly	**Vehicle/Formulation:** 1.42 mg/mL disodium hydrogen phosphate dihydrate,14.0 mg/mL propylene glycol, 5.5 mg/mL phenol and water for injection, pH 7.4	

Parameters collected: Viability, Clinical Condition, Body Weight, Ophthalmoscopy, Electrocardiography, Haematology, Clinical Chemistry, Urinalysis, Toxicokinetics, Organ Weights, Macropathology, Histopathology

Special Features: A 0-3 weeks dose escalation phase to ensure tolerability at the target dose levels

No Observed Adverse-Effect Level: 0.75 mg/kg twice-weekly

Brief conclusion: The tested doses of semaglutide were well tolerated and there was no effect on body weight. Decreased creatine phosphokinase activities (CPK) in males were considered of uncertain relationship to treatment and, in the absence of any correlating changes, non-adverse. Changes in the urinary parameters were considered to be of uncertain relationship to treatment and non-adverse in the absence of any correlating changes. In the absence of adverse changes at any dose level, the NOAEL was considered to be the highest dose tested, 0.75 mg/kg twice-weekly.

Nominal Dose (mg/kg twice-weekly)	**0 (Control)**	**0.01**	**0.06**	**0.21**	**0.75**	**0 (Control)**	**0.01**	**0.06**	**0.21**	**0.75**
Number of Animals	**M: 3**	**M: 3**	**M:3**	**M: 3**	**M: 3**	**F: 3**	**F:3**	**F: 3**	**F: 3**	**F: 3**
Toxicokinetics (AUC_{0-72h} (nmol*h/L))										
Day 1	**N/A**	692	5933	17686	87383	N/A	629	5411	16584	70826
Day 11	**N/A**	853	8238	27550	90070	N/A	751	7705	23395	90984
Noteworthy Findings										
Clinical Chemistry										
Creatine phosphokinase (IU/L)										
Pre-treatment	243	210	418	94	176	234	254	161	127	109
Week 2	1320	793**	698**	589***	673**	985	1108	1168	719	1172

Nominal Dose (mg/kg twice-weekly)	**0 (Control)**	**0.01**	**0.06**	**0.21**	**0.75**	**0 (Control)**	**0.01**	**0.06**	**0.21**	**0.75**
Number of Animals	**M: 3**	**M: 3**	**M:3**	**M: 3**	**M: 3**	**F: 3**	**F:3**	**F: 3**	**F: 3**	**F: 3**
Urinalysis										
Volume (mL)										
Pre-treatment	78.5	57.3	52.1	77.9	65.4	57.2	63.0	58.1	78.0	50.1
Week 2	85.7	49.1	37.0*	43.7	20.9**	35.5	30.7	45.4	23.5	31.9
Sodium (mmol/L)										
Pre-treatment	41.3	44.0	62.7	48.0	43.0	43.3	55.0	55.7	46.0	46.7
Week 2	29.3	22.0	30.0	40.0	31.3	53.7#	29.7	34.7	22.3	15.3
Potassium (mmol/L)										
Pre-treatment	34.23	47.27	41.57	39.70	40.57	39.20	44.47	31.47	32.43	38.07
Week 2	35.40	31.20	36.97	46.60	32.73	64.77	48.97	33.57	44.87	22.27
Chloride (mmol/L)										
Pre-treatment	31.7	29.3	50.3	42.3	35.0	26.3	37.0	34.3	34.7	33.3
Week 2	10.3	16.0	14.7	22.0	20.3	20.7	15.7	12.0	18.3	8.3
Histopathology										
Site of treatment/injection[a]										
Injection/treatment site (number examined)	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
Fasciitis, fibrotic, localised	1	0	3	0	2	0	1	0	1	1
Fasciitis, haemorrhagic, localised	1	2	0	0	0	1	0	0	1	1
Fasciitis, localised	1	1	0	3	1	1	1	1	1	1

* $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$ vs. control ; (pairwise test)

# $p<0.05$, linear dose response test, no pairwise test[a] Injection site findings are all considered unrelated to treatment with semaglutide.

2.6.7.7.G カニクイザルを用いた 13 週間反復皮下投与毒性試験及び 4 週間回復性試験 **Study ID: 206450**

Species/Strain: Cynomolgus monkey	**Duration of Dosing:** 13 weeks (preceded by 0-2 weeks dose escalation)	**Location in CTD: 4.2.3.2-10**
Initial Age: 15-26 months at dosing start	**Duration of Postdose:** 4 weeks	**GLP Compliance:** Yes
Date of First Dose: 29 January 2007	**Method of Administration:** Subcutaneous injection	
Nominal Dose Levels: 0, 0.01, 0.1 and 1.0/0.5 mg/kg twice-weekly	**Vehicle/Formulation:** 1.42 mg/mL disodium hydrogen phosphate dihydrate,14.0 mg/mL propylene glycol, 5.5 mg/mL phenol and water for injection, pH 7.4	

Parameters collected: Viability, Clinical Condition, Body Weight, Ophthalmoscopy, Electrocardiography, Haematology, Clinical Chemistry, Urinalysis, Toxicokinetics, Antibody Formation, Organ Weights, Macropathology, Histopathology

Special Features: A 0-2 weeks dose escalation phase to ensure tolerability at the target dose levels.

No Observed Adverse-Effect Level: 0.1 mg/kg twice-weekly

Brief conclusion: Poor food consumption and body weight loss, and associated persistent dehydration with low urinary output, lead to the premature euthanasia of two high dose females after unsuccessful suspension of dosing, treatment with supportive fluids and electrolytes supplements, and lowering of the high dose level from 1.0 to 0.5 mg/kg twice-weekly. During the initial weeks of dosing, there was a clear negative effect on body weight but at the end of the dosing period, there was generally only effect on body weight in females. Clinical chemistry changes were considered non-adverse due to their small magnitude and the likelihood that they were secondary to the pharmacological effect of semaglutide on food consumption. Effects on urinary parameters were likely to be secondary to the observed dehydration and were not considered adverse in the absence of any related histopathological changes. A range of organ weight changes were observed. In the absence of any treatment related histopathological changes in these organs or any other correlating changes, these changes were considered non-adverse. In the absence of any adverse changes at other dose levels than the high dose, the intermediate dose level, 0.1 mg/kg twice-weekly, was considered to be the NOAEL.

Nominal Dose (mg/kg twice-weekly)	**0 (Control)**	**0.01**	**0.1**	**1.0/0.5[##]**	**0 (Control)**	**0.01**	**0.1**	**1.0/0.5[##]**
Initial Number of Animals								
Main	**M: 4**	**M: 4**	**M: 4**	**M: 4**	**F: 4**	**F: 4**	**F: 4**	**F: 4**
Recovery[1]	**M: 2**	**M: 2**	**M: 2**	**M: 2**	**F: 2**	**F: 2**	**F: 2**	**F: 2**
Toxicokinetics ($AUC_{0\text{-}72h}$ (nmol*h/L))								
Day 1	**N/A**	618	8370	80100	N/A	586	8370	95900
Week 13	**N/A**	821	12800	61600	N/A	785	12500	68400

Nominal Dose (mg/kg twice-weekly)	**0 (Control)**	**0.01**	**0.1**	**1.0/0.5[##]**	**0 (Control)**	**0.01**	**0.1**	**1.0/0.5[##]**
Initial Number of Animals								
Main	**M: 4**	**M: 4**	**M: 4**	**M: 4**	**F: 4**	**F: 4**	**F: 4**	**F: 4**
Recovery[l]	**M: 2**	**M: 2**	**M: 2**	**M: 2**	**F: 2**	**F: 2**	**F: 2**	**F: 2**
Noteworthy Findings								
Died or euthanised/terminated prematurely	0	0	0	0	0	0	0	2
Clinical signs[a]								
Dehydration	0	0	0	2	0	1[b]	2	4
Thin	0	0	0	0	0	0	0	3
Bodyweight (main and recovery animals)								
Terminal body weight (kg)	2.5	2.6	2.3	2.4	2.3	2.4	2.1**	2.1**
Bodyweight gain (main and recovery animals)								
Day 1- Week 13(kg)	0.2	0.2	0.2	0.3	0.2	0.1	0.1**	0.1
Day 1- Week 13(% difference from control)	-	0	0	+50	-	-50	-50	-50
Clinical chemistry (main study animals)								
Urea (mmol/L)								
Pre-treatment	8.9	8.8	8.6	8.7	8.8	10.4	9.1	10.3
Week 6	8.5	6.8**	7.7	6.7**	8.8	7.4	6.8*	6.3**
Week 13	9.7	7.7	10.0	9.0	9.0	8.4	8.0	8.4
Sodium (mmol/L)[c]								
Pre-treatment	154	153	152	153	152	153	153	153
Week 6	154	155	153	153	154	155	154	153
Week 13	146	149*	148	150**	147	151	149	147
Chloride (mmol/L)[d]								
Pre-treatment	108	107	105	108	106	108	106	107
Week 6	105	107	105	106	107	106	106	106
Week 13	104	106	108**	109***	105	108	107	105
Urinalysis (main study animals)								

Nominal Dose (mg/kg twice-weekly)	0 (Control)	0.01	0.1	1.0/0.5[##]	0 (Control)	0.01	0.1	1.0/0.5[##]
Initial Number of Animals								
Main	**M: 4**	**M: 4**	**M: 4**	**M: 4**	**F: 4**	**F: 4**	**F: 4**	**F: 4**
Recovery[l]	**M: 2**	**M: 2**	**M: 2**	**M: 2**	**F: 2**	**F: 2**	**F: 2**	**F: 2**
Urinary volume (mL)								
Pre-treatment	25.8	43.9	35.2	16.8	29.6	53.8	67.2	53.3
Week 6	86.5	120.5	111.5	32.0	51.1	76.3	92.3**	7.7**
Week 13	47.3	42.8	52.3	66.4	55.1	73.7	72.9	95.3
Potassium (mmol/L)[f]								
Pre-treatment	107.48	83.80	81.58	117.07	65.83	54.42	40.77	38.20
Week 6	52.15	23.45	21.93	73.95	41.40	29.55	28.73	73.80**
Week 13	49.72	50.83	42.44	42.03	80.56	55.09	50.62*	27.48**
Anti-semaglutide antibodies								
Number of animals with antibodies[g]	0	0	1	0	0	0	1	1
Organ weights								
Heart[h]								
Absolute weight (g)	10.63	8.47	9.90	8.71	10.13#	10.06	8.83	8.03
% of body weight	0.439	0.321	0.408	0.376	0.427	0.416	0.410	0.381
Liver[i]								
Absolute weight (g)	67.24#	68.08	68.92	57.30	63.52	70.93	59.57	55.77
% of body weight	2.778	2.556	2.847	2.448	2.673	2.930	2.769	2.646
Thyroid gland[j]								
Absolute weight (g)	0.445	0.329	0.266*	0.270*	0.332	0.311	0.489*	0.244
% of body weight	0.0184	0.0123*	0.0109**	0.0116*	0.0140	0.0129	0.0228**	0.0117
Histopathology								
Site of treatment/injection[k]								
Injection/treatment site (number	4	4	4	4	4	4	4	4

Nominal Dose (mg/kg twice-weekly)	0 (Control)	0.01	0.1	1.0/0.5[##]	0 (Control)	0.01	0.1	1.0/0.5[##]
Initial Number of Animals								
Main	**M: 4**	**M: 4**	**M: 4**	**M: 4**	**F: 4**	**F: 4**	**F: 4**	**F: 4**
Recovery[l]	**M: 2**	**M: 2**	**M: 2**	**M: 2**	**F: 2**	**F: 2**	**F: 2**	**F: 2**
examined)								
Inflammation, subcutaneous, chronic	4	2	1	3	2	1	3	1
Inflammation, subcutaneous	0	1	2	0	0	1	0	0
Fibrosis, subcutaneous, localised	0	2	0	0	0	1	0	0
Haemorrhage, subcutaneous	2	3	2	2	1	0	1	0
Scab	1	1	0	0	0	0	0	0
Inflammatory cell foci, dermal	1	0	1	0	0	0	0	0

[##]On Day 18, dosing of the high dose group (1.0 mg/kg) was suspended due to adverse clinical signs. Treatment recommenced on Day 22 for males. On Day 25 and 29, the unaffected and affected females, respectively, recommenced dosing at 0.5 mg/kg. On Day 32, the dose level for the high dose males was reduced to 0.5 mg/kg and dosing was again suspended for two of the females.

[a] Number of animals with clinical sign

[b] *Yersinia pseudotuberculosis* infection diagnosed. Dehydration not considered related to treatment.

[c] By the end of the recovery period, the plasma sodium concentration was still slightly high in one high dose and both low dose males

[d] By the end of the recovery period, the plasma chloride concentration was still slightly high in one high dose male

[f] By the end of the recovery period, urinary potassium was similar to control values

[g] None of the antibodies were neutralising

[h] By the end of the recovery period, absolute and relative heart weights were similar to control values

[i] By the end of the recovery period, absolute liver weights were similar to control values

[j] By the end of the recovery period, absolute and relative thyroid weights were similar to control values

[k] Injection site findings are all considered unrelated to treatment with semaglutide.

[l] No group mean values for recovery animals are presented for this study, because only 2 animals/sex/group was examined at the end of the Recovery phase.

* $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$ vs. control ; (pairwise test)

[#] $p<0.05$, linear dose response test, no pairwise test

2.6.7.7.H カニクイザルを用いた 52 週間反復皮下投与毒性試験及び 4 週間回復性試験 **Study ID: 207288**

Species/Strain: Cynomolgus monkey	**Duration of Dosing:** 52 weeks (preceded by 0-2 weeks dose escalation)	**Location in CTD: 4.2.3.2-11**
Initial Age: 30-34 months at dosing start	**Duration of Postdose:** 4 weeks	**GLP Compliance:** Yes
Date of First Dose: 20 November 2008	**Method of Administration:** Subcutaneous injection	
Nominal Dose Levels: 0, 0.01, 0.06 and 0.36 mg/kg twice-weekly	**Vehicle/Formulation:** 1.42 mg/mL disodium hydrogen phosphate dihydrate,14.0 mg/mL propylene glycol, 5.5 mg/mL phenol and water for injection, pH 7.4	

Parameters collected: Viability, Clinical Condition, Body Weight, Food Consumption, Ophthalmoscopy, Electrocardiography, Haematology, Clinical Chemistry, Urinalysis, Toxicokinetics, Serum Calcitonin, Antibody Formation, Organ Weights, Macropathology, Histopathology, including extended thyroid evaluation.

Special Features: A 0-2 weeks dose escalation phase to ensure tolerability at the target dose levels. High calorific food supplement offered to all high dose animals due to substantial body weight loss in this group. Serum calcitonin analysis (pre-treatment, Day 1, Week 13, 26, 39, 52 and R4).

No Observed Adverse-Effect Level: 0.06 mg/kg/twice-weekly

Brief conclusion: Only few treatment-related clinical signs were observed early in the study. Body weight loss early in the study and decreased body weight gain throughout the study were observed and generally reflected a reduced food consumption. An ECG abnormality (bigeminy rhythm, with two episodes of sinus tachycardia in Week 13, and a continuous left-bundle-branch-block ECG recording in Weeks 26 and 52) was observed in one high dose female. Cardiac bundle-branch-blocks are occasional findings in monkeys. However, a relation to treatment could not be excluded in the study as the change progressed throughout the study. Although histopathology revealed no changes in the heart, the ECG finding was considered adverse. Changes in clinical pathology parameters were considered non-adverse in view of the low magnitude of these changes and/or in the absence of any correlating findings. A number of organ weights appeared to be changed secondary to the effect of semaglutide on body weight. In the absence of correlating adverse histopathology findings in any of the organs with organ weight changes, these were all considered non-adverse. Increased prostate and testes weights were considered incidental and attributed to differences in the sexual maturity state of the animals. Macropathology revealed small thymus sizes and histopathology revealed cortical atrophy or involution of thymus, both correlating with the finding of low thymus weights. These changes in thymus were considered to represent stress related changes and were not considered adverse. Histopathology revealed one high dose male with slight multifocal myocardial vacuolation and degeneration with karyomegaly, in the left ventricle. Following an extensive examination, no significant histopathological changes were observed elsewhere in the heart of this animal, or in the hearts of any of the other animals in the study. As this finding is observed occasionally in control animals, a relationship to treatment with semaglutide is considered unlikely. Based on the ECG findings at the high dose level and the absence of adverse findings at the lower dose levels, the intermediate dose level, 0.06 mg/kg twice-weekly, was considered to be the NOAEL.

Nominal Dose (mg/kg twice-weekly)	**0 (Control)**	**0.01**	**0.06**	**0.36**	**0 (Control)**	**0.01**	**0.06**	**0.36**
Initial Number of Animals								
Main	**M: 4**	**M: 4**	**M: 4**	**M: 4**	**F: 4**	**F: 4**	**F: 4**	**F: 4**
Recovery[n]	**M: 0**	**M: 2**	**M: 2**	**M: 2**	**F: 0**	**F: 2**	**F: 2**	**F: 2**
Toxicokinetics ($AUC_{0\text{-}72h}$ (nmol*h/L))								
Day 1	N/A	764	4570	36400	N/A	751	5320	38400
Week 13	N/A	1200	9160	56400	N/A	1340	9630	58500
Week 26	N/A	1260	8040	48700	N/A	1300	8870	46200
Week 39	N/A	1190	8230	51700	N/A	1370	8910	55300
Week 52	N/A	1380	9260	52500	N/A	1540	9210	56900
Noteworthy Findings								
Died or euthanised/terminated prematurely	0	0	0	0	0	0	0	0
Clinical signs[a]								
Thin	0	0	1	1	0	0	0	0
Underactive	0	0	0	2	0	0	0	2
Hunched posture	0	0	0	2	0	0	0	2
Skin tenting	0	0	0	2	0	0	0	0
Bodyweight (main and recovery animals)[b]								
Terminal body weight (kg)	4.40	4.38	4.04	3.83	3.50	3.66	2.71	2.75
Bodyweight gain (main and recovery animals)[b]								
Day -14 to Day 1(kg)	0.0525	0.0150	-0.0600	-0.1633**	0.0125	0.0417	-0-0300	-0.1233*
Day -14 to Day 1(% difference from control)	-	-71	-214	-411	-	+233	-340	-1087
Day 1 to Day 365 (kg)	1.73	1.59	1.30	1.21	1.09	1.17	0.28*	0.45
Day 1 to Day 365 (% difference from control)	-	-8	-25	-30	-	+7	-74	-58
Food consumption (main study animals (g/animal/week))[c]								
Week 1	1615	1453	1308	1163	1558	1335	968	1000

Nominal Dose (mg/kg twice-weekly)	**0 (Control)**	**0.01**	**0.06**	**0.36**	**0 (Control)**	**0.01**	**0.06**	**0.36**
Initial Number of Animals								
Main	**M: 4**	**M: 4**	**M: 4**	**M: 4**	**F: 4**	**F: 4**	**F: 4**	**F: 4**
Recovery[n]	**M: 0**	**M: 2**	**M: 2**	**M: 2**	**F: 0**	**F: 2**	**F: 2**	**F: 2**
Week 52	1668	1643	1605	1578	1630	1653	1578	1560
Electrocardiography								
Abnormalities	0	0	0	0	0	0	0	1[d]
Haematology (main and recovery animals)[e]								
Haematocrit (L/L)								
Pre-treatment	0.409	0.416	0.413	0.398	0.429	0.403	0.413	0.401
Week 13	0.390	0.405	0.365	0.350*	0.397	0.380	0.358	0.345**
Week 26	0.420	0.435	0.397	0.387	0.426	0.420	0.398	0.366**
Week 52	0.437	0.436	0.401	0.398	0.434	0.418	0.381*	0.353**
Haemoglobin (g/dL)								
Pre-treatment	13.1	13.4	13.1	12.8	13.6	13.0	13.2	12.8
Week 13	12.7	13.3	12.0	11.8	13.0	12.4	11.8	11.6*
Week 26	13.2	14.2	12.8	12.7	13.5	13.5	12.7	12.1*
Week 52	14.0	14.4	13.4	13.1	14.2	13.7	12.4*	11.7**
Red Blood Cells (*10^{12}/L)								
Pre-treatment	5.48	5.62	5.47	5.29	5.55	5.33	5.45	5.12
Week 13	5.33	5.63	5.03	4.90	5.31	5.18	5.00	4.67*
Week 26	5.62	5.97	5.42	5.31	5.64	5.62	5.35	4.93*
Week 52	5.84	5.97	5.52	5.42	5.73	5.67	5.15*	4.75**
Clinical chemistry (main and recovery animals)[f]								
Glucose (mmol/L)								
Pre-treatment	3.57	2.98	3.69	3.33	4.37	3.17	3.54	3.16
Week 13	4.18	3.09	2.80	2.86	3.17	2.66	2.64	2.54
Week 26	4.61	3.92	3.18	3.40	5.03	3.61*	3.76	3.17**
Week 52	3.98	2.83	3.41	3.00	3.64	3.25	3.32	2.23**
Cholesterol (mmol/L)								
Pre-treatment	3.35	3.45	3.67	3.73	3.36	3.56	3.72	3.53
Week 13	3.35	3.39	3.44	4.01*	3.22	3.42	3.30	3.13

Nominal Dose (mg/kg twice-weekly)	0 (Control)	0.01	0.06	0.36	0 (Control)	0.01	0.06	0.36
Initial Number of Animals								
Main	**M: 4**	**M: 4**	**M: 4**	**M: 4**	**F: 4**	**F: 4**	**F: 4**	**F: 4**
Recovery[n]	**M: 0**	**M: 2**	**M: 2**	**M: 2**	**F: 0**	**F: 2**	**F: 2**	**F: 2**
Week 26	3.02	3.20	3.27	3.61	3.09	3.24	3.19	2.98
Week 52	3.17	3.20	3.28	3.77	3.20	3.51	3.18	3.01
Total protein (g/L)								
Pre-treatment	78	77	77	76	78	75	79	75
Week 13	75.3	75.8	75.8	73.8	76.0	73.7	75.2	72.0
Week 26	74.3	76.8	75.2	72.5	75.8	74.5	74.8	70.8
Week 52	75.8	76.3	76.8	75.7	79.5	74.5	73.2*	71.0***
β-globulin (g/L)								
Pre-treatment	12	10	10	11	11	10	10	10
Week 13	11.0	10.3	10.0	10.2	10.5	10.2	9.3	9.2
Week 26	11.0	10.2	10.2	10.5	11.5	10.2	8.8***	8.8***
Week 52	11.8	11.0	11.5	10.7	13.3	11.3	9.0**	10.5
Albumin/globulin ratio								
Pre-treatment	1.27	1.44	1.41	1.35	1.35	1.61	1.45	1.58
Week 13	1.21	1.27	1.34	1.24	1.28	1.38	1.33	1.44
Week 26	1.23	1.24	1.30	1.17	1.16	1.32	1.30	1.40
Week 52	1.17	1.16	1.29	1.22	0.98	1.15	1.29*	1.37**
Urinalysis[g]								
Urinary sodium (mmol/L)								
Pre-treatment	52.3	43.3	74.5	48.0	25.5	20.2	19.8	19.2
Week 12	43.3	51.3	44.2	48.5	33.5	37.3	39.0	53.5
Week 25	39.5	52.7	43.8	57.5	19.5	24.0	12.3	30.5
Week 51	61.8	51.5	42.3	45.3	22.5	50.5	65.5*	80.7**
Urinary potassium (mmol/L)								
Pre-treatment	110.8	101.8	128.7	135.2	31.9	38.0	36.3	30.7
Week 12	43.4	42.5	47.1	39.2	27.4	33.6	65.3*	42.9
Week 25	131.5	119.9	124.9	63.0	35.8	60.8	49.5	53.7
Week 51	66.2	66.2	51.7	42.9	24.2	52.3	50.0	50.7

Nominal Dose (mg/kg twice-weekly)	**0 (Control)**	**0.01**	**0.06**	**0.36**	**0 (Control)**	**0.01**	**0.06**	**0.36**
Initial Number of Animals								
Main	**M: 4**	**M: 4**	**M: 4**	**M: 4**	**F: 4**	**F: 4**	**F: 4**	**F: 4**
Recovery[n]	**M: 0**	**M: 2**	**M: 2**	**M: 2**	**F: 0**	**F: 2**	**F: 2**	**F: 2**
Urinary chloride (mmol/L)								
Pre-treatment	92.3	69.8	115.8	99.7	29.3	17.5	23.0	16.3
Week 12	22.8	32.8	32.0	37.7	24.8	30.5	39.5	37.7
Week 25	75.5	79.5	72.7	59.7	21.3	34.2	19.7	44.8
Week 51	69.3	61.8	42.8	45.3	23.0	52.0	67.0	83.2
Organ weights								
Heart[h]								
Absolute weight (g)	17.08	15.79	15.10	14.16	15.11	12.32*	9.38***	9.77***
% of body weight	0.391	0.357	0.369	0.343	0.424	0.317**	0.352*	0.345**
Pancreas[i]								
Absolute weight (g)	8.349	6.246	6.258	5.660	5.483	4.861	4.337	3.887
% of body weight	0.190	0.143	0.157	0.135	0.154	0.129	0.162	0.139
Prostate[j]								
Absolute weight (g)	1.166	1.281	2.032	1.719	N/A	N/A	N/A	N/A
% of body weight	0.0255	0.0275	0.0413	0.0425	N/A	N/A	N/A	N/A
Testes[j]								
Absolute weight (g)	8.397	9.011	10.764	11.197	N/A	N/A	N/A	N/A
% of body weight	0.190	0.193	0.227	0.298	N/A	N/A	N/A	N/A
Thymus[k]								
Absolute weight (g)	4.21	3.09	2.21	3.04	3.23	2.34	2.90	1.86
% of body weight	0.0979	0.0727	0.0583	0.0691	0.0916	0.0581	0.1110	0.0630
Thyroid and parathyroid glands[l]								
Absolute weight (g)	0.641	0.632	0.462	0.581	0.291	0.376	0.317	0.466
% of body weight	0.0142	0.0141	0.0117	0.0151	0.0081	0.0110	0.0121	0.0168
Macropathology (number examined)	4	4	4	4	4	4	4	4
Thymus small	0	0	1	1	0	2	1	2

Nominal Dose (mg/kg twice-weekly)	0 (Control)	0.01	0.06	0.36	0 (Control)	0.01	0.06	0.36
Initial Number of Animals								
Main	**M: 4**	**M: 4**	**M: 4**	**M: 4**	**F: 4**	**F: 4**	**F: 4**	**F: 4**
Recovery[n]	**M: 0**	**M: 2**	**M: 2**	**M: 2**	**F: 0**	**F: 2**	**F: 2**	**F: 2**
Histopathology								
Heart, main study (number examined)	4	4	4	4	4	4	4	4
Myocardial vacuolation and degeneration, with karyomegaly	0	0	0	1	0	0	0	0
Thymus, main study (number examined)	4	4	4	4	4	4	4	4
Cortical atrophy/involution	0	1	3	2	0	0	1	4
Thymus, recovery study (number examined)	0	2	2	2	0	2	2	2
Cortical atrophy/involution	0	2	0	0	0	0	1	0
Site of treatment/injection, main study[m]								
Treated site 1 (number examined)	4	4	4	4	4	4	4	4
Epidermal Hyperplasia	1	0	0	0	0	0	0	0
Epidermal Ulceration	1	0	0	0	0	0	0	0
Hyperkeratosis	1	0	0	0	0	0	0	0
Overall Reaction	1	1	1	1	3	2	0	0
Panniculus Muscle - Fibrosis	0	1	0	0	0	0	0	0
Scab(s)	2	0	0	0	0	0	0	0
Subcutaneous Fibrosis	0	1	1	1	1	0	0	0
Subcutaneous Haemorrhage	0	0	0	0	1	2	0	0
Subcutaneous Inflammation	1	0	0	0	1	1	0	0
Subcutaneous Pigmented Macrophages	0	0	0	0	1	0	0	0
Subcutaneous Vacuolated Macrophages	0	0	0	0	1	0	0	0
Treated site 2 (number examined)	4	4	4	4	4	4	4	4
Dermal Inflammation	0	1	0	1	0	0	1	0
Overall Reaction	2	2	1	2	2	0	1	1
Panniculus Muscle - Myofibre Degeneration/Necrosis	0	0	0	1	0	0	1	1
Panniculus Muscle - Myofibre Regeneration	0	0	0	0	0	0	0	1

Nominal Dose (mg/kg twice-weekly)	0 (Control)	0.01	0.06	0.36	0 (Control)	0.01	0.06	0.36
Initial Number of Animals								
Main	**M: 4**	**M: 4**	**M: 4**	**M: 4**	**F: 4**	**F: 4**	**F: 4**	**F: 4**
Recovery[n]	**M: 0**	**M: 2**	**M: 2**	**M: 2**	**F: 0**	**F: 2**	**F: 2**	**F: 2**
Scab(s)	0	1	0	0	0	0	0	0
Subcutaneous Fibrosis	2	1	1	1	1	0	0	0
Subcutaneous Haemorrhage	0	1	0	0	0	0	0	1
Subcutaneous Inflammation	0	1	0	0	1	0	1	1
Treated site 3 (number examined)	4	4	4	4	4	4	4	4
Dermal Fibrosis	0	0	0	0	0	0	1	0
Dermal Inflammation	1	0	1	1	0	0	1	0
Overall Reaction	3	1	2	2	0	0	1	0
Panniculus Muscle - Inflammation	0	0	0	0	0	0	1	0
Subcutaneous Fibrosis	3	0	2	2	0	0	0	0
Subcutaneous Haemorrhage	0	1	0	0	0	0	0	0
Subcutaneous Inflammation	0	0	0	1	0	0	0	0
Treated site 4 (number examined)	4	4	4	4	4	4	4	4
Dermal Inflammation	1	0	0	0	1	0	0	0
Epidermal Hyperplasia	0	0	0	0	1	0	0	0
Overall Reaction	1	2	1	1	2	0	0	1
Recent Thrombus in Vein	0	0	0	0	0	0	1	0
Subcutaneous Fibrosis	1	1	1	1	1	0	0	1
Subcutaneous Haemorrhage	0	0	1	0	1	0	0	0
Subcutaneous Inflammation	1	2	0	0	1	0	0	1
Subcutaneous Necrosis	0	0	0	0	1	0	0	0
Treated site 5 (number examined)	4	4	4	4	4	4	4	4
Dermal Inflammation	0	1	0	0	0	0	0	1
Overall Reaction	3	0	2	3	2	1	0	0
Panniculus Muscle - Inflammation	0	0	0	0	1	0	0	0
Panniculus Muscle - Myofibre Regeneration	3	0	0	1	1	0	0	0
Subcutaneous Fibrosis	0	0	1	2	0	0	0	0
Subcutaneous Haemorrhage	1	0	0	0	1	0	0	0
Subcutaneous Inflammation	0	0	1	1	1	1	0	0
Treated site 6 (number examined)	4	4	4	4	4	4	4	4

Nominal Dose (mg/kg twice-weekly)	0 (Control)	0.01	0.06	0.36	0 (Control)	0.01	0.06	0.36
Initial Number of Animals								
Main	**M: 4**	**M: 4**	**M: 4**	**M: 4**	**F: 4**	**F: 4**	**F: 4**	**F: 4**
Recovery[n]	**M: 0**	**M: 2**	**M: 2**	**M: 2**	**F: 0**	**F: 2**	**F: 2**	**F: 2**
Dermal Inflammation	0	1	0	0	0	0	1	0
Overall Reaction	0	3	1	1	1	2	0	0
Panniculus Muscle - Inflammation	0	0	1	0	0	0	0	0
Panniculus Muscle - Myofibre Degeneration/Necrosis	0	0	1	0	0	0	0	0
Panniculus Muscle - Myofibre Regeneration	0	0	0	1	0	2	0	0
Subcutaneous Fibrosis	0	0	0	1	0	0	0	0
Subcutaneous Haemorrhage	0	2	0	0	0	0	0	0
Subcutaneous Inflammation	0	1	0	0	1	0	0	0

[a] Number of animals with clinical sign

[b] During the recovery period, animals previously treated with semaglutide exhibited a marked body weight gain demonstrating reversibility of the effects of semaglutide on body weight.

[c] During the recovery period, the high dose females tended to consume more food than they did at the end of the 52-week dosing period.

[d] Bigeminy rhythm with two episodes of sinus tachycardia in Week 13 and continuous left-bundle-branch-block ECG recording in Week 26 and 52. A pale area on the epicardial aspect of the right ventricle was seen at necropsy but there were no correlating histopathology changes.

[e] By the end of the recovery period, erythrocytic parameters were low in all groups of animals previously treated with semaglutide, however, in low dose females this trend was present from pre-treatment throughout the dosing period.

[f] By the end of the recovery period, no similar observations were made for glucose and cholesterol. β-globulin and the albumin/globulin ratio were recovering whereas the total protein concentrations were still slightly low.

[g] In Week 4 of the recovery period, urinary sodium and chloride decreased compared to Week 52 values, indicating that recovery was occurring. Urinary potassium continued to be high compared with Week 52 values, including control values.

[h] By the end of the recovery period, the low and intermediate dose groups, but not the high dose group, seemed to have values similar to or approaching the Week 52 control values.

[i] By the end of the recovery period, body weight relative pancreas weights were generally low compared to Week 52 control values.

[j] The wide variation in prostate and testes weights was attributed to differences in the sexual maturity state of the animals at the end of the 52-week treatment period.

[k] By the end of the recovery period, body weight relative thymus weights seemed similar to Week 52 control values.

[l] By the end of the recovery period, body weight-relative thyroid and parathyroid weights seemed similar to Week 52 control values.

[m] Injection site findings are all considered unrelated to treatment with semaglutide.

[n] No group mean values for recovery animals are presented for this study, because only 2 animals/sex/group was examined at the end of the Recovery phase.

* $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$ vs. control ; (pairwise test)

2.6.7.8 遺伝毒性 *in vitro*

Test Article: Semaglutide

2.6.7.8.A [redacted]品：4 種のヒスチジン要求性株の *Salmonella typhimurium* 及び 2 種のトリプトファン要求性株の *Escherichia coli* を用いた復帰突然変異試験

Study ID: 206415

Test for Induction of: Reverse mutation in bacterial cells	**No. of Independent Assays:** 2	**Location in CTD:** 4.2.3.3.1-1
Strains: *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* (TA98, TA100, TA1535, TA1537, WP2 pKM101 and WP2 uvrA pKM101)	**No. of Replicate Plates:** Five solvent controls, Three treatment and positive controls	**GLP Compliance:** Yes
Metabolising System: Supernatant from Aroclor-treated rats (S9 mix)		**Date of Treatment:** 20 October 2006

Vehicles:

For Test Article: Water for Injection

For Positive Controls: Water/DMSO

Treatment: Treat and plate assay. Maximum concentration = 5143 μg/plate

Cytotoxic Effects: None

Genotoxic Effects: None

Brief conclusion: Synthetic semaglutide did not induce mutation in the four strains of *Salmonella typhimurium* and in the two strains of *Escherichia coli* when tested at concentrations up to 5143 μg/plate in the absence and in the presence of a rat liver metabolic activation system (S-9).

Assay 1 summary of mean revertant colonies

Metabolic Activation	Test Article	Concentration (ug/plate)	TA98 Mean ± SD	TA100 Mean ± SD	TA1535 Mean ± SD	TA1537 Mean ± SD	WP2 pKM101 Mean ± SD	WP2 uvrA pKM101 Mean ± SD
-S9	Semaglutide	Water	22 ± 2	92 ± 12	10 ± 4	11 ± 4	51 ± 13	161 ± 37
		1.7	18 ± 4	127 ± 10	11 ± 4	12 ± 1	56 ± 9	138 ± 13(M)
		8.6	19 ± 3	101 ± 5	9 ± 3	12 ± 4	52 ± 5	171 ± 39
		43.2	21 ± 8	93 ± 3	9 ± 1	14 ± 2	44 ± 5	195 ± 10
		216.2	21 ± 2	85 ± 14	8 ± 1	7 ± 2	57 ± 2	183 ± 25
		1081	20 ± 2	81 ± 9	12 ± 4	12 ± 1	50 ± 11	188 ± 23
		5143	29 ± 6	105 ± 22	8 ± 4(M)	11 ± 5	46 ± 9	188 ± 26
	Positive controls	Compound	2NF	NQO	NQO	ICR-191	MNNG	MNNG
		Dose Level	25 µg	1 µg	2.5 µg	1 µg	7.5 µg	7.5 µg
		Mean ± SD	2539 ± 146	729 ± 24	1365 ± 149	2553 ± 50	955 ± 65	762 ± 51

Metabolic Activation	Test Article	Concentration (ug/plate)	TA98 Mean ± SD	TA100 Mean ± SD	TA1535 Mean ± SD	TA1537 Mean ± SD	WP2 pKM101 Mean ± SD	WP2 uvrA pKM101 Mean ± SD
+S9	Semaglutide	Water	21 ± 8	105 ± 7	10 ± 2	7 ± 1	52 ± 5	182 ± 16
		1.7	19 ± 7	81 ± 15(M)	11 ± 3	11 ± 2	51 ± 2	179 ± 17
		8.6	23 ± 3	92 ± 2	11 ± 6	6 ± 3	59 ± 10	186 ± 13
		43.2	18 ± 5	109 ± 19	9 ± 1	8 ± 5	59 ± 11	192 ± 20
		216.2	25 ± 6	109 ± 24	13 ± 4	8 ± 2	55 ± 6	199 ± 7
		1081	29 ± 4	110 ± 4	6 ± 4	8 ± 2	62 ± 3	188 ± 19
		5143	24 ± 11	125 ± 10	13 ± 3	9 ± 5	48 ± 12	185 ± 9
	Positive controls	Compound	AAN	AAN	AAN	AAN	NT	AAN
		Dose Level	2.5 µg	2.5 µg	5 µg	2.5 µg	NT	20 µg
		Mean ± SD	413 ± 40	401 ± 19	78 ± 10	23 ± 9	NT	537 ± 30

MNNG: N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine; NQO: 4-Nitroquinoline 1-oxide; 2NF: 2-Nitrofluorene; ICR-191: ICR-191 mutagen; M: Plate counted manually; AAN: 2-Aminoanthracene; SD Standard deviation, NT=Not treated

WP2 pKM101 data in the presence of S-9 are considered as supplemental information.

Assay 2 summary of mean revertant colonies

Metabolic Activation	Test Article	Concentration (ug/plate)	TA98 Mean ± SD	TA100 Mean ± SD	TA1535 Mean ± SD	TA1537 Mean ± SD	WP2 pKM101 Mean ± SD	WP2 uvrA pKM101 Mean ± SD
-S9	Semaglutide	Water	19 ± 4	109 ± 19	9 ± 2	11 ± 1	58 ± 7	175 ± 13
		168.9	18 ± 2	102 ± 12	7 ± 4	14 ± 7	55 ± 24	193 ± 18
		337.8	16 ± 2	83 ± 12	11 ± 5	11 ± 1	62 ± 10	176 ± 9
		675.6	15 ± 3	98 ± 9	4 ± 3	13 ± 2	73 ± 4	199 ± 28
		1351	17 ± 2	106 ± 13	10 ± 4	12 ± 2	70 ± 5	200 ± 32(M)
		2702	15 ± 7	114 ± 10	9 ± 3	8 ± 2	62 ± 14	199 ± 3
		5143	26 ± 1	129 ± 9	12 ± 3	7 ± 4	65 ± 5	204 ± 36
	Positive controls	Compound	2NF	NQO	MNNG	ICR-191	MNNG	MNNG
		Dose Level	25 µg	1 µg	2.5 µg	1 µg	7.5 µg	7.5 µg
		Mean ± SD	1775 ± 110	1109 ± 58	1885 ± 48	2156 ± 145	1087 ± 28	978 ± 30

Metabolic Activation	Test Article	Concentration (ug/plate)	TA98 Mean ± SD	TA100 Mean ± SD	TA1535 Mean ± SD	TA1537 Mean ± SD	WP2 pKM101 Mean ± SD	WP2 uvrA pKM101 Mean ± SD
+S9	Semaglutide	Water	23 ± 9	93 ± 16	8 ± 5	9 ± 3	69 ± 10	201 ± 21
		168.9	20 ± 1	93 ± 18	9 ± 2	11 ± 3	55 ± 4	193 ± 10
		337.8	23 ± 10	93 ± 13	11 ± 3	9 ± 3	59 ± 9	213 ± 3
		675.6	15 ± 2	93 ± 13	17 ± 5	11 ± 5	60 ± 11	205 ± 16
		1351	19 ± 5	104 ± 11	10 ± 6	11 ± 2	66 ± 8	218 ± 8
		2702	17 ± 7	110 ± 12	9 ± 3	9 ± 1	57 ± 5	213 ± 18
		5143	13 ± 7	109 ± 25	11 ± 3	12 ± 1	55 ± 19	204 ± 13
	Positive controls	Compound	AAN	AAN	AAN	AAN	NT	AAN
		Dose Level	2.5 µg	2.5 µg	5 µg	2.5 µg	NT	20 µg
		Mean ± SD	430 ± 37	420 ± 24	86 ± 9	33 ± 6	NT	549 ± 68

MNNG: N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine; NQO: 4-Nitroquinoline 1-oxide; 2NF: 2-Nitrofluorene; ICR-191: ICR-191 mutagen; M: Plate counted manually; AAN: 2-Aminoanthracene; SD Standard deviation, NT=Not treated

WP2 pKM101 data in the presence of S-9 are considered as supplemental information.

2.6.7.8.B 遺伝子組換え品：4 種のヒスチジン要求性株の *Salmonella typhimurium* 及び 2 種のトリプトファン要求性株の *Escherichia coli* を用いた復帰突然変異試験

Study ID: 210193

Test for Induction of: Reverse mutation in bacterial cells	**No. of Independent Assays:** 2	**Location in CTD:** 4.2.3.3.1-2
Strains: *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* (TA98, TA100, TA1535, TA1537, WP2 pKM101 and WP2 uvrA pKM101)	**No. of Replicate Plates:** Five solvent controls, Three treatment and positive controls	**GLP Compliance:** Yes
Metabolising System: Aroclor 1254-induced rat liver (S-9)		**Date of Treatment:** August 2010

Vehicles:

For Test Article: Water for Injection

For Positive Controls: Water/DMSO

Treatment: Treat and plate assay. Maximum concentration = 5000 µg/plate

Cytotoxic Effects: None

Genotoxic Effects: None

Brief conclusion: Recombinant semaglutide did not induce mutation in the four strains of *Salmonella typhimurium* and the two strains of *Escherichia coli* when tested at concentrations up to 5000 µg/plate, in the absence and in the presence of a rat liver metabolic activation system (S-9) using a treat and plate methodology.

In the original report, semaglutide produced by the recombinant method is also referred to as *semi-recombinant semaglutide*. For consistency across all summary documentation semaglutide manufactured by this method is only referred to as *recombinant semaglutide.*

Assay 1 summary of mean revertant colonies

Metabolic Activation	Test Article	Concentration (ug/plate)	TA98 Mean ± SD	TA100 Mean ± SD	TA1535 Mean ± SD	TA1537 Mean ± SD	WP2 pKM101 Mean ± SD	WP2 uvrA pKM101 Mean ± SD
-S9	Semaglutide	Purified water	27 ± 3	125 ± 14 M B	12 ± 4	6 ± 2	60 ± 6	178 ± 12
		8	29 ± 4	120 ± 12	13 ± 3	7 ± 2	67 ± 4	186 ± 12
		40	24 ± 5	138 ± 8	11 ± 4	7 ± 2	53 ± 8	184 ± 29
		200	18 ± 7	128 ± 11	11 ± 3	7 ± 4	50 ± 8	184 ± 10
		1000	23 ± 4	123 ± 2	11 ± 2	9 ± 6	70 ± 8 M B	181 ± 19
		5000	33 ± 6	134 ± 8 M B	12 ± 2	7 ± 2	63 ± 3	195 ± 16
	Positive controls	Compound	2NF	NQO	MNNG	ICR-191	MNNG	MNNG
		Dose Level	25 µg	1 µg	2.5 µg	1 µg	7.5 µg	7.5 µg
		Mean ± SD	947 ± 109	1180 ± 82	967 ± 86	553 ± 22	1050 ± 57	720 ± 59

Metabolic Activation	Test Article	Concentration (ug/plate)	TA98 Mean ± SD	TA100 Mean ± SD	TA1535 Mean ± SD	TA1537 Mean ± SD	WP2 pKM101 Mean ± SD	WP2 uvrA pKM101 Mean ± SD
+S9	Semaglutide	Purified water	26 ± 5	133 ± 10 M B	14 ± 4	7 ± 2	68 ± 11	193 ± 14
		8	24 ± 6	149 ± 6	10 ± 4	7 ± 1	62 ± 4	205 ± 12
		40	31 ± 4	146 ± 8	14 ± 11	5 ± 3	69 ± 12	187 ± 14
		200	26 ± 3	143 ± 18	11 ± 1	6 ± 2	63 ± 3	191 ± 15
		1000	30 ± 13	125 ± 5	11 ± 1	4 ± 2	66 ± 8	204 ± 13
		5000	28 ± 6	131 ± 16 M B	14 ± 3	5 ± 1	68 ± 10	186 ± 25
	Positive controls	Compound	AAN	AAN	AAN	AAN	NT	AAN
		Dose Level	2.5 µg	2.5 µg	5 µg	2.5 µg	NT	20 µg
		Mean ± SD	718 ± 26	482 ± 13	70 ± 10	84 ± 20	NT	675 ± 18

MNNG: N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine; NQO: 4-Nitroquinoline 1-oxide; B: Bubbles or Split in agar; 2NF: 2-Nitrofluorene; ICR-191: ICR-191 mutagen; M: Plate counted manually; AAN: 2-Aminoanthracene; NT: Not treated; SD: Standard deviation

WP2 pKM101 data in the presence of S-9 are considered as supplemental information.

Assay 2 summary of mean revertant colonies

Metabolic Activation	Test Article	Concentration (ug/plate)	TA98 Mean ± SD	TA100 Mean ± SD	TA1535 Mean ± SD	TA1537 Mean ± SD	WP2 pKM101 Mean ± SD	WP2 uvrA pKM101 Mean ± SD
-S9	Semaglutide	Purified water	24 ± 7	133 ± 7	12 ± 4	9 ± 2	61 ± 4	188 ± 15
		312.5	25 ± 8	142 ± 2	12 ± 3	12 ± 9	49 ± 8	190 ± 11
		625	27 ± 3	142 ± 13	14 ± 4	11 ± 4	59 ± 16	196 ± 11
		1250	31 ± 3	144 ± 15	19 ± 2	9 ± 2	51 ± 5	190 ± 22
		2500	24 ± 6	143 ± 9	16 ± 5	15 ± 6	60 ± 12	190 ± 12
		5000	32 ± 4	151 ± 3	15 ± 1	12 ± 6	69 ± 1	185 ± 21
	Positive controls	Compound	2NF	NQO	MNNG	ICR-191	MNNG	MNNG
		Dose Level	25 µg	1 µg	2.5 µg	1 µg	7.5 µg	7.5 µg
		Mean ± SD	798 ± 124	1336 ± 90	1417 ± 105	1074 ± 120	850 ± 20	612 ± 39

Metabolic Activation	Test Article	Concentration (ug/plate)	TA98 Mean ± SD	TA100 Mean ± SD	TA1535 Mean ± SD	TA1537 Mean ± SD	WP2 pKM101 Mean ± SD	WP2 uvrA pKM101 Mean ± SD
+S9	Semaglutide	Purified water	31 ± 10	142 ± 8	11 ± 4 M B	8 ± 4	52 ± 10	207 ± 11
		312.5	22 ± 2	129 ± 7	13 ± 3	10 ± 6	53 ± 11	183 ± 10
		625	21 ± 2	145 ± 12	15 ± 4	9 ± 4 M B	48 ± 8	186 ± 13
		1250	25 ± 4	144 ± 19	17 ± 7	11 ± 6	55 ± 17	197 ± 30
		2500	14 ± 14	143 ± 19	17 ± 7	13 ± 2	53 ± 8	210 ± 19
		5000	23 ± 3	134 ± 16	19 ± 4	11 ± 4	51 ± 8	219 ± 20
	Positive controls	Compound	AAN	AAN	AAN	AAN	NT	AAN
		Dose Level	2.5 µg	2.5 µg	5 µg	2.5 µg	NT	20 µg
		Mean ± SD	556 ± 20	493 ± 14	120 ± 30	66 ± 4	NT	631 ± 6

MNNG: N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine; NQO: 4-Nitroquinoline 1-oxide; B: Bubbles or Split in agar; 2NF: 2-Nitrofluorene; ICR-191: ICR-191 mutagen; M: Plate counted manually; AAN: 2-Aminoanthracene; NT: Not treated; SD: Standard deviation

WP2 pKM101 data in the presence of S-9 are considered as supplemental information.

2.6.7.8.C [redacted]品：ヒト末梢血リンパ球を用いた染色体異常試験 **Study ID: 206417**

Test for: Induction of chromosome aberrations	**No. of Independent Assays:** 2	**Location in CTD:** 4.2.3.3.1-3
Strains: Human peripheral blood lymphocytes from female donors	**No. of Replicate Cultures:** 2	**GLP Compliance:** Yes
Metabolising System: S-9 fraction from Aroclor-treated rats (S9 mix)	**No. of Cells Analysed/Culture:** 100 (from each replicate)	
Vehicles: **For Test Article:** Purified water **For Positive Controls:** Dimethyl sulphoxide (DMSO)		
Treatment: Experiment 1: 3-hour exposure +/- S-9, 17 hour recovery, harvest 20-hour after start of exposure. Experiment 2: 20-hour exposure - S-9, 3-hour exposure + S-9, 17 hour recovery, harvest 20-hour after start of exposure. Maximum tested concentration = 5143 μg/mL.		**Date of Treatment:** October 2006
Cytotoxic Effects: None		
Genotoxic Effects: None		
Brief conclusion: Synthetic semaglutide did not induce chromosome aberrations in cultured human peripheral blood lymphocytes when tested at concentrations up to 5143 μg/mL, in both the absence and presence of a rat metabolic activation system (S-9).		

Experiment 1 - cells with structural aberrations. 3 hour treatment ±S-9, 17 hour recovery (3+17)

Metabolic Activation	Test Article	Concentration (µg/ml)	Treatment 3+17 hours Total cells with aberrations including gaps (% with aberrations)	Treatment 3+17 hours Total cells with aberrations excluding gaps (% with aberrations)	Treatment 3+17 hours MIH †
-S9	Semaglutide	Vehicle (Water)	0 (0)	0 (0)	-
		3243	3 (1.5)	3 (1.5)	0
		4324	6 (3)	3 (1.5)	0
		5143	0 (0)	0 (0)	0
		NQO, 2.5	41*** (29)	39*** (27)	-
+S9	Semaglutide	Vehicle (Water)	3 (1.5)	3 (1.5)	-
		2162	2 (1)	1 (0.5)	15
		4324	5 (2.5)	3 (1.5)	0
		5143	4 (2)	4 (2)	1
		CPA, 12.5	41*** (73)	40*** (71)	-

* $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$ vs. control; † Mitotic inhibition (%); NQO: 4-Nitroquinoline 1-oxide; CPA: Cyclophosphamide

Experiment 1 - cells with numerical aberrations. 3 hour treatment ±S-9, 17 hour recovery (3+17)

Metabolic Activation	Test Article	Concentration (µg/ml)	Treatment 3+17 hours Total cells with aberrations (% with aberrations)
-S9	Semaglutide	Vehicle (Water)	0 (0)
		3243	1 (0.5)
		4324	0 (0)
		5143	2 (1)
		NQO, 2.5	1 (0.7)
+S9	Semaglutide	Vehicle (Water)	0 (0)
		2162	0 (0)
		4324	1 (0.5)
		5143	0 (0)
		CPA, 12.5	0 (0)

NQO: 4-Nitroquinoline 1-oxide; CPA: Cyclophosphamide

Experiment 2 - cells with structural aberrations. 20 hour treatment -S-9, 0 hour recovery (20+0)

Metabolic Activation	Test Article	Concentration (µg/ml)	Treatment 20+0 hours Total cells with aberrations including gaps (% with aberrations)	Treatment 20+0 hours Total cells with aberrations excluding gaps (% with aberrations)	Treatment 20+0 hours MIH †
-S9	Semaglutide	Vehicle (Water)	1 (0.5)	0 (0)	-
		3243	4 (2)	3 (1.5)	0
		4324	1 (0.5)	0 (0)	0
		5143	3 (1.5)	2 (1)	0
		NQO, 5.0	38*** (67)	37*** (65)	-

* $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$ vs. control; † Mitotic inhibition (%); NQO: 4-Nitroquinoline 1-oxide

Experiment 2 - cells with numerical aberrations. 20 hour treatment -S-9, 0 hour recovery (20+0)

Metabolic Activation	Test Article	Concentration (µg/ml)	Treatment 20+0 hours Total cells with aberrations (% with aberrations)
-S9	Semaglutide	Vehicle (Water)	1(0.5)
		3243	1 (0.5)
		4324	1 (0.5)
		5143	1 (0.5)
		NQO, 5.0	0 (0)

NQO: 4-Nitroquinoline 1-oxide

Experiment 2 - cells with structural aberrations. 3 hour treatment +S-9, 17 hour recovery (3+17)

Metabolic Activation	Test Article	Concentration (µg/ml)	Treatment 3+17 hours Cells with aberrations including gaps Total (% with aberrations)	Treatment 3+17 hours Cells with aberrations excluding gaps Total (% with aberrations)	Treatment 3+17 hours MIH †
+S9	Semaglutide	Vehicle (Water)	2 (1)	1 (0.5)	-
		3243	3 (1.5)	1 (0.5)	0
		4324	9 (4.5)	4 (2)	0
		5143	9 (4.5)	6 (3)	0
		CPA, 12.5	38*** (47)	35*** (43)	-

* p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001 vs. control; † Mitotic inhibition (%); CPA = Cyclophosphamide

Experiment 2 - cells with numerical aberrations. 3 hour treatment +S-9, 17 hour recovery (3+17)

Metabolic Activation	Test Article	Concentration (µg/ml)	Treatment 3+17 hours Total cells with aberrations (% with aberrations)
+S9	Semaglutide	Vehicle (Water)	1 (0.5)
		3243	1 (0.5)
		4324	0 (0)
		5143	1 (0.5)
		CPA, 12.5	0 (0)

CPA = Cyclophosphamide

2.6.7.8.D 遺伝子組換え品：ヒト末梢血リンパ球を用いた染色体異常試験

Study ID: 210194

<table>
<tr><td>Test for: Induction of chromosome aberrations</td><td>No. of Independent Assays: 2</td><td>Location in CTD: 4.2.3.3.1-4</td></tr>
<tr><td>Strains: Human peripheral blood lymphocytes from male donors</td><td>No. of Replicate Cultures: 2</td><td rowspan="3">GLP Compliance: Yes</td></tr>
<tr><td>Metabolizing System: Aroclor 1254-induced rat liver (S-9)</td><td>No. of Cells Analyzed/Culture: 100 (from each replicate where appropriate)</td></tr>
<tr><td colspan="2">Vehicles:
For Test Article: Purified water
For Positive Controls: Dimethyl sulphoxide (DMSO)</td></tr>
<tr><td colspan="2">Treatment:
Experiment 1: 3-hour exposure +/- S-9, 17 hour recovery, harvest 20-hour after start of exposure.
Experiment 2: 20-hour exposure - S-9, 3-hour exposure + S-9, 17 hour recovery, harvest 20-hour after start of exposure.
Maximum practicable concentration = 5000 μg/mL.</td><td>Date of Treatment: August 2010</td></tr>
<tr><td colspan="3">Cytotoxic Effects: None</td></tr>
<tr><td colspan="3">Genotoxic Effects: None</td></tr>
<tr><td colspan="3">Brief conclusion: Recombinant semaglutide did not induce chromosome aberrations in cultured human peripheral blood lymphocytes when tested at concentrations up to 5000 μg/mL in both the absence and presence of a rat metabolic activation system (S-9).</td></tr>
<tr><td colspan="3">In the original report, semaglutide produced by the recombinant method is also referred to as semi-recombinant semaglutide. For consistency across all summary documentation semaglutide manufactured by this method is only referred to as recombinant semaglutide.</td></tr>
</table>

Experiment 1 - cells with structural aberrations. 3 hour treatment ±S-9, 17 hour recovery (3+17)

Metabolic Activation	Test Article	Concentration (µg/ml)	Treatment 3+17 hours Total cells with aberrations including gaps (% with aberrations)	Treatment 3+17 hours Total cells with aberrations excluding gaps (% with aberrations)	Treatment 3+17 hours MIH †
-S9	Semaglutide	Vehicle (Water)	4 (2)	3 (1.5)	-
		3500	0 (0)	0 (0)	0
		4500	1 (0.5)	1 (0.5)	16
		5000	0 (0)	0 (0)	23
		NQO, 2.5	36*** (23)	36*** (23)	-
+S9	Semaglutide	Vehicle (Water)	2 (1)	1 (0.5)	-
		4000	1 (0.5)	0 (0)	0
		4500	0 (0)	0 (0)	0
		5000	2 (1)	1 (0.5)	0
		CPA, 12.5	40*** (54)	40*** (54)	-

* $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$ vs. control; † Mitotic inhibition (%); NQO = 4-Nitroquinoline 1-oxide; CPA: Cyclophosphamide

Experiment 1 - cells with numerical aberrations. 3 hour treatment ±S-9, 17 hour recovery (3+17)

Metabolic Activation	Test Article	Concentration (µg/ml)	Treatment 3+17 hours Total cells with aberrations (% with aberrations)
-S9	Semaglutide	Vehicle (Water)	0 (0)
		3500	2 (1)
		4500	0 (0)
		5000	1 (0.5)
		NQO, 2.5	3 (1.9)
+S9	Semaglutide	Vehicle (Water)	4 (2)
		4000	1 (0.5)
		4500	2 (1)
		5000	3 (1.5)
		CPA, 12.5	1 (1.3)

NQO = 4-Nitroquinoline 1-oxide; CPA: Cyclophosphamide

Experiment 2 - cells with structural aberrations. 20 hour treatment -S-9, 0 hour recovery (20+0)

Metabolic Activation	Test Article	Concentration (µg/ml)	Treatment 20+0 hours Total cells with aberrations including gaps (% with aberrations)	Treatment 20+0 hours Total cells with aberrations excluding gaps (% with aberrations)	Treatment 20+0 hours MIH †
-S9	Semaglutide	Vehicle (Water)	1 (0.5)	1 (0.5)	-
		3000	1 (0.5)	0 (0)	0
		4000	1 (0.5)	0 (0)	0
		5000	4 (2)	2 (1)	0
		NQO, 2.5	41*** (27)	39*** (26)	-

* p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001 vs. control; † Mitotic inhibition (%); NQO: 4-Nitroquinoline 1-oxide

Experiment 2 - cells with numerical aberrations. 20 hour treatment -S-9, 0 hour recovery (20+0)

Metabolic Activation	Test Article	Concentration (µg/ml)	Treatment 20+0 hours Total cells with aberrations (% with aberrations)
-S9	Semaglutide	Vehicle (Water)	1 (0.5)
		3000	3 (1.5)
		4000	2 (1)
		5000	3 (1.5)
		NQO, 2.5	2 (1.3)

NQO: 4-Nitroquinoline 1-oxide

Experiment 2 - cells with structural aberrations. 3 hour treatment +S-9, 17 hour recovery (3+17)

Metabolic Activation	Test Article	Concentration (µg/ml)	Treatment 3+17 hours Cells with aberrations including gaps Total (% with aberrations)	Treatment 3+17 hours Cells with aberrations excluding gaps Total (% with aberrations)	Treatment 3+17 hours MIH †
+S9	Semaglutide	Vehicle (Water)	1 (0.5)	1 (0.5)	-
		3000	3 (1.5)	2 (1)	0
		4000	2 (1)	1 (0.5)	0
		5000	2 (1)	2 (1)	0
		CPA, 6.25	42*** (35)	40*** (34)	-

* p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001 vs. control; † Mitotic inhibition (%); CPA: Cyclophosphamide

Experiment 2 - cells with numerical aberrations. 3 hour treatment +S-9, 17 hour recovery (3+17)

Metabolic Activation	Test Article	Concentration (µg/ml)	Treatment 3+17 hours Total cells with aberrations (% with aberrations)
+S9	Semaglutide	Vehicle (Water)	2 (1)
		3000	1 (0.5)
		4000	3 (1.5)
		5000	3 (1.5)
		CPA, 6.25	0 (0)

CPA: Cyclophosphamide

2.6.7.9 遺伝毒性 *in vivo*

Test Article: Semaglutide

セマグルチド投与ラットの骨髄を用いた小核試験		**Study ID: 206409**
Test for: Induction of micronuclei in the bone marrow of treated rats	**Treatment Schedule:** One administration.	**Location in CTD:** 4.2.3.3.2-1
Species/Strain: Sprague Dawley Crl:CD (SD) rats	**Sampling Time:** Bone marrow was sampled 24 or 48 hours after administration. 24 hours after for Cyclophosphamide (CPA) positive control groups	**GLP Compliance:** Yes
Age: 8 weeks	**Method of Administration:** Subcutaneous injection for Semaglutide. Oral gavage and subcutaneous injection for CPA at 20 and 25 mg/kg respectively.	
Cells Evaluated: polychromatic erythrocytes (PCE)	**Vehicle/Formulation:** Disodium hydrogen phosphate dihydrate 1.42 mg/mL, propylene glycol 14 mg/mL, phenol 5.5 mg/mL, water for injection 1 mL, pH 7.4	**Date of Treatment:** November 2006

No. of Cells Analysed/Animal: at least 2000 PCE

Special Features: None

Toxic/Cytotoxic Effects: Clinical signs including chromodacryorrhea, areas of red/brown staining around the snout were noted at dose levels of 1.875 mg/kg and above in addition to lethargy at 3.75 mg/kg and above. Semaglutide was noted to affect body weight gains such that group mean body weight losses of 13% and 12% were noted for the 7.5 mg/kg dose group (at 24 and 48 hour sample times, respectively).

Genotoxic Effects: None

Evidence of Exposure: Plasma analysis confirmed systemic exposure of semaglutide at a dose level of 7.5 mg/kg. At 7.5 mg/kg, individual plasma concentrations of synthetic semaglutide ranged from 3414 to 5685 nmol/L .

Brief conclusion:

Synthetic semaglutide did not induce micronuclei in the polychromatic erythrocytes of the bone marrow of male rats treated up to 7.5 mg/kg (an estimated maximum tolerated dose in the rat).

Summary of group mean data

Test Article	Dose (mg/kg)	No. of Animals	Sampling Time (hours)	Group Mean % PCE	Group Mean % Micronucleated PCE (±SD)	Plasma concentration (mean nmol/L)
Vehicle	0	6 M	24	42.52	0.06 ± 0.07	
Untreated controls	0	6 M	24	51.00	0.10 ± 0.10	-
Semaglutide	1.875	6 M	24	51.30	0.08 ± 0.09	-
Semaglutide	3.75	6 M	24	47.83	0.11 ± 0.09	-
Semaglutide	7.5	6 M	24	46.17	0.04 ± 0.06	4534 (4 hour sample)
CPA+	20	6 M	24	41.83	2.48 ± 0.35 ***	-
CPA++	25	6 M	24	45.75	2.97 ± 0.44 ***	-
Vehicle	0	6 M	48	46.22	0.07 ± 0.06	-
Semaglutide	7.5	6 M	48	46.60	0.07 ± 0.07	-

+ = Positive control cyclophosphamide (CPA). Administered as a single dose (subcutaneous injection)
++ = Positive control cyclophosphamide (CPA). Administered as a single dose (oral by gavage)
2 x 2 Contingency Significance:
* = $p<0.05$, ** = $p<0.01$, *** = $p<0.001$;
M = Male; SD = Standard deviation; PCE = polychromatic erythrocytes

2.6.7.10 がん原性試験

Test Article: Semaglutide

2.6.7.10.A マウスを用いた 104 週間反復皮下投与がん原性試験

Study ID: 207362

Species/Strain: Mouse/CD-1 (Crl: CD1 (ICR) (CD-1))	**Duration of Dosing:** 104 Weeks	**Location in CTD:** 4.2.3.4.1-1
Initial Age: 36 to 42 days at dosing start	**Vehicle/Formulation:** 1.42 mg/mL disodium hydrogen phosphate dihydrate,14.0 mg/mL propylene glycol, 5.5 mg/mL phenol and water for injection, pH 7.4	**Method of Administration:** Subcutaneous injection
Date of First Dose: 22 February 2008	**Treatment of Controls:** Vehicle	**GLP Compliance:** Yes

Parameters collected: Viability, Clinical Condition, Body Weight, Food Consumption, Haematology, Toxicokinetics, Antibody Assessment, Palpation of Masses, Macropathology, Histopathology.

Basis for High-Dose Selection: Maximum Tolerated Dose based on results from 13-week toxicity study in CD-1 mice (Novo Nordisk Ref. No.: 206663). Separate dose levels for males and females as the females appeared more sensitive to the effect on body weight than the males.

Nominal Dose Levels: Males: 0, 0.3, 1.0 and 3.0 mg/kg/day. Females: 0, 0.1, 0.3 and 1.0 mg/kg/day

NOAEL: Not established

Brief conclusion: Semaglutide was well tolerated and had no effect on survival but caused a range of pharmacologically mediated effects, including reduced body weight gain and food consumption, reduced red blood cell count, dilated lumens of Brunner's glands of the duodenum, and hyperplastic and neoplastic C-cell changes in the thyroid gland. The changes in the Brunner's glands were not associated with any inflammation or cellular damage neither in the Brunner's glands nor in the intestinal mucosa, and since there were no signs of progression to neoplasia, the finding was not considered adverse. Macropathology revealed increased incidence of distended gall bladder and of abnormal content in the gall bladder. As there were no associated histopathological changes or any signs of compromised bile efflux, and as the changes are considered to be secondary to low food consumption, the gall bladder changes were considered to be non-adverse. Since the hyperplastic and neoplastic C-cell changes of the thyroid were seen in all treated groups, a NOAEL could not be established.

Nominal Dose (mg/kg/day)	0 (Control)	0.3	1.0	3.0	0 (Control)	0.1	0.3	1.0
Initial Number of Animals								
Main	**M: 60**	**M: 60**	**M: 60**	**M: 60**	**F: 60**	**F: 60**	**F: 60**	**F: 60**
Satellite	**M: 12**	**M: 12**	**M: 12**	**M: 12**	**F: 12**	**F: 12**	**F: 12**	**F: 12**
Toxicokinetics (AUC_{0-24h} (nmol*h/L))								
Day 1	N/A	2490	7290	11000	N/A	750	3020	6920
Week 52	N/A	3770	11300	41900	N/A	1190	3590	12800
Group Distribution of Mortality (main study)								
Number of decedents	35[a]	17	26[b]	25	31	37	36	36
Number of survivors	25	43	34	35	29	23	24	24
% survival	42	72	57	58	48	38	40	40
Noteworthy Findings								
Clinical signs (main study animals)[c]								
Thin	3	3	4	2	2	7	6	11
Bodyweight (main study animals)								
Terminal body weight (g)	48.6	47.3	45.5	45.8	43.2	41.0	42.8	41.5
Bodyweight gain (main study animals)								
Day 1 to Week 52 (g)	19.8	16.8**	17.7**	16.3**	19.5	16.7**	15.5**	14.3**
Week 52 to 104 (g)	-2.1	-0.8	-1.8	0.1*	1.0	-0.3	3.2	2.8
Day 1 to Week 104 (g)	17.6	16.4	15.4	15.9	19.7	16.6	19.0	17.1
Day 1 to Week 104 (% difference from control)	-	-7	-13	-10	-	-16	-4	-13
Food consumption (main study animals)								
Week 1 (g/animal/week)	36	27	25	22	28	22	20	18
Mean Week 1-52 (g/animal/week)	38	36*	35**	32**	33	31*	32*	30**
Mean Week 1-104 (g/animal/week)	38	36*	35**	33**	33	32	32	31**
Haematology Week 104 (main study animals)								
Red Blood Cells (*10^{12}/L)								

Nominal Dose (mg/kg/day)	0 (Control)	0.3	1.0	3.0	0 (Control)	0.1	0.3	1.0
Initial Number of Animals								
Main	**M: 60**	**M: 60**	**M: 60**	**M: 60**	**F: 60**	**F: 60**	**F: 60**	**F: 60**
Satellite	**M: 12**	**M: 12**	**M: 12**	**M: 12**	**F: 12**	**F: 12**	**F: 12**	**F: 12**
Week 104	8.33	7.44*	7.85*	7.46*	7.62	7.13	6.64*	6.97*
Anti-semaglutide antibodies								
Number of animals with antibodies[f]	0	0	0	0	0	0	1	1
Macropathology								
Gall bladder (number of animals examined)	60	60	60	60	60	60	60	60
Distended	6	24	24	22	17	29	27	31
Abnormal content	3	20	14	15	1	12	7	14
Thyroid gland (number of animals examined)	60	60	60	60	60	60	60	60
Mass(es)	0	4	7	10	0	2	3	3
Enlarged	0	0	1	1	0	0	1	2
Unilaterally enlarged	0	3	1	2	0	0	1	1
Histopathology								
Neoplastic changes (treatment-related tumours)								
Thyroid (number of tissues examined)	60	60	59	59	58	59	58	60
B-C-cell adenoma	0	24[§]	23[§]	18[§]	0	16[§]	20[§†]	24[§##]
M-C-cell carcinoma	0	2	2	2	0	1	2	2
Combined incidence of C-cell neoplasias[e]	0	24§	24[§†]	20[§#]	0	16[§]	21[§†]	24[§##]
Thymus (number of tissues examined)	52	57	55	55	57	55	57	52
B-C-cell adenoma (ectopic thyroid tissue)	0	1	0	0	0	0	1	0
Deep cervical lymph nodes (number of tissues examined)	0	3	5	6	0	2	1	3
N-C-cell carcinoma	0	0	0	0	0	1	0	1
Neoplastic changes (non-treatment-related tumours)								
Aorta Thoracic (number of tissues examined)	59	59	58	60	59	58	58	57
N-Lymphoma	1	0	0	0	2	3	3	0

Nominal Dose (mg/kg/day)	0 (Control)	0.3	1.0	3.0	0 (Control)	0.1	0.3	1.0
Initial Number of Animals								
Main	**M: 60**	**M: 60**	**M: 60**	**M: 60**	**F: 60**	**F: 60**	**F: 60**	**F: 60**
Satellite	**M: 12**	**M: 12**	**M: 12**	**M: 12**	**F: 12**	**F: 12**	**F: 12**	**F: 12**
Trachea (number of tissues examined)	60	59	59	59	60	60	57	60
N-Lymphoma	2	0	0	0	1	0	3	0
Lung + Bronchi (number of tissues examined)	60	60	60	60	60	60	60	60
B-Bronchioloalveolar adenoma	21	12	19	11	8	8	4	7
M-Bronchioloalveolar adenocarcinoma	4	6	9	5	4	2	0	2
N-Cholangiocarcinoma	0	0	0	0	0	0	1	0
N-Fibrosarcoma	0	0	0	0	0	0	1	0
N-Histiocytic Sarcoma	0	0	0	0	1	3	1	1
N-Leukaemia	1	0	0	0	1	0	0	0
N-Lymphoma	4	1	2	1	5	7	6	7
N-Mammary adenocarcinoma	0	0	0	0	1	0	0	0
Liver (number of tissues examined)	60	60	60	60	60	60	60	60
B-Haemangioma	1	1	0	1	0	1	0	0
B-Hepatocellular adenoma	7	8	2	3	0	1	0	0
M-Cholangiocarcinoma	0	0	0	0	0	0	1	0
M-Haemangiosarcoma	0	0	1	1	0	0	0	0
N-Bronchioloalveolar adenocarcinoma	1	0	0	0	0	0	0	0
N-Fibrosarcoma	0	0	0	0	0	0	1	0
N-Hemangiosarcoma	0	0	0	0	0	0	1	0
N-Histiocytic Sarcoma	0	0	0	0	1	5	2	2
N-Leukaemia	1	0	0	0	1	0	1	1
N-Lymphoma	5	1	3	2	9	9	5	5
Kidney (number of tissues examined)	60	60	60	60	60	60	60	60
M-Haemangiosarcoma	0	0	0	1	0	0	0	0
N-Histiocytic sarcoma	0	0	0	0	0	2	2	0
N-Leukaemia	1	0	0	0	1	0	1	1

Nominal Dose (mg/kg/day)	0 (Control)	0.3	1.0	3.0	0 (Control)	0.1	0.3	1.0
Initial Number of Animals								
Main	**M: 60**	**M: 60**	**M: 60**	**M: 60**	**F: 60**	**F: 60**	**F: 60**	**F: 60**
Satellite	**M: 12**	**M: 12**	**M: 12**	**M: 12**	**F: 12**	**F: 12**	**F: 12**	**F: 12**
N-Lymphoma	3	1	3	1	6	3	6	7
Urinary Bladder (number of tissues examined)	59	53	60	58	57	53	58	57
B-Mesenchymal tumour	1	0	0	0	0	1	0	0
M-Sarcoma NOS	1	0	0	0	0	0	0	0
N-Leukaemia	0	0	1	0	1	0	0	0
N-Lymphoma	4	1	2	0	4	2	2	4
Heart (number of tissues examined)	60	60	60	60	60	60	60	60
N-Bronchioloalveolar adenocarcinoma	2	1	3	0	0	0	0	0
N-Histiocytic sarcoma	0	0	0	0	1	0	0	0
N-Lymphoma	1	1	0	0	2	1	1	3
Spleen (number of tissues examined)	60	60	60	60	60	60	60	60
B-Haemangioma	0	1	0	0	0	0	0	0
M-Haemangiosarcoma	0	0	0	0	0	0	2	0
N-Fibrosarcoma	0	0	0	0	0	0	1	0
N-Histiocytic sarcoma	0	0	0	0	0	0	0	1
N-Leukaemia	1	0	0	0	1	0	1	1
N-Lymphoma	4	2	3	2	7	7	7	7
N-Malignant mast cell tumour	0	1	0	0	0	0	0	0
Pancreas (number of tissues examined)	60	60	60	60	60	60	60	60
B-Islet cell adenoma	0	1	0	1	1	0	1	2
N-Bronchioloalveolar adenocarcinoma	0	1	0	0	0	0	0	0
N-Haemangiosarcoma	0	0	1	0	0	0	0	0
N-Histiocytic sarcoma	0	0	0	0	0	0	1	1
N-Leukaemia	0	0	0	0	1	0	1	0
N-Lymphoma	1	2	1	1	4	5	4	5

Nominal Dose (mg/kg/day)	0 (Control)	0.3	1.0	3.0	0 (Control)	0.1	0.3	1.0
Initial Number of Animals								
Main	**M: 60**	**M: 60**	**M: 60**	**M: 60**	**F: 60**	**F: 60**	**F: 60**	**F: 60**
Satellite	**M: 12**	**M: 12**	**M: 12**	**M: 12**	**F: 12**	**F: 12**	**F: 12**	**F: 12**
Lymph node mesenteric (number of tissues examined)	60	59	60	58	60	60	60	59
B-Haemangioma	0	2	1	1	4	0	0	0
M-Haemangiosarcoma	0	0	0	1	0	0	0	0
N-Haemangiosarcoma	0	0	0	0	0	0	1	0
N-Histiocytic sarcoma	0	0	0	0	1	1	0	0
N-Leukaemia	1	0	0	0	1	0	1	0
N-Lymphoma	4	3	4	3	7	7	9	9
Thymus (number of tissues examined)	52	57	55	55	57	55	57	52
B-Thymoma (epithelial)	0	0	0	0	0	0	1	0
N-Bronchioloalveolar adenocarcinoma	0	1	2	0	0	0	0	0
N-Fibrosarcoma	0	0	0	0	0	0	1	0
N-Histiocytic sarcoma	0	0	0	0	0	0	0	1
N-Leukaemia	1	0	0	0	1	0	0	1
N-Lymphoma	2	3	3	1	8	4	5	5
Thyroid (number of tissues examined)	60	60	59	59	58	59	58	60
B-Follicular cell adenoma	0	0	0	1	0	0	0	0
N-Lymphoma	1	0	0	0	2	1	3	3
Parathyroid (number of tissues examined)	48	44	45	35	46	43	43	42
N-Lymphoma	1	0	0	0	0	0	0	0
Adrenal (number of tissues examined)	59	59	58	60	60	59	59	59
B-Cortical adenoma	2	1	0	1	0	0	0	0
B-Phaeochromocytoma	1	1	0	0	0	1	0	0
B-Subcapsular cell adenoma	3	1	1	2	3	1	1	0
M-Subcapsular cell carcinoma	1	0	0	0	0	0	0	0
N-Leukaemia	0	0	0	0	1	0	0	0
N-Lymphoma	2	0	2	0	2	2	2	1

Nominal Dose (mg/kg/day)	**0 (Control)**	**0.3**	**1.0**	**3.0**	**0 (Control)**	**0.1**	**0.3**	**1.0**
Initial Number of Animals								
Main	**M: 60**	**M: 60**	**M: 60**	**M: 60**	**F: 60**	**F: 60**	**F: 60**	**F: 60**
Satellite	**M: 12**	**M: 12**	**M: 12**	**M: 12**	**F: 12**	**F: 12**	**F: 12**	**F: 12**
Gall Bladder (number of tissues examined)	60	59	60	59	60	58	59	60
B-Adenoma	1	2	0	0	0	0	1	0
N-Histiocytic sarcoma	0	0	0	0	0	1	0	0
N-Leukaemia	0	0	0	0	1	0	0	0
N-Lymphoma	2	1	2	0	2	1	0	1
Pituitary (number of tissues examined)	58	58	58	56	56	57	56	55
B-Adenoma, pars distalis	0	0	0	0	2	1	1	1
N-Lymphoma	1	0	1	0	0	1	1	0
Lymph node mandibular (number of tissues examined)	59	55	60	58	59	58	59	58
N-Histiocytic sarcoma	0	0	0	0	0	0	0	1
N-Leukaemia	1	0	0	0	1	0	1	0
N-Lymphoma	5	2	3	1	8	6	8	7
Tongue (number of tissues examined)	60	60	60	60	59	60	60	60
N-Lymphoma	0	0	0	1	1	0	1	0
Skeletal muscle (number of tissues examined)	60	60	60	60	60	60	60	60
N-Broncholoalveolar adenocarcinoma	0	0	1	0	0	0	0	0
N-Lymphoma	1	2	1	0	1	1	2	3
Stomach (number of tissues examined)	60	60	60	60	60	60	60	59
B-Adenoma	1	0	1	0	0	0	0	0
M-Neuroendocrine carcinoma	0	0	0	0	0	0	1	0
N-Bronchioloalveolar adenocarcinoma	1	1	0	0	0	0	0	0
N-Haemangiosarcoma	0	0	1	0	0	0	0	0
N-Histiocytic sarcoma	0	0	0	0	0	1	0	1

Nominal Dose (mg/kg/day)	0 (Control)	0.3	1.0	3.0	0 (Control)	0.1	0.3	1.0
Initial Number of Animals								
Main	**M: 60**	**M: 60**	**M: 60**	**M: 60**	**F: 60**	**F: 60**	**F: 60**	**F: 60**
Satellite	**M: 12**	**M: 12**	**M: 12**	**M: 12**	**F: 12**	**F: 12**	**F: 12**	**F: 12**
N-Leukaemia	2	0	0	0	1	0	1	0
N-Lymphoma	2	2	3	2	4	5	5	5
Duodenum (number of tissues examined)	59	60	58	60	60	60	59	59
M-Sarcoma NOS	0	1	0	0	0	0	0	0
N-Leukaemia	0	0	0	0	1	0	0	0
N-Lymphoma	1	1	2	0	0	1	0	0
Ileum (number of tissues examined)	60	60	60	60	60	60	60	60
N-Fibrosarcoma	0	0	0	0	0	0	1	0
N-Leukaemia	0	0	0	0	1	0	0	0
N-Lymphoma	1	0	1	0	0	1	0	0
Peyer’s Patch (number of tissues examined)	54	54	55	59	58	58	54	56
N-Leukaemia	1	0	0	0	1	0	0	0
N-Lymphoma	2	0	3	0	2	2	3	0
Colon (number of tissues examined)	60	60	60	60	60	60	60	60
N-Lymphoma	1	0	0	0	0	1	1	1
Oesophagus (number of tissues examined)	60	60	60	60	60	60	60	59
N-Leukaemia	1	0	0	0	0	0	0	0
N-Lymphoma	1	0	0	0	0	0	0	0
Jejunum (number of tissues examined)	60	60	60	60	60	60	60	60
M-Adenocarcinoma	0	1	0	1	0	0	0	0
N-Leukaemia	0	0	0	0	1	0	0	0
N-Lymphoma	1	0	2	0	0	0	0	0
Caecum (number of tissues examined)	60	60	60	60	60	60	60	60

Nominal Dose (mg/kg/day)	0 (Control)	0.3	1.0	3.0	0 (Control)	0.1	0.3	1.0
Initial Number of Animals								
Main	**M: 60**	**M: 60**	**M: 60**	**M: 60**	**F: 60**	**F: 60**	**F: 60**	**F: 60**
Satellite	**M: 12**	**M: 12**	**M: 12**	**M: 12**	**F: 12**	**F: 12**	**F: 12**	**F: 12**
M-Adenocarcinoma	0	1	0	0	0	0	0	1
N-Lymphoma	2	1	0	0	0	1	2	0
Rectum (number of tissues examined)	60	60	60	60	60	60	60	60
N-Leukaemia	0	0	0	01	1	0	1	0
N-Lymphoma	1	0	1	1	0	0	0	0
Mammary (number of tissues examined)	59	60	59	58	56	57	56	60
B-Mammary adenoma	0	0	0	0	0	1	1	0
M-Adenoacanthoma	0	0	0	0	2	1	0	0
M-Mammary adenocarcinoma	0	0	0	0	7	2	3	1
N-Leukaemia	0	0	0	0	1	0	0	0
N-Lymphoma	1	0	3	0	2	5	3	6
Skin (number of tissues examined)	59	60	59	59	57	57	59	60
B-Keratoacanthoma	0	0	0	0	0	1	1	0
M-Fibrosarcoma	0	1	0	1	2	0	0	0
M-Haemangiosarcoma	0	0	0	0	0	0	0	1
M-Leiomyosarcoma	0	1	0	0	0	0	0	0
M-Osteosarcoma	0	0	0	0	1	0	0	0
M-Sarcoma NOS	0	0	0	0	1	0	0	1
N-Leukaemia	0	0	0	0	1	0	0	0
N-Lymphoma	1	1	0	1	4	0	2	2
Lachrymal gland (number of tissues examined)	60	60	60	60	60	59	60	60
N-Leukaemia	1	0	0	0	1	0	1	0
N-Lymphoma	4	2	2	0	5	6	6	3
Eye (number of tissues examined)	60	60	60	60	60	60	60	60
N-Adenocarcinoma	0	0	0	0	0	0	0	1

Nominal Dose (mg/kg/day)	0 (Control)	0.3	1.0	3.0	0 (Control)	0.1	0.3	1.0
Initial Number of Animals								
Main	**M: 60**	**M: 60**	**M: 60**	**M: 60**	**F: 60**	**F: 60**	**F: 60**	**F: 60**
Satellite	**M: 12**	**M: 12**	**M: 12**	**M: 12**	**F: 12**	**F: 12**	**F: 12**	**F: 12**
N-Leukaemia	1	0	0	0	0	0	0	0
N-Lymphoma	0	1	1	0	0	0	2	1
Harderian gland (number of tissues examined)	60	60	60	60	60	60	60	60
B-Adenoma	5	4	3	3	4	2	5	7
M-Adenocarcinoma	1	0	1	1	0	0	0	3
N-Leukaemia	1	0	0	0	1	0	0	0
N-Lymphoma	1	1	2	0	2	2	3	2
Sternum + Marrow (number of tissues examined)	60	60	59	60	60	60	60	60
N-Histiocytic sarcoma	0	0	0	0	0	0	0	1
N-Leukaemia	1	0	0	0	1	0	1	0
N-Lymphoma	2	1	3	0	4	5	4	3
N-Malignant mast cell tumour	0	1	0	0	0	0	0	0
Femur including joint (number of tissues examined)	60	60	60	60	60	60	60	60
M-Osteosarcoma	0	0	1	0	0	0	0	0
N-Histiocytic sarcoma	0	0	0	0	0	0	0	1
N-Leukaemia	1	0	0	0	1	0	1	0
N-Lymphoma	2	1	3	0	3	4	5	2
N-Malignant mast cell tumour	0	1	0	0	0	0	0	0
Sciatic nerve (number of tissues examined)	60	60	60	60	60	59	60	59
N-Leukaemia	1	0	0	0	1	0	0	0
N-Lymphoma	1	0	0	0	0	1	2	0
Brain (number of tissues examined)	59	60	60	60	60	60	60	60
B-Glioma	0	1	0	0	0	0	0	0
M-Astrocytoma	0	0	0	0	0	1	0	0
M-Meningeal sarcoma	0	0	0	1	0	0	0	0

Nominal Dose (mg/kg/day)	0 (Control)	0.3	1.0	3.0	0 (Control)	0.1	0.3	1.0
Initial Number of Animals								
Main	**M: 60**	**M: 60**	**M: 60**	**M: 60**	**F: 60**	**F: 60**	**F: 60**	**F: 60**
Satellite	**M: 12**	**M: 12**	**M: 12**	**M: 12**	**F: 12**	**F: 12**	**F: 12**	**F: 12**
N-Histiocytic sarcoma	0	0	0	0	0	0	0	1
N-Leukaemia	1	0	0	0	1	0	0	0
N-Lymphoma	0	0	1	0	0	0	0	1
Spinal chord, cervical (number of tissues examined)	60	60	60	60	60	60	60	60
N-Lymphoma	0	0	0	0	0	0	0	2
Spinal chord, thoracic (number of tissues examined)	60	59	60	60	60	60	60	60
N-Leukaemia	1	0	0	0	0	0	0	0
N-Lymphoma	0	0	0	0	0	0	0	1
Spinal chord, lumbar (number of tissues examined)	60	60	60	60	60	60	60	60
N-Lymphoma	0	0	0	0	0	0	0	1
Prostate (number of tissues examined)	59	60	60	59	N/A	N/A	N/A	N/A
B-Decidual reaction	1	0	0	0	N/A	N/A	N/A	N/A
N-Leukaemia	1	0	0	0	N/A	N/A	N/A	N/A
N-Lymphoma	4	2	3	1	N/A	N/A	N/A	N/A
Seminal vesicle (number of tissues examined)	60	60	60	59	N/A	N/A	N/A	N/A
B-Adenoma	0	0	1	0	N/A	N/A	N/A	N/A
N-Haemangiosarcoma	0	0	1	0	N/A	N/A	N/A	N/A
N-Leukaemia	1	0	0	0	N/A	N/A	N/A	N/A
N-Lymphoma	3	2	2	1	N/A	N/A	N/A	N/A
					N/A	N/A	N/A	N/A
Epididymides (number of tissues examined)	60	60	60	60	N/A	N/A	N/A	N/A
N-Leukaemia	1	0	0	0	N/A	N/A	N/A	N/A
N-Lymphoma	3	1	2	0	N/A	N/A	N/A	N/A
Testes (number of tissues examined)	60	60	60	60	N/A	N/A	N/A	N/A

Nominal Dose (mg/kg/day)	0 (Control)	0.3	1.0	3.0	0 (Control)	0.1	0.3	1.0
Initial Number of Animals								
Main	**M: 60**	**M: 60**	**M: 60**	**M: 60**	**F: 60**	**F: 60**	**F: 60**	**F: 60**
Satellite	**M: 12**	**M: 12**	**M: 12**	**M: 12**	**F: 12**	**F: 12**	**F: 12**	**F: 12**
B-Adenoma, rete testis	0	0	1	0	N/A	N/A	N/A	N/A
B-Haemangioma	0	0	0	2	N/A	N/A	N/A	N/A
B-Interstitial (Leydig) cell adenoma	3	4	0	2	N/A	N/A	N/A	N/A
Ovary (number of tissues examined)	N/A	N/A	N/A	N/A	60	59	59	60
B-Cystadenoma	N/A	N/A	N/A	N/A	1	1	1	0
B-Granulosa cell tumour	N/A	N/A	N/A	N/A	1	0	1	0
B-Haemangioma	N/A	N/A	N/A	N/A	1	0	0	1
B-Luteoma	N/A	N/A	N/A	N/A	0	1	4	2
B-Sertoli cell like adenoma	N/A	N/A	N/A	N/A	1	0	1	0
B-Sex cord stromal mixed adenoma	N/A	N/A	N/A	N/A	0	1	0	0
B-Tubulostromal adenoma	N/A	N/A	N/A	N/A	2	1	2	0
M-Fibrosarcoma	N/A	N/A	N/A	N/A	0	0	1	0
M-Leiomyosarcoma	N/A	N/A	N/A	N/A	0	0	1	0
N-Histiocytic sarcoma	N/A	N/A	N/A	N/A	0	4	3	0
N-Leukaemia	N/A	N/A	N/A	N/A	1	0	0	0
N-Lymphoma	N/A	N/A	N/A	N/A	2	5	4	4
Uterus (number of tissues examined)	N/A	N/A	N/A	N/A	60	60	60	60
B-Deciduoma	N/A	N/A	N/A	N/A	0	0	1	0
B-Endometrial polyp	N/A	N/A	N/A	N/A	0	1	3	0
B-Haemangioma	N/A	N/A	N/A	N/A	1	1	1	1
B-Leiomyoma	N/A	N/A	N/A	N/A	3	3	4	4
M-Endometrial adenocarcinoma	N/A	N/A	N/A	N/A	0	1	0	0
M-Endometrial stromal cell sarcoma	N/A	N/A	N/A	N/A	0	1	1	2
M-Fibrosarcoma	N/A	N/A	N/A	N/A	1	0	1	0
M-Leiomyosarcoma	N/A	N/A	N/A	N/A	1	1	0	0
M-Malignant schwannoma	N/A	N/A	N/A	N/A	0	0	0	1
N-Histiocytic sarcoma	N/A	N/A	N/A	N/A	0	4	1	2
N-Leukaemia	N/A	N/A	N/A	N/A	1	0	0	0

Nominal Dose (mg/kg/day)	0 (Control)	0.3	1.0	3.0	0 (Control)	0.1	0.3	1.0
Initial Number of Animals								
Main	**M: 60**	**M: 60**	**M: 60**	**M: 60**	**F: 60**	**F: 60**	**F: 60**	**F: 60**
Satellite	**M: 12**	**M: 12**	**M: 12**	**M: 12**	**F: 12**	**F: 12**	**F: 12**	**F: 12**
N-Lymphoma	N/A	N/A	N/A	N/A	3	3	2	3
Uterine cervix (number of tissues examined)	N/A	N/A	N/A	N/A	60	59	58	60
B-Endometrial stromal polyp	N/A	N/A	N/A	N/A	3	1	1	0
B-Haemangioma	N/A	N/A	N/A	N/A	0	0	1	0
B-Leiomyoma	N/A	N/A	N/A	N/A	1	1	2	1
M-Leiomyosarcoma	N/A	N/A	N/A	N/A	1	0	0	0
N-Histiocytic sarcoma	N/A	N/A	N/A	N/A	0	0	1	0
N-Leukaemia	N/A	N/A	N/A	N/A	1	0	0	0
N-Lymphoma	N/A	N/A	N/A	N/A	4	3	3	1
Vagina (number of tissues examined)	N/A	N/A	N/A	N/A	59	59	58	60
N-Lymphoma	N/A	N/A	N/A	N/A	0	0	2	2
Larynx (number of tissues examined)	60	60	60	60	59	60	60	60
N-C-cell carcinoma	0	0	0	0	0	0	1	0
N-Lymphoma	1	1	2	0	2	1	2	1
Optic nerve (number of tissues examined)	57	59	60	59	60	59	59	58
N-Astrocytoma	0	0	0	0	0	1	0	0
N-Leukaemia	0	0	0	0	1	0	0	0
Treated site 1 (number of tissues examined)	60	60	60	60	60	60	60	60
M-Fibrosarcoma	0	0	1	0	0	0	0	0
N-Histiocytic sarcoma	0	0	0	0	0	1	0	0
N-Lymphoma	1	1	1	1	1	3	2	3
Treated site 2 (number of tissues examined)	60	60	60	60	60	60	60	60
N-Histiocytic sarcoma	0	0	0	0	0	1	0	0
N-Leukaemia	0	0	0	0	1	0	0	0

Nominal Dose (mg/kg/day)	0 (Control)	0.3	1.0	3.0	0 (Control)	0.1	0.3	1.0
Initial Number of Animals								
Main	**M: 60**	**M: 60**	**M: 60**	**M: 60**	**F: 60**	**F: 60**	**F: 60**	**F: 60**
Satellite	**M: 12**	**M: 12**	**M: 12**	**M: 12**	**F: 12**	**F: 12**	**F: 12**	**F: 12**
N-Lymphoma	1	1	2	0	2	3	3	4
Preputial gland (number of tissues examined)	60	60	60	60	N/A	N/A	N/A	N/A
N-Leukaemia	1	0	0	0	N/A	N/A	N/A	N/A
N-Lymphoma	2	0	3	2	N/A	N/A	N/A	N/A
Clitoral gland (number of tissues examined)	N/A	N/A	N/A	N/A	59	59	59	58
M-Adenocarcinoma	N/A	N/A	N/A	N/A	0	0	0	1
N-Leukaemia	N/A	N/A	N/A	N/A	1	0	0	0
N-Lymphoma	N/A	N/A	N/A	N/A	3	2	3	4
N-Mammary adenocarcinoma	N/A	N/A	N/A	N/A	1	0	0	0
Ureters (number of tissues examined)	58	60	58	60	60	59	58	60
N-Leukaemia	0	0	0	0	1	0	0	0
N-Lymphoma	1	0	1	0	3	5	5	2
Left lymph node, axillary (number of tissues examined)	58	59	58	58	58	55	52	56
N-Bronchioloalveolar adenocarcinoma	0	1	0	0	0	0	0	0
N-Histiocytic sarcoma	0	0	0	0	0	0	0	1
N-Leukaemia	1	0	0	0	1	0	1	0
N-Lymphoma	5	0	3	1	6	6	6	7
N-Malignant mast cell tumour	0	1	0	0	0	0	0	0
N-Mammary adenocarcionoma	0	0	0	0	1	0	0	0
Lymph node, mediastinal (number of tissues examined)	5	0	3	3	7	9	2	7
N-Fibrosarcoma	0	0	0	0	0	0	1	0
N-Histiocytic sarcoma	0	0	0	0	0	1	0	0
N-Leukaemia	1	0	0	0	1	0	0	0

Nominal Dose (mg/kg/day)	0 (Control)	0.3	1.0	3.0	0 (Control)	0.1	0.3	1.0
Initial Number of Animals								
Main	**M: 60**	**M: 60**	**M: 60**	**M: 60**	**F: 60**	**F: 60**	**F: 60**	**F: 60**
Satellite	**M: 12**	**M: 12**	**M: 12**	**M: 12**	**F: 12**	**F: 12**	**F: 12**	**F: 12**
N-Lymphoma	2	0	1	2	3	3	0	4
Lymph node, lumbar (number of tissues examined)	11	5	7	4	10	11	11	10
N-Histiocytic sarcoma	0	0	0	0	0	2	0	2
N-Leukaemia	1	0	0	0	0	0	1	1
N-Lymphoma	4	1	1	0	3	5	2	4
Lymph node, cisternal (number of tissues examined)	4	2	1	1	3	1	1	3
N-Lymphoma	3	1	0	1	1	1	1	3
Salivary gland (number of tissues examined)	60	60	60	60	60	59	59	58
N-Leukaemia	1	0	0	0	1	0	0	0
N-Lymphoma	2	2	3	0	4	4	6	3
Thorax (number of tissues examined)	5	0	4	0	4	5	3	7
M-Leiomyosarcoma	1	0	0	0	0	0	0	0
M-Osteosarcoma	0	0	0	0	1	0	0	1
N-Bronchioloalveolar adenocarcinoma	3	0	4	0	0	0	0	0
N-Histiocytic sarcoma	0	0	0	0	0	0	0	1
N-Lymphoma	1	0	0	0	1	3	2	4
Lymph node, renal (number of tissues examined)	4	3	4	2	5	6	10	10
B-Haemangioma	0	0	0	1	0	0	0	0
N-Histiocytic sarcoma	0	0	0	0	0	1	0	1
N-Leukaemia	1	0	0	0	1	0	0	1
N-Lymphoma	0	1	0	1	1	2	4	5
N-Subcapsular cell carcinoma	1	0	0	0	0	0	0	0
Haematopoietic tumour (number of tissues examined)	60	60	60	60	60	60	60	60
M-Histiocytic sarcoma	0	0	0	0	1	5	3	3

Nominal Dose (mg/kg/day)	0 (Control)	0.3	1.0	3.0	0 (Control)	0.1	0.3	1.0
Initial Number of Animals								
Main	**M: 60**	**M: 60**	**M: 60**	**M: 60**	**F: 60**	**F: 60**	**F: 60**	**F: 60**
Satellite	**M: 12**	**M: 12**	**M: 12**	**M: 12**	**F: 12**	**F: 12**	**F: 12**	**F: 12**
M-Malignant lymphoma	5	4	4	3	11	9	10	10
M-Malignant mast cell tumour	0	1	0	0	0	0	0	0
M-Myeloid cell leukaemia	1	0	0	0	1	0	1	1
Lymph node, bronchial (number of tissues examined)	0	1	4	0	9	1	4	2
N-Lymphoma	0	0	1	0	4	1	2	1
Adipose tissue (number of tissues examined)	1	3	5	3	6	6	8	6
N-Bronchioloalveolar adenocarcinoma	0	0	1	0	0	0	0	0
N-Fibrosarcoma	0	0	0	0	0	0	1	0
N-Haemangiosarcoma	0	0	1	0	0	0	0	0
N-Histocytic sarcoma	0	0	0	0	0	1	1	1
N-Lymphoma	0	0	1	2	3	0	3	2
Lymph node, pancreatic (number of tissues examined)	1	1	2	1	3	1	3	4
N-Histiocytic sarcoma	0	0	0	0	0	0	0	1
N-Leukaemia	0	0	0	0	1	0	1	0
N-Lymphoma	1	0	2	1	2	1	2	3
Tail (number of tissues examined)	2	1	0	1	1	0	3	3
B-Fibroma	0	0	0	0	0	0	0	1
M-Fibrosarcoma	0	0	0	0	0	0	1	0
M-Osteosarcoma	0	0	0	0	0	0	1	0
Lymph node, popliteal (number of tissues examined)	0	0	0	0	1	1	1	0
N-Lymphoma	0	0	0	0	1	0	1	0
Right Lymph node, axillary (number of tissues examined)	2	1	4	0	6	4	4	3
N-Leukaemia	0	0	0	0	0	0	1	0

Nominal Dose (mg/kg/day)	0 (Control)	0.3	1.0	3.0	0 (Control)	0.1	0.3	1.0
Initial Number of Animals								
Main	**M: 60**	**M: 60**	**M: 60**	**M: 60**	**F: 60**	**F: 60**	**F: 60**	**F: 60**
Satellite	**M: 12**	**M: 12**	**M: 12**	**M: 12**	**F: 12**	**F: 12**	**F: 12**	**F: 12**
N-Lymphoma	1	0	3	0	4	2	3	1
Lymph node, inguinal (number of tissues examined)	1	1	0	2	4	1	3	3
N-Lymphoma	1	0	0	1	3	1	2	3
Parotid, salivary gland (number of tissues examined)	0	0	0	0	1	1	0	0
N-Lymphoma	0	0	0	0	1	0	0	0
Pericardium (number of tissues examined)	0	0	0	0	1	0	0	1
N-Malignant lymphoma	0	0	0	0	1	0	0	1
Paws (number of tissues examined)	0	2	0	2	0	0	0	0
M-Fibrosarcoma	0	1	0	0	0	0	0	0
N-Fibrosarcoma	0	0	0	1	0	0	0	0
Bone (number of tissues examined)	1	1	1	0	1	1	0	0
N-Leukaemia	1	0	0	0	0	0	0	0
N-Lymphoma	0	0	1	0	0	0	0	0
Bulbo-urethral glands (number of tissues examined)	1	1	0	1	0	0	0	0
B-Cystadenoma/Cholesterol granuloma	0	1	0	0	0	0	0	0
Penis/Prepuce (number of tissues examined)	1	3	2	2	N/A	N/A	N/A	N/A
N-Lymphoma	1	0	0	0	N/A	N/A	N/A	N/A
Non-neoplastic changes								
Duodenum (number of tissues examined)	59	60	58	60	60	60	59	59
Brunner's glands, dilated glandular lumens[d]	13	31	36	31	6	26	28	36
Thyroid (number of tissues examined)	60	60	59	59	58	59	58	60

Nominal Dose (mg/kg/day)	0 (Control)	0.3	1.0	3.0	0 (Control)	0.1	0.3	1.0
Initial Number of Animals								
Main	**M: 60**	**M: 60**	**M: 60**	**M: 60**	**F: 60**	**F: 60**	**F: 60**	**F: 60**
Satellite	**M: 12**	**M: 12**	**M: 12**	**M: 12**	**F: 12**	**F: 12**	**F: 12**	**F: 12**
C-cell hyperplasia, focal/multifocal[d]	1	39	42	44	2	48	45	43

Abbreviations, B: Benign, M:Malignant, N:Metastasis, N/A: Not applicable, NOS: Not otherwise specified.

[a]Includes two animals that died during terminal procedures (not included in statistical analysis)

[b]Includes one animal that died during terminal procedures (not included in statistical analysis)

[c] Number of animals with clinical sign

[d] Minimal to moderate severity

[e] Combined incidence of C-cell tumours represents number of animals with C-cell adenoma, C-cell carcinoma or both.

[f] No cross reactivity to endogenous GLP-1 but due to lack of sample, the neutralising effect could not be assessed.

* $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$ vs. control ; (pairwise test)

Statistical analysis of tumours:

[§] - $p \leq 0.001$ – One-tailed pairwise comparison against control

[†] - $p \leq 0.001$ – One-tailed trend test using groups up to intermediate dose

[#] - $p \leq 0.05$ – One-tailed trend test using groups up to high dose for males

[##] - $p \leq 0.001$ – One-tailed trend test using groups up to high dose for females

2.6.7.10.B ラットを用いた 104 週間反復皮下投与がん原性試験 **Study ID: 207363**

Species/Strain: Rat/Sprague Dawley (Crl:CD® (SD)IGS BR)	**Duration of Dosing:** 104 weeks (including a 0-2 weeks dose escalation period)	**Location in CTD:** 4.2.3.4.1-2
Initial Age: 36 to 42 days at start of treatment	**Vehicle/Formulation:** 1.42 mg/mL disodium hydrogen phosphate dihydrate,14.0 mg/mL propylene glycol, 5.5 mg/mL phenol and water for injection, pH 7.4	**Method of Administration:** Subcutaneous injection
Date of First Dose: 04 February 2008	**Treatment of Controls:** Vehicle	**GLP Compliance:** Yes
Parameters collected: Viability, Clinical Condition, Body Weight, Food Consumption, Haematology, Clinical Chemistry, Urinalysis, Toxicokinetics, Antibody Assessment, Palpation of Masses, Macropathology, Histopathology.		
Basis for High-Dose Selection: Maximum Tolerated Dose based on results from 13 week toxicity study in rats (Novo Nordisk Ref. No. 206662).		
Nominal Dose Levels: 0, 0.0025, 0.01, 0.025 and 0.1 mg/kg/day (a 0-2 week dose escalation period was included to ensure tolerability at the target dose)		
NOAEL: Not established.		
Brief conclusion: Semaglutide had no effect on survival but caused a range of mainly pharmacologically mediated effects, including reduced body weight gain and food consumption, and secondary thereto, poor clinical condition. Changes of some of the clinical pathology parameters were observed but since they were minor, they were all considered non-adverse. Macroscopic changes in the thyroid, deep cervical lymph node, stomach and lungs all correlated with histopathological changes whereas changes observed in the liver, pituitary and uterus were considered of uncertain relationship to treatment and non-adverse as they were not substantiated by the histopathological examination. Expected and adverse hyperplastic and neoplastic C-cell changes were observed in the thyroid gland with some metastasis to the deep cervical lymph nodes. Non-adverse hypertrophy of Brunner's glands was observed in duodenum. The changes in Brunner's glands were not associated with any inflammation or cellular damage neither in the Brunner's glands nor in the intestinal mucosa, and since there were no signs of progression to neoplasia, the finding was not considered adverse. Ulceration and epithelial hyperplasia were observed in the non-glandular stomach and may be linked to the reduced food consumption. The changes are considered a reactive process and did not progress to tumour formation. Based on this, the finding is considered non-adverse. Differences in incidences were further noted in the lungs, adrenal glands, liver and kidney. These were either of uncertain relationship to treatment (lungs and adrenals) or they were reduced incidences of histopathological changes (liver and kidney), and all were considered non-adverse. Since the hyperplastic and neoplastic C-cell changes of the thyroid were seen in all treated groups, a NOAEL could not be established		

Nominal Dose Levels (mg/kg/day)	0 (Control)	0.0025	0.01	0.025	0.1	0 (Control)	0.0025	0.01	0.025	0.1
Initial Number of Animals	**M: 70**	**M: 70**	**M: 70**	**M: 70**	**M: 70**	**F: 70**	**F: 70**	**F: 70**	**F: 70**	**F: 70**
Toxicokinetics ($AUC_{0\text{-}24h}$ (nmol*h/L))										
Day 1	N/A	NR	NR	NR	1270	N/A	NR	NR	244	1060
Week 52	N/A	NR	NR	465	2490	N/A	NR	247	603	2970
Week 104	N/A	NR	264	673	3410	N/A	NR	321	609	4220
Group Distribution of Mortality										
Number of decedents	35§	38	42	30	37	36	39	50#	51#	39
Number of survivors	35	32	28	40	33	34	31	20	19	31
% survival	50	46	40	57	47	49	44	29	27	44
Noteworthy Findings										
Clinical signs[j]										
Thin appearance	8	7	16	14	25	8	12	18	27	32
Hunched posture	7	11	16	14	27	17	19	27	24	27
Reason for dispatch: General poor clinical condition	9	10	19	13	28	13	20	17	25	22
Underactivity	8	9	19	15	20	14	22	22	23	21
Bodyweight										
Terminal body weight (g)	758	759	679	618	558	488	467	405	391	344
Bodyweight gain										
Day 1 to Week 52 (g)	558	564	491**	456**	417**	262	244*	229**	203**	172**
Week 52 to 104 (g)	49	35	37	11*	-5**	94	84	53**	52**	32**
Day 1 to Week 104 (g)	581	584	507**	450**	390**	342	324	262**	249**	207**
Day 1 to Week 104 (% difference from control)	-	0	-13	-23	-33	-	-5	-23	-27	-39
Food consumption										
Week 3[a] (g/animal/week)	203	208	200	187	164	133	136	141	138	128
Mean Week 1-52 (g/animal/week)	204	206	195*	188**	181**	141	141	143	140	136*
Mean Week 1-104 (g/animal/week)	202	205	191**	184**	178**	143	143	143	142	136**

Nominal Dose Levels (mg/kg/day)	**0 (Control)**	**0.0025**	**0.01**	**0.025**	**0.1**	**0 (Control)**	**0.0025**	**0.01**	**0.025**	**0.1**
Initial Number of Animals	**M: 70**	**M: 70**	**M: 70**	**M: 70**	**M: 70**	**F: 70**	**F: 70**	**F: 70**	**F: 70**	**F: 70**
Haematology Week 104										
Haemoglobin (g/dL)	14.8	14.6	15.3*	15.8**	15.4**	14.1	14.5	14.6	14.4	14.9*
Reticulocytes (%)	2.20	1.97*	1.87*	1.57**	1.86**	2.11	1.95	1.59	2.91	1.72*
Mean Cell Haemoglobin (MCH) (pg)	17.3	18.0*	18.1*	18.5**	17.9**	18.9	19.4	19.3	19.3	19.1
Mean Cell Haemoglobin Concentration (MCHC) (g/dL))	32.9	33.9*	33.5*	34.3**	34.0**	34.2	35.1*	34.9*	34.5*	35.1**
White blood cells (*10^9/L)	11.49	10.35	9.91*	8.93**	9.21**	5.99	7.00	8.30	6.59	6.57
Lymphocytes (*10^9/L)	7.60	6.47	5.90**	5.82**	5.92**	3.66	4.07	4.24	3.66	3.88
Monocytes (*10^9/L)	0.57	0.54	0.45	0.48	0.42*	0.33	0.36	0.43	0.36	0.31
Platelets (*10^9/L)	1105	1167	1035	1005	1039	877	989	948	1020*	977*
Prothrombin time (s)	15.1	14.5	15.3	16.3*	16.5**	15.8	15.9	14.6**	14.6**	16.6
Clinical chemistry Week 104										
Cholesterol (mmol/L)	3.84	3.37	3.02*	3.04*	2.49**	3.55	3.56	2.80*	3.07*	2.62**
Triglycerides (mmol/L)	1.80	1.50	1.02**	0.95**	0.60**	2.83	2.24*	1.03**	0.96**	0.68**
Potassium (mmol/L)	5.0	4.8	4.5	4.6	4.4*	4.3	3.8	4.2	3.7	4.1
Calcium (mmol/L)	2.67	2.69	2.63	2.65	2.59**	2.81	2.78	2.76	2.78	2.68**
Phosphorus (mmol/L)	1.46	1.37	1.31	1.28*	1.33*	1.33	1.31	1.38	1.38	1.36
Total protein (g/L)	70	70	69	69	68	77	76	75	76	74*
Albumin (g/L)	25	26	26	27*	27*	37	36	34*	35*	34*
Albumin/globulin ratio	0.55	0.59	0.61	0.66**	0.67**	0.91	0.90	0.85	0.84	0.88
Urinalysis Week 104										
Volume (mL)	12.4	12.2	11.4	10.7	9.8	9.9	10.5	8.8	9.4	8.0
Macropathology (number of animals examined)	70	70	70	70	70	70	70	70	70	70
Deep cervical lymph node										
Mass(es)	0	1	0	2	3	0	2	1	0	0
General appearance										
Animal thin	1	4	14	16	31	3	6	15	23	29

Nominal Dose Levels (mg/kg/day)	0 (Control)	0.0025	0.01	0.025	0.1	0 (Control)	0.0025	0.01	0.025	0.1
Initial Number of Animals	**M: 70**	**M: 70**	**M: 70**	**M: 70**	**M: 70**	**F: 70**	**F: 70**	**F: 70**	**F: 70**	**F: 70**
Liver										
Dark areas	38	31	23	19	12	39	27	27	12	11
Lungs										
Pale areas	12	27	21	22	22	17	19	28	27	34
Pituitary										
Mass	16	15	23	22	31	41	41	45	44	31
Stomach										
Forestomach depression(s)	4	3	6	12	19	6	5	1	7	13
Thyroid										
Mass(es)	4	8	9	13	20	2	5	6	10	10
Dark area(s)	0	2	4	2	5	0	0	3	3	4
Uterus										
Mass(es)	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	9	6	9	11	19
Histopathology										
Neoplastic changes (treatment-related tumours)										
Thyroid (number of animals examined)	70	68	69	69	69	70	70	69	70	70
B-C-cell adenoma	7	17¤	29¤¤¤++	42¤¤¤++	41¤¤¤++	6	17¤¤	28¤¤¤++	31¤¤¤++	45¤¤¤++
M-C-cell carcinoma	3	3	12¤+	13¤¤++	24¤¤¤++	2	4	6	5	8¤
Combined incidence of C-cell neoplasia**	10	19¤	32¤¤¤++	48¤¤¤++	53¤¤¤++	8	19¤	34¤¤¤++	32¤¤¤++	50¤¤¤++
Deep cervical lymph node (number of animals examined)	3	7	8	12	17	2	5	4	7	9
N-C-cell carcinoma	0	1	3	4	8	1	2	2	3	2
Neoplastic changes (non-treatment-related tumours)										
Lung + Bronchi (number of animals examined)	70	70	70	70	70	70	70	70	70	70
B-Bronchioloalveolar Adenoma	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
N-Carcinoma	0	0	1	1	1	2	2	2	4	4
N-Histiocytic Sarcoma	2	1	2	0	0	0	1	0	0	0
N-Leukaemia	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
N-Lymphoma	1	2	0	3	0	0	0	0	0	1

Nominal Dose Levels (mg/kg/day)	0 (Control)	0.0025	0.01	0.025	0.1	0 (Control)	0.0025	0.01	0.025	0.1
Initial Number of Animals	**M: 70**	**M: 70**	**M: 70**	**M: 70**	**M: 70**	**F: 70**	**F: 70**	**F: 70**	**F: 70**	**F: 70**
N-Sarcoma	1	0	1	1	0	0	1	0	0	0
Liver (number of animals examined)	70	70	70	70	70	70	70	70	70	70
B-Hepatocellular Adenoma	3	2	0	3	1	1	3	1	2	0
M-Hepatocellular Carcinoma	1	0	0	2	0	0	0	0	0	0
N-Histiocytic Sarcoma	1	1	3	0	0	0	1	0	0	0
N-Leukaemia	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
N-Lymphoma	1	3	2	3	2	1	0	1	1	0
N-Sarcoma	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0
Kidney (number of animals examined)	70	70	70	70	70	70	70	70	70	70
B-Transitional Cell Papilloma	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
B-Tubular Adenoma	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
M-Nephroblastoma	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
M-Renal Liposarcoma	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0
N-Carcinoma	0	0	0	0	0	0	2	0	1	0
N-Histiocytic Sarcoma	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
N-Leukaemia	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
N-Lymphoma	1	2	1	2	1	1	0	0	1	0
N-Sarcoma	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
Urinary Bladder (number of animals examined)	70	69	69	68	69	67	69	70	69	70
N-Carcinoma	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
N-Lymphoma	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0
Heart (number of animals examined)	70	70	70	70	70	70	70	70	70	70
M-Atriocaval Mesothelioma	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
N-Carcinoma	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
N-Lymphoma	1	0	1	1	1	0	0	0	1	0
N-Sarcoma	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0

Nominal Dose Levels (mg/kg/day)	0 (Control)	0.0025	0.01	0.025	0.1	0 (Control)	0.0025	0.01	0.025	0.1
Initial Number of Animals	**M: 70**	**M: 70**	**M: 70**	**M: 70**	**M: 70**	**F: 70**	**F: 70**	**F: 70**	**F: 70**	**F: 70**
Spleen (number of animals examined)	70	70	70	70	70	70	70	70	70	70
M-Haemangiosarcoma	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
M-Stromal Cell Sarcoma	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0
N-Carcinoma	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0
N-Histiocytic Sarcoma	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0
N-Leukaemia	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
N-Lymphoma	1	3	1	3	2	1	0	1	1	1
N-Sarcoma	1	0	1	1	0	1	0	1	0	0
Pancreas (number of animals examined)	70	70	70	70	70	70	70	70	70	70
B-Acinar Cell Adenoma	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0
B-Islet Cell Adenoma	5	2	2	1	1	0	1	0	1	0
B-Mixed Cell Adenoma	0	1	0	0	2	0	0	0	1	0
M-Islet Cell Carcinoma	2	1	1	0	1	1	0	0	0	0
N-Carcinoma	0	0	0	0	0	2	1	0	1	3
N-Lymphoma	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0
N-Sarcoma	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0
Lymph node, Mesenteric (number of animals examined)	67	70	70	69	69	69	69	69	69	65
B-Haemangioma	0	0	3	2	0	0	0	0	0	0
N-Carcinoma	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
N-Histiocytic Sarcoma	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0
N-Lymphoma	0	2	1	3	0	1	0	0	0	1
N-Sarcoma	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
Thymus (number of animals examined)	67	63	64	65	66	66	69	67	67	69
B-Thymoma (Epithelial)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
N-Histiocytic Sarcoma	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0
N-Lymphoma	1	2	1	4	0	1	0	0	1	1

Nominal Dose Levels (mg/kg/day)	0 (Control)	0.0025	0.01	0.025	0.1	0 (Control)	0.0025	0.01	0.025	0.1
Initial Number of Animals	**M: 70**	**M: 70**	**M: 70**	**M: 70**	**M: 70**	**F: 70**	**F: 70**	**F: 70**	**F: 70**	**F: 70**
Thyroid (number of animals examined)	70	68	69	69	69	70	70	69	70	70
B-Follicular Cell Adenoma	2	1	1	0	0	0	1	0	1	0
M-Follicular Cell Carcinoma	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0
N-Histiocytic Sarcoma	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
N-Lymphoma	1	2	0	2	0	0	0	0	0	0
Parathyroid (number of animals examined)	67	66	65	65	63	68	60	67	67	67
B-Chief Cell Adenoma	0	3	2	0	0	0	0	0	0	1
Adrenal (number of animals examined)	70	70	70	70	70	70	70	70	70	70
B-Cortical Adenoma	2	0	4	4	4	2	3	3	0	0
B-Phaeochromocytoma	14	10	10	8	5	6	6	3	1	2
M-Cortical Carcinoma	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1
M-Malignant Phaeochromocytoma	5	3	0	1	2	0	1	1	1	1
N-Carcinoma	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
N-Histiocytic Sarcoma	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0
N-Lymphoma	1	1	0	2	1	1	0	0	0	0
N-Sarcoma	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
Pituitary (number of animals examined)	69	70	70	68	70	70	70	70	69	70
B-Adenoma, Pars Distalis	32	32	34	29	38	48	49	54	53	46
B-Adenoma, Pars Intermedia	2	1	0	2	3	0	0	0	1	1
M-Carcinoma, Pars Distalis	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
N-Histiocytic Sarcoma	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
N-Lymphoma	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0
Lymph node, Mandibular (number of animals examined)	70	68	69	68	69	70	70	69	70	69
N-Carcinoma	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0
N-Histiocytic Sarcoma	2	0	1	0	0	0	0	0	0	0
N-Leukaemia	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0

Nominal Dose Levels (mg/kg/day)	0 (Control)	0.0025	0.01	0.025	0.1	0 (Control)	0.0025	0.01	0.025	0.1
Initial Number of Animals	**M: 70**	**M: 70**	**M: 70**	**M: 70**	**M: 70**	**F: 70**	**F: 70**	**F: 70**	**F: 70**	**F: 70**
N-Lymphoma	2	1	2	3	0	1	0	1	0	1
N-Sarcoma	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Salivary Gland (number of animals examined)	70	68	69	68	69	70	70	69	70	69
M-Adenocarcinoma	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0
N-Lymphoma	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Tongue (number of animals examined)	70	68	69	69	70	70	70	70	70	70
N-Lymphoma	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0
Skeletal Muscle (number of animals examined)	70	70	70	70	70	70	70	70	70	70
M-Chordoma	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
N-Carcinoma	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
N-Histiocytic Sarcoma	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
N-Lymphoma	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Stomach (number of animals examined)	70	70	70	70	70	70	70	70	70	70
N-Carcinoma	0	0	0	0	0	0	0	0	2	1
N-Lymphoma	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
N-Sarcoma	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
Duodenum (number of animals examined)	70	70	70	70	70	70	69	70	70	70
N-Carcinoma	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
Ileum (number of animals examined)	70	70	70	70	70	70	69	70	70	70
B-Leiomyoma	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
N-Lymphoma	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Colon (number of animals examined)	70	70	70	70	70	70	69	70	70	70
B-Lipoma	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0
M-Adenocarcinoma	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0

Nominal Dose Levels (mg/kg/day)	0 (Control)	0.0025	0.01	0.025	0.1	0 (Control)	0.0025	0.01	0.025	0.1
Initial Number of Animals	**M: 70**	**M: 70**	**M: 70**	**M: 70**	**M: 70**	**F: 70**	**F: 70**	**F: 70**	**F: 70**	**F: 70**
N-Carcinoma	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Jejunum (number of animals examined)	70	70	70	70	70	70	69	69	70	70
M-Adenocarcinoma	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
Rectum (number of animals examined)	70	70	70	70	70	70	70	70	70	70
N-Histiocytic Sarcoma	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
Mammary (number of animals examined)	68	70	69	69	69	70	70	70	69	69
B-Mammary Adenoma	0	0	0	0	0	1	5	0	0	0
B-Mammary Fibroadenoma	0	2	2	0	1	33	35	32	24	23
M-Mammary Adenocarcinoma	1	0	0	0	0	18	20	27	19	16
Skin (number of animals examined)	70	70	70	70	70	70	70	70	70	70
B-Basal Cell Tumour	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0
B-Fibroma	10	14	11	11	13	4	1	0	1	1
B-Haemangioma	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
B-Haemangiopericytoma	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
B-Keratoacanthoma	5	7	6	5	2	1	1	0	0	0
B-Lipoma	2	4	3	2	3	1	3	2	1	0
B-Sebaceous Cell Adenoma	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B-Squamous Cell Papilloma	1	0	0	1	1	1	2	0	0	0
M-Fibrosarcoma	2	2	1	0	1	0	1	0	0	0
M-Fibrous Histiocytoma	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0
M-Haemangiosarcoma	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
M-Leiomyosarcoma	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
M-Liposarcoma	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
M-Sarcoma, NOS	0	1	0	0	0	1	2	1	0	1
M-Squamous Cell Carcinoma	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
N-Histiocytic Sarcoma	1	1	2	0	0	0	1	0	0	0
N-Lymphoma	1	2	0	1	0	0	0	0	0	0

Nominal Dose Levels (mg/kg/day)	0 (Control)	0.0025	0.01	0.025	0.1	0 (Control)	0.0025	0.01	0.025	0.1
Initial Number of Animals	**M: 70**	**M: 70**	**M: 70**	**M: 70**	**M: 70**	**F: 70**	**F: 70**	**F: 70**	**F: 70**	**F: 70**
Lachrymal Gland (number of animals examined)	70	68	70	70	69	70	70	69	70	69
N-Lymphoma	1	2	0	2	0	0	0	0	0	0
Eye (number of animals examined)	70	69	70	70	69	70	70	69	70	69
N-Lymphoma	1	1	0	2	0	0	0	0	0	0
Harderian Gland (number of animals examined)	70	69	70	70	69	70	70	69	70	69
B-Adenoma	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
N-Lymphoma	1	2	0	1	0	1	0	0	0	0
Sternum + Marrow (number of animals examined)	70	70	70	70	70	70	70	70	70	70
N-Histiocytic Sarcoma	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0
N-Leukaemia	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
N-Lymphoma	1	1	0	3	0	1	0	0	0	0
N-Sarcoma	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Femur including Joint (number of animals examined)	70	70	70	70	70	70	70	70	70	70
N-Histiocytic Sarcoma	1	0	2	0	0	0	0	0	0	0
N-Leukaemia	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
N-Lymphoma	1	2	0	3	0	0	0	0	0	0
N-Sarcoma	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0
Brain (number of animals examined)	70	70	70	70	70	70	70	70	70	70
B-Granular Cell Tumour	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
B-Meningioma	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
M-Astrocytoma	0	2	0	0	2	0	0	1	1	0
M-Malignant Granular Cell Tumour	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
M-Medulloblastoma	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
M-Mixed Glioma	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
M-Oligodendroglioma	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0

Nominal Dose Levels (mg/kg/day)	0 (Control)	0.0025	0.01	0.025	0.1	0 (Control)	0.0025	0.01	0.025	0.1
Initial Number of Animals	**M: 70**	**M: 70**	**M: 70**	**M: 70**	**M: 70**	**F: 70**	**F: 70**	**F: 70**	**F: 70**	**F: 70**
N-Carcinoma	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
N-Lymphoma	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0
Spinal Chord, Cervix (number of animals examined)	70	70	70	70	70	70	70	70	70	70
N-Lymphoma	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Spinal Chord, Thoracic (number of animals examined)	70	70	70	70	70	70	70	70	70	70
M-Astrocytoma	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
N-Lymphoma	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Spinal Chord, Lumber (number of animals examined)	70	70	70	70	70	70	70	70	70	70
N-Astrocytoma	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
N-Lymphoma	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Prostate (number of animals examined)	70	70	69	70	70	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
M-Adenocarcinoma	0	0	1	0	0	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
M-Leiomyosarcoma	0	0	0	0	1	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
N-Lymphoma	0	1	0	0	0	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
N-Sarcoma	0	0	0	1	0	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Seminal Vesicle (number of animals examined)	70	70	69	70	70	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
M-Adenocarcinoma	0	0	0	1	0	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
N-Carcinoma	0	0	1	0	0	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
N-Sarcoma	0	0	0	1	0	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Epididymides (number of animals examined)	70	70	70	70	70	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
N-Histiocytic Sarcoma	0	1	0	0	0	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
N-Sarcoma	0	1	1	1	0	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A

Nominal Dose Levels (mg/kg/day)	0 (Control)	0.0025	0.01	0.025	0.1	0 (Control)	0.0025	0.01	0.025	0.1
Initial Number of Animals	**M: 70**	**M: 70**	**M: 70**	**M: 70**	**M: 70**	**F: 70**	**F: 70**	**F: 70**	**F: 70**	**F: 70**
Testes (number of animals examined)	70	70	70	70	70	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
B-Interstitial (Leydig) Cell Adenoma	3	6	8	5	3	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
N-Sarcoma	0	1	1	1	0	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Ovary (number of animals examined)	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	70	69	70	70	70
B-Cystadenoma	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	0	0	1	0	0
B-Granulosa Cell Tumour	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	1	0	0	0	0
B-Luteoma	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	0	1	0	0	0
B-Sertoliform Tubular Adenoma	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	1	1	2	2	0
B-Thecal Cell tumour	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	1	0	0	0	0
M-Malignant Granulosa Cell Tumour	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	0	0	0	1	0
M-Yolk Sac Cell Tumour	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	0	1	0	0	0
N-Carcinoma	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	1	0	0	0	0
N-Leukaemia	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	0	0	1	0	0
N-Sarcoma	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	1	0	0	0	0
Uterus (number of animals examined)	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	69	70	70	70	70
B-Endometrial Adenoma	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	0	3	2	1	1
B-Endometrial Polyp	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	8	4	6	13	12
B-Squamous Papilloma	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	0	0	0	0	1
M-Endometrial Adenocarcinoma	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	3	1	3	4	6
M-Endometrial Stromal Cell Sarcoma	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	0	0	1	0	0
M-Leiomyosarcoma	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	0	0	0	0	1
M-Malignant Schwannoma	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	0	0	0	1	1
M-Squamous Cell Carcinoma	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	1	0	0	0	2
N-Carcinoma	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	0	1	0	0	0
Uterine cervix (number of animals examined)	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	69	70	70	70	70
B-Squamous Cell Papilloma	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	0	0	0	0	1
M-Fibrosarcoma	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	0	0	0	1	0
M-Leiomyosarcoma	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	0	0	0	0	1

Nominal Dose Levels (mg/kg/day)	0 (Control)	0.0025	0.01	0.025	0.1	0 (Control)	0.0025	0.01	0.025	0.1
Initial Number of Animals	**M: 70**	**M: 70**	**M: 70**	**M: 70**	**M: 70**	**F: 70**	**F: 70**	**F: 70**	**F: 70**	**F: 70**
N-Carcinoma	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	0	1	0	0	1
Vagina (number of animals examined)	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	69	70	70	70	70
M-Schwannoma	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	1	0	0	0	0
M-Squamous Cell Carcinoma	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	0	1	0	0	0
N-Carcinoma	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	1	0	0	0	0
Larynx (number of animals examined)	70	68	69	69	69	70	70	69	70	70
N-Carcinoma	0	0	1	2	1	0	0	0	0	0
Treated Site 4 (number of animals examined)	70	70	70	69	70	70	70	70	70	70
N-Histiocytic Sarcoma	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
Preputial gland (number of animals examined)	70	70	70	70	70	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
N-Histiocytic Sarcoma	0	0	0	1	0	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Lymph node, Left Axillary (number of animals examined)	69	70	69	68	68	65	63	67	62	68
N-Histiocytic Sarcoma	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0
N-Leukaemia	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
N-Lymphoma	2	1	1	3	0	0	0	0	0	1
N-Sarcoma	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
Hematopoietic Tumour (number of animals examined)	70	70	70	70	70	70	70	70	70	70
M-Histiocytic Sarcoma	3	1	3	1	0	0	1	0	0	0
M-Large Granular Cell Lymphoma	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0
M-Malignant Lymphoma	2	3	2	4	0	1	0	1	2	1
M-Myeloid Cell Leukaemia	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
Lymph node, Mediastinal (number of animals examined)	5	4	6	2	2	3	3	3	1	4

Nominal Dose Levels (mg/kg/day)	0 (Control)	0.0025	0.01	0.025	0.1	0 (Control)	0.0025	0.01	0.025	0.1
Initial Number of Animals	**M: 70**	**M: 70**	**M: 70**	**M: 70**	**M: 70**	**F: 70**	**F: 70**	**F: 70**	**F: 70**	**F: 70**
N-Histiocytic Sarcoma	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0
N-Leukaemia	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
N-Lymphoma	1	1	2	2	0	0	0	0	0	0
Bone (number of animals examined)	3	5	1	1	2	0	0	2	1	1
B-Osteoma	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1
M-Osteosarcoma	0	2	0	0	1	0	0	1	0	0
N-Leukaemia	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
N-Lymphoma	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Thorax (number of animals examined)	2	0	0	2	0	0	2	0	1	1
N-Carcinoma	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
N-Histiocytic Sarcoma	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
N-Sarcoma	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0
Lymph node, Right Axillary (number of animals examined)	1	1	1	4	0	0	2	3	1	0
N-Lymphoma	1	1	1	3	0	0	0	0	0	0
Lymph node, Lumbar (number of animals examined)	7	7	4	6	2	5	6	5	2	6
N-Carcinoma	0	0	0	0	0	0	1	1	0	2
N-Histiocytic Sarcoma	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0
N-Leukaemia	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
N-Lymphoma	1	1	1	3	0	1	0	0	0	1
N-Sarcoma	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
Lymph node, Cisternal (number of animals examined)	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1
N-Granulosa Cell Tumour	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
N-Histiocytic Sarcoma	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0
N-Lymphoma	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0

Nominal Dose Levels (mg/kg/day)	0 (Control)	0.0025	0.01	0.025	0.1	0 (Control)	0.0025	0.01	0.025	0.1
Initial Number of Animals	**M: 70**	**M: 70**	**M: 70**	**M: 70**	**M: 70**	**F: 70**	**F: 70**	**F: 70**	**F: 70**	**F: 70**
Lymph node, Bronchial (number of animals examined)	1	1	2	0	1	0	1	0	0	0
N-Histiocytic Sarcoma	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
N-Lymphoma	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0
N-Sarcoma	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
Adipose tissue (number of animals examined)	3	2	2	2	4	4	7	2	5	3
N-Carcinoma	0	0	0	0	0	1	1	0	2	2
N-Lymphoma	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
N-Sarcoma	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0
Lymph node, Inguinal (number of animals examined)	1	0	0	1	0	1	4	1	1	1
N-Lymphoma	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1
Lymph node, Renal (number of animals examined)	0	2	0	0	0	0	2	2	1	1
M-Leiomyosarcoma	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
N-Carcinoma	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
N-Lymphoma	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Lymph node, Pancreatic (number of animals examined)	1	5	1	1	1	0	0	1	1	1
N-Histiocytic Sarcoma	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
N-Leukaemia	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
N-Lymphoma	0	2	1	1	0	0	0	0	1	1
Abdomen (number of animals examined)	1	1	0	0	0	0	1	1	0	1
M-Neuroendocrine Tumour	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
M-Sarcoma	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
N-Carcinoma	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1

Nominal Dose Levels (mg/kg/day)	0 (Control)	0.0025	0.01	0.025	0.1	0 (Control)	0.0025	0.01	0.025	0.1
Initial Number of Animals	**M: 70**	**M: 70**	**M: 70**	**M: 70**	**M: 70**	**F: 70**	**F: 70**	**F: 70**	**F: 70**	**F: 70**
Head (number of animals examined)	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0
M-Squamous Cell Carcinoma	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Diaphragm (number of animals examined)	0	0	0	1	0	2	1	0	2	3
N-Carcinoma	0	0	0	0	0	1	1	0	2	3
N-Sarcoma	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0
Deep cervical lymph node (number of animals examined)	3	7	8	12	17	2	5	4	7	9
N-Histiocytic Sarcoma	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0
N-Lymphoma	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
Peritoneum (number of animals examined)	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0
M-Mesothelioma	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0
Pinnae (number of animals examined)	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0
B-Schwannoma	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
Non-neoplastic changes										
Adrenals (number of animals examined)	70	70	70	70	70	70	70	70	70	70
Cortical cystic/haemorrhagic degeneration	12	15	24	21	25	60	60	59	62	63
Duodenum (number of animals examined)	70	70	70	70	70	70	69	70	70	70
Brunner's glands hypertrophy[c]	1	3	28	29	40	1	3	9	33	36
Brunner's glands dilatation[c]	8	2	5	10	9	0	0	2	5	7
Kidney (number of animals examined)	70	70	70	70	70	70	70	70	70	70
Chronic progressive nephropathy[g]	14	10	10	11	5	3	0	3	1	2
Cortical tubular basophilia[d]	31	35	20	20	18	12	7	6	6	6
Medullary tubular dilatation[b]	9	6	9	6	5	10	6	4	4	2
Mineralisation papillary/pelvic epithelium	1	0	1	2	3	35	28	17	18	16

Nominal Dose Levels (mg/kg/day)	0 (Control)	0.0025	0.01	0.025	0.1	0 (Control)	0.0025	0.01	0.025	0.1
Initial Number of Animals	**M: 70**	**M: 70**	**M: 70**	**M: 70**	**M: 70**	**F: 70**	**F: 70**	**F: 70**	**F: 70**	**F: 70**
Lungs (number of animals examined)										
Aggregations of alveolar macrophages[d]	6	14	15	16	16	9	10	16	14	15
Liver (number of animals examined)	70	70	70	70	70	70	70	70	70	70
Bile duct hyperplasia[b]	24	14	14	24	19	11	10	10	8	2
Clear cell foci	26	26	22	21	13	12	5	1	1	3
Cystic degeneration	14	9	8	6	2	2	0	0	0	0
Periportal hepatocyte vacuolation[b]	3	8	8	1	3	11	6	6	2	1
Stomach (number of animals examined)	70	70	70	70	70	70	70	70	70	70
Ulceration, non-glandular region[dh]	2	1	5	5	10	3	2	1	2	6
Epithelial hyperplasia, non-glandular region[di]	2	1	9	6	11	4	5	3	4	7
Ulceration and epithelial hyperplasia, non-glandular region, combined	2	1	4	4	5	2	0	0	1	5
Dilated glands[d]	16	11	6	9	19	15	4	3	6	3
Thyroid (number of animals examined)	70	68	69	69	69	70	70	69	70	70
C-cell hyperplasia (diffuse)[b]	14	25	15	22	7	20	33	13	23	13
C-cell hyperplasia (focal)[b]	11	21	30	29	26	27	23	29	24	25
Prominent ultimobranchial cysts	11	9	4	5	3	21	13	12	11	9

$AUC_{0\text{-}24h}$ was not reported if the last measured time point was before 24 h

Abbreviations, NR: No results, B: Benign, M: Malignant, N: Metastasis, N/A: Not applicable, NOS: Not otherwise specified.

§ Two animals died during terminal procedures and were not included in statistical analysis

# $p<0.05$ (two-tailed pairwise comparison against control)

* $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$ vs. control; (pairwise test)

Statistical analysis of tumours:

¤ $p < 0.05$, ¤¤ $p < 0.01$, ¤¤¤ $p < 0.001$ (one-tailed pairwise comparison against control)

+ $p < 0.01$ and ++ $p < 0.001$ (trend test using groups up to the respective column)

**Combined incidence of C-cell tumours – represents number of animals with C-cell adenoma, C-cell carcinoma or both.

[a] Week 3 shown as it was the first week at target dose for all groups
[b] Minimal to moderate severity
[c] Minimal to slight severity
[d] Minimal to marked severity
[e] Slight to moderate severity
[f] Minimal to severe severity
[g] Slight to severe severity
[h] Historical control data for stomach ulceration, nonglandular region: Males, mean 4.16%, range 0.0-9.4%; females, mean 3.11%, range 0.0-6.7%.
i Historical control data for stomach epithelial hyperplasia, nonglandular region: Males, mean 11.09%, range 3.1-23.4%; females, mean 8.13%, range 1.6-16.9%.
[j] Number of animals with clinical sign

2.6.7.10.C　げっ歯類の甲状腺 C 細胞の GLP-1R の活性化に関する検討

Species/ Strain	Route of Administration	Test compounds	Nominal Dose (mg/kg)	EC_{50} (pmol/L) ±SEM	Noteworthy Findings	Study ID
In vitro / MTC 6-23	N/A	Semaglutide Liraglutide Native GLP-1 Exenatide	N/A	3000±400 2200±350 86±16 69±12	Semaglutide activated rat thyroid GLP-1 receptors *in vitro* with a similar maximal efficacy as liraglutide, exenatide and native GLP-1, only the potency of the individual compounds were different.	LBKN150301

2.6.7.10.D　げっ歯類のカルシトニン濃度に及ぼすセマグルチドの影響に関する探索試験

Species/ Strain	Route of Administration	Duration of Dosing	Nominal Dose (mg/kg)	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	Study ID
Mouse/CD-1	Subcutaneous	Single dose	0 10	12 M & 12 F 12 M & 12 F	A single dose of 10 mg/kg of semaglutide caused a significant increase in the plasma calcitonin concentration within 3 hours after dosing and it remained elevated for at least 24 hours after dosing. Mean calcitonin conc., control vs. semaglutide treated (pg/mL): 3h: 45.63 vs. 149.5* 6h: 30.00 vs. 97.43* 12h: 30.23 vs. 157.6* 24h: 30.10 vs. 176.9*	208422
Mouse/CD-1	Subcutaneous	Single dose	0 1	12 M & 12 F 12 M & 12 F	A single subcutaneous injection of 1 mg/kg of semaglutide caused a significant increase in the plasma calcitonin concentration at 12 and 24 hours after dosing. Mean calcitonin conc., control vs. semaglutide treated (pg/mL)#: 12h males: 38.43 vs. 162.14** 12h females: 41.40 vs. 291.74** 24h - males: 31.50 vs. 202.86** 24h – females: 59.59 vs. 288.34**	213448

Species/ Strain	Route of Administration	Duration of Dosing	Nominal Dose (mg/kg)	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	Study ID
Rat/Sprague Dawley	Subcutaneous	6 weeks, preceded by a 2-week dose escalation period	0 0.01 0.1 0.86	12 M & 12 F 12 M & 12 F 12 M & 12 F 12 M & 12 F	Once-daily dosing of semaglutide demonstrated an increase in plasma calcitonin levels after 6 weeks, at a stage where no treatment related C-cell changes could be observed. Mean terminal calcitonin conc., control vs. semaglutide treated (pg/mL): Males: 31.8 vs. 53.4*, 60.4*, 65.6* Females: 83.2 vs. 65.9, 110.9, 85.1	208456

The plasma concentrations were log transformed (natural logarithm) prior to statistical analysis. Values shown are back-transformed means.

2.6.7.11 重要でない生殖発生毒性試験

Test Article: Semaglutide

Species / Strain	Route of Administration*	Duration of Dosing	Nominal Doses (mg/kg/day)	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	Study ID
Rat/Sprague Dawley	Subcutaneous	Females: From 4 weeks (incl. 2 weeks dose escalation) before mating and until Day 19 of gestation (GD19) Males: From 4 weeks before mating (incl. 2 weeks dose escalation) and 5 weeks hereafter	0 0.03 0.21 0.86	8 M&8 F 8 M & 8 F 8 M & 8 F 8 M & 8 F	Hunched posture in females at the highest dose. Generally initial and transient body weight loss and decreased body weight gain and food consumption at all dose levels. There was no effect on fertility, but treatment at the highest dose resulted in the early death of all embryos. Treatment at the intermediate dose resulted in marked reduction of live implants, low foetal weight, and various external, minor visceral, and minor and major skeletal abnormalities in the surviving foetuses. At the low dose, only few minor skeletal changes were observed. In males, organ weights of reproductive organs were decreased, but this was attributed to the effect on body weight and of no concern. In conclusion, 0.21 and 0.86 mg/kg/day were considered too high to use in a main fertility and embryo-foetal development study.	206616
Rat/Sprague Dawley	Subcutaneous	Females: From 4 weeks (incl. 2 weeks dose escalation) before mating and until GD17 (10 females per group) or until GD 20 (3 females per group)	Only females were dosed 0 0.05 0.10 0.15	13 F	Initial and transient body weight loss and reduced bodyweight gain and reduced food/water consumption. Increased calcitonin on GD6 and GD17. Mean calcitonin conc., controls vs. semaglutide treated (pg/mL): GD6, 0h:44.8 vs. 54.9, 81.9, 38.7 GD6, 8h: 25.2 vs. 65.2, 85.6, 105.2 GD17, 0h:35.9 vs. 52.7, 69.9, 112.7 GD17, 8h: 37.5 vs. 56.7, 61.7, 118.2 Increased oestrus cycle length, reduction in the number of corpora lutea, increased embryo-foetal mortality and reduced placental and foetal weights. Foetal pathology revealed a dose related increase in	207359

Species / Strain	Route of Administration*	Duration of Dosing	Nominal Doses (mg/kg/day)	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	Study ID
					incidences of major and minor skeletal and visceral abnormalities. 0.1 mg/kg/day was concluded to be a suitable dose level for the main study.	
Rabbit / New Zealand White	Subcutaneous *	MTD phase: 13, 55 or 57 days	MTD phase (target dose): 0.005 daily and twice-weekly 0.01 daily and twice-weekly 0.025 twice-weekly	MTD phase: 3 groups of 3F	Body weight loss and reduced body weight gain and food consumption, and altered faecal output. MTD concluded to be 0.01 mg/kg/day when only administered from GD6 to GD19.	206536
		Mated phase: 13 days (GD6-18)	Mated phase: 0 0.001 0.005 0.01 0.01 every second day.	Mated phase: 6 F 6 F 6 F 6 F 6 F	Body weight loss, reduced body weight gain and food consumption and changed faecal output. Doses up to 0.01 mg/kg/day would be expected to be tolerable in a main rabbit embryo-foetal development study when dosed from GD6 to GD19.	
Rabbit / New Zealand White	Subcutaneous	GD 6-19 Day -7 – GD19 Day -7 to Day 7 GD6-28	0 0.001 0.005 0.0075 0.001 0.01 0.001 0.0075	6 F 6 F 6 F 6 F 6 F 6 F 6 F 6 F	0.01 mg/kg/day was associated with clinical signs such as underactivity, few or abnormal faeces, reduced urine output, cold to touch, and thin build, and with a progressive body weight loss and a markedly reduced food consumption. Consequently, these animals were not considered suitable for mating and the dose level exceeded the MTD. At 0.005 and 0.0075 mg/kg/day, the only treatment related signs were abnormal or few faeces, and thin build. Initial and transient body weight loss was generally seen and correlated with reduced food consumption. Similarly, water consumption was reduced. Doses up to 0.0075 mg/kg/day would be expected to be tolerable in a main rabbit embryo-foetal development study when dosed from GD6 to GD19.	207358

Species / Strain	Route of Administration*	Duration of Dosing	Nominal Doses (mg/kg/day)	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	Study ID
Cynomolgus monkey	Subcutaneous	GD16-50	0.075 0.15 every third day from GD20 to GD50, preceded by a dose escalation phase on GD16 and 18	6 F 6F	Body weight losses throughout the dosing period (12 and 18% at the low and high dose, respectively) were associated with frequent observations of low food consumption and occasional cases of dehydration. Consequently, the maternal MTD was considered to be 0.15 mg/kg every third day. Abortion in one low dose female on GD44was within the normal background control range. No remarkable effects on placental weight, foetus weight and measurements, or on foetal organ weights, when compared with background control data. One low dose foetus was observed to have a red-coloured right lower body side, including right leg and tail, and red colouration of the right ovary, the right adrenal gland, and the right side of uterus. At the time of the study conduct, skin reddening had not been observed previously at the testing laboratory and consequently, the relationship to treatment was uncertain, although the changes could possibly have been caused by an unusual uterine position of the foetus. Since the time of the conduct of the study, skin reddening has been observed in a vehicle treated animal at the same laboratory.	208477

***Vehicle/Formulation:** 1.42 mg/mL disodium hydrogen phosphate dihydrate,14.0 mg/mL propylene glycol, 5.5 mg/mL phenol and water for injection, pH 7.4

2.6.7.12 ラットを用いた受胎能及び胚・胎児の発生（EFD）に関する試験

Test Article: Semaglutide

Combined Fertility and Embryo-Foetal Development Study in Sprague Dawley Rats		**Study ID: 207361**
Design similar to ICH S5 Paragraph 4.1.1 and 4.1.3 combined: Yes		**Location in CTD:** 4.2.3.5.1-3
Species/Strain: Rat /Sprague Dawley (Crl:CD(SD))	**Day of Mating:** Day 0	
Duration of Dosing:# **Males:** From 4 weeks prior to pairing (preceded by a 2-week dose escalation period) and until termination after 72-73 days of dosing. **Females:** From 2 weeks prior to pairing (preceded by a 2-week dose escalation period) until termination on Day 20 of gestation (GD20)		**GLP Compliance: Yes**
Initial Age: Males 55-69 Days old Females 62-69 Days old	**Day of Caesarean Section**: Gestation Day 20	**Nominal Dose Levels:** 0, 0.01, 0.03, 0.09 mg/kg/day
Date of First Dose: Males 13 May 2008 Females 27 May 2008	**Method of Administration:** Subcutaneous	
	Vehicle/Formulation: 1.42 mg/mL disodium hydrogen phosphate dihydrate,14.0 mg/mL propylene glycol, 5.5 mg/mL phenol and water for injection, pH 7.4	
Parameters collected: **Dams and Males:** Viability, Clinical Condition, Body Weight, Food Consumption, Water Consumption, Maternal Plasma Calcitonin, Oestrus Cycle, Mating Performance, Fertility, Pregnancy Performance, Toxicokinetics (females only), Macropathology, Male Reproductive Organ Weights **Foetuses:** Body Weight, Plasma Calcitonin, and External, Visceral, and Skeletal Foetal Pathology		
Special Features: A 0-2 week dose escalation period was included for consistency with the preliminary studies		
NOAEL **Reproductive performance and fertility:** 0.09 mg/kg/day **Embryo-Foetal Development:** 0.01 mg/kg/day.		
Brief conclusion: Once-daily administration of semaglutide caused changes in male reproductive organ weights, increased the oestrus cycle length and caused a reduction of number of corpora lutea with subsequent effect on number of implantations and litter size. These effects were all considered secondary to the pharmacological effect of semaglutide on food consumption and body weight and non-adverse. Consequently, the NOAEL for reproductive performance and fertility was the high dose level, 0.09 mg/kg/day. Major and minor visceral and skeletal foetal abnormalities at the high and intermediate dose levels defined the embryo-foetal development NOAEL which was considered to be the low dose, 0.01 mg/kg/day, in the absence of any adverse treatment related effects on this dose level.		

Nominal Dose Levels (mg/kg/day)	0 (Control)	0.01	0.03	0.09
Initial number of animals				
Main	**22 M & 22 F**	**22 M & 22 F**	**22 M & 22 F**	**22 M & 22 F**
Satellite	**5 F**	**5 F**	**5 F**	**5 F**
MALES				
Noteworthy Findings				
Died or euthanised/terminated prematurely	0	1[a]	0	0
Bodyweight[b]				
Terminal body weight (g)	541	510*	489**	480**
Bodyweight gain[b]				
Week -4 to Day 29 (g)	125	97**	92**	92**
Week -4 to Day 29 (% difference from control)	-	-22	-26	-26
Food consumption[c]				
Day -28 to -26 (g/animal/week)	30	24**	23**	23**
Day -3 to -1 (g/animal/week)	31	30	29	30
Organ weights				
Epididymides				
Absolute weight (g)	1.357	1.281	1.305	1.283
% of body weight	0.250	0.252	0.267*	0.268
Prostate				
Absolute weight (g)	1.249	1.031**	1.126**	1.056**
% of body weight	0.232	0.203	0.229	0.220
Testes				
Absolute weight (g)	3.75	3.66	3.82	3.76
% of body weight	0.691	0.720	0.784**	0.785**
FEMALES (dams/does)				
Toxicokinetics ($AUC_{0\text{-}24h}$ (nmol*h/L))				
Gestation Day 6	N/A	94.1	286	880

Nominal Dose Levels (mg/kg/day)	0 (Control)	0.01	0.03	0.09
Initial number of animals				
Main	**22 M & 22 F**	**22 M & 22 F**	**22 M & 22 F**	**22 M & 22 F**
Satellite	**5 F**	**5 F**	**5 F**	**5 F**
Gestation Day 17	N/A	71.6	208	590
Noteworthy Findings				
Died or euthanised/terminated prematurely	0	0	0	0
Bodyweight gain[d]				
Week -2 to Day 0 (g)	15	9*	8*	7
Week -2 to Day 0 (% difference from control)	-	-40	-47	-53
Day 0 to GD20 (g)	143	134	130**	116**
Day 0 to GD20 (% difference from control)	-	-6	-9	-19
Day 0 to GD20 (g) adjusted for gravid uterine weight	56	48	50	50
Day 0 to GD20 adjusted for gravid uterine weight (% difference from control)	-	-14	-11	-11
Absolute body weight				
GD18 (g)	374	356**	338**	316**
GD18 (% difference from control)	-	-5	-10	-16
Food consumption[c]				
Day -14 to -12 (g/animal/week)	19	15*	15*	14**
GD14 to GD17 (g/animal/week)	29	29	27*	25**
Fertility, mating and pregnancy performance				
Regular oestrus cycles				
4 days	20	16	19	15
4/5 days	1	5	0	2
5 days	0	0	2	2

Nominal Dose Levels (mg/kg/day)	0 (Control)	0.01	0.03	0.09
Initial number of animals				
Main	**22 M & 22 F**	**22 M & 22 F**	**22 M & 22 F**	**22 M & 22 F**
Satellite	**5 F**	**5 F**	**5 F**	**5 F**
Number of corpora lutea	17.3	16.5	15.9*	14.2**
Number of implantations	16.0	15.3	14.8	13.6**
Gravid uterine weight (g)	87	87	80	66**
LITTER DATA				
Noteworthy Findings				
Placental weight (g)	0.55	0.55	0.56	0.50*
Litter weight (g)	53.50	54.81	50.52	41.22**
Litter size	15.14	14.95	13.86	12.55**
Foetal weight, males and females combined(g)	3.53	3.67	3.64	3.28**
Foetal pathology (No. of foetuses (No. of litters))				
Major abnormalities				
Number examined	333 (22)	314 (21)	305 (22)	276 (22)
Retro-oesophageal aortic arch	0	0	1 (1)	1 (1)
Double aortic arch	0	0	0	1 (1)
Membranous ventricular septal defect	0	0	0	1(1)
Short tibia: malrotated hindlimb	0	0	0	1 (1)
Minor visceral abnormalities				
Number examined	166 (22)	155 (21)	153 (22)	137 (22)
Dilated brain ventricles	0	0	0	2 (1)
Dilated foramen interventriculare	0	0	1 (1)	0
Subclavian artery arises from aortic arch	0	0	1 (1)	5 (4)
Tail kinked	0	0	0	1 (1)
Minor skeletal abnormalities and variants				
Number examined	167 (22)	159 (21)	152 (22)	139 (22)
Cranial, bridge of ossification/partially fused maxilla to jugal	0	0	0	4 (4)
Caudal vertebral elements misaligned	0	0	0	4 (3)

Nominal Dose Levels (mg/kg/day)	0 (Control)	0.01	0.03	0.09
Initial number of animals				
Main	**22 M & 22 F**	**22 M & 22 F**	**22 M & 22 F**	**22 M & 22 F**
Satellite	**5 F**	**5 F**	**5 F**	**5 F**
Ribs partially fused	0	0	0	2 (2)
Costal cartilage partially fused/fused	0	0	0	3 (2)
Skeletal variants				
Cervical rib	1 (1)	1 (1)	5 (5)	5 (5)
Incomplete ossification/unossified				
Cranial centres	11 (8)	4 (4)	16 (9)	24 (14)
Cervical vertebrae	0	0	1 (1)	2 (2)
Lumbar vertebrae	0	0	3 (1)	2 (2)
Ribs	0	0	1(1)	4 (4)

* $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$ vs. control (pairwise test)

GD: Gestation Day(s)

#Negative Week numbers denotes the period before pairing. The 2-week dose escalation period commenced in Week -6 for males and in Week -4 for females. Accordingly, the first week on the target dose was Week -4 for males and Week -2 for females. Males were dosed up to Day 29/30 after the start of mating and females were dosed up to GD20.

[a] This male was euthanised due to a large cut on its upper dorsal thorax which was clearly unrelated to treatment

[b] Corresponds to the treatment period at the target dose

[c] Corresponds to the days immediately after escalation to the target dose (males and females) and to the days immediately prior to pairing (for males) or to the last days of dosing (females)

[d] For the body weights from Week -2, Day 0 denotes the day of pairing whereas for the weights during gestation, Day 0 denotes the day of mating.

2.6.7.13 生殖発生毒性：EFD 試験

Test Article: Semaglutide

2.6.7.13.A ウサギを用いた EFD 試験

Study ID: 207360

Species/Strain: Rabbit/New Zealand White	**Duration of Dosing:** Gestation Day (GD) 6 to 19	**Location in CTD**: 4.2.3.5.2-3
Initial Age: 19-20 Weeks	**Day of Mating**: Day 0	**GLP Compliance:** Yes
Date of First Dose: 13 April 2008	**Day of Caesarean Section**: GD29	
Nominal Dose Levels: 0, 0.001, 0.0025, 0.0075 mg/kg/day	**Vehicle**: 1.42 mg/mL disodium hydrogen phosphate dihydrate,14.0 mg/mL propylene glycol, 5.5 mg/mL phenol and water for injection, pH 7.4	**Method of Administration**: Subcutaneous

Parameters collected:
Dams: Viability, Clinical Condition, Body Weight, Food Consumption, Water Consumption, Serum Glucose, Toxicokinetics, Macropathology, Pregnancy Performance
Foetuses: Body Weight and External, Visceral, and Skeletal Foetal Pathology

Special Features: None

NOAEL: 0.001 mg/kg/day

Brief conclusion: Semaglutide markedly reduced maternal body weight and food and water consumption. This coincided with increased post-implantation losses (mainly due to higher incidences of early resorptions), incomplete ossification of metacarpals, and increased incidences of minor skeletal and visceral abnormalities. The increased post-implantation losses and the foetal pathology findings were possibly secondary to the marked maternal effects, but a direct effect of semaglutide could not be excluded. Consequently, the NOAEL was considered to be the lowest dose tested, 0.001 mg/kg/day.

Nominal Dose Level (mg/kg/day)	0 (Control)	0.001	0.0025	0.0075
Initial Number of Animals	**22 F**	**22 F**	**22 F**	**22 F**
DAMS				
Toxicokinetics ($AUC_{0\text{-}24h}$ (nmol*h/L))				
Gestation Day 6	N/A	NC	9.22	145
Gestation Day 19	N/A	20.2	208	1530
Noteworthy Findings				
Died or euthanised/terminated prematurely	0	0	0	0
Clinical signs[a]				
Few faeces	0	0	2	7
Body weight change (kg)				
GD6-9	0.05	0.03	-0.06**	-0.18**
GD6-19	0.32	0.22	0.03**	-0.12**
GD20-29	0.13	0.22**	0.32**	0.43**
GD6-29	0.47	0.46	0.36*	0.32**
GD6-29 (% difference from control)	-	-2	-23	-32
GD6-29 adjusted for gravid uterine weight	-0.15	-0.15	-0.23	-0.25*
Absolute body weight				
GD18 (kg)	4.38	4.19*	4.12**	3.92**
GD18 (% difference from control)	-	-4	-6	-11
Food consumption (g/animal/day)				
GD6	190	169	156**	101**
GD19	186	156*	126**	99**
GD22	153	170	185**	180**
GD28	99	109	124*	164**
Water consumption (mL/animal/day)				
GD6	338	282*	240**	149**
GD19	310	258*	204**	170**
GD22	269	321*	341**	333**

Nominal Dose Level (mg/kg/day)	**0 (Control)**	**0.001**	**0.0025**	**0.0075**
Initial Number of Animals	**22 F**	**22 F**	**22 F**	**22 F**
GD28	206	235	259**	301**
Number pregnant	22	20	21	21
LITTER DATA				
Noteworthy Findings				
Post-implantation loss (%)	9.5	9.3	13.5	15.3
Resorptions, total	1.1	1.1	1.5	1.6
Resorptions, early	0.6	0.6	0.8	1.1
Litter size/live young	10.5	9.8	9.4	9.4
Foetal pathology (No. of foetuses (No. of litters))				
Number examined	232 (22)	196 (20)	198 (21)	197 (21)
Minor skeletal abnormalities (total)	9 (8)	16 (11)	41 (18)	41 (19)
Cranial, sutural bone	0	2 (2)	1 (1)	3 (3)
Cranial, fissures/extra sutures	0	2 (2)	5 (4)	7 (5)
Sternebrae, additional centre(s)	3 (3)	4 (3)	21 (10)	20 (9)
Sternebrae, bridge of ossification/partially fused/fused	0	2 (2)	1 (1)	6 (6)
Incomplete ossification/unossified				
Metacarpals/phalanges	13 (5)	8 (4)	18 (8)	36 (15)
Minor visceral abnormalities				
Kidneys, dilated renal pelvis	2 (2)	2 (2)	1 (1)	5 (4)
Forelimb/paw flexure	0	0	2 (2)	3 (3)

NC Not calculated

[a] Number of animals with clinical sign

* $p<0.05$, ** $p<0.01$ vs. control (pairwise test)

GD – gestation day(s)

2.6.7.13.B カニクイザルを用いた EFD 試験

Study ID: 208486

Species/Strain: Cynomolgus monkey	**Duration of Dosing:** Gestation Day (GD) 16 to 50	**Location in CTD:** 4.2.3.5.2-5
Initial Age: at least 3 years	**Day of Mating**: Day 0	
Date of First Dose: 06 April 2009	**Day of Caesarean Section**: GD100	**GLP Compliance:** Yes
Nominal Dose Levels: 0, 0.015, 0.075, 0.15 mg/kg every third day	**Vehicle/Formulation**: 1.42 mg/mL disodium hydrogen phosphate dihydrate,14.0 mg/mL propylene glycol, 5.5 mg/mL phenol and water for injection, pH 7.4	**Method of Administration**: subcutaneous injection

Parameters collected:
Females: Viability, Clinical Condition, Body Weight, Pregnancy Monitoring, Toxicokinetics, Macropathology
Foetuses: Foetal Body Weight, Foetal Body Measurements, Foetal Organ Weights, External, Visceral and Skeletal Foetal Pathology, histopathological examination of abnormalities

Special Features: The females were dosed on GD 16, 18, and 20, and every third day thereafter until GD50 (inclusive).
Dose escalation on GD16 and 18 to ensure tolerability to the target dose and steady state exposure on GD20.

NOAEL: 0.015 mg/kg every third day

Brief conclusion: Semaglutide caused maternal body weight loss in all treated groups. There was no effect on embryo-foetal survival or embryo-foetal growth assessed by foetal weights and measurements. There were no effects on foetal heart morphology or major blood vessel organisation. External, visceral and skeletal examination revealed a few abnormalities at the high and intermediate dose levels which were without commonality in nature, but the incidences of the findings exceeded the incidences in the control group and in the limited historical control data, thus a direct relationship to treatment could not be excluded. At the low dose level, the marked reddening of the skin and the kinked and stiff wrist in one foetus were considered to be due to the position of the foetus in uterus. The generalised or focal reddening seen in all treated groups was seen at similar incidences in the control foetuses and was therefore, especially in the light of the absence of a similar finding in the pre- and post-natal study, considered incidental or related to the terminal procedures. In the absence of any findings considered to be related to treatment at the low dose level, 0.015 mg/kg every third day was considered to be the NOAEL

Nominal Dose Levels (mg/kg every third day)	**0 (Control)**	**0.015**	**0.075**	**0.15**
Initial Number of Animals (initially pregnant females)	**16 F**	**16 F**	**16 F**	**16 F**
FEMALES				
Toxicokinetics				
$AUC_{0\text{-}48h}$ (nmol*h/L)				
Gestation Day 16	N/A	1270	N/A	N/A
Gestation Day 18	N/A	N/A	7310	N/A
$AUC_{0\text{-}72h}$ (nmol*h/L)				
Gestation Day 20	N/A	N/A	N/A	24000

Nominal Dose Levels (mg/kg every third day)	**0 (Control)**	**0.015**	**0.075**	**0.15**
Initial Number of Animals (initially pregnant females)	**16 F**	**16 F**	**16 F**	**16 F**
Gestation Day 50	N/A	2000	10400	30000
Noteworthy Findings				
Died or euthanised/terminated prematurely	0	0	0	0
Clinical signs[a]				
Thin/cachexia	0	0	2	1
Dehydration	0	0	0	1
Low activity	0	0	0	1
Body weight				
Terminal body weight (kg)	4.1	3.9	4.3	4.1
Body weight change				
GD16-50[b] (kg)	0.2	-0.3***	-0.5***	-0.5***
GD15-50 (% change from first day in period)	9.7	-12.1	-14.3	-17.6
GD50-100 (% change from first day in period)	20.6	34.5	43.3	46.4
GD15-100 (% change from first day in period)	32.3	18.2	22.9	20.6
Pregnancy				
Number of females with abortion	1	2	2	2
FOETAL DATA				
Foetal pathology				
External				
Skin (variation)				
Generalised reddening	1[c]	1	1[c]	1
Focal reddening	2	2[c]	3	2
Histopathology: congested	3	2	4	2

Nominal Dose Levels (mg/kg every third day)	0 (Control)	0.015	0.075	0.15
Initial Number of Animals (initially pregnant females)	**16 F**	**16 F**	**16 F**	**16 F**
vessel, multifocal[d]				
Histopathology: haemorrhage, multifocal dermis and subcutis[d]	3	2	4	2
Number of foetuses examined histologically	6	3	4	3
Extremities (malformation)				
Wrist kinked and stiff	0	1	0	0
Visceral				
Brain (malformation)				
Right hemisphere misshapen, caused by blood between dura mater and brain	0	0	0	1
Kidneys (malformation)				
Fused in the hilus region[e]	0	0	1	0
Liver (variation)				
Cysts	0	0	1	0
Histopathology: focal angiectasia, moderate	-	-	1	-
Skeletal				
Vertebral column (malformation)				
Shift in alignment of the vertebrae, ribs and sternebrae at the cervico-thoracic border	0	0	1	1

GD Gestation Day

-: Not examined or not applicable

[a] Number of animals with clinical sign

[b] GD16-50 = dosing period

[c] One animal was normal when removed from the mother, but reddening appeared after euthanisation of the foetus with barbiturate

[d] , Minimal-slight

[e] No indication of impaired function
* p<0.05, ** p<0.01 vs. control (pairwise test)

2.6.7.14 生殖発生毒性：母体の機能ならびに出生前及び出生後の発生（PPND）に関する試験

Test Article: Semaglutide

2.6.7.14.A カニクイザルを用いた EFD 及び PPND 試験

Study ID: 210061

Species/Strain: Cynomolgus monkey	**Duration of Dosing:** Gestation Day (GD)16 to140	**Location in CTD:** 4.2.3.5.3-1
Initial Age: 3-10 years	**Day of Mating**: Day 0	
Date of First Dose: 21 April 2010	**Day of necropsy**: GD180	**GLP Compliance:** Yes
Nominal Dose Levels: 0, 0.015, 0.075, 0.15 mg/kg every third day	**Vehicle/Formulation**: 1.42 mg/mL disodium hydrogen phosphate dihydrate,14.0 mg/mL propylene glycol, 5.5 mg/mL phenol and water for injection, pH 7.4	**Method of Administration**: subcutaneous injection

Parameters collected:
Females: Viability, Clinical Condition, Body Weight, Pregnancy Monitoring, Pregnancy Outcome, Toxicokinetics, Organ Weights, Macropathology.
Infants: Viability, Clinical Condition, Body Weight, Neurobehavioral Performance, Grip Strength, Infant Body Measurements, Haematology, Clinical Chemistry, External Abnormalities, Skeletal Development (X-ray), Organ Weights, Macropathology and Histopathology.

Special Features: The females were dosed on GD 16, 18, and 20, and every third day thereafter until GD140 (inclusive).
Dose escalation on GD16 and 18 to ensure tolerability to the target dose and steady state exposure on GD20.

No Observed Adverse-Effect Level: 0.015 mg/kg every third day

Brief conclusion: Two pregnant females were euthanised prematurely during the study, one control female on GD120 and one intermediate dose female on GD142. Both animals were unremarkable until the day of euthanisation where they were in poor clinical condition and foetal death was observed by ultrasound. Both foetuses were autolysed. These deaths were not considered to be treatment related. Semaglutide caused a marked maternal body weight loss initially, which coincided with an increase in early pregnancy losses, at the intermediate and high dose levels, and lead to delivery of slightly smaller infants. The apparent increase in post-natal deaths was considered incidental as the incidences were within the historical control range. There were no treatment related external, macroscopic or histopathologic abnormalities. In the absence of background data to support the interpretation that the early pregnancy losses were secondary to the marked maternal body weight loss, the NOAEL was established at the low dose level.

Nominal Dose Levels (mg/kg every third day)	**0 (Control)**	**0.015**	**0.075**	**0.15**
Initial Number of Animals (initially pregnant females)	**24 F**	**22 F#**	**22 F#**	**24 F**
FEMALES				
Toxicokinetics				
$AUC_{0\text{-}48h}$ (nmol*h/L)				
Gestation Day 16	N/A	1290	N/A	N/A
Gestation Day 18	N/A	N/A	8140	N/A
Gestation Day 20	N/A	N/A	N/A	17700
$AUC_{0\text{-}72h}$ (nmol*h/L)				
Gestation Day 50	N/A	2900	14000	27900
Gestation Day 140	N/A	1320	6720	14400
Noteworthy Findings				
Died or euthanised/terminated prematurely[a]	1	0	1	0
Body weight change (% of first day in period, in females with no pregnancy loss)				
GD16-50	3	-6	-15	-16
GD50-98	22	27	24	19
GD98-140	13	14	14	14
GD50-140	38	45	41	35
GD16-140	42	37	21	14
GD16-PPD175	31	37	35	16
Body Weight (kg, in females with no pregnancy loss)				
GD16	3.6	3.5	3.4	3.7
GD140	5.1	4.8	4.1***	4.2***

Nominal Dose Levels (mg/kg every third day)	0 (Control)	0.015	0.075	0.15
Pregnancy				
Number of early pregnancy losses	2	1	5	8
Number of late pregnancy losses	2	3	1	2
Number of stillbirths	1	1	1	0
Number of total pregnancy losses	5	5	7	10
INFANT DATA				
Number of infants born alive	19	17	15	14
Number of infants found dead	0	4	2	3
Number of infants euthanised	0	1	1	0
Number of infants alive at scheduled termination PPD181±1	19	12	12	11
Body weight (g)				
PPD1	338	334	299	290*
PPD181±1 (at necropsy)	1053	1076	1039	1040
Foetal body measurements (cm)				
Crown-heel length, PPD1	25.4	24.9	23.7***	24.1*
Chest circumference, PPD1	12.5	12.6	11.9*	11.8*
Length of upper extremities, PPD84				
Right	9.0	8.3*	8.5	8.4*
Left	9.0	8.4*	8.4*	8.4*
Length of lower extremities, PPD1				
Right	9.6	9.3	9.0	8.7*
Left	9.6	9.3	9.0	8.7*
Length of lower extremities, PPD21				
Right	10.8	10.6	10.0**	9.9**
Left	10.8	10.4	10.2*	9.8***
Length of lower extremities, PPD84				
Right	12.8	12.1*	2.2	11.8**
Left	12.7	12.2	12.2	12.1

22 females included instead of the intended 24, since monkey Chorion Gonadotropin analysis confirmed that 2 females in each group were not pregnant

[a] Foetal death was observed on ultrasound on GD120 (control) or GD142 (intermediate dose). The foetuses were removed and the maternal animals were euthanised due to poor clinical condition.

PPD *Post Partum* Day

* $p<0.05$, ** $p<0.01$ vs. control (pairwise test)

2.6.7.15 幼若動物を用いた試験

Test Article: Semaglutide

Species/ Strain	Route of Administration	Duration of Dosing	Nominal Dose (mg/kg/day)	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	Study ID
Rat/Sprague Dawley	Subcutaneous	35 days (from Day 21 to 56 of age)	0 (pair-fed)# 0.03 (pair-fed)# 0.13 (pair-fed)# 0.6 (*ad libitum* fed) 0 (*ad libitum* fed)	10 M & 10 F 10 M & 10 F 10 M & 10 F 10 M & 10 F 10 M & 10 F	Semaglutide was generally well tolerated and resulted in a pharmacologically mediated marked reduction of body weight gain in both males and females, which, despite the pair-feeding, was lower in the semaglutide treated males than in the pair-fed controls, indicating that semaglutide affected body weight to an extent beyond the effect of the reduced food consumption in males. Sexual maturation was delayed in a non-dose-dependent manner at all dose levels. In females, sexual maturation occurred at a higher body weight than in the pair-fed controls.	214276

One control group and low and intermediate dose semaglutide groups were pair-fed to the high dose semaglutide group.

幼若ラットを用いた 11 週間反復皮下投与毒性試験及び 4 週間回復性試験 **Study ID: 214479**

Species/Strain: Rat/Sprague Dawley	**Duration of Dosing:** 10 weeks (preceded by 1 week dose escalation)	**Location in CTD: 4.2.3.5.4-2**
Initial Age: 21 days at start of treatment	**Duration of Post-dose:** 4 weeks before start of mating trial	
Date of First Dose: 5 May 2015	**Method of Administration:** Subcutaneous	**GLP Compliance:** Yes
Nominal dose levels: 0, 0.02, 0.13, 0.6 mg/kg/day	**Vehicle/Formulation:** Vehicle for semaglutide (1.42 mg/mL disodium hydrogen phosphate dihydrate,14.0 mg/mL propylene glycol, 5.5 mg/mL phenol and water for injection, pH 7.4)	

Parameters collected:
All animals: Viability, Clinical Condition, Body Weight, Food Consumption, Haematology, Clinical Chemistry, Urinalysis, Limb Measurements, Organ Weights, Macropathology and Histopathology.
Recovery/reproductive phase animals: Toxicokinetics, Sexual maturation, Neurobehaviour, Oestrous cycle, Mating performance and Fertility

Special Features: A 1-week dose escalation phase (Day 21 to 28 of age) to ensure tolerability at the target dose levels. Two (2) control groups (1 *ad libitum* fed and one pair-fed control group). The pair-fed control, and the low and mid dose semaglutide treated groups, were pair-fed to the high dose semaglutide treated group.

No Observed Adverse Effect Level: 0.6 mg/kg/day

Brief Conclusion: Semaglutide was well tolerated and no treatment related unscheduled deaths occurred. As expected, food consumption in the *ad libitum* fed high dose semaglutide group was markedly reduced compared to the *ad libitum* fed control group. There was a trend that the pair-fed animals in the low and intermediate dose groups, and occasionally the pair-fed control females, consumed slightly less food than the high dose group. Despite the pair-feeding, the body weight gain was lower in the semaglutide treated groups than in the pair-fed controls. In females dosed with semaglutide, vaginal opening was delayed compared with the pair-fed controls and sexual maturation occurred at a higher body weight than in the pair-fed controls. In males, despite similar body weights in the semaglutide treated groups and the pair-fed control group, at the age at onset of preputial separation in the pair-fed control group, a delay in onset of preputial separation occurred in the high dose semaglutide treated males, and body weight at the onset of preputial separation was higher in the high dose males than in the pair-fed controls. Completion of preputial separation was delayed in all semaglutide treated groups compared with the pair-fed controls and the body weight at completion of preputial separation was higher than in the pair-fed control group. As there were no consequential effects upon the reproductive performance, the delays in attainment of sexual maturation were not considered to be adverse. Clinical chemistry revealed minor non-adverse changes of several parameters and organ weights were generally low secondary to the effect on body weight, although absolute and body weight-relative heart weights were reduced further than what would be expected based on the reduced terminal body weight. Given the minor magnitude of the reduction and in the absence of correlating histopathology findings, the reduced heart weights were not considered adverse.
Macropathology revealed scabs in the skin of the scapular region in approximately half of the high dose animals with histopathological correlates. The scapular region was not the injection site and the findings which were mainly seen in epidermis and dermis, were of uncertain relation to treatment. Hypertrophy of Brunner's glands in the duodenum was observed in all semaglutide treated groups. Since the Brunner's glands hypertrophy was not associated with inflammation or cellular damage and as recovery occurred following the cessation of treatment, the finding was not considered adverse. In the absence of any adverse changes, the NOAEL was considered to be the highest dose tested, 0.6 mg/kg/day.

Nominal Dose (mg/kg/day)	**0 (Control)**	**0 (Control)**	**0.02**	**0.13**	**0.6**	**0 (Control)**	**0 (Control)**	**0.02**	**0.13**	**0.6**
Feeding Regimen	*Ad libitum*	Pair-fed	Pair-fed	Pair-fed	*Ad libitum*	*Ad libitum*	Pair-fed	Pair-fed	Pair-fed	*Ad libitum*
Initial Number of Animals										
Main phase	M: 10	M: 10	M: 10	M: 10	M: 10	F: 10	F: 10	F: 10	F: 10	F: 10
Recovery/Reproductive phase	M: 20	M: 20	M: 20	M: 20	M: 20	F: 20	F: 20	F: 20	F: 20	F: 20
Toxicokinetics										
Week 5: AUC_{tau} (nmol*h/L)	N/A	N/A	313	2290	11100	N/A	N/A	344	2400	11200
Week 11: AUC_{tau} (nmol*h/L)	N/A	N/A	439	3560	13900	N/A	N/A	472	3660	16100
Noteworthy Findings										
Died or euthanised/terminated prematurely	0	0	1[a]	0	0	0	0	0	0	0
Clinical signs										
Injection site observations[b]										
Skin incrustations	8	3	18	13	33	2	0	3	4	7
Bodyweight (all animals)										
Terminal body weight (g)	524	467^^	439**	425**	423**	291	271^	256**	253**	262**
Bodyweight gain (all animals)										
Day 21 - Day 24 of age (g)	16	12^^	10**	9**	13**	14	12^^	9**	8**	11**
Day 21- Day 24 of age (% difference from control)[c]	-	-25^^	-17**	-25**	+8**	-	-14^^	-25**	-33**	-8**
Day 21 - Day 98 of age (g)	477	420^^	394**	377**	377**	246	225^^	214**	208**	216**
Day 21- Day 98 of age (% difference from control)[c]	-	-12^^	-6**	-10**	-10**	-	-9^^	-5**	-8**	-4**
Recovery period, Day 1-46 of recovery	62	94^^	114*	152**	131**	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Recovery period, Day 1-46 of recovery (% difference from control)[c]	-	+52^^	+21*	+62**	+39**	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Recovery period, Day 1-29 of recovery (g)	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A-	15	32^^	25	35	42*
Recovery period, Day 1-29 of recovery (% difference from control)[c]	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	-	+113^^	-22	+9	+31*
Gestation period, Day 1-14 of gestation	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	59	58	56	58	54

Nominal Dose (mg/kg/day)	**0 (Control)**	**0 (Control)**	**0.02**	**0.13**	**0.6**	**0 (Control)**	**0 (Control)**	**0.02**	**0.13**	**0.6**
Gestation period, Day 1-14 of gestation (% difference from control)[c]	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	-	-2	-3	0	-7
Food consumption (all animals)[d]										
Day 21-34 of age (g/animal/day)	15	10	10	9	10	14	10	10	9	10
Day 35-97 of age (g/animal/day)	29	26	25	25	25	20	18	17	17	19
Day 21-97 of age (g/animal/day)	26	23	22	22	23	19	17	16	16	17
Ulna growth (all animals)										
Day 21 - Day 35 of age (mm)[c]	6.1	5.4^^	5.3	5.2**	5.5**	5.9	5.5	5.2	4.5**	5.2
Day 21 - Day 91 of age (mm)[c]	16.9	16.9	16.2	16.2	16.6	13.8	13.4	13.4	13.2	13.8
Sexual maturation (Recovery/Reproductive phase animals)										
Vaginal opening [c]										
Age at attainment (days)	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	33.1	34.4	37.3**	41.8**	38.5**
Body weight at attainment (g)	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	114	108	122*	137**	130**
Preputial separation [c]										
Age at onset (days)	41.6	41.2	40.9	40.4	45.2**	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Body weight at onset (g)	204	178^^	164**	151**	197**	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Age at completion (days)	46.4	45.7	48.5**	50.9**	50.6**	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Body weight at completion (g)	239	213^^	225	229*	234**	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Haematology[c]										
Haematocrit (L/L)										
Week 11	0.443	0.445	0.440	0.440	0.461*	0.436	0.419^^	0.426	0.435*	0.442**
Week R4	0.476	0.458^	0.471	0.462	0.471	0.456	0.413^	0.450	0.461**	0.463**
Haemoglobin (g/dL)										
Week 11	15.0	15.2	15.0	15.2	15.8**	15.0	14.7	14.7	15.2*	15.6**
Week R4	15.4	14.9	15.1	14.8	15.3	15.2	13.9	14.7	15.1	15.2
Red blood cells ($*10^{12}$/L)										
Week 11	8.48	8.37	8.41	8.08	8.68	8.11	7.93	8.10	8.36**	8.43**
Week R4	8.79	8.45^	8.47	8.45	8.45	8.36	7.40^	7.99	8.24*	8.14*

Nominal Dose (mg/kg/day)	0 (Control)	0 (Control)	0.02	0.13	0.6	0 (Control)	0 (Control)	0.02	0.13	0.6
Mean cell haemoglobin concentration (g/dL)										
Week 11	33.8	34.0	34.1	34.6**	34.2	34.3	35.0^^	34.6	35.0	35.3
Week R4	32.3	32.5	32.1	32.2	32.6	33.2	33.7^	32.7**	32.7**	33.0**
Clinical chemistry[c]										
Aspartate aminotransferase (U/L)										
Week 11	67	66	72	73	84**	69	68	71	75	81**
Week R4	83	69	72	71	78**	79	72	74	65	88
Glucose (mmol/L)										
Week 11	8.16	7.40	7.69	8.34	6.75	7.34	7.77	7.30	6.08**	5.96**
Week R4	6.87	6.79	7.08	7.35	6.91	6.71	7.79^	7.76	8.37	6.78*
Triglycerides (mmol/L)										
Week 11	0.91	0.66	0.36**	0.28**	0.20**	0.31	0.36	0.30	0.22*	0.18**
Week R4	0.72	0.74	0.77	0.49	0.64	0.36	0.41	0.39	0.47	0.34
Total protein (g/L)										
Week 11	60	60	60	60	61	65	63	62	61	60*
Week R4	65	67	64	64	63	66	65	66	64	67
Albumin (g/L)										
Week 11	34	34	34	33	34	39	38	36*	36**	35**
Week R4	35	35	34	35	35	39	38	39	37	39
Organ Weights[e]										
Terminal body weight (g)										
Week 11	533	468^^	433**	432**	417**	293	271	258*	246**	251**
Week R4	588	565	561	575	563	363	356	341	354	370
Adrenals										
Absolute weight (g)	0.054	0.058	0.055	0.065	0.056	0.067	0.064	0.065	0.068	0.068
% of body weight	0.0102	0.0125^^	0.0126	0.0151*	0.0136*	0.0228	0.0235	0.0252	0.0278**	0.0271**
Brain										
Absolute weight (g)	2.219	2.155	2.126	2.138	2.186	1.965	1.897	1.973	1.904	1.973*
% of body weight	0.417	0.461^^	0.491*	0.496*	0.529**	0.680	0.701	0.767**	0.777**	0.788**
Epididymides										
Absolute weight (g)	1.242	1.187	1.165	1.177	1.171	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A

Nominal Dose (mg/kg/day)	**0 (Control)**	**0 (Control)**	**0.02**	**0.13**	**0.6**	**0 (Control)**	**0 (Control)**	**0.02**	**0.13**	**0.6**
% of body weight	0.233	0.254^	0.270	0.273*	0.283**	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Heart										
Absolute weight (g)	1.627	1.457^^	1.292**	1.299**	1.227**	1.030	0.966	0.863**	0.823**	0.836**
% of body weight	0.306	0.311	0.299	0.301	0.294*	0.353	0.357	0.335*	0.335*	0.333*
Kidneys										
Absolute weight (g)	3.624	3.218^^	3.187	3.048	3.159	2.163	1.927^	1.950	1.923	2.030
% of body weight	0.682	0.688	0.737	0.707	0.759**	0.741	0.712	0.755	0.782**	0.807**
Liver										
Absolute weight (g)	20.191	18.068^^	16.532	16.538	15.530**	11.016	10.579	9.819	9.823	9.383*
% of body weight	3.79	3.86	3.82	3.83	3.71	3.75	3.91	3.81	3.99	3.72
Lungs and bronchi										
Absolute weight (g)	1.939	1.722^^	1.745	1.749	1.732	1.489	1.315^^	1.362	1.291	1.307
% of body weight	0.364	0.367	0.403	0.406*	0.416*	0.511	0.487	0.529	0.527	0.520
Pituitary										
Absolute weight (g)	0.013	0.015	0.013	0.014	0.014	0.018	0.019	0.016*	0.016*	0.017*
% of body weight	0.0025	0.0031^^	0.0030	0.0033	0.0033	0.0061	0.0071^	0.0062	0.0066	0.0066
Salivary glands										
Absolute weight (g)	0.771	0.719	0.684	0.651	0.725	0.459	0.444	0.420	0.412	0.440
% of body weight	0.145	0.154	0.158	0.151	0.175**	0.158	0.164	0.163	0.168	0.175
Seminal Vesicles										
Absolute weight (g)	1.677	1.282^^	1.315	1.230	1.417					
% of body weight	0.315	0.275	0.304	0.286	0.343**					
Spleen										
Absolute weight (g)	0.857	0.798	0.715	0.731	0.680*	0.585	0.575	0.539	0.525	0.526
% of body weight	0.161	0.171	0.165	0.170	0.162	0.199	0.213	0.209	0.213	0.209
Testes										
Absolute weight (g)	3.629	3.413^	3.467	3.452	3.546					
% of body weight	0.682	0.730	0.802**	0.800**	0.855**					
Thyroids/parathyroids										
Absolute weight (g)	0.024	0.021	0.018	0.017	0.017*	0.015	0.017	0.015	0.014	0.015
% of body weight	0.0044	0.0044	0.0043	0.0040	0.0040	0.0050	0.0063^	0.0059	0.0056	0.0058
Macropathology (number of animals examined)	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Scabs (scapular region)[f]	0	0	0	0	5	0	0	0	0	4

Nominal Dose (mg/kg/day)	**0 (Control)**	**0 (Control)**	**0.02**	**0.13**	**0.6**	**0 (Control)**	**0 (Control)**	**0.02**	**0.13**	**0.6**
Histopathology										
Duodenum, main study (number of animals examined)	10	10	10(1)[g]	10	10	10	10	10	10	10
Brunner's gland hypertrophy, minimal	0	0	7	5	3	0	0	4	4	3
Brunner's gland hypertrophy, slight	0	0	0	5	7	0	0	0	5	7
Brunner's gland hypertrophy, total	0	0	7	10	10	0	0	4	9	10
Duodenum, recovery/reproductive phase (number of animals examined)										
Brunner's gland hypertrophy, minimal	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0
Brunner's gland hypertrophy, total	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0

* - $p<0.05$ ** - $p<0.01$ (pairwise test, semaglutide treated groups versus pair-fed control)

^ - $p<0.01$ ^^ - $p<0.01$ (pairwise test, pair-fed control group versus *ad libitum* fed control group)

[a] Accidental death due to drop, not related treatment with semaglutide

[b] Number of animals with injection site observation

[c] Pair-fed control versus *ad libitum* fed control and semaglutide treated groups versus pair-fed control.

[d] During the recovery period, food consumption was increased in the semaglutide treated groups and the pair-fed control group, compared with the *ad libitum* fed control group.

[e] At scheduled termination of the recovery/reproductive phase animals, no notable differences, were observed between controls and groups previously treated with semaglutide, demonstrating that full or partial recovery from the effects of semaglutide had occurred (data not shown).

[f] Histopathological correlates comprised scabs, epidermal ulceration and hyperplasia, dermal fibrosis, dermal and subcutaneous mixed cell inflammatory cell infiltrate, and a single incidence of degeneration/regeneration/necrosis of the panniculus muscle. It should be noted that the scapular region was not the injection site and that the findings in the scapular region was mainly seen in the superficial layers of the skin (epidermis and dermis). Consequently, the findings in the skin of the scapular region were of uncertain relation to treatment.

[g] Including recovery/reproductive phase animal No. 21, euthanised due to trauma on Day 58 of age.

2.6.7.16 局所刺激性

Test Article: Semaglutide

Species / Strain	Route of Administration*	Nominal Doses	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	Study ID
Rabbit/New Zealand White	Intramuscular Intravenous Intra-arterial	1.35 mg/mL and 0.06 mL per injection site, right side 0 mg/mL (vehicle control) and 0.06 mL per injection site, left side	4 M 4 M 4 M	A mean body weight loss of 6-8% from Day 1 to Day 5 in all groups corresponded with markedly low food consumption. No changes observed at clinical examination of the injection sites or at the macropathologic and histopathologic examinations could be attributed to semaglutide. The changes observed included minimal or slight inflammatory cell reaction, perivascular or vascular necrosis, intima proliferation and haemorrhage, and were also seen in the vehicle treated tissues. Consequently, these mild changes were attributed to the vehicle or the administration procedures themselves.	212073
Pig /non-pigmented SPF	Subcutaneous	Semaglutide, 10 mg/mL Vehicle* Insulatard® (100 U/mL); 0.9% saline 0.2 mL/injection site, single dose 2 and 5 days prior to termination	5 F in total (all animals received all 4 treatments on the dosing days i.e.5 injection sites/test compound/day)	Histopathology 2 and 5 days after the injections revealed very similar effects of the 10 mg/mL semaglutide dose formulation and the vehicle, which included either no reaction or minimal to slight inflammatory reactions. The incidences and severities of the changes were slightly milder than in the Insulatard® comparator group, whereas the saline control group was the one with the mildest changes and most injection sites with no tissue reaction.	206664

* Vehicle: 1.42 mg/mL disodium hydrogen phosphate dihydrate, 14.0 mg/mL propylene glycol, 5.5 mg/mL phenol and water for injection, pH 7.4

2.6.7.17 その他の試験

2.6.7.17.A 免疫原性

No antigenicity studies with semaglutide have been conducted.

2.6.7.17.B 免疫毒性

No immunotoxicity studies with semaglutide have been conducted.

2.6.7.17.C 依存性

No dependence studies with semaglutide have been conducted.

2.6.7.17.D 代謝物

No toxicity studies with metabolites of semaglutide have been conducted.

2.6.7.17.E 不純物及び溶出物

不純物の品質確認用に実施した試験

Species/ Strain	Route of Administration	Duration of Dosing	Nominal Doses (mg/kg/day)	Gender and No. per Group	NOAEL (mg/kg/day)	Noteworthy Findings	Study ID
Rat/Sprague Dawley	Subcutaneous	4 weeks (preceded by 2 weeks dose escalation)	0 0.86 (aged) 0.86 (fresh)	12 M & 12 F (main) 6 M & 6 F (recovery)	N/A	The majority of findings were considered either directly or indirectly (via reduced food consumption and body weight) related to the pharmacological action of semaglutide. Generally, the range and extent of the treatment-related findings were similar for the fresh and aged forms of semaglutide and all were non-adverse. Accordingly, the few minor differences were of no toxicological significance.	209159
Rat/Sprague Dawley	Subcutaneous	13 weeks (preceded by 2 weeks dose escalation)	0 0.48 (synthetic) 0.45 (recombinant)	10 M & 10 F (main) 5 M & 5 F (recovery)	N/A	The majority of findings were considered either directly or indirectly (via reduced food consumption and body weight) related to the pharmacological action of semaglutide. Generally, the range and extent of the treatment-related findings were similar for the synthetic and recombinant forms of semaglutide and the few minor differences were all of no toxicological significance.	210195*

* In the original report for study 210195, semaglutide produced by the recombinant method is also referred to as *semi-recombinant semaglutide*. For consistency across all summary documentation, semaglutide manufactured by this method is only referred to as *recombinant semaglutide.*

2.6.7.17.F 添加物

No studies have been conducted to qualify the excipients separately.

2.6.7.17.G　メカニズム試験

ラットを用いた EFD に及ぼす影響の検討

Species / Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Nominal Doses	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	Study ID
Whole Embryo Culture Studies						
Rat/Sprague Dawley	Subcutaneous and *in vitro* (Whole Embryo Culture, WEC)	Females: 2 weeks prior to pairing until Day 11, 13 and 15 after mating and 48 hr *in vitro*	0, 0.2, 0.4 mg/kg	3 groups of 15 F for embryo culture and direct embryo-foetal evaluation 3 groups of 4F for providing serum from treated animals	The study confirmed the findings from the *in vivo* EFD rat study (207361). Reductions in yolk sac diameter and embryonic size were more marked on GD13 and 15 compared to GD11. Also, embryonic death was observed on GD 13 and 15. The effects observed following whole embryo culture (WEC) were similar to those observed *in vivo* and thereby confirmed suitability of WEC as a test system.	209213
Rat/Sprague Dawley	*In vitro* (WEC)	48 h *in vitro*	0, 0.85, 2.7, 8.5, 27, 85, 125, 575 and 1000 µmol/L	9 groups of 10 GD9.5 embryos	A reduction in yolk sac diameter and embryonic growth. Low incidences of morphological abnormalities were observed in all groups.	210019
Rat/Sprague Dawley	*In vitro* (WEC)	48 h *in vitro*	0, 8.5, 85 and 850 nmol/L, and a 10-fold higher molar concentration of the GLP-1 receptor antagonist (exendin 9-39)	8 groups of 15 GD9.5 embryos	Reduced yolk sac diameter ≥85nmol/L. No apparent effect on embryonic growth. Additionally, evidence of heart enlargement and other malformations were observed at 850 nmol/L. Yolk sac effects were prevented by the prior addition of the GLP-1 receptor antagonist exendin 9-39. Examination by transmission electron microscopy showed a reduced number of pinocytotic vesicles in the yolk sac membrane.	211213

Species / Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Nominal Doses	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	Study ID
Rat/Sprague Dawley NNC0113-0236 *	*In vitro* (WEC)	48 h *in vitro*	50, 500 and 5000 nmol/L and a 10-fold higher molar concentration of the GLP-1 receptor antagonist.	8 groups of 15 GD9.5 embryos	NNC 0113-0236 caused reduced yolk sac diameter ≥50 nmol/L. An increased incidence of heart enlargement was apparent at 500 and 5000 nmol/L. These effects were prevented by prior treatment with the GLP-1R antagonist, exendin 9-39.	211341
Rat/Sprague Dawley Native GLP-1	*In vitro* (WEC)	48 h *in vitro*	10, 100 and 1000 nmol/L and a 10-fold higher molar concentration of the GLP-1R antagonist.	8 groups of 15 GD9.5 embryos	Reduced embryonic growth ≥100 nmol/L and above and on yolk sac diameter at 1000 nmol/L. These effects were prevented by prior treatment with the GLP-1R antagonist, exendin 9-39.	211342
Studies to explore GLP-1 receptor expression and localisation, receptor activation, pinocytotic activity and transport across the yolk sac membrane						
Rat/Sprague Dawley	*In vitro*	N/A	None	6 groups of 30 GD9.5 embryos	Specific binding of ^{125}I GLP-1 in yolk sac tissue was observed at GD11.5 and 13.5. The binding was concurrent with GLP-1 receptor mRNA expression in rat yolk sac at GD11.5. No binding of ^{125}I GLP-1 was observed at GD9.5. These results confirmed the presence of the GLP-1R in the yolk sac.	211238
Rat/Sprague Dawley	*In vitro*	N/A	N/A	N/A	The GLP-1R was identified in rat yolk sac from GD9.5, with increasing levels of expression seen at GD11.5 and GD13.5. In embryonic tissue, GLP-1R expression was seen at GD13.5 and GD16.5.	212301

Species / Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Nominal Doses	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	Study ID
Rat/Sprague Dawley	*In vitro* WEC study	48 h in culture	850 nmol/L	45 untreated GD9.5 embryos 55 treated GD9.5 embryos	By TEM, the number of pinocytotic vesicles per unit length of yolk sac membrane was found to be reduced from 27.1 in controls to 8.6 in semaglutide exposed embryos. This confirmed the findings in study 211213. qPCR confirmed that the GLP-1R was expressed in rat yolk sac at GD11.5. The expression of the GLP-1R in rat yolk sac after 48h of semaglutide treatment was significantly lower than in untreated yolk sacs.	211489
Rat/Sprague Dawley	*In vitro*	N/A	850 nmol/L	N/A	This Ussing chamber study demonstrated that acute *in vitro* exposure to semaglutide reduced trans-cellular transport of the macropinocytotic marker FITC-dextran 70kD across the yolk sac membrane.	212241
Cynomolgus monkey	*In vitro*	N/A	N/A	N/A	No GLP-1R protein was detected in the four cynomolgus monkey yolk sacs examined. Using ISH, no GLP-1R mRNA was detected in three yolk sacs while tissue from one yolk sac had a weak signal in the endodermal layer of the membrane. Using RT-PCR, no expression of GLP-1R was detected. In conclusion, no GLP-1R expression could be detected in yolk sacs from cynomolgus monkeys using immunohistochemistry, *in situ* hybridisation and RT-PCR.	JHES150306
***In vivo* studies**						
Rat/Sprague Dawley	Subcutaneous	Females: 2 weeks prior to pairing until Day 17 after mating	Only females were dosed in this study Group 1: 0 Group 2: 0.03 Group 3: 0.15	24 F	Maternal plasma glucose, leptin and stress hormones were unlikely to play a causative role in the embryotoxicity observed with semaglutide in rats.	208485

Species / Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Nominal Doses	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	Study ID
Rat/Sprague Dawley Test compound NNC 0113-0236 *	Intravenous infusion	Females: 11 days prior to pairing until Day 17 after mating	Only females were dosed in this study Group 1: 0 Group 2: 240 Group 3: 1200 Group 4: 2400 Group 5: 4800 [nmol/kg/day]	12 F	Embryo-foetal growth and survival was dose-dependently affected and a range of skeletal and major blood vessel abnormalities were recorded in the foetuses (tail, hind limb, digit, bent fore limb long bones, ribs and clavicle/scapula and major blood vessel abnormalities).	211411
Rat/Sprague Dawley Test compound NNC 0113-0236 *	Intravenous infusion	Females: From 10 days before paring until termination on following days after pairing Gr. 1: GD 17 Gr. 2: GD 8 Gr. 3: GD 13 Gr. 4: GD 17	Only females were dosed in this study Gr. 1 received 0 and all other groups received 2160 nmol/kg/day during the dosing period following an up titration phase	24 F	There was no effect on embryo-foetal survival and development when dams were treated until GD 8. In animals where exposure continued through the period of gestation when the embryo is entirely dependent on yolk sac function for nutrition (infusion was stopped on gestation day 13), foetal observations comprised; kinked tails, malrotated hindlimbs, digit abnormalities, and major blood vessel abnormalities. In the animals where exposure continued throughout the period of organogenesis (gestation day 17), the same foetal findings (tail, hindlimb, digit, and major blood vessel abnormalities) were observed. In addition, there was a reduction in embryo-foetal growth and survival and bent fore limb long bones, ribs and clavicle/scapula.	211412

Species / Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Nominal Doses	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	Study ID
Rat/Sprague Dawley	Subcutaneous	Females: 2 weeks prior to pairing until Day 17 after mating	0, 0.1, 0.25 mg/kg/day	Group 1: 25F Group 2: 12F Group 3: 22F	Investigations on tissues from this *in vivo* study concluded the following: Presence of a functional GLP-1R in the yolk sac of rat embryos on GD12 was confirmed. A treatment-related reduction in pinocytotic transport across the visceral yolk sac of the GD14 rat embryo was observed. GD14 embryos from pregnant females treated with 0.25 mg/kg/day were significantly smaller than the control embryos. Digit malformations could be observed in the developing forelimbs on semaglutide treated embryos.	212080

* NNC 0113-0236 is the peptide moiety of semaglutide, i.e., semaglutide without the acyl side chain. Compound has a faster clearance than semaglutide.

EFD 試験に用いる第 3 の動物種の選択を裏付ける試験

Species/ Strain	Route of Administration	Duration of Dosing	Doses (mg/kg)	Gender and No. per Group	NOAEL[a] (mg/kg)	Noteworthy Findings	Study ID
Göttingen Minipig	Subcutaneous	MTD phase: up to 4 weeks	0.01, 0.05, 0.15, 0.5 twice-weekly 0.05 once 0.15 once	2 F 2F 2F	NA	Doses of semaglutide up to 0.15 mg/kg were tolerated when administered twice-weekly, after appropriate dose escalation, starting at 0.01 mg/kg. The expected effects on food consumption and body weight were observed. Clinical signs in combination with reduced food consumption and body weight losses at 0.5 mg/kg precluded further dose escalation and demonstrated that 0.5 mg/kg two times per week exceeded the maximum tolerated dose.	208404
		DRF phase: 3 weeks preceded by 2 weeks dose escalation	0.01, 0.05, 0.15 twice-weekly	2 non-naïve F and 4 naïve F	NA		