目次

1. まとめ 5
1.1 反復投与毒性試験 6
1.2 遺伝毒性試験 6
1.3 がん原性試験 6
1.4 生殖発生毒性試験 7
1.5 その他の毒性試験 7
1.5.1 依存性試験 7
1.5.2 不純物の安全性評価 8
2. 単回投与毒性試験 9
3. 反復投与毒性試験（補助的なトキシコキネティクス評価を含む） 10
3.1 重要な試験以外の試験 11
3.1.1 ラット 2 週間反復投与毒性試験 11
3.1.2 サル 2 週間反復投与毒性試験 13
3.2 重要な試験 14
3.2.1 ラット 14
3.2.1.1 ラット 4 週間反復投与毒性試験及び 8 週間回復性試験 14
3.2.1.2 ラット 13 週間反復投与毒性試験 16
3.2.1.3 ラット 26 週間反復投与毒性試験 17
3.2.2 サル 17
3.2.2.1 サル 4 週間反復投与毒性試験及び 8 週間回復性試験 17
3.2.2.2 サル 13 週間反復投与毒性試験 19
3.2.2.3 サル 39 週間反復投与毒性試験 20
4. 遺伝毒性試験 21
4.1 In vitro 遺伝毒性試験 21
4.1.1 細菌を用いた復帰突然変異試験 21
4.1.2 染色体異常試験 21
4.2 In vivo 遺伝毒性試験 22
4.2.1 ラット骨髄小核試験 22
5. がん原性試験（補助的なトキシコキネティクス評価を含む） 23
5.1 用量設定試験 23
5.1.1 マウス 2 週間用量設定試験（予備試験） 23
5.1.2 マウス 13 週間用量設定試験 24
5.2 長期試験 26
5.2.1 マウス 104 週間がん原性試験 26
5.2.2 ラット 104 週間がん原性試験 26

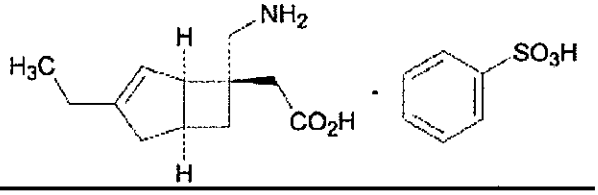
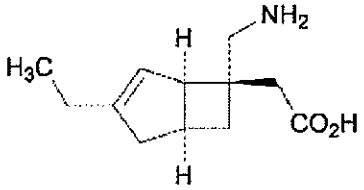
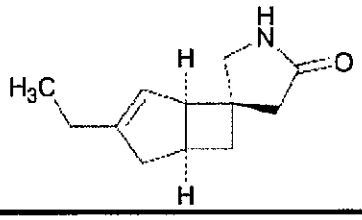
5.3　短期又は中期試験 28
5.4　その他の試験 28
5.4.1　ラットにおける膀胱腫瘍発生機序試験 28
5.4.1.1　ラット膀胱尿路上皮に対する有糸分裂誘発性の検討（13及び26週間反復投与毒性試験） 28
5.4.1.2　ラットの尿及び膀胱尿路上皮に対する影響の検討 29
5.4.1.3　ラット膀胱尿路上皮に対する有糸分裂誘発性の検討（104週間がん原性試験） 30
6.　生殖発生毒性試験 31
6.1　受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験 33
6.1.1　ラットの受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験 33
6.2　胚・胎児発生に関する試験 33
6.2.1　ラット胚・胎児発生に関する試験 33
6.2.2　ラット胚・胎児発生に関する試験（低用量追加試験） 34
6.2.3　ウサギ胚・胎児発生に関する試験 35
6.3　出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験 35
6.3.1　ラット出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験 35
7.　局所刺激性試験 37
8.　その他の毒性試験 38
8.1　依存性試験 38
8.1.1　ラット薬物弁別試験 38
8.1.2　ラット身体依存性試験 39
8.1.3　サル静脈内自己投与試験 40
8.2　不純物の安全性試験 41
8.2.1　製剤中の分解物（不純物A*）の安全性試験 42
8.2.1.1　ラット反復投与毒性試験 42
8.2.1.2　細菌を用いた復帰突然変異試験 43
8.2.1.3　染色体異常試験 43
8.2.2　ミロガバリン原薬中の分解物の安全性試験 44
8.2.2.1　細菌を用いた復帰突然変異試験 44
8.2.3　ミロガバリンベシル酸塩の製造工程で生成する[redacted]の安全性試験 44
8.2.3.1　物質A*　の細菌を用いた復帰突然変異試験 44
8.2.3.2　物質B*の細菌を用いた復帰突然変異試験 44
8.2.3.3　物質C*の細菌を用いた復帰突然変異試験 45
8.2.3.4　物質D*の細菌を用いた復帰突然変異試験 45
9.　考察及び結論 46
10.　引用文献 52

＊新薬承認情報提供時に置換

略語一覧

略語	略していない表現（英）	略していない表現（日）
$AUC_{0\text{-}24h}$	area under the plasma concentration-time curve up to 24 hours	投与後24時間までの血漿中濃度－時間曲線下面積
bid	bis in die, twice daily	1日2回
BrdU	5-bromo-2'-deoxyuridine	5-ブロモ-2'-デオキシウリジン
CHL	Chinese hamster lung	チャイニーズ・ハムスター肺組織由来
CYP	cytochrome P450	チトクローム P450
Cmax	maximum plasma concentration	最高血漿中濃度
DMSO	dimethyl sulfoxide	ジメチルスルフォキシド
GLP	Good Laboratory Practice	医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準
h	hours	時間
ICH	International Council for Harmonisation	医薬品規制調和国際会議
LC-MS/MS	liquid chromatography-tandem mass spectrometry	液体クロマトグラフィータンデム質量分析法
MC	methylcellulose	メチルセルロース
MN	micronucleus	小核
SEM	scanning electron microscope	走査型電子顕微鏡
Tmax	time to reach the maximum plasma concentration	最高血漿中濃度到達時間
TK	toxicokinetics	トキシコキネティクス

化合物一覧

名称	定義	構造式
ミロガバリンベシル酸塩 (DS-5565)	原薬	
ミロガバリン (A200-0700)	原薬のフリー体、原薬の活性本体	
A204-4455 ([redacted])	ミロガバリンのラクタム体代謝物、[redacted]	

1. まとめ

ミロガバリンベシル酸塩の安全性プロファイルは、ラット及びカニクイザルの反復投与毒性試験、遺伝毒性試験、マウス及びラットのがん原性試験、ラット及びウサギの生殖発生毒性試験、並びにその他の毒性試験（薬物依存性試験、ミロガバリンベシル酸塩の不純物及び製造工程で生成する中間体の安全性試験など）にて評価した。遺伝毒性試験及び薬物依存性試験を除くすべての試験で、ミロガバリンのトキシコキネティクス（toxicokinetics: TK）を評価した。ラットの2及び26週間反復投与毒性試験、並びにカニクイザルの2及び39週間反復投与毒性試験では、A204-4455（ミロガバリンのラクタム体代謝物）のTKも評価した（表2.6.6.1-1）。

ミロガバリンベシル酸塩の投与量は、フリー体であるミロガバリン相当量で示している。

表 2.6.6.1-1　ミロガバリンベシル酸塩及び関連物質の毒性試験プログラム

Type of Study[a] and Duration of Dosing	Route of Administration	Species/cells	Compound
Repeat-dose toxicity			
2 weeks (non-GLP)	oral, gavage	rat, cynomolgus monkey	mirogabalin besylate
4 weeks	oral, gavage	rat, cynomolgus monkey	mirogabalin besylate
13 weeks	oral, gavage	rat, cynomolgus monkey	mirogabalin besylate
26 weeks	oral, gavage	rat	mirogabalin besylate
39 weeks	oral, gavage	cynomolgus monkey	mirogabalin besylate
Genotoxicity			
Bacterial reverse mutation	in vitro	*S. typhimurium, E. coli*	mirogabalin besylate
Chromosomal aberration	in vitro	CHL cell	mirogabalin besylate
Bone marrow micronucleus	oral, gavage	rat	mirogabalin besylate
Carcinogenicity			
2 weeks (dose-range finding, non-GLP)	oral, gavage	mouse	mirogabalin besylate
13 week (dose-range finding)	oral, gavage	mouse	mirogabalin besylate
104 week	oral, gavage	mouse, rat	mirogabalin besylate
Mechanistic study (Ki-67 morphometry, non-GLP) in 13- and 26-week toxicity studies	oral, gavage[b]	rat	mirogabalin besylate
4 week mechanistic study (non-GLP)	oral, gavage	rat	mirogabalin besylate
Mechanistic study (Ki-67 morphometry, non-GLP) in 104--week carcinogenicity study	oral, gavage[c]	rat	mirogabalin besylate
Reproductive and developmental toxicity			
Fertility and early embryonic development	oral, gavage	rat	mirogabalin besylate
Embryo-fetal development	oral, gavage	rat, rabbit	mirogabalin besylate
Prenatal and postnatal development	oral, gavage	rat	mirogabalin besylate
Other toxicity studies			
Dependence			
Drug discrimination	oral, gavage	rat	mirogabalin besylate
Physical dependence	oral, gavage	rat	mirogabalin besylate
Psychological dependence	iv, infusion	rhesus monkey	mirogabalin besylate

Type of Study[a] and Duration of Dosing	Route of Administration	Species/cells	Compound
Impurity			
Bacterial reverse mutation	in vitro	*S. typhimurium, E. coli*	不純物A* spiked mirogabalin besylate
Chromosomal aberration	in vitro	CHL cell	不純物A* spiked mirogabalin besylate
2 weeks	oral, gavage	rat	mirogabalin besylate, 不純物A* spiked mirogabalin besylate
Bacterial reverse mutation (non-GLP)	in vitro	*S. typhimurium, E. coli*	不純物B* spiked mirogabalin besylate, 不純物C* spiked mirogabalin besylate, 不純物D* spiked mirogabalin besylate
Bacterial reverse mutation	in vitro	*S. typhimurium, E. coli*	物質A* , 物質B*, 物質C*, 物質D*

[a] Studies were conducted in compliance with GLP regulations unless especially mentioned.
[b] The paraffin specimens of 13- and 26-week toxicity studies were used for the evaluation.
[c] The paraffin specimens of 104-week carcinogenicity study were used for the evaluation.
CHL: Chinese hamster lung

1.1　反復投与毒性試験

ミロガバリンベシル酸塩による用量制限毒性は、過度の薬理学的作用による軽微ないし軽度の中枢神経機能抑制に関連する症状（軽微: 自発運動の減少すなわち活動性低下、軽度: ふらつき歩行、運動失調）であった。重度の中枢神経抑制による死亡が、ラットの 4 週間反復投与毒性試験の 1000 mg/kg／日及び 2 週間反復投与毒性試験の 2000 mg/kg／日、並びにカニクイザル 2 週間反復投与毒性試験の 2000 mg/kg／日でみられた。ミロガバリンベシル酸塩の概略の致死量はラットで 1000 mg/kg、サルで 2000 mg/kg と考えられた。ラット 3 例で心筋壊死、カニクイザル 1 例で心筋変性が、2000 mg/kg／日で観察された。胃粘膜上皮の変性又は再生性組織学的変化が、ラット 2、4、及び 13 週間試験の 300 mg/kg／日以上、並びにカニクイザル 4 週間試験の 1000 mg/kg／日にみられた。腎の硝子滴増加を伴った尿細管上皮の限局性壊死が、ラット 4 週間試験の 1000 mg/kg／日の雄 1 例のみに認められ、雌ラット及びカニクイザルにはみられなかった。無毒性量は、ラット 26 週間反復投与毒性試験では 10 mg/kg／日、カニクイザル 39 週間反復投与毒性試験では 30 mg/kg／日であった。

1.2　遺伝毒性試験

細菌を用いた復帰突然変異試験、チャイニーズ・ハムスター肺組織由来（Chinese hamster lung: CHL）細胞を用いた染色体異常試験、及びラット骨髄小核試験で遺伝毒性を示さなかった。

1.3　がん原性試験

マウス 104 週間がん原性試験では、投薬による腫瘍発生あるいは増殖性病変は認められなかった。ラット 104 週間がん原性試験では、雄の高用量（100 mg/kg／日）のみで膀胱の移行

＊新薬承認情報提供時に置換

上皮乳頭腫（良性腫瘍）の統計学的に有意な増加が認められた。しかし、膀胱の粘膜上皮の過形成（び慢性又は限局性）の発生頻度には、100 mg/kg／日まで有意な増加はみられなかった。雄ラットの膀胱腫瘍発生に関する機序試験では、100 mg/kg／日まで 4 週間反復投与したとき、走査型電子顕微鏡検査で膀胱粘膜の傷害性は認められず、4、13、26、及び 104 週間反復投与したときの膀胱尿路上皮の増殖活性の増加は認められなかった。これらの試験成績から判断して、ミロガバリンベシル酸塩の造腫瘍性は極めて低いと考えられる。

1.4　生殖発生毒性試験

ラット受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験では、100 mg/kg／日で歩行困難が認められた。投与期間終了後に、100 mg/kg／日で体重及び摂餌量の減少が認められた。
100 mg/kg／日で発情前期及び発情期の持続が認められた。雄生殖能に対する毒性、並びに受胎能及び着床までの初期胚発生の異常はみられなかった。親動物の一般毒性に対する無毒性量は雌雄ともに 30 mg/kg／日と判断した。親動物の生殖に対する無毒性量は、雄で 100 mg/kg／日、雌で 30 mg/kg／日と判断した。次世代発生に対する無毒性量は 100 mg/kg／日と判断した。

ラット胚・胎児発生に関する試験では、母動物の死亡が 1000 mg/kg／日で認められた。活動性低下、ふらつき歩行、及び歩行困難が 100 mg/kg／日以上で認められた。さらに、300 mg/kg／日以上で会陰部の汚れが認められ、1000 mg/kg／日で鼻周囲の汚れ及び呼吸不整が認められた。母動物では、100 mg/kg／日以上で投与終了後に体重及び摂餌量の減少が認められた。胎児では、30 mg/kg／日以上で外表・内臓・骨格異常を伴わない生存胎児の体重減少が認められた。母動物の一般毒性、生殖機能、次世代発生に対する無毒性量は、それぞれ 30 mg/kg／日、1000 mg/kg／日、10 mg/kg／日と判断された。ウサギ胚・胎児発生に関する試験では、母動物の死亡が 1000 mg/kg／日で認められた。30 mg/kg／日以上で活動性低下及びふらつき歩行が認められた。100 mg/kg／日以上で流産が認められた。母動物では、10 mg/kg／日以上で投与終了後に体重及び摂餌量の減少が認められた。胎児では、30 mg/kg 以上で外表・内臓・骨格異常を伴わない生存胎児の体重減少が認められた。母動物の一般毒性、生殖機能、次世代発生に関する無毒性量は、それぞれ 10 mg/kg／日未満、30 mg/kg／日、10 mg/kg／日と判断された。ミロガバリンベシル酸塩はラット及びウサギで催奇形性を示さなかった。

ラット出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験では、30 mg/kg／日以上で、親動物の活動性低下が投与期間（妊娠期間及び哺育期間）を通してみられた。100 mg/kg／日では、妊娠期間の延長がみられた。F1 出生児では、30 mg/kg／日以上で出生率の低下がみられた。母動物の一般毒性、生殖機能、次世代の出生前及び出生後の発生に関する無毒性量は、それぞれ 10 mg/kg／日、30 mg/kg／日、10 mg/kg／日と判断された。

1.5　その他の毒性試験

1.5.1　依存性試験

薬物依存性の評価として、独立した薬物依存性試験を実施した。ミロガバリンベシル酸塩

は、ラットで身体依存性、アカゲザルで精神依存性形成能を示した。ラットでは、ミロガバリンベシル酸塩の弁別刺激効果はミダゾラムとの類似性を示さなかった。

1.5.2　不純物の安全性評価

原薬又は製剤中の不純物（不純物A*、不純物B*、不純物C*、及び 不純物D*）は、ミロガバリンベシル酸塩と比較して、新たな毒性変化を示さず、ミロガバリンベシル酸塩の安全性に影響を及ぼさないと判断された。ミロガバリンベシル酸塩の製造工程で生成する[redacted]（物質A*、物質B*、物質C*、及び物質D*）は、変異原性を示さなかった。

＊新薬承認情報提供時に置換

2. 単回投与毒性試験

2週間及び4週間反復投与毒性試験の高用量群から急性毒性の情報を外挿したため、ミロガバリンベシル酸塩の単回投与毒性試験は実施しなかった。これは、医薬品規制調和国際会議（International Council for Harmonisation: ICH）M3(R2)ガイドラインにも適合している。

3. 反復投与毒性試験（補助的なトキシコキネティクス評価を含む）

ラットでは最長 26 週間、カニクイザルでは最長 39 週間の反復経口投与毒性試験を実施した。4 週間試験のための用量設定試験として、2 週間反復投与試験（重要な試験以外の試験）を、両動物種で実施した。ラット及びカニクイザルの 4 週間反復投与毒性試験では、投与期間後に 8 週間の休薬期間を設け、観察された毒性の回復性とともに、薬物依存性検討のため退薬症候の有無を評価した。すべての試験でミロガバリンの TK を評価した。ラットの 2 及び 26 週間反復投与毒性試験、並びにカニクイザルの 2 及び 39 週間反復投与毒性試験では、A204-4455 の TK も評価した。

各試験の要約を表 2.6.6.3-1（ラット）又は表 2.6.6.3-2（サル）に示す。

表 2.6.6.3-1　ラット反復投与毒性試験の要約

動物種／系統	投与経路（媒体）	投与量（mg/kg／日）	投与期間	性及び例数／群	特筆すべき所見
ラット／F344	経口（0.5% MC）	0、100、300、2000	2 週間	雄: 5 雌: 5	100 mg/kg／日以上: 腹臥位、活動性低下、歩行困難、ふらつき歩行、被毛の汚れ、糞量減少 300 mg/kg／日以上: 腺胃の糜爛 2000 mg/kg／日: 死亡、筋弛緩、呼吸不整、体温低下、摂餌量↓、体重↓（雄）、前胃の糜爛及び粘膜肥厚、心臓の限局性出血及び心筋壊死 無毒性量: 100 mg/kg／日未満
ラット／F344	経口（0.5% MC）	0、10、30、100、1000	4 週間	雄: 10 雌: 10 回復性試験 雄: 5 雌: 5	10 mg/kg／日: 腹臥位、活動性低下、ふらつき歩行（散発的に観察され、投与 11 日目以降に消失） 30 mg/kg／日以上: 10 mg/kg／日で認められた一般状態の異常の発生頻度上昇及び持続期間延長 1000 mg/kg／日: 死亡、尿による会陰部の汚れ、糞量減少、呼吸不整、前胃の糜爛及び粘膜肥厚、腺胃の糜爛及び潰瘍（雄）、腎尿細管上皮の限局性壊死（雄）、心内膜下の限局性石灰化（雌） 無毒性量: 10 mg/kg／日
ラット／F344	経口（0.5% MC）	0、10、100、300	13 週間	雄: 10 雌: 10	100 mg/kg／日以上: 活動性低下、ふらつき歩行、流涙 300 mg/kg／日: 会陰部の汚れ、紅涙、前胃の粘膜肥厚 無毒性量: 10 mg/kg／日
ラット／F344	経口（0.5% MC）	0、10、30、100	26 週間	雄: 10 雌: 10	30 mg/kg／日以上: ふらつき歩行 100 mg/kg／日: 活動性低下 無毒性量: 10 mg/kg／日

MC: メチルセルロース
↓: 減少

表 2.6.6.3-2　カニクイザル反復投与毒性試験の要約

動物種／系統	投与経路（媒体）	投与量（mg/kg／日）	投与期間	性及び例数／群	特筆すべき所見
カニクイザル	経口（0.5% MC）	0、30、300、2000	2 週間	雄: 2 雌: 2	300 mg/kg／日以上: 運動失調、活動性低下、吐物 2000 mg/kg／日: 死亡、間代性痙攣、軟便、摂餌量↓、体重↓、フィブリノーゲン↑、C 反応性タンパク↑、電解質↓、総タンパク↓、アルブミン↓、アルブミン／グロブリン比↓、胃噴門部の扁平上皮の水腫性変性、胃の粘膜萎縮及び粘膜下組織の出血、心臓の心筋変性 無毒性量: 30 mg/kg／日
カニクイザル	経口（0.5% MC）	0、30、100、1000	4 週間	雄: 3 雌: 3 回復性試験 雄: 2 雌: 2	100 mg/kg／日以上: 活動性低下 1000 mg/kg／日: 運動失調、筋攣縮（雄）、嘔吐、流涎、好中球数↑、大型非染色細胞数↑、フィブリノーゲン↑、アルブミン／グロブリン比↓、ナトリウム↓、胃噴門部の扁平上皮の水腫性変性（雄） 無毒性量: 30 mg/kg／日
カニクイザル	経口（0.5% MC）	0、10、100、300	13 週間	雄: 3 雌: 3	100 mg/kg／日: 体温低下（雄）、横臥位（雄） 100 mg/kg／日以上: 活動性低下、運動失調 300 mg/kg／日:流涎、嘔吐（雄） 無毒性量: 10 mg/kg／日
カニクイザル	経口（0.5% MC）	0、10、30、100	39 週間	雄: 4 雌: 4	100 mg/kg／日: 活動性低下、運動失調 無毒性量: 30 mg/kg／日

MC: メチルセルロース
↑: 増加、↓: 減少

3.1　重要な試験以外の試験

3.1.1　ラット 2 週間反復投与毒性試験

添付資料番号: 4.2.3.2-1、4.2.3.2-2

ミロガバリンベシル酸塩を 0.5%メチルセルロース溶液に懸濁し、F344/DuCrlCrlj ラット（雌雄各 5 例／群）に、0、100、300、又は 2000 mg/kg／日の投与量で 2 週間反復経口投与した。ICH M3(R2)ガイドラインでは、反復投与毒性試験で投与可能な最大投与量は 2000 mg/kg／日と規定されているため、2000 mg/kg／日をこの試験の高用量に設定した。TK 測定群（雌雄各 4 例／群）を別途設け、投与 1 日目及び 14 日目におけるミロガバリン及び A204-4455 の血漿中濃度を、液体クロマトグラフィータンデム質量分析法（liquid chromatography-tandem mass spectrometry: LC-MS/MS）によって測定した。

2000 mg/kg／日の毒性評価群では、雄 4 例及び雌 2 例が腹臥位、活動性低下、歩行困難、ふらつき歩行、筋弛緩、呼吸不整、体温低下、被毛の汚れ、及び糞量減少を特徴とする一般状態の異常を示した後、投与 4～6 日目に死亡した。2000 mg/kg／日の生存例（雄 1 例及び雌 3 例）は投与 7 日目に安楽死処置した。対照群と比較して、雄で有意な体重減少が、雌雄で

有意な摂餌量減少が認められた。2000 mg/kg／日の病理組織学的検査で認められた変化を以下に示す。心臓に出血及び限局的心筋壊死が認められた。肺に異物性気管支肺炎及び肺胞水腫が認められた。気管の内腔に異物が認められた他、好中球浸潤を伴う粘膜上皮の糜爛及び再生も認められた。肺及び気管内に認められた異物は粉末飼料と考えられた。前胃及び腺胃では糜爛及び粘膜下組織への細胞浸潤が認められた。前立腺の単細胞壊死、並びに精巣上体管内の細胞残屑及び精子数減少が認められ、これら生殖器の変化は動物の一般状態悪化が主因と判断された。また、動物の一般状態悪化に起因すると考えられる二次的な病理組織学的変化は、その他の多くの臓器でも観察された。剖検では、膀胱の尿貯留が認められたが、膀胱に病理組織学的変化は認められなかったことから、肉眼的変化の毒性学的意義は乏しいと考えられた。死亡例では、萎縮性又はストレス性の変化が様々な臓器に認められたが、死因を示唆する病変は認められなかった。しかし、一般状態、摂餌量、及び体重に認められた変化を勘案すると、ミロガバリンベシル酸塩の重度の中枢神経抑制作用による一般状態の悪化が主な死因と考えられた。

100 及び 300 mg/kg／日では、投与期間中に死亡例は観察されず、2000 mg/kg／日で観察された上記の一般状態の異常のうち、呼吸不整及び体温低下を除く変化が認められた。
300 mg/kg／日では、腺胃の糜爛及び粘膜下組織の細胞浸潤／線維化が雄 1 例に認められた。摂餌量及び体重の増加の他、投与に関連する変化が、血液学的検査（赤血球系パラメータの増加）、血液生化学検査（アラニンアミノトランスフェラーゼの増加、総コレステロールの増加、リン脂質の増加、尿素窒素の増加、クロライドの減少）、器官重量測定（副腎重量の増加、及び精巣重量の減少）、剖検（膀胱の尿貯留）、及び病理組織学的検査（脾臓の髄外造血亢進）で認められた。これらの変化は、軽微であり他に関連する変化が認められないことから、いずれも毒性学的意義は乏しいと考えられた。

ミロガバリンベシル酸塩は、300 mg/kg／日までラット肝臓の薬物代謝酵素に明らかな影響を及ぼさなかった。2000 mg/kg／日で、臨時剖検時に採取した肝臓中のチトクローム P450（cytochrome P450: CYP）含量及び活性は、雌雄ともに、対照群から剖検予定日に採取した肝臓中の値よりも高値を示した。

TK の評価では、ミロガバリンの $AUC_{0\text{-}24h}$ は、雌雄ともに投与量にほぼ比例した。A204-4455 の Cmax 及び $AUC_{0\text{-}24h}$、並びにミロガバリンの Cmax は、投与量比を下回る上昇を示した。TK 値には、反復投与による明らかな変化及び性差は認められなかった。

以上、ミロガバリンベシル酸塩の毒性の標的臓器は、中枢神経系及び胃と考えられた。さらに、100 mg/kg／日で中等度の中枢神経抑制症状（ふらつき歩行、歩行困難など）の持続が観察されたことから、無毒性量は 100 mg/kg／日未満と判断した。低用量（100 mg/kg／日）では、投与 14 日目におけるミロガバリンの Cmax 及び $AUC_{0\text{-}24h}$ は、雄でそれぞれ 11.3 μg/mL 及び 144 μg·h/mL、雌でそれぞれ 14.3 μg/mL 及び 110 μg·h/mL であり、A204-4455 の Cmax 及び $AUC_{0\text{-}24h}$ は、雄でそれぞれ 0.237 μg/mL 及び 2.90 μg·h/mL、雌でそれぞれ 0.423 μg/mL 及び 4.00 μg·h/mL であった。

3.1.2　サル 2 週間反復投与毒性試験

添付資料番号: 4.2.3.2-7、4.2.3.2-8

ミロガバリンベシル酸塩を 0.5%メチルセルロース溶液に懸濁し、カニクイザル（雌雄各 2 例／群）に、0、30、300、又は 2000 mg/kg／日の投与量で 2 週間反復経口投与した。ICH M3(R2)ガイドラインでは、反復投与毒性試験で投与可能な最大投与量は 2000 mg/kg／日と規定されているため、2000 mg/kg／日をこの試験の高用量に設定した。TK 評価では、投与 1 日目及び 13 日目におけるミロガバリン及び A204-4455 の血漿中濃度を LC-MS/MS によって測定した。

2000 mg/kg／日で雄 1 例が投与 3 日目に死亡した。本例では、死亡前（投与 1～3 日目）に運動失調、間代性痙攣、活動性低下、吐物といった中等度ないし重度の中枢神経抑制作用が認められた。また、体重減少及び顕著な摂餌量減少が投与 3 日目に認められた。剖検では、胃の拡張、餌の貯留、及び変色巣が認められた。病理組織学的検査では、心臓で心筋変性、胃で糜爛、粘膜萎縮、及び粘膜下組織の出血が認められた。一般状態の推移から、ミロガバリンベシル酸塩の中枢神経系への影響により一般状態が悪化し、死亡したと考えられた。

2000 mg/kg／日の投与期間終了時まで生存した動物では、運動失調、活動性低下、軟便、及び吐物が投与期間を通じて認められ、雌 2 例では間代性痙攣も投与 1 日目に観察された。300 mg/kg／日では、運動失調、活動性低下、及び吐物が投与 1 日目に認められた。これらの変化は投与 7 日目以降には消失した。摂餌量減少及び体重減少が 2000 mg/kg／日で認められた。血液学的検査では、フィブリノーゲンの増加が 2000 mg/kg／日で認められた。血液生化学検査では、電解質、総タンパク、アルブミン、及びアルブミン／グロブリン比の減少、並びに C 反応性タンパクの増加が 2000 mg/kg／日で認められた。血液学的検査及び血液生化学検査でみられたこれらの変化は、嘔吐に起因するものと考えられた。剖検では、胃で変色巣及び膜状付着物、肺で結節が 2000 mg/kg／日で認められた。副腎の絶対重量及び相対重量の増加が 2000 mg/kg／日で認められた。病理組織学的検査では、心臓で心筋変性、胃で噴門部の扁平上皮の水腫性変性、肺で異物性気管支肺炎、及び副腎で束状帯細胞好酸性化が 2000 mg/kg／日で認められた。肺の変化は嘔吐に起因するものと考えられた。副腎の変化はストレスによる二次的変化と考えられた。なお、300 mg/kg／日以上では、膀胱内尿貯留が認められたが、病理組織学的検査で泌尿器に変化は認められなかった。心電図及び眼科学的検査では投与に関連する所見は認められなかった。

薬物代謝酵素の活性測定では、雌雄ともに明らかな変化は認められなかった。

TK の評価では、ミロガバリン及び A204-4455 の Cmax 及び $AUC_{0\text{-}24h}$ は、雌雄ともに 30～2000 mg/kg／日の間で概ね投与量の増加に伴い上昇したが、2000 mg/kg／日の投与 1 日目に著明な個体間変動が認められた。TK パラメータには、反復投与による明らかな変化及び明らかな性差は認められなかった。

以上、この試験では、ミロガバリンベシル酸塩の毒性の標的臓器は、中枢神経系、胃、及び心臓と考えられた。300 mg/kg／日で中枢神経抑制作用に関連する症状が認められたことから、カニクイザルでの無毒性量は 30 mg/kg／日であると判断した。無毒性量では、投与 13 日目におけるミロガバリンの Cmax 及び $AUC_{0\text{-}24h}$ は、雄でそれぞれ 26.2 μg/mL 及び

72.9 μg·h/mL、雌でそれぞれ 22.4 μg/mL 及び 52.3 μg·h/mL であり、A204-4455 の Cmax 及び $AUC_{0\text{-}24h}$ は、雄でそれぞれ 0.221 μg/mL 及び 0.767 μg·h/mL、雌でそれぞれ 0.203 μg/mL 及び 0.580 μg·h/mL であった。

3.2　重要な試験

3.2.1　ラット

3.2.1.1　　ラット 4 週間反復投与毒性試験及び 8 週間回復性試験

添付資料番号: 4.2.3.2-3

ミロガバリンベシル酸塩を 0.5%メチルセルロース溶液に懸濁し、F344/DuCrlCrlj ラット（雌雄各 10 例／群）に、0、10、30、100、又は 1000 mg/kg／日の投与量で 4 週間反復経口投与した。さらに、0、100、及び 1000 mg/kg／日には回復群（雌雄各 5 例／群）を設け、8 週間の休薬期間中に毒性作用の回復性を評価するとともに、薬物依存性検討のため退薬症候の有無を評価した。2 週間反復投与毒性試験では、2000 mg/kg／日で死亡例が認められ、100 mg/kg／日以上で中枢神経関連の一般状態の異常が認められた（3.1.1 項）。そのため、この試験の最高用量を 1000 mg/kg／日とし、これより低い用量を 10、30、及び 100 mg/kg／日に設定した。TK 測定群（雌雄各 4 例／群）を別途設け、投与 1 日目及び 28 日目におけるミロガバリンの血漿中濃度を LC-MS/MS によって測定した。（2.6.7.7.1）

1000 mg/kg／日では、雄 1 例が投与 3 日目、雌 1 例が投与 2 日目に死亡した。死亡前には、2 例ともにふらつき歩行、腹臥位、活動性低下、及び呼吸不整を示し、雄 1 例のみ糞量減少を示した。剖検では、雄で腺胃に変色巣、回腸、盲腸、及び結腸にガス貯留が認められた。雌では、膀胱内尿貯留が認められたが、病理組織学的変化を伴わなかった。病理組織学的検査では、雄で腺胃及び十二指腸の糜爛、並びに肝臓、胸腺、脾臓、及び顎下リンパ節の萎縮が認められた。その他の病理組織学的変化として、副腎の束状帯細胞肥大、唾液腺の腺房細胞肥大、及びハーダー氏腺の分泌産物増加が認められた。雌では、心内膜下の限局性石灰化、肺胞水腫、副腎の束状帯細胞肥大、及び子宮の萎縮が認められた。雄では、一般状態の異常及び各種臓器の萎縮性変化が認められたが、死因となるような特定の病理組織学的変化が観察されなかったことから、雄の主な死因は、ミロガバリンベシル酸塩の重度の中枢神経抑制作用による一般状態の悪化と考えられた。雌の死亡例では、肺胞水腫が認められたことから、重度の中枢神経抑制作用による一般状態悪化に加えて循環障害も死因と考えられた。

100 mg/kg／日以下では死亡例は認められなかった。10 mg/kg／日では、ミロガバリンベシル酸塩の薬理作用の過剰発現に起因する中枢神経抑制作用を示唆する一般状態の異常（腹臥位、活動性低下、及びふらつき歩行）が散発的に観察されたが、雄で投与 11 日目以降、雌で投与 7 日目以降に消失した。これらの変化は投与期間中に消失したことから毒性学的意義はないと考えられた。30 mg/kg／日以上では、上記の一般状態の異常が持続的に観察された。さらに、1000 mg/kg／日では死亡例も含め、尿による会陰部の汚れ、糞量減少、及び呼吸不整が観察された。100 mg/kg／日では、体重及び摂餌量の増加が投与期間中に認められた。1000 mg/kg／日で投与期間初期に体重及び摂餌量が一過性に減少したが、その後増加傾向を

示した。血液学的検査では、好中球、単球、及び好酸球増加による白血球数の増加並びにフィブリノーゲンの増加が、100 mg/kg／日の雌及び 1000 mg/kg／日の雌雄で認められた。血液生化学検査では、尿素窒素の増加が 1000 mg/kg／日の雄で認められた。副腎重量の増加が 1000 mg/kg／日で認められた。また、1000 mg/kg／日で腎重量の増加が 1000 mg/kg／日の雄、脳重量の減少が 1000 mg/kg／日の雌で認められた。剖検では、前胃の肥厚及び盲腸の拡張が 1000 mg/kg／日で認められた。また、1000 mg/kg／日の雄で前胃及び腺胃に変色巣が認められた。病理組織学的検査では、1000 mg/kg／日で前胃の糜爛及び粘膜肥厚、副腎の束状帯細胞肥大、並びに肺の異物肉芽腫が観察された。さらに、雄で腺胃の糜爛及び潰瘍、腎尿細管上皮の限局性壊死及び硝子滴増加、並びに胸腺皮質萎縮が観察された。1000 mg/kg／日の雌で肺の限局性炎症が認められた。上記の白血球系パラメータ及びフィブリノーゲンの増加は、胃の変化に関連すると考えられた。副腎、胸腺、及び肺の病変は、一般状態の悪化又は呼吸不整に起因する粉末飼料の誤嚥による二次的病変と判断された。投与に関連するその他の変化が、血液学的検査（赤血球系パラメータの増加）、血液生化学検査（総コレステロールの増加、リン脂質の増加、無機リンの増加、クロールの減少）、器官重量測定（肝臓重量の増加、及び雌の脳重量の減少）、及び病理組織学的検査（脾臓の髄外造血亢進）で認められた。これらの変化は、軽微であり他に関連する変化が認められないことから、いずれも毒性学的意義は乏しいと考えられた。尿検査及び眼科学的検査では、いずれの投与群にも、対照群と比較して著明な変化は認められなかった。

回復群のうち、1000 mg/kg／日では活動性低下及びふらつき歩行が休薬期間初日に観察されたが、その後、一般状態の異常はみられなかった。100 及び 1000 mg/kg／日では、休薬第 2 週まで摂餌量の減少が認められた。また、1000 mg/kg／日の雄で休薬期間 15 日目まで、1000 mg/kg／日の雌で休薬期間 50 日目まで、体重の減少が認められた。これら休薬期間の体重及び摂餌量の減少から、退薬症候の可能性が示唆された。1000 mg/kg／日では、回復期間終了時に雄 1 例で肺に軽微な異物肉芽腫が認められ、雌で脾臓及び骨髄の病理組織学的変化を伴わない網赤血球数の増加が認められた。投与に関連する重要な変化はいずれも、8 週間の回復期間中に回復又は回復傾向を示した。

TK の評価では、ミロガバリンの Cmax 及び $AUC_{0\text{-}24h}$ は、雌雄ともに投与量に概ね比例したが、投与 1 日目には 100～1000 mg/kg／日の間で投与量比を下回る上昇を示した。TK パラメータには、反復投与による明らかな変化はみられなかったが、1000 mg/kg／日で Cmax 及び $AUC_{0\text{-}24h}$ は、投与 28 日目に投与 1 日目と比較して高値であった。TK パラメータに明らかな性差はみられなかった。

以上、ミロガバリンベシル酸塩の毒性の標的臓器は、中枢神経系及び胃に加えて、雄では腎臓も標的と考えられた。30 mg/kg／日で持続的な一般状態の変化が観察されたことから毒性と判断し、無毒性量は 10 mg/kg／日と考えられた。投与期間中に認められた明らかな変化は、8 週間の休薬期間中に回復又は回復傾向を示した。無毒性量では、投与 28 日目におけるミロガバリンの Cmax 及び $AUC_{0\text{-}24h}$ は、雄でそれぞれ 2.79 μg/mL 及び 8.13 μg·h/mL、雌でそれぞれ 2.88 μg/mL 及び 6.55 μg·h/mL であった。

3.2.1.2　ラット 13 週間反復投与毒性試験

添付資料番号: 4.2.3.2-4

ミロガバリンベシル酸塩を 0.5%メチルセルロース溶液に懸濁し、F344/DuCrlCrlj ラット（雌雄各 10 例／群）に、0、10、100、又は 300 mg/kg／日の投与量で 13 週間反復経口投与した。4 週間反復投与毒性試験では、1000 mg/kg／日で死亡例が認められ、30 mg/kg／日以上で中枢神経関連の一般状態の異常が認められた（3.2.1.1 項）。そのため、この試験の最高用量を 300 mg/kg／日とし、これより低い用量を 10 及び 100 mg/kg／日に設定した。TK 測定群（雌雄各 3 例／群）を別途設け、投与 1 日目、28 日目、及び 91 日目におけるミロガバリンの血漿中濃度を LC-MS/MS によって測定した。（2.6.7.7.2）

いずれの群においても投与に関連する死亡例は認められなかった。100 及び 300 mg/kg／日では、活動性低下及びふらつき歩行が認められ、流涙が雌に認められた。さらに 300 mg/kg／日では、会陰部の汚れ及び紅涙が認められた。体重の増加が 100 及び 300 mg/kg／日で雌に認められ、摂餌量の増加が 100 及び 300 mg/kg／日で認められた。尿検査では、尿量の増加及び尿比重の減少が 100 及び 300 mg/kg／日で認められた。血液生化学検査では、総コレステロールの増加が 100 及び 300 mg/kg／日の雄、並びに 300 mg/kg／日の雌に認められた。300 mg/kg／日の雌では、トリグリセリドの増加も認められた。さらに、遊離脂肪酸の増加が 10 mg/kg／日以上の雄、300 mg/kg／日の雌に認められた。投与に関連する遊離脂肪酸の増加は、総コレステロールの増加による二次的変化と考えられた。しかし、変化が軽微であったことから毒性学的意義はないと判断した。器官重量測定では、肝臓重量の増加が 300 mg/kg／日の雌に認められた。病理組織学的検査では、前胃の境界縁の肥厚、肝細胞の肥大、及び副腎の束状帯皮質細胞の脂肪滴増加が 300 mg/kg／日で認められた。さらに、腎臓の尿細管上皮の硝子滴沈着が 300 mg/kg／日の雄に認められた。胃境界縁の肥厚を除くこれらの病理組織学的変化は、その程度が極めて軽微で、関連するその他の毒性所見もなかったことから、毒性学的意義はないと判断した。顎下腺の腺房萎縮が 100 及び 300 mg/kg／日で認められ、舌下腺の腺房萎縮が 100 及び 300 mg/kg／日の雌に認められた。これらの変化は極めて軽微で、関連する毒性所見もなかったことから、毒性学的意義はないと判断した。膀胱では、排尿筋／移行上皮の肥大が 100 及び 300 mg/kg／日で認められたが、尿貯留による二次的変化と考えられ、毒性学的意義はないと判断した。

眼科学的検査、血液学的検査、及び剖検では、いずれのミロガバリンベシル酸塩群にも異常な変化は認められなかった。

TK の評価では、雌雄ともに、ミロガバリンの Cmax は投与量比を下回る上昇を示し、ミロガバリンの $AUC_{0\text{-}24h}$ は投与量にほぼ比例した。TK パラメータには、反復投与による明らかな変化及び明らかな性差は認められなかった。

以上、毒性の標的臓器は中枢神経系及び胃と考えられた。この試験での無毒性量は 10 mg/kg／日と判断した。無毒性量では、投与 91 日目におけるミロガバリンの Cmax 及び $AUC_{0\text{-}24h}$ は、雄でそれぞれ 2.79 μg/mL 及び 7.66 μg·h/mL、雌でそれぞれ 3.07 μg/mL 及び 8.74 μg·h/mL

であった。

3.2.1.3　ラット 26 週間反復投与毒性試験

添付資料番号: 4.2.3.2-5、4.2.3.2-6

ミロガバリンベシル酸塩を 0.5%メチルセルロース溶液に懸濁し、F344/DuCrlCrlj ラット（雌雄各 10 例／群）に、0、10、30、又は 100 mg/kg／日の投与量で 26 週間反復経口投与した。13 週間反復投与毒性試験では、100 mg/kg／日以上で中枢神経関連の一般状態の異常が認められ、無毒性量は 10 mg/kg／日と判断された（3.2.1.2 項）。そのため、この試験の最高用量を 100 mg/kg／日とし、これより低い用量を 10 及び 30 mg/kg／日に設定した。TK 測定群（雌雄各 3 例／群）を別途設け、投与 1 日目、91 日目、及び 180 日目におけるミロガバリン及び A204-4455 の血漿中濃度を LC-MS/MS によって測定した。（2.6.7.7.3）

ふらつき歩行が 30 及び 100 mg/kg／日で、活動性低下が 100 mg/kg／日で認められた。さらに、摂餌量の増加が 30 及び 100 mg/kg／日で、摂水量の増加が 30 及び 100 mg/kg／日の雄に認められた。尿検査では、尿量の増加が 10 mg/kg／日以上の雄に認められた。血液生化学検査では、アルカリフォスファターゼの増加が 10 mg/kg／日以上の雌に認められた。器官重量測定では、甲状腺重量の増加が 30 及び 100 mg/kg／日の雄に認められた。病理組織学的検査では、顎下腺及び舌下腺の腺房萎縮が 100 mg/kg／日で認められ、膀胱の排尿筋／移行上皮の肥大が 10 mg/kg／日以上で認められた。しかし、これらの病理組織学的変化は極めて軽微であり、関連する毒性変化が認められなかったことから、毒性学的意義はないと判断した。

いずれの群においても死亡は認められなかった。また、体重測定、眼科学的検査、血液学的検査、及び剖検では、いずれのミロガバリンベシル酸塩群にも異常な変化は認められなかった。

TK の評価では、雌雄ともに、ミロガバリン及び A204-4455 の Cmax は投与量比を下回る上昇を示し、ミロガバリン及び A204-4455 の $AUC_{0\text{-}24h}$ は投与量にほぼ比例した。ミロガバリンの TK パラメータには、反復投与による明らかな変化及び明らかな性差は認められなかった。しかし、A204-4455 の $AUC_{0\text{-}24h}$ は、雌雄ともに反復投与後に上昇した。

以上、毒性の標的臓器は中枢神経系と考えられた。この試験でのミロガバリンベシル酸塩の無毒性量は 10 mg/kg／日と判断した。無毒性量では、投与 180 日目におけるミロガバリンの Cmax 及び $AUC_{0\text{-}24h}$ は、雄でそれぞれ 3.02 μg/mL 及び 10.2 μg·h/mL、雌でそれぞれ 3.19 μg/mL 及び 10.1 μg·h/mL であった。A204-4455 の Cmax 及び $AUC_{0\text{-}24h}$ は、雄でそれぞれ 76.7 ng/mL 及び 392 ng·h/mL、雌でそれぞれ 153 ng/mL 及び 607 ng·h/mL であった。

3.2.2　サル

3.2.2.1　サル 4 週間反復投与毒性試験及び 8 週間回復性試験

添付資料番号: 4.2.3.2-9

ミロガバリンベシル酸塩を 0.5%メチルセルロース溶液に懸濁し、カニクイザル（雌雄各 3 例／群）に、0、30、100、又は 1000 mg/kg／日の投与量で 4 週間反復経口投与した。2 週間

反復投与毒性試験では、2000 mg/kg／日で死亡例が認められ、300 mg/kg／日以上で中枢神経関連の一般状態の異常が認められた（3.1.2 項）。そのため、この試験の最高用量を 1000 mg/kg／日とし、これより低い用量を 30 及び 100 mg/kg／日に設定した。さらに、1000 mg/kg／日には回復群（雌雄各 2 例／群）を設け、8 週間の休薬期間中に毒性作用の回復性を評価するとともに、薬物依存性検討のため退薬症候の有無を評価した。TK 評価では、投与 1 日目及び 28 日目におけるミロガバリンの血漿中濃度を LC-MS/MS によって測定した。（2.6.7.7.4）

投与及び休薬期間中、死亡例は認められなかった。投与期間中の体重、摂餌量、眼科学的検査、及び器官重量には、被験物質投与に関連する異常は認められなかった。

投与期間中の一般状態観察では、活動性低下が 100 mg/kg／日以上で認められ、運動失調、筋攣縮、嘔吐、及び流涎が 1000 mg/kg／日で認められた。投与期間中の心電図検査では、心拍数の減少が 100 mg/kg／日以上の雄で認められた。この変化は、ミロガバリンベシル酸塩の中枢神経抑制作用による持続的な活動性低下による二次的反応と考えられた。投与期間中の血液学的検査では、好中球数、大型非染色細胞数、及びフィブリノーゲンの増加が 1000 mg/kg／日の雄で認められた。投与期間中の血液生化学検査では、アルブミンの減少が 100 mg/kg／日以上で、アルブミン／グロブリン比及びナトリウムの減少が 1000 mg/kg／日で認められた。剖検では、胃噴門部の粘膜に白色の膜状付着物が 1000 mg/kg／日の雄で認められ、肺の赤色化、赤色巣、又は褐色化が 1000 mg/kg／日で認められた。病理組織学的検査では、胃噴門部の扁平上皮の水腫性変性の他、異物性微小肉芽腫及び肺胞のうっ血／出血を特徴とする気管支肺炎が、1000 mg/kg／日の雄で認められた。しかし、気管支肺炎及び肺胞のうっ血／出血に関連するこれらの変化は、投与後の嘔吐又は流涎による二次的変化と考えられた。副腎の束状帯細胞の脂質減少、又は束状帯及び網状帯の肥大が、100 mg/kg／日以上の雄で認められた。さらに、大腿骨骨髄脂肪組織及び心臓の冠状動脈脂肪組織の萎縮が 1000 mg/kg／日の雄で認められた。投与期間中の尿検査では、尿量の増加及び尿比重の低下が 100 mg/kg／日以上で認められた。しかし、血液生化学検査及び病理組織学的検査で泌尿器系に関連する異常が認められなかったことから、これらの変化の毒性学的意義はないと判断した。

回復群（1000 mg/kg／日）では、投与期間中に認められた活動性低下が、休薬初日から 6 日目まで持続した。投与期間中に認められたその他の変化はすべて、8 週間の休薬期間中に回復した。

TK の評価では、ミロガバリンの Cmax 及び $AUC_{0\text{-}24h}$ は、雌雄ともに概ね投与量の増加に伴い上昇した。TK パラメータは反復投与中に有意な変化を示さなかったが、1000 mg/kg／日では雌で投与 28 日目の Cmax 及び $AUC_{0\text{-}24h}$ が投与 1 日目より高い傾向にあった。TK パラメータに明らかな性差はみられなかったが、1000 mg/kg／日では、投与 1 日目の Cmax 及び $AUC_{0\text{-}24h}$ は雌で雄と比較して低い傾向にあった。

以上、ミロガバリンベシル酸塩の毒性の標的臓器は、中枢神経系及び胃（雄のみ）と考えられた。100 mg/kg／日で持続的な活動性低下が認められたことから、カニクイザルでの無毒性量は 30 mg/kg／日であると判断した。投与期間中に認められた変化は 8 週間の休薬期間中

に回復した。無毒性量では、投与 28 日目におけるミロガバリンの Cmax 及び $AUC_{0\text{-}24h}$ は、雄でそれぞれ 9.37 μg/mL 及び 50.1 μg·h/mL、雌でそれぞれ 14.8 μg/mL 及び 40.6 μg·h/mL であった。

3.2.2.2　サル 13 週間反復投与毒性試験

添付資料番号: 4.2.3.2-10

ミロガバリンベシル酸塩を 0.5%メチルセルロース溶液に懸濁し、カニクイザル（雌雄各 3 例／群）に、0、10、100、又は 300 mg/kg／日の投与量で 13 週間反復経口投与した。4 週間反復投与毒性試験では、100 mg/kg／日以上で中枢神経関連の一般状態の異常が認められ、無毒性量は 30 mg/kg／日と判断された（3.2.2.1 項）。そのため、この試験の最高用量を 300 mg/kg／日とし、これより低い用量を 10 及び 100 mg/kg／日に設定した。TK 評価では、投与 1 日目、28 日目、及び 91 日目におけるミロガバリンの血漿中濃度を LC-MS/MS によって測定した。（2.6.7.7.5）

投与期間中、いずれの群にも死亡例は認められなかった。一般状態観察では、投与期間中に活動性低下（軽微又は中等度）及び運動失調が 100 mg/kg／日以上で認められ、流涎が 300 mg/kg／日の雌雄で、嘔吐が 300 mg/kg／日の雄で認められた。100 mg/kg／日の雄 1 例で、体温低下及び横臥位が投与 1 日目に、運動失調が投与 2～8 日目に認められた。これらの変化は被験物質投与による中枢神経系への影響に関連すると考えられた。尿検査では、尿量の増加が 100 mg/kg／日以上の雄で認められた。しかし、投与期間終了付近の血液生化学検査及び病理組織学的検査において、泌尿器系に関連する異常が認められなかったことから、毒性学的意義のない変化であると考えられた。血液生化学検査では、トリグリセリドの増加が 300 mg/kg／日の雌 1 例で認められたが、摂餌量、体重、並びに血液生化学検査及び病理組織学的検査の関連するパラメータに異常が認められなかったことから、毒性学的に意義のない変化であると考えられた。病理組織学的検査では、副腎の束状帯細胞肥大が 100 mg/kg／日以上の雄及び 300 mg/kg／日の雌で認められたが、被験物質投与によるストレス又は一般状態の異常に対する二次的な適応性変化と考えられた。

体重、摂餌量、眼科学的検査、心電図検査、血液学的検査、剖検、及び器官重量測定では、被験物質投与に関連すると考えられる異常は認められなかった。

TK の評価では、ミロガバリンの Cmax 及び $AUC_{0\text{-}24h}$ は、雌雄ともに 10～300 mg/kg／日の間で概ね投与量の増加に伴い上昇したが、概して投与量比を下回る上昇を示した。TK パラメータには反復投与による明らかな変化及び明らかな性差は認められなかった。

以上、ミロガバリンベシル酸塩の毒性の標的臓器は、中枢神経系と考えられた。100 mg/kg／日で活動性低下が認められたことから、カニクイザルでの無毒性量は 10 mg/kg／日であると判断した。無毒性量では、投与 91 日目における Cmax 及び $AUC_{0\text{-}24h}$ は、雄でそれぞれ 4.62 μg/mL 及び 20.0 μg·h/mL、雌でそれぞれ 3.93 μg/mL 及び 12.4 μg·h/mL であった。

3.2.2.3　サル 39 週間反復投与毒性試験

添付資料番号: 4.2.3.2-11、4.2.3.2-12

ミロガバリンベシル酸塩を 0.5%メチルセルロース溶液に懸濁し、カニクイザル（雌雄各 4 例／群）に、0、10、30、又は 100 mg/kg／日の投与量で 39 週間反復経口投与した。13 週間反復投与毒性試験では、100 mg/kg／日で中枢神経関連の一般状態の異常が認められ、無毒性量は 10 mg/kg／日と判断された（3.2.2.2 項）。そのため、この試験の最高用量を 100 mg/kg／日とし、これより低い用量を 10 及び 30 mg/kg／日に設定した。TK 評価ではは、投与 1 日目、91 日目、及び 273 日目におけるミロガバリン及び A204-4455 の血漿中濃度を LC-MS/MS によって測定した。(2.6.7.7.6)

投与期間中、いずれの群にも死亡例は認められなかった。一般状態観察では、運動失調が 100 mg/kg／日の雌雄各 1 例で投与 1 日目に認められた。軽微な活動性低下が 100 mg/kg／日で認められた。この変化は、ほぼ全例で投与期間中期ないし後期に消失した。摂水量の増加、並びに血清中ナトリウム及びクロールの減少が、10、30、及び 100 mg/kg／日で認められた。尿中のナトリウム排泄量の増加、並びに血清中ナトリウム及びクロールの減少は、摂水量又は尿量の増加による二次的な変化と考えられた。

体重、摂餌量、眼科学的検査、心電図検査、血液学的検査、剖検、器官重量測定、及び病理組織学的検査では、投与に関連すると考えられる異常は認められなかった。

TK の評価では、ミロガバリンの Cmax は、雌雄ともに概ね投与量の増加に伴い上昇したが、投与量比を下回る上昇を示した。ミロガバリンの $AUC_{0\text{-}24h}$ は投与量にほぼ比例した。A204-4455 の Cmax 及び $AUC_{0\text{-}24h}$ は、雌雄ともに投与量比を下回る上昇を示した。ミロガバリン及び A204-4455 の TK パラメータは、反復投与による有意な変化及び有意な性差を示さなかった。

以上、ミロガバリンベシル酸塩の毒性の標的臓器は、中枢神経系と考えられた。100 mg/kg／日で活動性低下が認められたことから、カニクイザルでの無毒性量は 30 mg/kg／日であると判断した。無毒性量では、投与 273 日目におけるミロガバリンの Cmax 及び $AUC_{0\text{-}24h}$ は、雄でそれぞれ 13.9 μg/mL 及び 58.1 μg·h/mL、雌でそれぞれ 12.2 μg/mL 及び 52.4 μg·h/mL であり、A204-4455 の Cmax 及び $AUC_{0\text{-}24h}$ は、雄でそれぞれ 136 ng/mL 及び 796 ng·h/mL、雌でそれぞれ 116 ng/mL 及び 586 ng·h/mL であった。

4. 遺伝毒性試験

ミロガバリンベシル酸塩の遺伝毒性は、in vitro 試験（細菌を用いた復帰突然変異試験、CHL 細胞を用いた染色体異常試験）及び in vivo 試験（ラット骨髄小核試験）で評価した。結果を表 2.6.6.4-1 に要約する。

表 2.6.6.4-1　遺伝毒性試験の概要

試験の種別	試験系	例数／群	濃度／投与量	結果
細菌を用いた復帰突然変異試験	*Salmonella typhimurium* (TA98, TA100, TA1535, TA1537) 及び *E. coli* (WP2*uvrA*)	4	313, 625, 1250, 2500, 5000 μg/plate	陰性
染色体異常試験	CHL 細胞	2	2.5, 5, 10 mmol/L	陰性
骨髄小核試験	ラット／F344 経口 (0.5%MC)	雄: 6	0, 500, 1000, 2000 mg/kg	陰性

CHL: チャイニーズ・ハムスター肺組織由来、MC: メチルセルロース

4.1 In vitro 遺伝毒性試験

4.1.1 細菌を用いた復帰突然変異試験

添付資料番号: 4.2.3.3.1-1

サルモネラ菌（*Salmonella typhimurium*）の 4 株（TA100、TA98、TA1535、及び TA1537）及び大腸菌（*Escherichia coli*）の 1 株（WP2*uvr*A）を用いて、ミロガバリンベシル酸塩の復帰突然変異試験を実施した。ミロガバリンベシル酸塩はジメチルスルフォキシド（dimethyl sulfoxide: DMSO）に溶解して使用した。復帰突然変異試験では、濃度設定試験の結果に基づき、各菌株につき 5 段階の濃度（313～5000 μg/plate）を、代謝活性化系（ラット肝 S9 mix）の存在下及び非存在下で評価した。加えて、媒体対照群及び陽性対照群（2-Aminoanthracene 群、Benzo[a]pyrene 群、2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide 群、Sodium azide 群、及び ICR-191 群）を設けた。（2.6.7.8.1）

代謝活性化系の有無にかかわらず、いずれの試験菌株においても、ミロガバリンベシル酸塩の全濃度で復帰変異コロニー数の増加は観察されなかった。

以上、この試験系では、ミロガバリンベシル酸塩に変異原性はないと判断した。

4.1.2 染色体異常試験

添付資料番号: 4.2.3.3.1-2

CHL 細胞由来のほ乳類細胞株を用いて、ミロガバリンベシル酸塩の染色体異常試験を実施した。ミロガバリンベシル酸塩は DMSO に溶解して使用した。染色体異常試験では、濃度設定試験の結果に基づき、濃度 2.5、5、10 mmol/L のミロガバリンベシル酸塩によって、代謝活性化系（ラット肝 S9 mix）の存在下及び非存在下で細胞を処理した。連続処理法による試験では細胞を 24 時間処理し、短時間処理法による試験では細胞を 6 時間処理した後、18 時間の回復時間を設けた。加えて、媒体対照群及び陽性対照群（Mitomycin C 群及び Benzo[a]pyrene 群）を設けた。（2.6.7.8.2）

いずれのミロガバリンベシル酸塩群でも、代謝活性化系の有無にかかわらず、構造異常及び数的異常の増加は認められなかった。以上、この試験系では、ミロガバリンベシル酸塩に染色体異常誘発性はないと判断した。

4.2　In vivo 遺伝毒性試験

4.2.1　ラット骨髄小核試験

添付資料番号: 4.2.3.3.2-1

雄 F344/DuCrlCrlj ラット（6 例／群）を用いて、ミロガバリンベシル酸塩の in vivo 小核試験を実施した。ミロガバリンベシル酸塩を 0.5%メチルセルロース溶液に懸濁し、単回経口投与した。投与量は、用量設定試験の結果に基づき、500、1000、又は 2000 mg/kg とした。被験物質の投与 24 及び 48 時間後に骨髄を採取し、小核を含有する未成熟赤血球の出現頻度を評価した。加えて、媒体対照群及び陽性対照群（cyclophosphamide 群）を設けた。(2.6.7.9.1)

ミロガバリンベシル酸塩のすべての投与群で、一般状態の異常（腹臥位、活動性低下、ふらつき歩行、会陰部の汚れ、又は糞量減少）が観察された。小核を含有する未成熟赤血球の出現頻度は、いずれのミロガバリンベシル酸塩群でも高値を示さなかった。

以上、この試験系では、ミロガバリンベシル酸塩は in vivo で染色体異常を誘発しないと判断した。

5. がん原性試験（補助的なトキシコキネティクス評価を含む）

標準的なマウス及びラットの 104 週間がん原性試験で、ミロガバリンベシル酸塩のがん原性を評価した。マウス及びラットの 104 週間がん原性試験の用量設定及び試験デザインは、[redacted]。ラットの膀胱腫瘍発生に関する機序試験を追加実施した。すべての試験でミロガバリンの TK を評価した。

104 週間がん原性試験及びラット膀胱腫瘍発生に関する機序試験の要約を表 2.6.6.5-1 に示す。

表 2.6.6.5-1　マウス及びラットがん原性試験、並びにラット機序試験の要約

動物種／系統	投与経路（媒体）	投与量（mg/kg／日）	投与期間	性及び例数／群	特筆すべき所見
マウス／B6C3F1	経口（0.5% MC）	0、10、30、100	104 週間	雄: 60 雌: 60	投与に関連する腫瘍の発生頻度上昇なし（雄、雌）
ラット／F344	経口（0.5% MC）	0、10、30、100	104 週間	雄: 60 雌: 60 対照; 60 × 2 群／性	100 mg/kg／日: 膀胱の移行上皮乳頭腫の発生頻度上昇（雄） 投与に関連する腫瘍の発生頻度上昇なし（雌）
ラット／F344[a]	経口（0.5% MC）	13 週間: 0、10、100 26 週間: 0、10、30、100	13 及び 26 週間	雄: 10	13 及び 26 週間反復投与毒性試験では、100 mg/kg／日までの投与量で、膀胱の Ki-67 陽性率の有意な変化なし
ラット／F344	経口（0.5% MC）	0、10、30、100	4 週間	雄: 10	10 mg/kg／日以上: 尿中の微細結晶の発現頻度上昇（発現頻度及び程度に明らかな用量依存性なし） 膀胱の走査型電子顕微鏡解析で、BrdU 陽性率及び尿路上皮の形態に有意な変化なし
ラット／F344[b]	経口（0.5% MC）	0、10、30、100	104 週間	雄: 20	100 mg/kg／日までの投与量で、膀胱の Ki-67 陽性率の有意な変化なし

MC: メチルセルロース
[a] 13 及び 26 週間反復投与毒性試験のパラフィン包埋標本を評価に使用した。
[b] 104 週間がん原性試験のパラフィン包埋標本を評価に使用した。

5.1 用量設定試験

5.1.1 マウス 2 週間用量設定試験（予備試験）

添付資料番号: 4.2.3.4.1-1

ミロガバリンベシル酸塩を 0.5%メチルセルロース溶液に懸濁し、B6C3F1/Crlj マウス（雌雄各 5 例／群）に、0、100、300、又は 1500 mg/kg／日の投与量で 2 週間反復経口投与した。高用量（1500 mg/kg／日）は ICH S1C(R2)ガイドラインを参考として設定した。TK 測定群（雌雄各 4 例／群／時点）を別途設け、投与 1 日目及び 14 日目におけるミロガバリンの血漿中濃度を、LC-MS/MS によって測定した。(2.6.7.10.1)

投与に関連する死亡が、1500 mg/kg／日の雄 1 例で認められた。本例は一般状態の異常（腹

臥位、ふらつき歩行、下腹部被毛の汚れ、体温低下など）を示し、投与4日目に死亡が確認された。本例の剖検では、ガス貯留による空腸、回腸、及び盲腸の拡張が認められた。しかし、これらの臓器には、投与に関連すると判断された病理組織学的変化は観察されなかった。病理組織学的検査では、一般状態の悪化による二次的変化と考えられる変化がいくつか検出された。したがって、死因は中枢神経系の抑制による一般状態の悪化と考えられた。300 mg/kg／日以下では、死亡例は認められなかった。TK測定群では、投与に関連する死亡が、1500 mg/kg／日の雄4例及び雌1例で投与3～12日目に認められた。

生存例では、投与に関連する一般状態として、腹臥位又は活動性低下（100 mg/kg／日以上の全例）、下腹部被毛の汚れ（300 mg/kg／日以上の一部の雄）、及びふらつき歩行（1500 mg/kg／日の雄1例）が認められた。1500 mg/kg／日では、摂餌量が対照群と比較して増加した。血液生化学検査では、1500 mg/kg／日でアルカリフォスファターゼ及び総コレステロールの増加、100 mg/kg／日以上の雌で血中尿素窒素の減少が認められた。しかし、摂餌量及び血液生化学検査で認められたこれらの変化は軽微であり、なおかつ関連する病変が観察されなかったことから、毒性学的意義は乏しいと判断した。剖検では、1500 mg/kg／日の雄4例及び雌3例で前胃に複数の隆起巣が観察された。病理組織学的検査では、前胃に多巣性の粘膜肥厚が認められた。

体重、血液学的検査値、及び器官重量には、毒性学的に意義のある変化はみられなかった。

薬物代謝酵素の測定では、肝臓の第I相酵素であるCYPの含量増加及び7-alkoxycoumarin O-dealkylaseの活性上昇が、1500 mg/kg／日で検出された。CYPの含量増加及び7-alkoxycoumarin O-dealkylaseの活性上昇が認められた主因は、ミロガバリンベシル酸塩のCYP2B誘導能にあると、ウエスタンブロット解析の結果から判断された。肝臓の第II相酵素の明らかな変化は、雌雄ともにみられなかった。

TKの評価では、ミロガバリンのCmax及び$AUC_{0\text{-}24h}$は、雌雄ともに100～1500 mg/kg／日の間で概ね投与量の増加に伴い上昇したが、Cmaxは投与量比を下回る上昇を示した。TKパラメータには、反復投与による明らかな変化及び明らかな性差は認められなかった。

以上、マウスにミロガバリンベシル酸塩を2週間経口投与したときの致死量は1500 mg/kg／日であった。一般状態の異常及び前胃の病理組織学的病変が認められたことから、ミロガバリンベシル酸塩の毒性の標的臓器は、中枢神経系及び胃と判断した。また、1500 mg/kg／日で死亡例が認められたことから、最大耐量は300 mg/kg／日と判断した。最大耐量の投与14日目におけるミロガバリンのCmax及び$AUC_{0\text{-}24h}$は、雄でそれぞれ40.4 μg/mL及び109 μg·h/mL、雌でそれぞれ44.8 μg/mL及び105 μg·h/mLであった。

5.1.2　マウス13週間用量設定試験

添付資料番号: 4.2.3.4.1-2

ミロガバリンベシル酸塩を0.5%メチルセルロース溶液に懸濁し、B6C3F1/Crljマウス（雌雄各10例／群）に、0、100、300、又は1000 mg/kg／日の投与量で13週間反復経口投与した。2週間反復投与毒性試験では、1500 mg/kg／日で死亡例が認められ、100 mg/kg／日以上

で中枢神経関連の一般状態の異常が認められた（5.1.1 項）。そのため、この試験の最高用量を 1000 mg/kg／日とし、これより低い用量を 100 及び 300 mg/kg／日に設定した。TK 測定群（雌雄各 4 例／群／時点）を別途設け、投与 1 日目及び 91 日目におけるミロガバリンの血漿中濃度を、LC-MS/MS によって測定した。（2.6.7.10.2）

投与期間中、1000 mg/kg／日の毒性評価群の雄 2 例及び雌 3 例、並びに 1000 mg/kg／日の TK 測定群の雄 2 例及び雌 6 例が死亡又は瀕死期屠殺された。また、300 mg/kg／日の TK 測定群の雄 1 例及び雌 2 例が死亡又は瀕死期屠殺された。これらの動物では活動性低下又は腹臥位が認められており、これらの症状の原因はミロガバリンベシル酸塩による中枢神経抑制と考えられた。また、1000 mg/kg／日の雄 1 例が腹部膨満を呈した。剖検では、300 mg/kg／日以上でガス貯留による胃、十二指腸、空腸、回腸、及び盲腸の拡張が認められた。病理組織学的検査では、萎縮性又はストレス性の変化が様々な臓器に認められ、一般状態の悪化又は一般状態の異常による二次的変化と考えられたが、死因を示唆する特定の変化は認められなかった。したがって、死因は中枢神経抑制による一般状態の悪化に関連するものと考えられた。

生存例では、100 mg/kg／日以上のすべての生存例で活動性低下もしくは腹臥位がみられた。これらの一般状態の異常は、反復投与により減弱する傾向にあった。1000 mg/kg／日の雄及び 100 mg/kg／日以上の雌では摂餌量の増加がみられた。尿検査では、尿 pH の低値（7.5 以下）が 100 mg/kg／日以上で、尿タンパクの増加（2+）が 300 mg/kg／日以上の雄で、尿量の増加が 1000 mg/kg／日の雌で認められた（いずれも対照群との比較）。器官重量測定では、心臓及び腎臓の絶対及び相対重量の増加が、100 mg/kg／日以上の雌でみられた。しかし、摂餌量、尿検査値、及び器官重量の変化は、軽微な変化であるとともに、病理組織学的検査を含むその他の検査で関連する変化が認められなかったことから、毒性学的な意義はないと考えられた。剖検では、膀胱の拡張が 300 mg/kg／日以上で認められたが、尿路系に病理組織学的変化がみられなかったことから、毒性学的に意義のない変化と考えられた。病理組織学的検査では、前胃の粘膜肥厚が 1000 mg/kg／日の雌で認められた。その他の変化として、会陰部皮膚の痂皮形成及び会陰部皮膚の痂皮が 1000 mg/kg／日の雄 1 例で、顎下腺の腺房細胞萎縮が 1000 mg/kg／日の雌で認められた。これらの変化は、一般状態の異常による二次的変化であり、毒性学的意義はないと判断した。

体重、眼科学的検査、血液学的検査、及び血液生化学検査では、投与に関連する変化は認められなかった。

TK の評価では、ミロガバリンの Cmax 及び $AUC_{0\text{-}24h}$ は、雌雄ともに概ね投与量の増加に伴い上昇したが、投与量比を下回る上昇を示した。100 mg/kg／日では、反復投与による Cmax 及び $AUC_{0\text{-}24h}$ の明らかな変化はみられなかったが、300 及び 1000 mg/kg／日で Cmax 及び $AUC_{0\text{-}24h}$ は、投与 91 日目に投与 1 日目と比較して高値であった。TK パラメータに明らかな性差はみられなかった。

以上、投与に関連する死亡が 300 mg/kg／日以上で認められた。したがって、最大耐量は 100 mg/kg／日と考えられた。最大耐量では、投与 91 日目におけるミロガバリンの Cmax 及

び $AUC_{0\text{-}24h}$ は、雄でそれぞれ 15.8 μg/mL 及び 40.2 μg·h/mL、雌でそれぞれ 16.9 μg/mL 及び 35.8 μg·h/mL であった。

5.2 長期試験

5.2.1 マウス 104 週間がん原性試験

添付資料番号: 4.2.3.4.1-3

ミロガバリンベシル酸塩を 0.5%メチルセルロース溶液に懸濁し、B6C3F1/Crlj マウス（雌雄各 60 例／群）に、0、10、30、又は 100 mg/kg／日の投与量で 104 週間反復経口投与した。13 週間反復投与毒性試験では、300 mg/kg／日で死亡例が認められ、100 mg/kg／日以上で中枢神経系に関連する一般状態の異常が認められた（5.1.2 項）。そのため、この試験の最高用量を 100 mg/kg／日とし、これより低い用量を 10 及び 30 mg/kg／日に設定した。TK 測定群（雌雄各 4 例／群／時点）を別途設け、投与 1 日目、89 日目、及び 177 日目におけるミロガバリンの血漿中濃度を LC-MS/MS によって測定した。(2.6.7.10.3)

雌では、投与量の増加に伴って生存率が低下し、100 mg/kg／日の生存率は対照群と比較して有意に低かった一方、特定の死因の増加はみられなかった。一般状態の観察では、一時的な活動性低下又は腹臥／横臥位が 30 及び 100 mg/kg／日で認められ、発生頻度は投与量の増加に伴って上昇した。これらの症状は、反復投与によって消失あるいは発生頻度が低下した。触診では、被験物質に関連する表在性腫瘤はみられなかった。体重及び摂餌量の評価では、体重の減少及び摂餌量の増加が 30 及び 100 mg/kg／日で雌に認められた。血液学的検査では、赤血球数、ヘモグロビン値、及びヘマトクリット値の増加が、30 mg/kg／日の雌及び 100 mg/kg／日で認められた。血小板数、リンパ球数、及びリンパ球比率の減少が、100 mg/kg／日の雄で認められた。剖検では、膀胱の拡張が全投与群の雄で認められた。病理組織学的検査では、被験物質に関連する腫瘍は認められなかった。非腫瘍性の病変については、膀胱の内腔拡張の発生頻度上昇が 30 mg/kg／日の雄及び 100 mg/kg／日で認められた。

TK の評価では、投与 1 日目、89 日目、及び 177 日目における Cmax 及び $AUC_{0\text{-}24h}$ は、雌雄ともに投与量にほぼ比例した。明らかな性差及び反復投与による明らかな影響は認められなかった。

以上、B6C3F1 マウスにミロガバリンベシル酸塩を 104 週間反復投与したとき、腫瘍発生はみられなかった。高用量（100 mg/kg／日）で、投与 177 日目におけるミロガバリンの Cmax 及び $AUC_{0\text{-}24h}$ は、雄でそれぞれ 15.2 μg/mL 及び 28.7 μg·h/mL、雌でそれぞれ 18.5 μg/mL 及び 34.4 μg·h/mL であった。

5.2.2 ラット 104 週間がん原性試験

添付資料番号: 4.2.3.4.1-4

ミロガバリンベシル酸塩を 0.5%メチルセルロース溶液に懸濁し、F344/DuCrlCrlj ラット（雌雄各 60 例／群）に、0（媒体対照）、10、30、又は 100 mg/kg／日の投与量で 104 週間反復経口投与した。2 つの媒体対照群（対照群 1 及び 2）を含む各群の動物数は、雌雄各 60 例に設

定した。13 週間反復投与毒性試験では、最大耐量は 300 mg/kg／日と判断され、中枢神経系に関連する一般状態の異常が 100 mg/kg／日以上で認められた（3.2.1.2 項）。100 mg/kg／日でのミロガバリンの $AUC_{0\text{-}24h}$ は、予定する最大推奨臨床用量（15 mg 1 日 2 回）をヒトに投与したときの $AUC_{0\text{-}24h}$ と比較して 25 倍超と予想された。この $AUC_{0\text{-}24h}$ 比は、ICH S1C(R1)ガイドラインに提示されているがん原性試験の高用量設定時の曝露量の要件を満たすものである。そのため、この試験の最高用量を 100 mg/kg／日とし、これより低い用量を 10 及び 30 mg/kg／日に設定した。TK 測定群（雌雄各 3 例／群）を別途設け、投与 1 日目及び 182 日目におけるミロガバリンの血漿中濃度を、LC-MS/MS によって測定した。(2.6.7.10.4)

ふらつき歩行及び活動性低下が 30 及び 100 mg/kg／日で認められた。一般状態観察及び剖検の結果、眼球混濁の発生頻度上昇が、30 mg/kg／日以上で認められた。体重減少が、100 mg/kg／日の雄及び 10 mg/kg／日以上の雌でみられた。摂餌量増加が、10 mg/kg／日以上の雄及び 30 mg/kg／日以上の雌でみられた。血液学的検査では、投与に関連する変化は認められなかった。

100 mg/kg／日の雄で、膀胱の移行上皮乳頭腫の発生頻度が統計学的に有意に上昇した。10 及び 30 mg/kg／日では、移行上皮乳頭腫の発生頻度に統計学的に有意な上昇は認められなかったが、雄での発生頻度は統計学的に有意な用量反応性を示した。非腫瘍性の増殖性病変である粘膜上皮の過形成（び慢性又は限局性）の発生頻度は、いずれの群でも有意な上昇を示さなかった。さらに、膀胱粘膜上皮の変性及び壊死は認められなかった（表 2.6.6.5-2）。

上記以外の変化として、眼球の角膜石灰化の発生頻度上昇が 30 mg/kg／日以上で認められ、角膜パンヌスの発生頻度上昇が 100 mg/kg／日の雌でみられた。顎下腺及び舌下腺の軽微な萎縮の発生頻度上昇が、30 mg/kg／日以上でみられたが、極めて軽微な変化であり、関連する毒性所見がみられなかったことから、毒性学的意義はないと考えられた。

TK の評価では、ミロガバリンの Cmax 及び $AUC_{0\text{-}24h}$ は投与量の増加に伴い上昇したが、投与量比を下回る上昇を示した。TK パラメータには、反復投与による明らかな変化及び性差はみられなかった。

以上、生存率には、投与に関連する影響はみられなかった。高用量群（100 mg/kg／日）の雄で膀胱の移行上皮乳頭腫（良性腫瘍）の発生頻度が統計学的に有意に上昇したが、粘膜上皮の過形成（び慢性又は限局性）の発生頻度には、100 mg/kg／日まで有意な上昇はみられなかった。したがって、ミロガバリンベシル酸塩が造腫瘍性を示す可能性は極めて低いと考えられる。30 mg/kg／日では、投与 182 日目におけるミロガバリンの Cmax 及び $AUC_{0\text{-}24h}$ は、雄でそれぞれ 14.9 μg/mL 及び 46.9 μg·h/mL、雌でそれぞれ 15.4 μg/mL 及び 44.9 μg·h/mL であった。

表 2.6.6.5-2　ラットがん原性試験で膀胱に認められた腫瘍性及び非腫瘍性病変の要約

Organ / Findings	Sex / Dose (mg/kg/day) / Number of animals	Grade	Male 0 / 120	Male 10 / 60	Male 30 / 60	Male 100 / 60	Female 0 / 120	Female 10 / 60	Female 30 / 60	Female 100 / 60
Urinary bladder			<120>	<60>	<60>	<60>	<120>	<60>	<60>	<59>[3]
Transitional cell carcinoma			0	0	0	0	0	0	0	1[4]
P-value by Peto's test[1]			—	—	—	—	0.1873	0.5936	0.5936	0.1873
Transitional cell papilloma			0[a]	2	1	3[b]	0	0	2	1
P-value by Peto's test[1]			0.0206	0.0715	0.1578	0.0215	0.0723	0.4686	0.0570	0.1873
Hyperplasia, mucosal epithelium, diffuse (incidence and grade)		(Total)	0	2	1	1	1	0	0	0
		Grade[#] 1	0	1	0	1	1	0	0	0
		2	0	0	1	0	0	0	0	0
		3	0	1	0	0	0	0	0	0
Hyperplasia, mucosal epithelium, focal		1	1	2	0	0	2	0	1	1
Toxicokinetics of mirogabalin										
$AUC_{0\text{-}24h}$ (μg·h/mL) on Day 182			NE	16.1	46.9	112	NE	15.4	44.9	113
Exposure margin to human[2]			NE	7.6	22.1	52.9	NE	7.2	21.2	53.4

<>, number of animals examined; #, Grade: 1, minimal; 2, mild; 3, moderate; NE: Not examined
1) *P*-values by the trend test are presented in the column in the control group (0 mg/kg/day) and those by the Pairwise comparison test are presented in the column in each dose group.
2) Compared with $AUC_{0\text{-}24h}$ in humans given 15 mg. bid (2.114 μg·h/mL, Study No.DS5565-A-E103)
3) The tissue of 1 female was not examined due to autolysis.
4) Transitional cell carcinoma of 1 female receiving 100 mg/kg/day was considered to be related to incidental calculus noted in the urinary bladder.
a Significantly positive trend; $P < 0.025$ (Trend test, Peto's test, rare tumor)
b Significantly different from the control group; $P < 0.05$ (Pairwise comparison test, Peto's test, rare tumor)

5.3　短期又は中期試験

短期又は中期試験は実施していない。

5.4　その他の試験

5.4.1　ラットにおける膀胱腫瘍発生機序試験

5.4.1.1　ラット膀胱尿路上皮に対する有糸分裂誘発性の検討（13 及び 26 週間反復投与毒性試験）

添付資料番号: 4.2.3.4.3-1

ミロガバリンベシル酸塩を 100 mg/kg／日までの投与量で投与した雄 F344/DuCrlCrlj ラット（10 例／群）で、尿路上皮に対する有糸分裂誘発性を評価した。13 週間反復投与毒性試験（0、10、及び 100 mg/kg／日）及び 26 週間反復投与毒性試験（0、10、30、及び 100 mg/kg／日）で採取した膀胱を用いて、上皮細胞の Ki-67 陽性率を検討した。(2.6.7.10.5)

上皮細胞の Ki-67 陽性率（平均値）は、13 週間反復投与毒性試験の 0、10、及び 100 mg/kg／日でそれぞれ 0.11%、0.03%、及び 0.12%、26 週間反復投与毒性試験の 0、10、30、及び

100 mg/kg／日でそれぞれ 0.14%、0.20%、0.18%、及び 0.30%であった。13 及び 26 週間反復投与毒性試験のミロガバリンベシル酸塩群では、Ki-67 陽性率の統計学的に有意な上昇（対照群との比較）はみられなかった。

以上、ミロガバリンベシル酸塩をラットに 13 又は 26 週間経口投与したとき、膀胱上皮細胞の増殖活性の亢進は認められなかった。

5.4.1.2　ラットの尿及び膀胱尿路上皮に対する影響の検討

添付資料番号: 4.2.3.4.3-2

ミロガバリンベシル酸塩を 0.5%メチルセルロース溶液に懸濁し、雄 F344/DuCrlCrlj ラット（10 例／群）に、0、10、30、又は 100 mg/kg／日の投与量で 4 週間反復経口投与した。4 週間の投与期間終了時に、同じ週齢のラットからなる TK 測定群（18 例／群）にミロガバリンベシル酸塩を単回投与後、血液及び尿検体を採取し、ミロガバリン及び A204-4455 の血漿中及び尿中濃度を分析した（4 例／群／採取時点）。(2.6.7.10.6)

投与期間中に死亡例はみられなかった。ふらつき歩行及び活動性低下が 30 及び 100 mg/kg／日で認められた。すべての被験物質群で摂餌量が増加し、100 mg/kg／日では高値が投与期間を通して持続した。尿検査では、新鮮尿を用いて、pH 測定、及び走査型電子顕微鏡（scanning electron microscope: SEM）による尿中の微細結晶の検査を行い、尿性状及び結晶物形成への投与に関連する影響を検討した。また、20 時間蓄積尿を用いて、浸透圧、尿量、クレアチニン、グルコース、総タンパク、カルシウム、カルシウムイオン、マグネシウム、マグネシウムイオン、無機リン、ナトリウム、カリウム、及びクロールを測定した。SEM 解析の結果、尿中の微細結晶の発現頻度上昇がすべての被験物質群で認められたが、発現頻度及び程度に明らかな用量依存性はみられなかった。尿量の増加が 100 mg/kg／日で認められた。その他のパラメータには、投与に関連する変化はみられなかった。

病理学的検査では、膀胱に対する投与に関連する影響を検討するため、剖検、膀胱の病理組織学的検査、膀胱尿路上皮の 5-ブロモ-2'-デオキシウリジン（5-bromo-2'-deoxyuridine: BrdU）陽性率の評価、及び SEM 解析を実施した。膀胱尿路上皮では、投与に関連する変化はみられなかった。SEM による観察で細胞傷害性はみられず、BrdU 陽性率を指標とする評価で増殖活性は認められなかった。

体重及び血液生化学検査では、投与に関連する変化はみられなかった。

10、30、又は 100 mg/kg／日を単回経口投与したとき、ミロガバリン及び A204-4455 の血漿中濃度は投与 1 時間後に最高値に達した後、低下した。投与後のミロガバリン及び A204-4455 の尿中濃度は投与 4 時間後に最高値に達した後、低下した。ミロガバリン及び A204-4455 の血漿中濃度及び尿中濃度は、投与量の増加に伴って上昇した。

以上、雄 F344/DuCrlCrlj ラットでは、10 mg/kg／日以上で尿中の微細結晶が増加したが、その発現頻度及び程度に明らかな用量依存性はみられなかった。雄 F344/DuCrlCrlj ラットでは、膀胱尿路上皮の細胞傷害性や増殖活性は 100 mg/kg／日まで認められなかった。

5.4.1.3　ラット膀胱尿路上皮に対する有糸分裂誘発性の検討（104 週間がん原性試験）

添付資料番号: 4.2.3.4.3-3

ラット 104 週間がん原性験（0、10、30、及び 100 mg/kg／日）の雄（60 例／群）のうち膀胱に組織変化の認められていない動物から無作為に抽出した 20 例／群の膀胱を用いて、上皮細胞の Ki-67 陽性率を計測して尿路上皮に対する有糸分裂誘発性を評価した。(2.6.7.10.7)

上皮細胞の Ki-67 陽性率の平均値は、0、10、30、及び 100 mg/kg／日でそれぞれ 1.896%、0.156%、0.202%、及び 0.073%、上皮細胞の Ki-67 陽性率の中央値は、それぞれ 0.053%、0.054%、0.076%、及び 0.039%であり、対照群と比較してミロガバリンベシル酸塩群で Ki-67 陽性率の統計学的に有意な上昇はみられなかった。

以上、ミロガバリンベシル酸塩をラットに 104 週間経口投与したとき、膀胱上皮細胞の増殖活性の亢進は認められなかった。

6. 生殖発生毒性試験

ミロガバリンベシル酸塩について、ラット受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験、ラット及びウサギ胚・胎児発生に関する試験、並びにラット出生前及び出生後の発生に関する試験を実施した。すべての本試験で、ミロガバリンの TK 評価を実施した。

特筆すべき所見を表 2.6.6.6-1 に要約する。

表 2.6.6.6-1　ラット及びウサギの生殖発生毒性試験の概要

動物種／系統	投与経路（媒体）	投与量（mg/kg／日）	投与期間	性及び例数／群	特筆すべき所見
受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験					
ラット／SD	経口（0.5% MC）	0、10、30、100	雄: 交配前2週間から交尾成立の前日まで 雌: 交配前2週間から妊娠7日まで	雄: 20 雌: 20	100 mg/kg／日: 歩行困難（雄、雌）、発情前期及び発情期の持続（雌）、体重及び摂餌量↓（雌、投与期間終了後） 雌雄親動物の一般毒性に対する無毒性量: 30 mg/kg／日 親動物（雄）の生殖に対する無毒性量: 100 mg/kg／日 親動物（雌）の生殖に対する無毒性量: 30 mg/kg／日 次世代発生に対する無毒性量: 100 mg/kg／日
胚・胎児発生に関する試験					
ラット／SD	経口（0.5% MC）	0、100、300、1000	妊娠7～17日	雌: 21～22	100 mg/kg／日以上: 活動性低下、ふらつき歩行、歩行困難、体重及び摂餌量↓（投与期間終了後）、胎児体重↓ 300 mg/kg／日以上: 会陰部の汚れ 1000 mg/kg／日: 母動物の死亡、鼻周囲の汚れ、呼吸不整、胸椎体未骨化の出現頻度↑、仙尾椎骨骨化数↓ 催奇形性を示さず 母動物の一般毒性に対する無毒性量: 100 mg/kg／日未満 母動物の生殖に対する無毒性量: 1000 mg/kg／日 次世代発生に対する無毒性量: 100 mg/kg／日未満
ラット／SD	経口（0.5% MC）	0、10、30	妊娠7～17日	雌: 22	30 mg/kg／日: 胎児体重↓（雄） 母動物の一般毒性に対する無毒性量: 30 mg/kg／日 次世代発生に対する無毒性量: 10 mg/kg／日
ウサギ／NZW	経口（0.5% MC）	0、10、30、100	妊娠6～18日	雌: 18～19	10 mg/kg／日以上: 体重↓、摂餌量↓（投与期間終了後） 30 mg/kg／日以上: 活動性低下及びふらつき歩行、胎児体重↓ 100 mg/kg／日: 流産 母動物の一般毒性に対する無毒性量: 10 mg/kg／日未満 母動物の生殖に対する無毒性量: 30 mg/kg／日 次世代発生に対する無毒性量: 10 mg/kg／日
出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験					
ラット／SD	経口（0.5% MC）	0、10、30、100	妊娠7日～分娩21日後	雌: 18～19	30 mg/kg／日以上: 活動性低下、F1児の出生率↓ 100 mg/kg／日: 妊娠期間の延長 母動物の一般毒性に対する無毒性量: 10 mg/kg／日 母動物の生殖に対する無毒性量: 30 mg/kg／日 次世代発生に対する無毒性量: 10 mg/kg／日

MC: メチルセルロース、↓: 減少, ↑: 増加

6.1　受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験

6.1.1　ラットの受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験

添付資料番号: 4.2.3.5.1-1

ミロガバリンベシル酸塩を 0.5%メチルセルロース溶液に懸濁し、Crl:CD(SD)ラット（雌雄各 20 例／群）に、0、10、30、又は 100 mg/kg／日の投与量で反復経口投与した。F344 DuCrlCrlj ラットの 13 週間反復投与毒性試験で 0、10、100、及び 300 mg/kg／日の投与量を検討したとき、100 mg/kg／日以上で中枢神経系に関連する一般状態の異常がみられたが、雄生殖器に器官重量の変化及び病理組織学的変化は認められなかった（3.2.1.2 項）。したがって、この試験の高用量を 100 mg/kg／日に設定した。雄には交配前 2 週間から交尾成立の前日まで投与を行い、交尾成立後に解剖した。雌には交配前 2 週間から妊娠 7 日まで投与を行い、妊娠 14 日に解剖した。TK 測定群（雌雄各 5 例／群）を別途設け、ミロガバリンの血漿中濃度を LC-MS/MS によって測定した。(2.6.7.12)

いずれの群でも投与に関連する死亡は認められなかった。歩行困難が 100 mg/kg／日で認められた。投与期間終了後に体重及び摂餌量の減少が 100 mg/kg／日の雌でみられた。発情前期及び発情期の持続が 100 mg/kg／日で認められた。いずれの群でも、投与に関連する肉眼的剖検所見は認められなかった。

いずれの被験物質群でも、雄生殖器重量及び精子検査に毒性変化は認められず、交尾率、受胎率、及び交尾成立に要した日数に影響はみられなかった。いずれの被験物質群でも、黄体数、着床数、着床前死亡率、着床後死亡率、及び生存胚数に投与に関連する変化は認められなかった。

TK の評価では、いずれの TK パラメータにも顕著な性差はみられなかった。Cmax は概ね投与量の増加に伴い上昇したが、投与量比を下回る上昇を示した。$AUC_{0\text{-}24h}$ は投与量にほぼ比例した。反復投与による TK パラメータの明らかな変化はみられなかった。

以上、親動物の一般毒性に対する無毒性量は 30 mg/kg／日と判断した。親動物の生殖に対する無毒性量は、雄で 100 mg/kg／日、雌で 30 mg/kg／日と判断した。次世代発生に対する無毒性量は 100 mg/kg／日と判断した。母動物の生殖に対する無毒性量（30 mg/kg／日）では、投与最終日におけるミロガバリンの Cmax 及び $AUC_{0\text{-}24h}$ は、それぞれ 7.16 μg/mL 及び 26.5 μg·h/mL であった。

6.2　胚・胎児発生に関する試験

6.2.1　ラット胚・胎児発生に関する試験

添付資料番号: 4.2.3.5.2-1、4.2.3.5.2-2

ミロガバリンベシル酸塩を 0.5%メチルセルロース溶液に懸濁し、0、100、300、又は 1000 mg/kg／日の投与量で、妊娠ラット（Crl:CD(SD)、21 又は 22 例／群）に妊娠 7 日から妊娠 17 日まで反復経口投与した。ラット胚・胎児発生に関する予備試験（2.6.7.11）では、100 mg/kg／日以上で中枢神経系に関連する一般状態の異常が認められ、1000 mg/kg／日で体重及び摂餌量の減少が認められた。したがって、この試験の高用量を 1000 mg/kg／日、中用

量及び低用量をそれぞれ 300 及び 100 mg/kg／日に設定した。TK 測定群（雌雄各 4 又は 5 例／群）を別途設け、ミロガバリンの血漿中濃度を LC-MS/MS によって測定した。(2.6.7.13.1)

母動物では、1000 mg/kg／日で 2 例に投与に関連する死亡が認められた。投与に関連する一般状態の変化として、すべての被験物質群で活動性低下、ふらつき歩行、及び歩行困難が観察された。さらに、300 mg/kg／日以上で会陰部の汚れが認められ、1000 mg/kg／日で鼻周囲の汚れ及び呼吸不整が認められた。すべての被験物質群で、妊娠 20 日に体重及び摂餌量の減少が認められた。母動物の剖検及び胎盤の検査で異常は認められなかった。黄体数及び着床数に投与に関連する変化は認められなかった。

胎児では、いずれの被験物質群でも、死亡胚・胎児数、性比、及び外表・内臓・骨格異常の出現頻度に投与に関連する変化はみられなかった。すべての被験物質群で生存胎児体重が減少した。1000 mg/kg／日で胸椎体未骨化の出現頻度の上昇及び仙尾椎骨骨化数の減少が認められた。

TK の評価では、ミロガバリンの Cmax 及び $AUC_{0\text{-}24h}$ は、100～1000 mg/kg／日の間で概ね投与量の増加に伴い上昇し、特に 1000 mg/kg／日では、反復投与後に上昇傾向が認められた。

以上、この試験でミロガバリンベシル酸塩は催奇形性を示さなかったと判断された。母動物の一般毒性及び次世代発生に対する無毒性量は、100 mg/kg／日未満と判断された。母動物の生殖に対する無毒性量は 1000 mg/kg／日と判断された。母動物の生殖に対する無毒性量（1000 mg/kg／日）では、妊娠 17 日におけるミロガバリンの Cmax 及び $AUC_{0\text{-}24h}$ は、それぞれ 84.3 μg/mL 及び 1120 μg·h/mL であった。

6.2.2　ラット胚・胎児発生に関する試験（低用量追加試験）

添付資料番号: 4.2.3.5.2-3

ミロガバリンベシル酸塩を 0.5%メチルセルロース溶液に懸濁し、0、10、又は 30 mg/kg／日の投与量で、妊娠ラット（Crl:CD(SD)、22 例／群）に妊娠 7 日～17 日まで反復経口投与した。先に実施したラット胚・胎児発生に関する試験では、100 mg/kg／日で胎児体重が減少したため、次世代発生に対する無毒性量を決定できなかった（6.2.1 項）。したがって、この追加試験では、投与量を 10 及び 30 mg/kg／日に設定した。TK 測定群（雌雄各 5 例／群）を別途設け、ミロガバリンの血漿中濃度を LC-MS/MS によって測定した。(2.6.7.13.2)

いずれの群の母動物でも、死亡はみられず、一般状態の変化、並びに体重及び摂餌量の毒性変化は認められなかった。母動物の剖検及び胎盤の肉眼的観察で異常は認められなかった。

胎児では、いずれの被験物質群でも、死亡胚・胎児数、性比、外表異常の出現頻度に投与に関連する変化はみられなかった。雄胎児体重の減少が 30 mg/kg／日で認められた。

以上、母動物の一般毒性に対する無毒性量は 30 mg/kg／日、次世代発生に対する無毒性量は 10 mg/kg／日と判断した。次世代発生に対する無毒性量（10 mg/kg／日）では、妊娠 17 日におけるミロガバリンの Cmax 及び $AUC_{0\text{-}24h}$ は、それぞれ 4.57 μg/mL 及び 15.5 μg·h/mL であった。

6.2.3　ウサギ胚・胎児発生に関する試験

添付資料番号: 4.2.3.5.2-4、4.2.3.5.2-5

ミロガバリンベシル酸塩を 0.5%メチルセルロース溶液に懸濁し、0、10、30、又は 100 mg/kg／日の投与量で、妊娠ウサギ（Kbl:NZW、18 又は 19 例／群）に妊娠 6 日～18 日まで反復経口投与した。ウサギ胚・胎児発生に関する予備試験（2.6.7.11）では、母動物の死亡が 1000 mg/kg／日で、母動物の中枢神経系に関連する一般状態の異常、並びに体重及び摂餌量の減少が、30 mg/kg／日以上で認められた。胎児体重の減少が 100 mg/kg／日以上で認められた。したがって、この試験の高用量を 100 mg/kg／日、中用量及び低用量をそれぞれ 30 及び 10 mg/kg／日に設定した。TK 測定群（5 例／群）を別途設けて、ミロガバリンの血漿中濃度を LC-MS/MS によって測定した。（2.6.7.13.3）

母動物では、いずれの群でも投与に関連する死亡は認められなかった。流産が 100 mg/kg／日で 1 例に認められた。30 mg/kg／日以上では、投与に関連する一般状態変化（活動性低下、ふらつき歩行など）が認められた。すべての被験物質群で、投与期間終了後に体重及び摂餌量の減少が認められた。母動物の剖検及び胎盤の検査で異常は認められなかった。黄体数及び着床数に投与に関連する変化は認められなかった。

胎児では、いずれの被験物質群でも、死亡胚・胎児数、性比、外表・内臓・骨格異常の出現頻度、及び仙尾椎骨骨化数に投与に関連する変化はみられなかった。生存胎児体重の減少が 30 mg/kg／日以上で認められた。

TK の評価では、ミロガバリンの Cmax 及び $AUC_{0\text{-}24h}$ は概ね投与量にほぼ比例した。TK パラメータには、反復投与による明らかな変化は認められなかった。

以上、この試験でミロガバリンベシル酸塩は催奇形性を示さなかったと判断された。母動物の一般毒性に対する無毒性量は 10 mg/kg／日未満、母動物の生殖に対する無毒性量は 30 mg/kg／日、次世代発生に対する無毒性量は 10 mg/kg／日と判断された。次世代発生に対する無毒性量（10 mg/kg／日）では、妊娠 18 日におけるミロガバリンの Cmax 及び $AUC_{0\text{-}24h}$ は、それぞれ 3.07 μg/mL 及び 9.25 μg·h/mL であった。

6.3　出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験

6.3.1　ラット出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験

添付資料番号: 4.2.3.5.3-1、4.2.3.5.3-2

ミロガバリンベシル酸塩を 0.5%メチルセルロース溶液に懸濁し、0、10、30、又は 100 mg/kg／日の投与量で、妊娠ラット（Crl:CD(SD)、18 又は 19 例／群）に妊娠 7 日から分娩 21 日後まで反復経口投与した。先に実施したラット出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験では、中枢神経系に関連する一般状態の異常、妊娠期間の延長、生存児数の減少、及び出生率の低下が、100 mg/kg／日で認められた（2.6.7.11）。したがって、この試験の高用量を 100 mg/kg／日、中用量を 30 mg/kg／日、低用量を 10 mg/kg／日に設定した。TK 測定群（5 例／群）を別途設け、ミロガバリンの血漿中濃度を LC-MS/MS によって測定した。（2.6.7.14）

母動物の死亡は認められなかった。30 及び 100 mg/kg／日で、活動性低下が投与期間（妊娠期間及び哺育期間）を通してみられた。100 mg/kg／日では妊娠期間の延長がみられた。10 mg/kg／日では被験物質に関連する一般状態変化はみられず、10 及び 30 mg/kg／日では分娩データに被験物質に関連する変化はみられなかった。

いずれの被験物質群でも、母動物の体重、摂餌量、及び剖検所見に被験物質に関連する変化はみられなかった。

F1 出生児では、30 及び 100 mg/kg／日で出生率の低下がみられた。10 mg/kg／日では、被験物質に関連する出生率の変化はみられなかった。

いずれの被験物質群の F1 出生児でも、出生児数、出生時の生存児数、性比、生後 4 日の生存児数、生存率、離乳時の生存児数、離乳率、一般状態、体重、機能発達、身体発達、剖検（外表、内臓、及び骨格所見）、外生殖器の形態分化、行動、学習、生殖機能、同腹児データ（黄体数、着床数、着床率）、及び妊娠 15 日胚検査に被験物質投与に関連する変化はみられなかった。

妊娠 7 日及び分娩 21 日後におけるミロガバリンの Cmax 及び $AUC_{0\text{-}24h}$ は、概ね投与量の増加に伴い上昇した。Cmax は投与量比を下回る上昇を示した。$AUC_{0\text{-}24h}$ は投与量にほぼ比例する傾向にあった。反復投与による TK パラメータの明らかな変化はみられなかった。

以上、ミロガバリンベシル酸塩の母動物の一般毒性に対する無毒性量は 10 mg/kg／日、母動物の生殖に対する無毒性量は 30 mg/kg／日、次世代の出生前及び出生後の発生に対する無毒性量は 10 mg/kg／日と判断された。母動物の一般毒性並びに次世代の出生前及び出生後の発生に対する無毒性量（10 mg/kg／日）では、分娩 21 日後におけるミロガバリンの Cmax 及び $AUC_{0\text{-}24h}$ は、それぞれ 3.42 μg/mL 及び 11.0 μg·h/mL であった。

7. 局所刺激性試験

投与経路が経口であるため、局所刺激性試験は実施していない。

8. その他の毒性試験

8.1 依存性試験

薬物依存性の評価として、ラット薬物弁別試験（ミダゾラムとの比較）、ラット身体依存性試験、及びアカゲザル自己投与試験を実施した。

特筆すべき所見を表 2.6.6.8-1 に要約する。

表 2.6.6.8-1 ラット及びアカゲザル依存性試験の要約

試験の種類	動物種／系統	投与経路（媒体）	投与量	投与期間	性及び例数／群	特筆すべき所見
薬物弁別試験	ラット／F344	経口（0.5% MC）	0、3、10、30 mg/kg	単回	雄: 8	ミダゾラムへの般化なし
身体依存性試験	ラット／F344	経口（0.5% MC）	0、30、100、300 mg/kg／日	4 週間の投与期間及び 3 週間の休薬期間	雄: 10	30 mg/kg／日: 摂餌量↓、体重増加率↓（一過性） 100 mg/kg／日以上: 摂餌量↓、体重増加率↓（継続的） 300 mg/kg／日: ハンドリングに対する反応性亢進、体重↓
精神依存性試験	アカゲザル	静脈内	0、0.3、1、3 mg/kg/infusion	2 週間／用量	雄: 2 雌: 2	3 mg/kg: 強化作用あり

MC: メチルセルロース、↓: 減少

8.1.1 ラット薬物弁別試験

添付資料番号: 4.2.3.7.4-1、4.2.3.7.4-2

依存性及び中枢神経抑制作用を有するミダゾラムと生理食塩液との弁別を獲得した雄 F344/DuCrlCrlj ラットを用い、2 レバー選択法の薬物弁別実験において、ミダゾラムからミロガバリンベシル酸塩への般化の有無を観察し、ミロガバリンベシル酸塩（3、10、又は 30 mg/kg 経口投与）とミダゾラム（6 mg/kg 経口投与）との弁別刺激効果の類似性の有無を評価した。ミロガバリンベシル酸塩の予備的な薬物弁別試験では、20 mg/kg で 3 例中 1 例に、30 mg/kg で 3 例中 2 例にレバー押し頻度の低下が認められた。したがって、ミロガバリンベシル酸塩の高用量を 30 mg/kg、中用量及び低用量をそれぞれ 10 及び 3 mg/kg に設定した。ミダゾラムの投与量は、試験施設の背景データに基づいて設定した。ミロガバリンベシル酸塩の媒体には 0.5%メチルセルロース溶液を使用した。

実験 1 では、実験環境への馴化及び餌ペレット強化によるレバー押し行動獲得訓練を実施した。その結果、第 2～12 セッションまでに、全 64 例の動物が試験施設のレバー押し行動獲得基準を満たした。次いで、これらの動物を用いて、ミダゾラム（3 mg/kg）と生理食塩液の腹腔内投与による弁別獲得訓練を実施した。その結果、第 37 セッションまでに 64 例中 32 例が試験施設の弁別獲得基準を満たした。

実験 2 では、ミダゾラム（3 mg/kg）と生理食塩液の腹腔内投与による弁別獲得基準を満たした動物を用いて、初めにミダゾラム（6 mg/kg）及び注射用水の経口投与後のレバー押し行

動を観察した。その結果、ミダゾラム側のレバー押し回数の割合の平均値は、ミダゾラム（6 mg/kg経口投与）では98.2%（26例）、注射用水（経口投与）では3.9%（26例）であった。この結果から、弁別獲得訓練時とは異なる投与経路（経口投与）を用いてもミダゾラムと注射用水を弁別できることが示された。次いで、総レバー押し回数に対するミダゾラム（腹腔内投与）側のレバー押し回数の割合が、ミダゾラム（経口投与）投与後に80%以上、かつ注射用水（経口投与）投与後に20%以下であった動物を選抜し、ミロガバリンベシル酸塩及び0.5%メチルセルロース溶液の経口投与による般化テストを実施した。各テストの直前に、ミダゾラム（腹腔内投与）と生理食塩液（腹腔内投与）を3セッション以上連続で弁別できた動物を選抜した。その結果、ミロガバリンベシル酸塩の3、10、及び30 mg/kg（経口投与）でのミダゾラム側のレバー押し回数の割合の平均値は、それぞれ6.8%、3.6%、及び24.5%（8例／投与量）、0.5%メチルセルロース溶液（経口投与）では5.5%（8例）であり、ミロガバリンベシル酸塩のいずれの投与量でも、ミダゾラム（腹腔内投与）からの般化基準（初回強化における総レバー押し回数に対するミダゾラム側のレバー押し回数の割合が80%以上であること）を満たした動物は認められなかった。したがって、ミロガバリンベシル酸塩はミダゾラム（腹腔内投与）に般化しないと結論付けられた。なお、ミロガバリンベシル酸塩の弁別刺激効果は、ミダゾラムの腹腔内投与には類似してないと考えられ、ミダゾラムの経口投与による弁別刺激効果とミロガバリンベシル酸塩の経口投与による弁別刺激効果は異なると推測された。

以上、ミロガバリンベシル酸塩の弁別刺激効果はミダゾラムには類似していないと考えられた。

8.1.2　ラット身体依存性試験

添付資料番号: 4.2.3.7.4-3

ミロガバリンベシル酸塩を0.5%メチルセルロース溶液に懸濁し、雄F344/DuCrlCrljラット（10例／群）に、30、100、又は300 mg/kg／日の投与量で1日1回4週間反復経口投与した後、3週間の休薬期間を設けた。4週間反復投与毒性試験及び8週間回復性試験（3.2.1.1項）において、1000 mg/kg／日で死亡例が認められ、休薬期間中に100 mg/kg／日以上で摂餌量減少、1000 mg/kg／日で体重減少が認められたことから、100 mg/kg／日で身体依存形成能を示す可能性が示唆された。そのため、この試験の中用量を100 mg/kg／日、高用量を300 mg/kg／日、低用量を30 mg/kg／日に設定した。陽性対照群には、ジアゼパムを1日2回（6時間以上の間隔）、4週間反復経口投与した。投与量は、投与第1週に200 mg/kg／日、投与第2週に400 mg/kg／日、投与第3及び4週に600 mg/kg／日とした。ジアゼパムの投与量は、文献及び試験施設の社内試験の結果に基づいて設定した。

投与期間中、一般状態、並びに体重及び摂餌量の変化を観察した。4週間の投与期間後に3週間の休薬期間を設け、一般状態、体重、体重変化率、及び摂餌量を指標として退薬症候を観察した。

投与期間中、中枢神経抑制症状（30 mg/kg／日以上で運動失調、ハンドリングに対する反

応性低下、横臥位、及び腹臥位、100 mg/kg／日以上で動作緩慢及び筋弛緩）が認められた。陽性対照群でも、ハンドリングに対する反応性低下、運動失調、筋弛緩、動作緩慢、腹臥位、及び横臥位が認められた。被験物質群では、投与 11～22 日目に統計学的に有意な体重増加が認められ、陽性対照群では、投与 4 日目に統計学的に有意な体重減少が認められた（陰性対照群との比較）。被験物質群では、投与 4～8 日目に統計学的に有意な摂餌量増加が認められ、陽性対照群では、投与期間の初期に統計学的に有意な摂餌量減少、投与 15 日目以降に統計学的に有意な摂餌量増加が認められた（陰性対照群との比較）。

休薬期間中、陰性対照群、並びに 30 及び 100 mg/kg／日では、一般状態の明らかな異常はみられなかった。300 mg/kg／日では、ハンドリングに対する反応性亢進が休薬 2 及び 3 日目に、軟便が休薬 2 日目に認められた。陽性対照群では、ハンドリングに対する反応性亢進が休薬 2 又は 3 日目に認められた。30 及び 100 mg/kg／日では、体重に陰性対照群との統計学的な有意差はみられなかった。一方、300 mg/kg／日では休薬 7～19 日目、陽性対照群では休薬 2～19 日目に統計学的に有意な体重減少が認められた。体重増加率は、30 mg/kg／日で休薬 2 日目（最大減少率: −0.4%）、100 及び 300 mg/kg／日で休薬 2～21 日目（最大減少率: −2.7% 及び−5.8%）、陽性対照で休薬 1～21 日目（最大減少率: −10.8%）に統計学的に有意な低値を示した（陰性対照との比較）。摂餌量は、30 mg/kg／日では休薬 2、3、5、6、9、及び 10 日目、100 mg/kg／日では休薬 2～11 及び 13 日目、300 mg/kg／日では休薬 2～14 及び 16 日目に統計学的に有意な減少を示し、陽性対照群では、休薬 2～6 日目に統計学的に有意な減少、休薬 7 日目に統計学的に有意な増加を示した（陰性対照群との比較）。

陽性対照群では、4 週間の漸増用量投与期間後の休薬期間中に明らかな退薬症候（ハンドリングに対する反応性亢進、体重及び摂餌量の減少など）が認められた。したがって、この試験に用いた方法は身体依存形成能の評価に適することが示された。

以上のことから、休薬期間中に摂餌量の減少が 30 mg/kg／日以上で認められ、体重増加率の一過性の減少が 30 mg/kg／日、持続的な減少が 100 及び 300 mg/kg／日で認められた。さらに、一般状態の変化及び体重の減少が 300 mg/kg／日で認められた。したがって、ミロガバリンベシル酸塩は身体依存形成能を有すると判断された。

8.1.3　サル静脈内自己投与試験

添付資料番号: 4.2.3.7.4-4、4.2.3.7.4-5

アカゲザル（各 4 例）を用いて、ミロガバリンベシル酸塩の 2 及び 24 時間静脈内自己投与試験を行った。静脈内自己投与試験の用量設定試験では、一般状態に対する最小作用量は 10 mg/kg であった。また、静脈内自己投与試験では、依存性形成能を持つ薬物の強化効果を、一般状態に対する最小作用量より低用量で評価できることが知られている。そのため、2 時間自己投与試験の最高用量は 6 mg/kg/infusion に設定した。24 時間自己投与試験の用量は 0.3、1、及び 3 mg/kg、2 時間自己投与試験の用量は 0.1、0.3、1、3、及び 6 mg/kg に設定した。各試験では、各動物の自己投与回数を高用量から順に観察した。24 時間自己投与試験では、2 時間自己投与試験の結果をもとに、ミロガバリンベシル酸塩の強化効果の有無を厳密に評価

した。これらの試験は、ケージ内に設置したレバースイッチを動物が5回押すと、一定量の投与液が留置カテーテルを介して静脈内に注入される条件で実施した。ミロガバリンベシル酸塩は0.1%リン酸二水素ナトリウム・生理食塩液（媒体）に溶解した。陽性対照物質としてペントバルビタールを用いた。

2時間自己投与試験では、ペントバルビタール1 mg/kg/infusionの自己投与回数が全例で高値増加（13～18回）した一方、媒体の自己投与回数はいずれの動物でも増加しなかった。続いて、ミロガバリンベシル酸塩の4又は5段階の投与量を、6、3、1、0.3、及び0.1 mg/kg/infusionの順（4例中3例）、又は3、1、0.3、及び0.1 mg/kg/infusionの順（4例中1例）で、1投与量につき4日間ずつ自己投与させた。6 mg/kg/infusionでの観察を3例同時に開始したところ、観察1日目の強制投与（技術者による2回投与）後、1例では自己投与が観察されなかったが、その他2例では5又は7回の自己投与が観察された。さらに、この2例で全身性の振戦が観察された。このため、自己投与の継続によりミロガバリンベシル酸塩が重度の影響をもたらし、試験継続が困難になることを避けるため、6 mg/kg/infusionでの自己投与試験を同日中止した。その後の観察では、1例において、3 mg/kg/infusionの2～4日目及び1 mg/kg/infusionの1～4日目に自己投与回数が増加したが、0.3又は0.1 mg/kg/infusionの自己投与回数は増加しなかった。他の3例では、いずれの投与量の自己投与回数も増加しなかった。これらの結果に基づき、24時間自己投与試験の高用量を3 mg/kg/infusion、中用量及び低用量をそれぞれ1及び0.3 mg/kg/infusionに設定した。

24時間自己投与試験では、ペントバルビタール1 mg/kg/infusionの自己投与回数は増加（13～20回）するが、媒体の自己投与回数は増加しないことを最初に確認した。続いて、ミロガバリンベシル酸塩の3、1、及び0.3 mg/kg/infusionをこの順序で1投与量につき2週間ずつ自己投与させ、自己投与回数及び一般状態変化を観察した。その結果、4例中2例の3 mg/kg/infusionの第1週において、株式会社イナリサーチの強化効果陽性判定基準（1日11回以上の自己投与が5日間以上連続すること）を満たす自己投与が認められた。ミロガバリンベシル酸塩の自己投与回数が増加した試験日には、流涎、嘔吐、動作緩慢、運動失調、下顎の弛緩などの一般状態変化も認められた。他の2例では、同様のパターンかつ強化効果陽性判定基準を満たすミロガバリンベシル酸塩の自己投与はみられなかったが、この試験条件下では、ミロガバリンベシル酸塩が3 mg/kg/infusionで強化作用を示すと判断された。

8.2　不純物の安全性試験

製剤中の分解物（不純物A*）の安全性は、2週間反復投与毒性試験、細菌を用いた復帰突然変異試験、及び染色体異常試験で評価した。試験報告書では、不純物A*は不純物A'と記載されている。原薬中の3種類の分解物（不純物B*、不純物C*、及び不純物D*）は、[redacted]が確認された。[redacted]、これらの分解物の遺伝毒性を評価するための細菌を用いた復帰突然変異試験は非GLP試

＊新薬承認情報提供時に置換

験として実施した。さらに、各化合物の試験成績書を作成せず、媒体中での安定性試験を実施しなかった。この点については、[redacted]。ミロガバリンベシル酸塩の製造工程で生成する4つの[redacted]（ 物質A* 、物質B*、物質C*、及び物質D*）は、細菌を用いた復帰突然変異試験で評価した。

8.2.1 製剤中の分解物（ 不純物A* ）の安全性試験

8.2.1.1 ラット反復投与毒性試験

添付資料番号: 4.2.3.7.6-1

不純物A* を[redacted]添加したミロガバリンベシル酸塩又はミロガバリンベシル酸塩を0.5%メチルセルロース溶液に懸濁した後、F344/DuCrlCrlj ラット（雌雄各 10 例／群）に 0、10、又は 300 mg/kg／日の投与量で2週間反復経口投与し、 不純物A* 添加ミロガバリンベシル酸塩とミロガバリンベシル酸塩の安全性プロファイルを比較した。TK 測定群（雌雄各 4 例／群）を別途設け、投与 1 日目及び 14 日目におけるミロガバリンの血漿中濃度を、LC-MS/MS によって測定した。

ミロガバリンベシル酸塩の 300 mg/kg／日では、雌 1 例が鼻腔内に粉末飼料を詰まらせたことによる呼吸困難によって、投与 6 日目に死亡した。したがって、この死亡は偶発的なものと判断した。 不純物A* 添加ミロガバリンベシル酸塩及びミロガバリンベシル酸塩の 300 mg/kg／日では、生存例が一般状態の異常（腹臥位 [雄のみ]、活動性低下、ふらつき歩行、流涎 [雌のみ]、流涙、紅涙、会陰部の汚れなど）を示した。これらの所見の程度及び発生頻度は、両群でほぼ等しかった。投与期間中、体重及び摂餌量の増加が両群で認められた。いずれの被験物質の 10 mg/kg／日でも、雌 1 例に会陰部の汚れが認められた他、摂餌量の増加が両群の雄で認められた。他の毒性所見が観察されなかったことから、これらの変化には、毒性学的意義はないと判断された。

不純物A* 添加ミロガバリンベシル酸塩の 300 mg/kg／日の雌雄及びミロガバリンベシル酸塩の 300 mg/kg／日の雌のみに、尿量増加が認められた。血液学的検査及び血液生化学検査では、両被験物質の 300 mg/kg／日で、網赤血球率及び総コレステロールの増加、並びにグルコース、アルブミン／グロブリン比、及び無機リンの減少が雄又は雌で認められた。また、血液生化学検査では、トリグリセリド増加が両群の雌で、トリグリセリド減少が両群の雄で認められた。器官重量測定では、肝臓、脾臓、及び副腎の重量が両群の雄又は雌で増加した。病理組織学的検査では、脾臓の髄外造血亢進、腎臓の尿細管上皮での硝子滴沈着、及び副腎の束状帯皮質細胞の脂肪滴増加が、両群の雄又は雌で認められた。これらの所見は、変性、壊死といった毒性学的意義のある種類のものでなかったため、毒性学的意義は低いと判断された。

TK の評価では、不純物A* 添加ミロガバリンベシル酸塩群とミロガバリンベシル酸塩群の間で TK パラメータに明らかな差はみられず、有意な性差もみられなかった。投与量の増加に伴い Tmax は延長傾向を示した。Cmax は投与量比を下回る上昇を示し、$AUC_{0\text{-}24h}$ は投与量にほぼ比例した。反復投与による明らかな変化は認められなかった。

＊新薬承認情報提供時に置換

以上、不純物A* 添加ミロガバリンベシル酸塩及びミロガバリンベシル酸塩の毒性の主な標的臓器は中枢神経系と判断された。毒性変化の程度は被験物質間でほぼ等しく、無毒性量はいずれも 10 mg/kg／日と判断された。さらに、TK パラメータにも明らかな差はみられなかった。これらの結果から、添加した 不純物A* がミロガバリンベシル酸塩の毒性に影響を及ぼさなかったことが示唆された。

8.2.1.2　細菌を用いた復帰突然変異試験

添付資料番号: 4.2.3.7.6-2

サルモネラ菌の 4 株（TA1535、TA1537、TA98、及び TA100）及び大腸菌の 1 株（WP2*uvr*A）を用いて、不純物A* を [redacted] 添加したミロガバリンベシル酸塩の復帰突然変異試験を実施した。不純物A* 添加ミロガバリンベシル酸塩は DMSO に溶解して使用した。主試験では、用量設定試験の結果に基づき、不純物A* 添加ミロガバリンベシル酸塩を 5 段階の濃度（313～5000 μg/plate）に設定し、各菌株で代謝活性化系（ラット肝 S9 mix）の存在下及び非存在下にて評価した。加えて、媒体対照群及び陽性対照群（2-Aminoanthracene 群、Benzo[a]pyrene 群、2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide 群、Sodium azide 群、及び ICR-191 群）を設けた。

代謝活性化系の有無にかかわらず、いずれの試験菌株においても、不純物A* 添加ミロガバリンベシル酸塩群で復帰変異コロニー数の増加は観察されなかった。

以上、この試験系では、不純物A* 添加ミロガバリンベシル酸塩に変異原性はないと判断した。

8.2.1.3　染色体異常試験

添付資料番号: 4.2.3.7.6-3

CHL 由来のほ乳類細胞株を用いて、不純物A* を [redacted] 添加したミロガバリンベシル酸塩の染色体異常試験を実施した。被験物質は DMSO に溶解して使用した。先に実施したミロガバリンベシル酸塩の染色体異常試験の結果に基づき、濃度 2.5～10 mmol/L の不純物A* 添加ミロガバリンベシル酸塩によって、代謝活性化系（ラット肝 S9 mix）の存在下及び非存在下で細胞を処理した。連続処理法による試験では細胞を 24 時間処理し、短時間処理法による試験では細胞を 6 時間処理した後、18 時間の回復時間を設けた。加えて、媒体対照群及び陽性対照群（Mitomycin C 群及び Benzo[a]pyrene 群）を設けた。

代謝活性化系の有無にかかわらず、不純物A* 添加ミロガバリンベシル酸塩群で、構造異常及び数的異常の増加は認められなかった。

以上、この試験系では、不純物A* 添加ミロガバリンベシル酸塩に染色体異常誘発性はないと判断した。

＊新薬承認情報提供時に置換

8.2.2　ミロガバリン原薬中の分解物の安全性試験

8.2.2.1　細菌を用いた復帰突然変異試験

添付資料番号: 4.2.3.7.6-4、4.2.3.7.6-5、4.2.3.7.6-6

ミロガバリンベシル酸塩の原薬中の分解物（不純物B*、不純物C*、又は 不純物D*）を添加したミロガバリンベシル酸塩の変異原性を評価するため、サルモネラ菌の4株（TA100、TA98、TA1535、及びTA1537）及び大腸菌の1株（WP2*uvr*A）を用いて、復帰突然変異試験を実施した。ミロガバリンベシル酸塩はDMSOに溶解して使用した。各分解物を蒸留水に溶解し、5%の濃度でミロガバリンベシル酸塩にそれぞれ添加した。代謝活性化系（ラット肝S9 mix）の存在下及び非存在下で、プレインキュベーション法による試験を実施した。

不純物B*、不純物C*、又は 不純物D* を[redacted]添加したミロガバリンベシル酸塩は、代謝活性化系の有無にかかわらず、9.77～5000 μg/plate（試験ガイドラインに規定されている濃度上限値）までの濃度範囲で、復帰変異コロニー数を2倍以上増加させなかった（陰性対照群との比較）。陽性対照物質による復帰変異コロニー数の増加は、変異原性陽性の判定基準を十分に満たすものであった。用量設定試験及び主試験の結果から、試験結果の再現性が確認された。

以上、不純物B*、不純物C*、又は 不純物D* を添加したミロガバリンベシル酸塩は、この試験の条件下で変異原性はないと判断した。

8.2.3　ミロガバリンベシル酸塩の製造工程で生成する[redacted]の安全性試験

8.2.3.1　物質A*　の細菌を用いた復帰突然変異試験

添付資料番号: 4.2.3.7.6-7

サルモネラ菌の4株（TA100、TA98、TA1535、及びTA1537）及び大腸菌の1株（WP2*uvr*A）を用いて、物質A*　の復帰突然変異試験を実施した。物質A*　はDMSOに溶解して使用した。代謝活性化系（ラット肝S9 mix）の存在下及び非存在下で、プレインキュベーション法による試験を実施した。

代謝活性化系の有無にかかわらず、物質A*　は0.305～5000 μg/plateの濃度範囲で、復帰変異コロニー数を2倍以上増加させなかった（陰性対照群との比較）。陽性対照物質による復帰変異コロニー数の増加は、変異原性陽性の判定基準を十分に満たすものであった。用量設定試験及び主試験の結果から、試験結果の再現性が確認された。

以上、物質A*　は、この試験の条件下で変異原性はないと判断した。

8.2.3.2　物質B*の細菌を用いた復帰突然変異試験

添付資料番号: 4.2.3.7.6-8

サルモネラ菌の4株（TA100、TA1535、TA98、及びTA1537）及び大腸菌の1株（WP2*uvr*A）を用いて、物質B*の復帰突然変異試験を実施した。物質B*はDMSOに溶解して使用した。主試験では、用量設定試験の結果に基づき、物質B*を6又は7段階の濃度（4.88～5000 μg/plate）に設定し、各菌株で代謝活性化系（ラット肝S9 mix）の存在下及び非存在下にて評価した。

＊新薬承認情報提供時に置換

加えて、媒体対照（DMSO）群及び陽性対照群（2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide 群、Sodium azide 群、9-aminoacridine hydrochloride hydrate 群、及び 2-Aminoanthracene 群）を設けた。

代謝活性化系の有無にかかわらず、いずれの試験菌株においても、物質B*処理群で復帰変異コロニー数の増加は観察されなかった。陰性対照群及び陽性対照群の復帰変異コロニー数はいずれも、試験施設の対照群に関する背景データの範囲（平均値 ±3SD）内であった。したがって、試験成立と判断した。

以上、この試験系では、物質B*に変異原性はないと判断した。

8.2.3.3　物質C*の細菌を用いた復帰突然変異試験

添付資料番号: 4.2.3.7.6-9

サルモネラ菌の 4 株（TA100、TA98、TA1535、及び TA1537）及び大腸菌の 1 株（WP2*uvr*A）を用いて、物質C*の復帰突然変異試験を実施した。物質C*は DMSO に溶解して使用した。代謝活性化系（ラット肝 S9 mix）の存在下及び非存在下で、プレインキュベーション法による試験を実施した。

代謝活性化系の有無にかかわらず、物質C*は 0.305～5000 μg/plate の濃度範囲で、復帰変異コロニー数を 2 倍以上増加させなかった（陰性対照群との比較）。陽性対照物質による復帰変異コロニー数の増加は、変異原性陽性の判定基準を十分に満たすものであった。用量設定試験及び主試験の結果から、試験結果の再現性が確認された。

以上、物質C*は、この試験の条件下で変異原性はないと判断した。

8.2.3.4　物質D*の細菌を用いた復帰突然変異試験

添付資料番号: 4.2.3.7.6-10

サルモネラ菌の 4 株（TA100、TA98、TA1535、及び TA1537）及び大腸菌の 1 株（WP2*uvr*A）を用いて、物質D*の復帰突然変異試験を実施した。物質D*は DMSO に溶解して使用した。代謝活性化系（ラット肝 S9 mix）の存在下及び非存在下で、プレインキュベーション法による試験を実施した。

代謝活性化系の有無にかかわらず、物質D*は 0.305～5000 μg/plate の濃度範囲で、復帰変異コロニー数を 2 倍以上増加させなかった（陰性対照群との比較）。陽性対照物質による復帰変異コロニー数の増加は、変異原性陽性の判定基準を十分に満たすものであった。用量設定試験及び主試験の結果から、試験結果の再現性が確認された。

以上、物質D*は、この試験の条件下で変異原性はないと判断した。

＊新薬承認情報提供時に置換

9. 考察及び結論

ミロガバリンベシル酸塩の安全性プロファイルは、ラット（最長 24 週間）及びカニクイザル（最長 39 週間）の反復投与毒性試験、遺伝毒性試験、マウス及びラットのがん原性試験、ラット及びウサギの生殖発生毒性試験、その他の特殊毒性試験（薬物依存性試験など）、並びにミロガバリンベシル酸塩の不純物及び製造工程で生成する中間体の試験にて評価した。ミロガバリンに関連する毒性作用の回復性及び薬物依存性（退薬症候）は、ラット及びカニクイザルの 4 週間反復投与毒性試験の 8 週間の休薬期間に評価した。遺伝毒性試験及び薬物依存性試験を除くすべての試験で、ミロガバリンの TK を評価した。ラットの 2 及び 26 週間反復投与毒性試験、並びにカニクイザルの 2 及び 39 週間反復投与毒性試験では、A204-4455 の TK も評価した。

ラット、カニクイザル、及びウサギの毒性試験では、ラットで 1000 mg/kg／日以上、カニクイザルで 2000 mg/kg／日、妊娠ウサギで 1000 mg/kg／日で死亡例が認められた。死亡例で認められた急性毒性は、ラット及びサルの反復投与毒性試験の他、ウサギの胚・胎児発生に関する予備試験で評価した。ラットでは、死亡前に重度の中枢神経抑制症状（腹臥位、活動性低下、ふらつき歩行、筋弛緩、呼吸不整、被毛の汚れ、糞量減少など）が認められた。ラットの死亡例は投与 2～6 日目に認められ、投与 3 日目より後の死亡例では摂餌量及び体重の減少が認められた。一般状態の悪化を示唆する病理組織学的変化（萎縮性及びストレス性の変化）が観察されたが、死因を示唆する一貫した特定の変化は認められなかった。カニクイザルでは、2 週間反復投与毒性試験の投与 3 日目に雄 1 例が死亡した。この死亡例は、死亡前に一般状態の異常（運動失調、間代性痙攣、活動性低下、嘔吐など）とともに摂餌量及び体重の著しい減少を示し、ミロガバリンベシル酸塩の中枢神経抑制作用が示唆された。この死亡例の病理組織学的検査では、軽微な心筋変性、胃粘膜の糜爛及び萎縮が認められた。死因は、ミロガバリンベシル酸塩の中枢神経抑制作用による一般状態の悪化であった。妊娠ウサギでは、死亡前に中枢神経抑制症状、並びに摂餌量及び体重の減少が認められた。3 動物種（ラット、カニクイザル、及びウサギ）で死亡前に観察された一般状態の異常から、ミロガバリンベシル酸塩の急性毒性は中等度ないし重度の中枢神経抑制であると考えられた。

ラット反復投与毒性試験では、ミロガバリンベシル酸塩の毒性の標的臓器は、中枢神経系（30 mg/kg／日以上）、並びに胃、腎臓、及び心臓（30 mg/kg／日より高用量）であり、中枢神経系に対する毒性は過度の薬理学的作用によるものと考えられた。2、4、13、及び 26 週間反復投与毒性試験では、用量制限毒性は中枢神経抑制による一般状態の異常と判断された。ラット 2 週間反復投与毒性試験では、300 mg/kg／日以上で腺胃の糜爛、2000 mg/kg／日で前胃の糜爛及び粘膜肥厚が認められた。ラット 4 週間反復投与毒性試験では、1000 mg/kg／日で前胃の糜爛及び粘膜肥厚、並びに腺胃の糜爛及び潰瘍が認められた。ラット 13 週間反復投与毒性試験では、300 mg/kg／日で前胃に粘膜肥厚が認められた。胃で認められた所見は、高濃度の投与懸濁液によるミロガバリンベシル酸塩分子内のベシル酸成分の局所刺激性によるものと考えられた。腎臓では、尿細管上皮の限局性壊死及び硝子滴増加が 4 週間反復投与毒性試験の 1000 mg/kg／日で雄に認められた。心臓では、心内膜下の限局性石灰化が 4 週間反

復投与毒性試験の 1000 mg/kg／日で、限局性出血及び心筋壊死が 2 週間反復投与毒性試験の 2000 mg/kg／日で認められた。26 週間反復投与毒性試験では、100 mg/kg／日まで臓器毒性は認められなかった。4 週間反復投与毒性試験では、ミロガバリンベシル酸塩の休薬後、投与に関連する変化は 8 週間以内に回復し、新たな一般状態の異常はみられなかった。しかし、100 及び 1000 mg/kg／日で休薬期間前半に摂餌量及び体重の減少が認められ、これらの変化から退薬症候の可能性が示唆された。26 週間反復投与毒性試験では、無毒性量は 10 mg/kg／日と判断され、無毒性量での Cmax 及び $AUC_{0\text{-}24h}$ は、ヒトに最大推奨臨床用量（15 mg 1 日 2 回）のミロガバリンベシル酸塩を投与したときの Cmax 及び $AUC_{0\text{-}24h}$ と比較して、それぞれ 7.9 及び 4.7 倍高かった（表 2.6.6.9-1）。

カニクイザル反復投与毒性試験では、ミロガバリンベシル酸塩の毒性の標的臓器は、中枢神経系、並びに高用量での胃及び心臓であり、中枢神経系に対する毒性は過度の薬理学的作用によるものと考えられた。2、4、13、及び 39 週間反復投与毒性試験では、用量制限毒性は中枢神経抑制症状と判断された。胃では、胃噴門部の扁平上皮の水腫性変性が、4 週間反復投与毒性試験の 1000 mg/kg／日、及び 2 週間反復投与毒性試験の 2000 mg/kg／日で認められた。胃の扁平上皮の病理組織学的変化は、胃粘膜刺激性を有する他の薬物あるいは化学物質でも報告されている[1]。胃で認められた所見は、ミロガバリンベシル酸塩分子内のベシル酸成分の局所刺激性によるものと考えられた。心臓では、心筋変性が 2 週間反復投与毒性試験の 2000 mg/kg／日で認められた。13 週間反復投与毒性試験では 300 mg/kg／日まで、39 週間反復投与毒性試験では 100 mg/kg／日まで、臓器毒性は認められなかった。4 週間反復投与毒性試験では、ミロガバリンベシル酸塩の休薬後、投与に関連する変化は 8 週間以内に回復し、新たな一般状態の異常、並びに摂餌量及び体重の減少はみられなかった。カニクイザルでは、1000 mg/kg／日の 4 週間投与後に退薬症候の可能性を示唆する所見はみられなかった。39 週間反復投与毒性試験では、無毒性量は 30 mg/kg／日と判断され、無毒性量での Cmax 及び $AUC_{0\text{-}24h}$ は、ヒトに最大推奨臨床用量（15 mg 1 日 2 回）のミロガバリンベシル酸塩を投与したときの Cmax 及び $AUC_{0\text{-}24h}$ と比較して、それぞれ 32.0 及び 24.7 倍高かった（表 2.6.6.9-1）。

ヒト主要代謝物である A204-4455 のヒトでの曝露量は、ミロガバリンに関連する総曝露量の 10%未満であった。さらに、ラット及びカニクイザルでの A204-4455 の曝露量は、ヒトに一日当たりの最大推奨用量である 30 mg のミロガバリンベシル酸塩を単回投与したときの A204-4455 の全身曝露量より高かった（表 2.6.6.9-2）。したがって、A204-4455 の安全性は、ミロガバリンベシル酸塩の非臨床毒性プログラムで十分に評価されたと判断した。

遺伝毒性試験（細菌を用いた復帰突然変異試験、CHL 細胞を用いた染色体異常試験、及びラット単回投与後の骨髄小核試験）では、ミロガバリンベシル酸塩の遺伝毒性は陰性であり、ミロガバリンベシル酸塩は遺伝毒性を示さないと判断した。

マウス 104 週間がん原性試験では、ミロガバリンベシル酸塩群で腫瘍あるいは非腫瘍性病変による死亡の増加はみられなかった。100 mg/kg／日まで、投与に関連する腫瘍発生あるいは増殖性病変は認められなかった。マウスでは、100 mg/kg／日でのミロガバリンの $AUC_{0\text{-}24h}$ は、ヒトに最大推奨臨床用量（15 mg 1 日 2 回）のミロガバリンベシル酸塩を投与したとき

の $AUC_{0\text{-}24h}$ と比較して 13.5 倍高かった（表 2.6.6.9-1）。ラット 104 週間がん原性試験では、ミロガバリンベシル酸塩による腫瘍あるいは非腫瘍性病変による死亡の増加はみられなかった。100 mg/kg／日では、雄で膀胱の移行上皮乳頭腫（良性腫瘍）の発生頻度が統計学的に有意に上昇したが、発生頻度（60 例中 3 例）は低かった。この移行上皮乳頭腫は、内腔へ突出する孤立性乳頭腫として観察され、多発性乳頭腫とは異なるものであった。ラットでの膀胱腫瘍の発現過程では、初期に移行上皮細胞のびまん性又は限局性の単純性過形成が出現し、これが次第に限局性の結節状又は乳頭状の過形成を形成して移行上皮乳頭腫へと進展すると考えられている[2),3),4),5),6)]。ミロガバリンベシル酸塩では、膀胱粘膜上皮の変性及び壊死並びに投薬による膀胱移行上皮細胞のびまん性又は限局性の過形成は認められなかった。さらに、雄ラットでの膀胱腫瘍発生に関する機序試験では、4 週間反復投与後の SEM 解析では、尿中の微細結晶の発現頻度上昇がミロガバリンベシル酸塩群の雄で認められたが、発現頻度及び程度に明らかな用量依存性はみられず、膀胱粘膜上皮に対する傷害作用も 100 mg/kg／日まで認められなかった。細胞増殖活性は、抗 Ki-67 あるいは BrdU 抗体を用いた免疫組織学的染色による陽性細胞の形態計測で評価可能であることから[7)]、ミロガバリンベシル酸塩（100 mg/kg／日）を 4、13、26、及び 104 週間反復投与した試験の膀胱試料の陽性細胞数を計測した。その結果、膀胱粘膜で陽性細胞比率の増加は認められなかった。上述した試験成績を踏まえると、ミロガバリンベシル酸塩はラット正常上皮細胞の増殖活性に影響を与えないと判断され、ミロガバリンベシル酸塩が遺伝毒性を示さないこともあわせて考えると、移行上皮乳頭腫の形成はミロガバリンベシル酸塩に起因するものでないと考えられた。なお、ラットでは自然発生する膀胱腫瘍は稀とされている[8),9)]が、同系統ラットの雄では移行上皮乳頭腫が 0～4%、移行上皮癌が 0～2%に発生し[10)]、当該試験を実施した施設の背景データのうち、あるロットの動物（雌雄各 50 例）でそれぞれ 1 例（2%）に、良性腫瘍である移行上皮乳頭腫が認められている（4.2.3.4.1-4）。また、ミロガバリンベシル酸塩のがん原性試験で使用した F344 系ラット（特に雄）は他の系統と比べ膀胱腫瘍の発生が高いことも報告されている[11)]。移行上皮乳頭腫の有意な発生頻度上昇がみられない投与量（30 mg/kg／日）を雄ラットに投与したとき、ミロガバリンの $AUC_{0\text{-}24h}$ は、ヒトに最大推奨臨床用量（15 mg 1 日 2 回）のミロガバリンベシル酸塩を投与したときの $AUC_{0\text{-}24h}$ と比較して 22.1 倍高かった（表 2.6.6.9-1）。以上のことから、雄ラットの 100 mg/kg／日で認められた膀胱の移行上皮乳頭腫は、ヒトでの造腫瘍性リスクを示唆するものではないと考えられた。

ラットの受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験では、100 mg/kg／日で歩行困難が認められた。投与期間終了後に、100 mg/kg／日で雌に体重及び摂餌量の減少が認められた。100 mg/kg／日で発情前期及び発情期の持続が認められた。雄生殖能に対する毒性、並びに受胎能及び着床までの初期胚発生の異常はみられなかった。雌雄親動物の一般毒性に対する無毒性量は 30 mg/kg／日と判断した。親動物の生殖に対する無毒性量は、雄で 100 mg/kg／日、雌で 30 mg/kg／日と判断した。次世代発生に対する無毒性量は 100 mg/kg／日と判断した。雄生殖能に対する無毒性量（生殖毒性なし）及び雌生殖能に対する無毒性量（発情前期及び発情期の持続）での $AUC_{0\text{-}24h}$ は、ヒトに最大推奨臨床用量（15 mg 1 日 2 回）のミロガバリ

ンベシル酸塩を投与したときの $AUC_{0\text{-}24h}$ と比較して、それぞれ 49.6 及び 12.5 倍高かった（表 2.6.6.9-1）。

ラット胚・胎児発生に関する試験では、母動物の死亡が 1000 mg/kg／日で認められた。100 mg/kg／日以上で活動性低下、ふらつき歩行、及び歩行困難が認められた。また、300 mg/kg／日以上で会陰部の汚れが認められ、1000 mg/kg／日で呼吸不整が認められた。母動物では、100 mg/kg／日以上で投与終了後に体重及び摂餌量の減少が認められた。胎児では、30 mg/kg／日以上で外表・内臓・骨格異常を伴わない生存胎児体重減少が認められた。1000 mg/kg／日で胸椎体未骨化の出現頻度の増加及び仙尾椎骨骨化数の減少が認められ、胎児体重の減少に起因すると判断された。母動物で投与終了後に認められた体重及び摂餌量の減少は、ラット 4 週間反復投与毒性試験で認められた症状と同じ退薬症候であり、胎児体重に悪影響を及ぼした可能性があると判断された。母動物の一般毒性、生殖機能、次世代発生に関する無毒性量は、それぞれ 30 mg/kg／日、1000 mg/kg／日、10 mg/kg／日と判断された。次世代発生に対する無毒性量（胎児体重減少）での $AUC_{0\text{-}24h}$ は、ヒトに最大推奨臨床用量（15 mg 1 日 2 回）のミロガバリンベシル酸塩を投与したときの $AUC_{0\text{-}24h}$ と比較して、7.3 倍高かった（表 2.6.6.9-1）。

ウサギ胚・胎児発生に関する試験では、母動物の死亡が 1000 mg/kg／日で認められた。30 mg/kg／日以上で活動性低下及びふらつき歩行が認められた。100 mg/kg／日以上で流産が認められた。母動物では、10 mg/kg／日以上で投与終了後に体重及び摂餌量の減少が認められた。胎児では、30 mg/kg／日以上で外表・内臓・骨格異常を伴わない生存胎児体重減少が認められた。母動物で投与終了後に認められた体重及び摂餌量の減少は、妊娠ラットで認められた体重及び摂餌量の減少と同じく退薬症候と考えられ、胎児体重に悪影響を及ぼした可能性があると判断された。母動物の一般毒性、生殖機能、次世代発生に関する無毒性量は、それぞれ 10 mg/kg／日未満、30 mg/kg／日、10 mg/kg／日と判断された。次世代発生に対する無毒性量（胎児体重減少）での $AUC_{0\text{-}24h}$ は、ヒトに最大推奨臨床用量（15 mg 1 日 2 回）のミロガバリンベシル酸塩を投与したときの $AUC_{0\text{-}24h}$ と比較して、4.3 倍高かった（表 2.6.6.9-1）。ミロガバリンベシル酸塩はラット及びウサギで催奇形性を示さなかった。

ラット出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験では、30 mg/kg／日以上で、親動物の活動性低下が投与期間（妊娠期間及び哺育期間）を通してみられた。100 mg/kg／日では、妊娠期間の延長がみられた。F1 出生児では、30 mg/kg／日以上で出生率の低下がみられた。出生児数、出生時の生存児数、性比、生後 4 日の生存児数、生存率、離乳時の生存児数、離乳率、一般状態、体重、機能発達、身体発達、剖検、外生殖器の形態分化、行動、学習、生殖機能、同腹児（黄体数、着床数、着床率）データ、及び妊娠 15 日胚検査に被験物質投与に関連する変化はみられなかった。母動物の一般毒性、生殖機能、次世代の出生前及び出生後の発生に関する無毒性量は、それぞれ 10 mg/kg／日、30 mg/kg／日、10 mg/kg／日と判断された。次世代発生に対する無毒性量（F1 出生児の出生率の低下）での $AUC_{0\text{-}24h}$ は、ヒトに最大推奨臨床用量(15 mg 1 日 2 回)のミロガバリンベシル酸塩を投与したときの $AUC_{0\text{-}24h}$ と比較して、5.2 倍高かった（表 2.6.6.9-1）。

独立した薬物依存性試験として、ラット薬物弁別試験、ラット反復経口投与身体依存性試験、及びアカゲザル静脈内自己投与試験を実施した。ラット薬物弁別試験では、ミロガバリンベシル酸塩の弁別刺激効果はミダゾラムには類似していないと考えられた。ラット4週間反復投与身体依存性試験では、3週間の休薬期間中、摂餌量の減少が30 mg/kg／日以上で認められ、体重増加率の一過性の減少が30 mg/kg／日で、体重増加率の継続的な減少が100 mg/kg／日以上で認められた。また、300 mg/kg／日でハンドリングに対する反応性亢進及び体重減少が認められ、明らかな退薬症候と判断された。30 mg/kg／日で一過性の身体依存性が認められた。4週間反復投与毒性試験では、30 mg/kg／日での $AUC_{0\text{-}24h}$（2.6.7.7.1）が、ヒトに最大推奨臨床用量（15 mg 1日2回）を投与したときの $AUC_{0\text{-}24h}$ と比較して12倍高かった。ミロガバリンベシル酸塩はラットで身体依存形成能を示し、その重症度はジアゼパム200～600 mg/kg／日（陽性対照）と比較して低かった。上記のように、カニクイザル4週間反復投与毒性試験では、ミロガバリンベシル酸塩の1000 mg/kg／日まで、退薬症候は認められなかった。アカゲザル静脈内自己投与試験では、3 mg/kg/infusionで4例中2例に自己投与が認められたが、0.3及び1 mg/kg/infusionでは自己投与はみられなかった。ミロガバリンベシル酸塩はアカゲザル自己投与試験で精神依存形成能を示し、その強度はペントバルビタール1 mg/kg/infusion（陽性対照）と比較して低かった。

原薬又は製剤中の不純物（不純物A*、不純物B*、不純物C*、及び 不純物D*）は、ミロガバリンベシル酸塩と比較して、新たな毒性変化を示さず、ミロガバリンベシル酸塩の安全性に影響を及ぼさないと判断された。ミロガバリンベシル酸塩の製造工程で生成する[redacted]（物質A*、物質B*、物質C*、及び物質D*）は、変異原性を示さなかった。

結論として、ラット、カニクイザル、妊娠ラット、及び妊娠ウサギへのミロガバリンベシル酸塩投与により認められた主な毒性は、過度の薬理学的作用によると考えられる中枢神経機能抑制症状であった。ミロガバリンベシル酸塩は遺伝毒性及び催奇形性を示さなかった。しかし、生殖発生毒性試験では、母動物の発情前期及び発情期の持続、胎児体重の減少、及びF1出生児の出生率の低下が認められた。ミロガバリンベシル酸塩はマウスで造腫瘍性を示さなかった。ラットがん原性試験で移行上皮乳頭腫の発生頻度が統計学的に有意な上昇を示したが、機序試験の結果から、ミロガバリンベシル酸塩が造腫瘍作用を示す可能性は極めて低いと判断された。ミロガバリンベシル酸塩は、ラットで身体依存性、アカゲザルで精神依存性形成能を示した。ラットでは、ミロガバリンベシル酸塩の弁別刺激効果はミダゾラムとの類似性を示さなかった。

最大推奨臨床用量（15 mg 1日2回）と非臨床毒性試験での無毒性量でのミロガバリン及びA204-4455の曝露量の比較に基づく安全域を、表 2.6.6.9-1及び表 2.6.6.9-2に示す。これらの安全域とともに、ラット及びカニクイザルで用量制限毒性となる臓器毒性が認められなかったことに基づき、非臨床データからは、ミロガバリンベシル酸塩を臨床で長期間反復投与しても問題ないと考えられる。

＊新薬承認情報提供時に置換

表 2.6.6.9-1　ミロガバリンの安全域: 臨床用量と重要な試験の無毒性量での曝露量の比較

Type of Study	Species	Dose/ NOAEL (mg/kg/day)	Sex	Cmax (μg/mL)	$AUC_{0\text{-}24h}$ (μg·h/mL)	MOS
Clinical Trial[a]	Human	15 mg bid	—	0.381[h]	2.114[i]	—
Repeated-dose toxicity (26 weeks)	Rat/F344	10[b]	M	3.02	10.2	4.8
		10[b]	F	3.19	10.1	4.7
Repeated-dose toxicity (39 weeks)	Cynomolgus monkey	30[b]	M	13.9	58.1	27.4
		30[b]	F	12.2	52.4	24.7
Carcinogenicity (104 weeks)	Mouse/ B6C3F1	100[c]	M	15.2	28.7	13.5
		100[c]	F	18.5	34.4	16.2
Carcinogenicity (104 weeks)	Rat/F344	30[c]	M	14.9	46.9	22.1
		100[c]	F	30.4	113	53.4
Fertility and early embryonic development	Rat/SD	100[d]	M	17.3	105	49.6
		30[e]	F	7.16	26.5	12.5
Embryo-fetal development	Rat/SD	10[f]	F	4.57	15.5	7.3
	Rabbit/NZW	10[f]	F	3.07	9.25	4.3
Pre- and postnatal development	Rat/SD	10[g]	F	3.42	11.0	5.2

M: male, F: female, NOAEL: no observed adverse effect level, MOS: margin of safety on the $AUC_{0\text{-}24h}$ of mirogabalin

[a] Study No. DS5565-A-E103
[b] NOAEL for abnormal clinical signs related to the CNS
[c] The dose level of no-observed significant increase in tumor
[d] NOAEL for reproduction (No reproductive toxicity)
[e] NOAEL for the reproduction (Persistent proestrus and estrus)
[f] NOAEL for the next generation (Decrease in fetal body weight)
[g] NOAEL for the next generation (Decrease in live birth index of F1)
[h] Cmax,ss for Japanese subjects at Day 7 (Cmax,ss = Cmax at steady state)
[i] AUCtau × 2 for Japanese subjects at Day 7 (AUCtau = AUC from time 0 to 12 hours)

表 2.6.6.9-2　A204-4455 の安全域: 臨床用量と重要な試験の無毒性量での曝露量の比較

Type of Study	Species	Dose/ NOAEL (mg/kg/day)	Sex	Cmax (μg/mL)	$AUC_{0\text{-}24h}$ (μg·h/mL)	MOS
Clinical Trial[a]	Human	15 mg bid	—	0.0179	0.2788	—
Repeated-dose toxicity (26 weeks)	Rat/F344	10[b]	M	0.0767	0.392	1.4
		10[b]	F	0.153	0.607	2.1
Repeated-dose toxicity (39 weeks)	Cynomolgus monkey	30[b]	M	0.136	0.796	2.8
		30[b]	F	0.116	0.586	2.1

M: male, F: female, NOAEL: No observed adverse effect level, MOS: margin of safety on the $AUC_{0\text{-}24h}$ of A204-4455

[a] Study No. DS5565-A-U104
[b] NOAEL for abnormal clinical signs related to the CNS

10. 引用文献

1) Greaves P. Digestive system. Forestomach. Non-neoplastic lesions. In: Histopathology of preclinical toxicity studies. Interpretation and relevance in drug safety studies. 4th ed. Elsevier; 2012. p. 343-6.
2) Cohen SM. Urinary bladder carcinogenesis. Toxicol Pathol. 1998;26:121-7.
3) Cohen SM. Comparative pathology of proliferative lesions of the urinary bladder. Toxicol Pathol. 2002;30:663-71.
4) Greaves P. Urinary Tract. Urinary Bladder. Urothelial (transitional epithelial) hypertrophy and hyperplasia. In: Histopathology of preclinical toxicity studies. Interpretation and relevance in drug safety studies. 4th ed. Elsevier; 2012. p. 587-9.
5) Greaves P. Urinary Tract. Neoplasia. In: Histopathology of preclinical toxicity studies. Interpretation and relevance in drug safety studies. 4th ed. Elsevier; 2012. p. 589-94.
6) Frazier KS, Seely JC, Hard GC, et al. Proliferative and nonproliferative lesions of the rat and mouse urinary system. Toxicol Pathol. 2012;40:14S-86S.
7) Cohen SM. Screening for human urinary bladder carcinogens: two-year bioassay is unnecessary. Toxicol Res (Camb). 2018;7:565-75.
8) Jokinen MP. Urinary bladder, ureter, and urethra. In: Boorman GA, Eustis SL, Elwell MR, et al., editors. Pathology of the Fischer rat. Academic Press Inc; 1990. p. 109-26.
9) Jokinen MP, Seely JC. Urinary bladder, ureter, and urethra. In: Suttie AW, Leininger JR, Bradley AE, editors. Boorman's pathology of the rat. 2nd ed. Academic Press Inc;2018. p. 167-88.
10) ラットの背景病変. 日本毒性病理学会編. 新毒性病理組織学. 西村書店;2017. p. 705-11.
11) Kacew S, Festing MF. Role of rat strain in the differential sensitivity to pharmaceutical agents and naturally occurring substances. J Toxicol Environ Health. 1996;47:1-30.

目次

1. 毒性試験：一覧表 3
2. トキシコキネティクス：トキシコキネティクス試験の一覧表 10
3. トキシコキネティクス：トキシコキネティクス試験成績の一覧 12
4. 毒性試験：被験物質（バッチ毎）一覧 15
5. 単回投与毒性試験 19
6. 反復投与毒性試験：重要な試験以外の試験 20
7. 反復投与毒性試験：重要な試験 21
7.1 ラット 4 週間反復投与毒性試験及び 8 週間回復性試験 21
7.2 ラット 13 週間反復投与毒性試験 28
7.3 ラット 26 週間反復投与毒性試験 31
7.4 サル 4 週間反復投与毒性試験及び 8 週間回復性試験 33
7.5 サル 13 週間反復投与毒性試験 40
7.6 サル 39 週間反復投与毒性試験 42
8. In Vitro 遺伝毒性試験 45
8.1 細菌を用いた復帰突然変異試験 45
8.2 染色体異常試験 48
9. In Vivo 遺伝毒性試験 49
10. がん原性試験 50
10.1 マウス 2 週間用量設定試験（予備試験） 50
10.2 マウス 13 週間用量設定試験 54
10.3 マウス 104 週間がん原性試験 57
10.4 ラット 104 週間がん原性試験 64
10.5 ラットにおける膀胱腫瘍発生機序試験 1 73
10.6 ラットにおける膀胱腫瘍発生機序試験 2 74
10.7 ラットにおける膀胱腫瘍発生機序試験 3 77
11. 生殖発生毒性試験：重要な試験以外の試験 78
12. 生殖発生毒性試験：受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験 79
12.1 ラット受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験 79
13. 生殖発生毒性試験：胚・胎児発生に関する試験 83
13.1 ラット胚・胎児発生に関する試験 83
13.2 ラット胚・胎児発生に関する試験（低用量追加試験） 86
13.3 ウサギ胚・胎児発生に関する試験 89
14. 生殖発生毒性試験：出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験 92
14.1 ラット出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験 92
15. 新生児を用いた試験 97

16. 局所刺激性試験 98
17. その他の毒性試験 99
17.1 依存性試験 99
17.2 不純物の安全性試験 101

1. 毒性試験：一覧表 (1/7)

					Test Article: Mirogabalin besylate			
Type of Study	Species and Strain	Method of Admin	Duration of Dosing	Doses (mg/kg/day)	GLP Compliance	Testing Facility	Attachment Number	Location in CTD
Repeat-Dose Toxicity	Rat (F344/DuCrlCrlj)	Oral, gavage	2 weeks	0, 100, 300, 2000	No	Daiichi Sankyo Co. Ltd., Japan	4.2.3.2-1	4.2.3.2
						[redacted], Japan	4.2.3.2-2	
	Rat (F344/DuCrlCrlj)	Oral, gavage	4 weeks	0, <u>10</u>, 30, 100, 1000	Yes	Daiichi Sankyo Co. Ltd., Japan	4.2.3.2-3	4.2.3.2
	Rat (F344/DuCrlCrlj)	Oral, gavage	13 weeks	0, <u>10</u>, 100, 300	Yes	[redacted], Japan	4.2.3.2-4	4.2.3.2
	Rat (F344/DuCrlCrlj)	Oral, gavage	26 weeks	0, <u>10</u>, 30, 100	Yes	[redacted], Japan	4.2.3.2-5	4.2.3.2
					No	[redacted], USA	4.2.3.2-6	
	Cynomolgus Monkey	Oral, gavage	2 weeks	0, <u>30</u>, 300, 2000	No	Daiichi Sankyo Co. Ltd., Japan	4.2.3.2-7	4.2.3.2
						[redacted], Japan	4.2.3.2-8	
	Cynomolgus Monkey	Oral, gavage	4 weeks	0, <u>30</u>, 100, 1000	Yes	[redacted], Japan	4.2.3.2-9	4.2.3.2
	Cynomolgus Monkey	Oral, gavage	13 weeks	0, <u>10</u>, 100, 300	Yes	[redacted], Japan	4.2.3.2-10	4.2.3.2
	Cynomolgus Monkey	Oral, gavage	39 weeks	0, 10, <u>30</u>, 100	Yes	[redacted], Japan	4.2.3.2-11	4.2.3.2
					No	[redacted], USA	4.2.3.2-12	

Underline indicates the no observed adverse effect level

1. 毒性試験：一覧表 (2/7)

					Test Article: Mirogabalin besylate			
Type of Study	**Species and Strain**	**Method of Admin**	**Duration of Dosing**	**Doses (mg/kg/day)**	**GLP Compliance**	**Testing Facility**	**Attachment Number**	**Location in CTD**
Genotoxicity (Bacterial Reverse Mutation)	*S. typhimurium* (TA98, TA100, TA1535, TA1537); *E. coli* (WP2*uvrA*)	In vitro	–	Initial: 9.77-5000 µg/plate Confirmatory: 313-5000 µg/plate	Yes	Daiichi Sankyo Co. Ltd., Japan	4.2.3.3.1-1	4.2.3.3.1
Genotoxicity (Chromosome Aberration)	CHL cell	In vitro	–	2.5, 5, 10 mmol/L	Yes	Daiichi Sankyo Co. Ltd., Japan	4.2.3.3.1-2	4.2.3.3.1
Genotoxicity (Bone Marrow Micronucleus)	Rat (F344/DuCrlCrlj)	Oral, gavage	Single	0, 500, 1000, 2000 mg/kg	Yes	Daiichi Sankyo Co. Ltd., Japan	4.2.3.3.2-1	4.2.3.3.2
Carcinogenicity	Mouse (B6C3F1/Crlj)	Oral, gavage	2 weeks	0, 100, 300, 1500	No	[redacted], Japan	4.2.3.4.1-1	4.2.3.4.1
	Mouse (B6C3F1/Crlj)	Oral, gavage	13 weeks	0, 100, 300, 1000	Yes	[redacted], Japan	4.2.3.4.1-2	4.2.3.4.1
	Mouse (B6C3F1/Crlj)	Oral, gavage	104 weeks	0, 10, 30, 100	Yes	[redacted], Japan	4.2.3.4.1-3	4.2.3.4.1
	Rat (F344/DuCrlCrlj)	Oral, gavage	104 weeks	0, 10, 30, 100	Yes	[redacted], Japan	4.2.3.4.1-4	4.2.3.4.1
Carcinogenicity (Mechanistic study)	Rat (F344/DuCrlCrlj)	Oral, gavage[a]	13 or 26 weeks	0, 10, 100 or 0, 10, 30, 100	No	[redacted], Japan	4.2.3.4.3-1	4.2.3.4.3
	Rat (F344/DuCrlCrlj)	Oral, gavage	4 weeks	0, 10, 30, 100	No	[redacted], Japan	4.2.3.4.3-2	4.2.3.4.3
	Rat (F344/DuCrlCrlj)	Oral, gavage[b]	104 weeks	0, 10, 30, 100	No	[redacted], Japan	4.2.3.4.3-3	4.2.3.4.3

Underline indicates the no observed adverse effect level.
a: The paraffin specimens of 13- and 26-week toxicity studies were used for the evaluation.
b: The paraffin specimens of 104-week carcinogenicity study were used for the evaluation.

1. 毒性試験：一覧表 (3/7)

					Test Article: Mirogabalin besylate			
Type of Study	Species and Strain	Method of Admin	Duration of Dosing	Doses (mg/kg/day)	GLP Compliance	Testing Facility	Attachment Number	Location in CTD
Reproductive and Developmental Toxicity (Fertility and Early Embryonic Development)	Rat (Crl:CD(SD))	Oral, gavage	M: 2 weeks before mating to copulation, F: 2 weeks before mating to Day 17 of pregnancy	0, 10, 30, 100	Yes	Daiichi Sankyo Co. Ltd., Japan	4.2.3.5.1-1	4.2.3.5.1
Reproductive and Developmental Toxicity (Embryo-fetal Development)	Rat (Crl:CD(SD))	Oral, gavage	Day 7 to Day 17 of pregnancy	0, 100, 300, 1000	No	Daiichi Sankyo Co. Ltd., Japan	4.2.3.5.2-1	4.2.3.5.2
	Rat (Crl:CD(SD))	Oral, gavage	Day 7 to Day 17 of pregnancy	0, 100, 300, 1000	Yes	Daiichi Sankyo Co. Ltd., Japan	4.2.3.5.2-2	4.2.3.5.2
	Rat (Crl:CD(SD))	Oral, gavage	Day 7 to Day 17 of pregnancy	0, 10, 30	Yes	Daiichi Sankyo Co. Ltd., Japan	4.2.3.5.2-3	4.2.3.5.2
	Rabbit (Kbl:NZW)	Oral, gavage	Day 6 to Day 18 of pregnancy	0, 30, 100, 300, 1000	No	Daiichi Sankyo Co. Ltd., Japan	4.2.3.5.2-4	4.2.3.5.2
	Rabbit (Kbl:NZW)	Oral, gavage	Day 6 to Day 18 of pregnancy	0, 10, 30, 100	Yes	Daiichi Sankyo Co. Ltd., Japan	4.2.3.5.2-5	4.2.3.5.2
Reproductive and Developmental Toxicity (Pre- and Postnatal Development)	Rat (Crl:CD(SD))	Oral, gavage	Day 7 of pregnancy to Day 21 of lactation	0, 10, 30, 100	No	[redacted], Japan	4.2.3.5.3-1	4.2.3.5.3
	Rat (Crl:CD(SD))	Oral, gavage	Day 7 of pregnancy to Day 21 of lactation	0, 10, 30, 100	Yes	[redacted], Japan	4.2.3.5.3-2	4.2.3.5.3

1. 毒性試験：一覧表 (4/7)

					Test Article: Mirogabalin besylate			
Type of Study	Species and Strain	Method of Admin	Duration of Dosing	Doses	GLP Compliance	Testing Facility	Attachment Number	Location in CTD
Other Toxicity Studies (Dependence, Drug Discrimination)	Rat (F344/DuCrlCrlj)	Intraperitoneal (IP), Oral, gavage	Single	IP: 3, 6, 10, 15, 20, 30 mg/kg Oral: 0, 10, 20, 30 mg/kg	No	[redacted], Japan	4.2.3.7.4-1	4.2.3.7.4
	Rat (F344/DuCrlCrlj)	Oral, gavage	Single	0, 3, 10, 30 mg/kg	Yes	[redacted], Japan	4.2.3.7.4-2	4.2.3.7.4
Other Toxicity Studies (Dependence, Physical Dependence)	Rat (F344/DuCrlCrlj)	Oral, gavage	4 weeks	0, 30, 100, 300 mg/kg/day	Yes	[redacted], Japan	4.2.3.7.4-3	4.2.3.7.4
Other Toxicity Studies (Dependence, Psychological Dependence)	Rhesus monkey	Intravenous	Single	0, 0.3, 1, 3, 6, 10 mg/kg/infusion	No	[redacted], Japan	4.2.3.7.4-4	4.2.3.7.4
	Rhesus monkey	Intravenous (self-administration) for 2h or 24h	2h: 4 days/dose 24h: 2 weeks/dose	2h: 0, 0.1, 0.3, 1, 3, 6 mg/kg/infusion 24h: 0, 0.3, 1, 3 mg/kg/infusion	Yes	[redacted], Japan	4.2.3.7.4-5	4.2.3.7.4

1. 毒性試験：一覧表 (5/7)

					Test Article: 不純物A* [a]-spiked mirogabalin besylate			
Type of Study	**Species and Strain**	**Method of Admin**	**Duration of Dosing**	**Doses**	**GLP Compliance**	**Testing Facility**	**Attachment Number**	**Location in CTD**
Other Toxicity Studies (Impurity)	Rat (F344/DuCrlCrlj)	Oral, gavage	2 weeks	0, <u>10</u>, 300 mg/kg/day	Yes	[redacted], Japan	**4.2.3.7.6-1**	4.2.3.7.6
	S. typhimurium (TA98, TA100, TA1535, TA1537); *E. coli* (WP2*uvrA*)	In vitro	–	Initial: 78.1-5000 µg/plate Confirmatory: 313-5000 µg/plate	Yes	Daiichi Sankyo Co. Ltd., Japan	**4.2.3.7.6-2**	4.2.3.7.6
	CHL cell	In vitro	–	0.5, 5, 10 mmol/L	Yes	Daiichi Sankyo Co. Ltd., Japan	**4.2.3.7.6-3**	4.2.3.7.6

Underline indicates the no observed adverse effect level.
a: 不純物A* is referred to as [redacted] in the study reports.

＊新薬承認情報提供時に置換

1. 毒性試験：一覧表 (6/7)

					Test Article:	不純物B* -spiked mirogabalin besylate		
Type of Study	Species and Strain	Method of Admin	Duration of Dosing	Doses	GLP Compliance	Testing Facility	Attachment Number	Location in CTD
Other Toxicity Studies (Impurity)	*S. typhimurium* (TA98, TA100, TA1535, TA1537); *E. coli* (WP2*uvrA*)	In vitro	–	Initial: 9.77-5000 µg/plate Confirmatory: 156-5000 µg/plate	No	[redacted], Japan	4.2.3.7.6-4	4.2.3.7.6
					Test Article:	不純物C* -spiked mirogabalin besylate		
Type of Study	Species and Strain	Method of Admin	Duration of Dosing	Doses	GLP Compliance	Testing Facility	Attachment Number	Location in CTD
Other Toxicity Studies (Impurity)	*S. typhimurium* (TA98, TA100, TA1535, TA1537); *E. coli* (WP2*uvrA*)	In vitro	–	Initial: 9.77-5000 µg/plate Confirmatory: 156-5000 µg/plate	No	[redacted], Japan	4.2.3.7.6-5	4.2.3.7.6
					Test Article:	不純物D* - spiked mirogabalin besylate		
Type of Study	Species and Strain	Method of Admin.	Duration of Dosing	Doses	GLP Compliance	Testing Facility	Attachment Number	Location in CTD
Other Toxicity Studies (Impurity)	*S. typhimurium* (TA98, TA100, TA1535, TA1537); *E. coli* (WP2*uvrA*)	In vitro	–	Initial: 9.77-5000 µg/plate Confirmatory: 156-5000 µg/plate	No	[redacted], Japan	4.2.3.7.6-6	4.2.3.7.6

＊新薬承認情報提供時に置換

1. 毒性試験：一覧表 (7/7)

				Test Article: [redacted] in the manufacturing process (物質A*)				
Type of Study	Species and Strain	Method of Admin	Duration of Dosing	Doses	GLP Compliance	Testing Facility	Attachment Number	Location in CTD
Other Toxicity Studies (Impurity)	*S. typhimurium* (TA98, TA100, TA1535, TA1537); *E. coli* (WP2*uvrA*)	In vitro	–	Initial: 0.305-5000 µg/plate Confirmatory: 313-5000 µg/plate	No	[redacted] Japan	4.2.3.7.6-7	4.2.3.7.6
				Test Article: [redacted] in the manufacturing process (物質B*)				
Type of Study	Species and Strain	Method of Admin	Duration of Dosing	Doses	GLP Compliance	Testing Facility	Attachment Number	Location in CTD
Other Toxicity Studies (Impurity)	*S. typhimurium* (TA98, TA100, TA1535, TA1537); *E. coli* (WP2*uvrA*)	In vitro	–	Initial: 1.22-5000 µg/plate Confirmatory: 4.88-5000 µg/plate	Yes	[redacted] Japan	4.2.3.7.6-8	4.2.3.7.6
				Test Article: [redacted] in the manufacturing process (物質C*)				
Type of Study	Species and Strain	Method of Admin	Duration of Dosing	Doses	GLP Compliance	Testing Facility	Attachment Number	Location in CTD
Other Toxicity Studies (Impurity)	*S. typhimurium* (TA98, TA100, TA1535, TA1537); *E. coli* (WP2*uvrA*)	In vitro	–	Initial: 0.305-5000 µg/plate Confirmatory: 156-5000 µg/plate	No	[redacted] Japan	4.2.3.7.6-9	4.2.3.7.6
				Test Article: [redacted] in the manufacturing process (物質D*)				
Type of Study	Species and Strain	Method of Admin	Duration of Dosing	Doses	GLP Compliance	Testing Facility	Attachment Number	Location in CTD
Other Toxicity Studies (Impurity)	*S. typhimurium* (TA98, TA100, TA1535, TA1537); *E. coli* (WP2*uvrA*)	In vitro	–	Initial: 0.305-5000 µg/plate Confirmatory: 4.88-1250 µg/plate	No	[redacted] Japan	4.2.3.7.6-10	4.2.3.7.6

＊新薬承認情報提供時に置換

2. トキシコキネティクス：トキシコキネティクス試験の一覧表 (1/2)

				Test Article: Mirogabalin besylate		
Type of Study	**Test System**	**Method of Administration**	**Doses (mg/kg/day)**	**GLP Compliance**	**Attachment Number**	**Location in CTD**
Repeat-Dose Toxicity: 2 weeks	Rat	Oral, gavage	100, 300, 2000	No	**4.2.3.2-1, 4.2.3.2-2**	4.2.3.2
Repeat-Dose Toxicity: 4 weeks	Rat	Oral, gavage	10, 30, 100, 1000	Yes	**4.2.3.2-3**	4.2.3.2
Repeat-Dose Toxicity: 13 weeks	Rat	Oral, gavage	10, 100, 300	Yes	**4.2.3.2-4**	4.2.3.2
Repeat-Dose Toxicity: 26 weeks	Rat	Oral, gavage	10, 30, 100	Yes	**4.2.3.2-5**	4.2.3.2
				No	**4.2.3.2-6**	
Repeat-Dose Toxicity: 2 weeks	Cynomolgus Monkey	Oral, gavage	30, 300, 2000	No	**4.2.3.2-7, 4.2.3.2-8**	4.2.3.2
Repeat-Dose Toxicity: 4 weeks	Cynomolgus Monkey	Oral, gavage	30, 100, 1000	Yes	**4.2.3.2-9**	4.2.3.2
Repeat-Dose Toxicity: 13 weeks	Cynomolgus Monkey	Oral, gavage	10, 100, 300	Yes	**4.2.3.2-10**	4.2.3.2
Repeat-Dose Toxicity: 39 weeks	Cynomolgus Monkey	Oral, gavage	10, 30, 100	Yes	**4.2.3.2-11**	4.2.3.2
				No	**4.2.3.2-12**	
Carcinogenicity: 2 weeks	Mouse	Oral, gavage	100, 300, 1500	No	**4.2.3.4.1-1**	4.2.3.4.1
Carcinogenicity: 13 weeks	Mouse	Oral, gavage	100, 300, 1000	Yes	**4.2.3.4.1-2**	4.2.3.4.1
Carcinogenicity: 104 weeks	Mouse	Oral, gavage	10, 30, 100	Yes	**4.2.3.4.1-3**	4.2.3.4.1
Carcinogenicity: 104 weeks	Rat	Oral, gavage	10, 30, 100	Yes	**4.2.3.4.1-4**	4.2.3.4.1
Carcinogenicity: Mechanistic Study	Rat	Oral, gavage	10, 30, 100	No	**4.2.3.4.3-2**	4.2.3.4.3

2. トキシコキネティクス：トキシコキネティクス試験の一覧表 (2/2)

				Test Article: Mirogabalin besylate		
Type of Study	**Test System**	**Method of Administration**	**Doses (mg/kg/day)**	**GLP Compliance**	**Attachment Number**	**Location in CTD**
Fertility and Early Embryonic Development	Rat	Oral, gavage	10, 30, 100	Yes	**4.2.3.5.1-1**	4.2.3.5.1
Embryo-fetal Development	Rat	Oral, gavage	100, 300, 1000	Yes	**4.2.3.5.2-2**	4.2.3.5.2
Embryo-fetal Development	Rat	Oral, gavage	10, 30	Yes	**4.2.3.5.2-3**	4.2.3.5.2
Embryo-fetal Development	Rabbit	Oral, gavage	30, 100, 300, 1000	No	**4.2.3.5.2-4**	4.2.3.5.2
Embryo-fetal Development	Rabbit	Oral, gavage	10, 30, 100	Yes	**4.2.3.5.2-5**	4.2.3.5.2
Pre- and Postnatal Development	Rat	Oral, gavage	10, 30, 100	Yes	**4.2.3.5.3-2**	4.2.3.5.3
Dose-Range Finding for Psychological Dependence	Rhesus monkey	Intravenous	6, 10 mg/kg	No	**4.2.3.7.4-4**	4.2.3.7.4

3. トキシコキネティクス：トキシコキネティクス試験成績の一覧 (1/3)

$AUC_{0\text{-}24h}$ (μg·h/mL) at Steady State							Analyte: Mirogabalin		
Species	**Mouse**		**Rat**		**Pregnant Rat**	**Pregnant Rabbit**	**Monkey**		**Human**
Daily Dose (mg/kg)	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Female**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**
0.5[a]									2.114[p]
10	3.80[b]	3.69[b]	10.2[e]	10.1[e]	15.5[h]	9.25[j]	18.0[l]	18.6[l]	
30	9.95[b]	9.45[b]	29.6[e]	29.0[e]	46.0[h]	21.1[j]	58.1[l]	52.4[l]	
100	28.7[b]	34.4[b]	108[e]	107[e]	171[i]	69.3[j]	195[l]	171[l]	
300	162[c]	136[c]	323[f]	278[f]	429[i]	218[k]	765[m]	487[m]	
1000	552[c]	404[c]	1070[g]	1260[g]	1120[i]	2660[k]	1700[n]	1240[n]	
1500	504[d]	610[d]							
2000							2060[o]	3170[o]	

a: The daily dose was calculated based on the maximum recommended clinical dose of 15 mg bid for 60-kg person.
b: 104-week carcinogenicity study (at week 26) (Section 10.3),
c: 13-week dose range-finding study for carcinogenicity (Section 10.2),
d: 2-week preliminary dose range-finding study for carcinogenicity (Section 10.1),
e: 26-week repeated dose toxicity study (Section 7.3),
f: 13-week repeated dose toxicity study (Section 7.2),
g: 4-week repeated dose toxicity study (Section 7.1),
h: Embryo-fetal development study (additional low-dose study) (at Day 11 [Day 17 of pregnancy]) (Section 13.2),
i: Embryo-fetal development study (at Day 11 [Day 17 of pregnancy]) (Section 13.1),
j: Embryo-fetal development study (at Day 13 [Day 18 of pregnancy]) (Section 13.3),
k: Preliminary embryo-fetal development study (at Day 13 [Day 18 of pregnancy]) (Section 11),
l: 39-week repeated dose toxicity study (Section 7.6),
m: 13-week repeated dose toxicity study (Section 7.5),
n: 4-week repeated dose toxicity study (Section 7.4),
o: 2-week repeated dose toxicity study (Section 6),
p: Study No. DS5565-A-E103

3. トキシコキネティクス：トキシコキネティクス試験成績の一覧 (2/3)

Cmax (μg/mL) at Steady State							Analyte: Mirogabalin		
Species	**Mouse**		**Rat**		**Pregnant Rat**	**Pregnant Rabbit**	**Monkey**		**Human**
Daily Dose (mg/kg)	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Female**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**
0.5[a]									0.381[p]
10	2.16[b]	1.81[b]	3.02[e]	3.19[e]	4.57[h]	3.07[j]	3.72[l]	5.30[l]	
30	5.51[b]	4.98[b]	7.56[e]	7.73[e]	7.88[h]	9.21[j]	13.9[l]	12.2[l]	
100	15.2[b]	18.5[b]	23.3[e]	22.5[e]	21.5[i]	26.4[j]	28.4[l]	32.2[l]	
300	49.3[c]	42.4[c]	27.5[f]	32.4[f]	35.7[i]	65.1[k]	81.0[m]	71.1[m]	
1000	67.9[c]	109[c]	83.3[g]	137[g]	84.3[i]	339[k]	152[n]	124[n]	
1500	82.2[d]	74.8[d]							
2000							255[o]	370[o]	

a: The daily dose was calculated based on the maximum recommended clinical dose of 15 mg bid for 60-kg person.
b: 104-week carcinogenicity study (at week 26) (Section 10.3),
c: 13-week dose range-finding study for carcinogenicity (Section 10.2),
d: 2-week preliminary dose range-finding study for carcinogenicity (Section 10.1),
e: 26-week repeated dose toxicity study (Section 7.3),
f: 13-week repeated dose toxicity study (Section 7.2),
g: 4-week repeated dose toxicity study (Section 7.1),
h: Embryo-fetal development study (additional low-dose study) (at Day 11 [Day 17 of pregnancy]) (Section 13.2),
i: Embryo-fetal development study (at Day 11 [Day 17 of pregnancy]) (Section 13.1),
j: Embryo-fetal development study (at Day 13 [Day 18 of pregnancy]) (Section 13.3),
k: Preliminary embryo-fetal development study (at Day 13 [Day 18 of pregnancy]) (Section 11),
l: 39-week repeated dose toxicity study (Section 7.6),
m: 13-week repeated dose toxicity study (Section 7.5),
n: 4-week repeated dose toxicity study (Section 7.4),
o: 2-week repeated dose toxicity study (Section 6),
p: Study No. DS5565-A-E103

3. トキシコキネティクス：トキシコキネティクス試験成績の一覧 (3/3)

	Analyte: A204-4455									
	$AUC_{0\text{-}24h}$ (μg·h/mL) at Steady State					Cmax (μg/mL) at Steady State				
Species	**Rat**		**Monkey**		**Human**	**Rat**		**Monkey**		**Human**
Daily Dose (mg/kg)	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**
0.5[a]					0.2788[f]					0.0179[f]
10	0.392[b]	0.607[b]	0.282[d]	0.280[d]		0.0767[b]	0.153[b]	0.0508[d]	0.0591[d]	
30	1.043[b]	1.513[b]	0.796[d]	0.586[d]		0.184[b]	0.348[b]	0.136[d]	0.116[d]	
100	3.753[b]	4.752[b]	2.321[d]	1.529[d]		0.542[b]	0.725[b]	0.275[d]	0.227[d]	
300	5.02[c]	8.43[c]	3.80[e]	2.76[e]		0.438[c]	0.762[c]	0.630[e]	0.363[e]	
1000										
2000			11.6[e]	20.0[e]				1.28[e]	2.00[e]	

a: The daily dose was calculated based on the maximum recommended clinical dose of 15 mg bid for 60-kg person.
b: 26-week repeated dose toxicity study (Section 7.3),
c: 2-week repeated dose toxicity study (Section 6),
d: 39-week repeated dose toxicity study (Section 7.6),
e: 2-week repeated dose toxicity study (Section 6),
f: Study No. DS5565-A-U104

4. 毒性試験：被験物質（バッチ毎）一覧 (1/4)

						Test Article: Mirogabalin besylate
Batch No.	**Purity (%)[a]**	**Specified Impurities (%) [b]**			**Attachment Number**	**Type of Study**
		不純物E*	不純物F* + 不純物G*	不純物H*		
PROPOSED SPECIFICATION (Drug Substance):	—	[redacted]	[redacted]	[redacted]		
A205-1770-05	NA	NA	NA	NA	**4.2.3.2-1**	2-Week Repeated Dose Toxicity in Rats
					4.2.3.2-7	2-Week Repeated Dose Toxicity in Monkeys
YK101	99.0	0.62	0.23	1.57	**4.2.3.2-3**	4-Week Repeated Dose Toxicity in Rats
					4.2.3.2-9	4-Week Repeated Dose Toxicity in Monkeys
					4.2.3.3.1-1	Bacterial Reverse Mutation
					4.2.3.3.1-2	Chromosome Aberration
					4.2.3.3.2-1	Bone Marrow Micronucleus in Rats
					4.2.3.4.1-1	2-Week Dose Range-Finding for Carcinogenicity Study in Mice
					4.2.3.5.2-1	Preliminary Embryo-fetal Development in Rats
					4.2.3.5.2-2	Embryo-fetal Development in Rats
					4.2.3.5.2-4	Preliminary Embryo-fetal Development in Rabbits
					4.2.3.5.2-5	Embryo-fetal Development in Rabbits

—: Not applicable, NA: Not available
a: Analyzed by GLP-compliant method
b: The values refer to batch analyses in Table 2.3.S.4.4-1 which were analyzed using GMP-compliant method.
c: the enantiomer of mirogabalin

＊新薬承認情報提供時に置換

4. 毒性試験：被験物質（バッチ毎）一覧 (2/4)

						Test Article: Mirogabalin besylate
Batch No.	**Purity (%)[a]**	**Specified Impurities (%) [b]**			**Attachment Number**	**Type of Study**
		不純物E*	不純物F* + 不純物G*	不純物H*		
PROPOSED SPECIFICATION (Drug Substance):	—	[redacted]	[redacted]	[redacted]		
YK101 (continued)	99.0	0.62	0.23	1.57	**4.2.3.7.4-4**	Dose-Range Finding Study for Psychological Dependence in Rhesus Monkeys
					4.2.3.7.4-5	Psychological Dependence in Rhesus Monkeys
					4.2.3.7.6-1	2-Week Repeated Dose Toxicity in Rats with 不純物A* -Spiked Sample
					4.2.3.7.6-4	Bacterial Reverse Mutation with 不純物B* -Spiked Sample
					4.2.3.7.6-5	Bacterial Reverse Mutation with 不純物C* -Spiked Sample
					4.2.3.7.6-6	Bacterial Reverse Mutation with 不純物D* -Spiked Sample
YK102	99.7	0.29	0.20	0.92	**4.2.3.2-4**	13-Week Repeated Dose Toxicity in Rats
					4.2.3.2-10	13-Week Repeated Dose Toxicity in Monkeys
					4.2.3.4.1-2	13-Week Dose Range-Finding Study for Carcinogenicity in Mice
					4.2.3.4.3-1	Mechanistic Study for Urinary Bladder Tumor in Rats (1)
					4.2.3.5.1-1	Fertility and Early Embryonic Development in Rats

—: Not applicable, NA: Not available
a: Analyzed by GLP-compliant method
b: The values refer to batch analyses in Table 2.3.S.4.4-1 which were analyzed using GMP-compliant method.
c: the enantiomer of mirogabalin

＊新薬承認情報提供時に置換

4. 毒性試験：被験物質（バッチ毎）一覧 (3/4)

						Test Article: Mirogabalin besylate
Batch No.	**Purity (%)[a]**	**Specified Impurities (%) [b]**			**Attachment Number**	**Type of Study**
		不純物E*	不純物F* + 不純物G*	不純物H*		
PROPOSED SPECIFICATION (Drug Substance):	—	[redacted]	[redacted]	[redacted]		
YK102 (continued)	99.7	0.29	0.20	0.92	**4.2.3.5.2-3**	Embryo-fetal Development in Rats (Additional Low Dose Study)
					4.2.3.7.4-1	Preliminary Drug Discrimination in Rats
					4.2.3.7.4-2	Drug Discrimination in Rats
					4.2.3.7.4-3	Physical Dependence in Rats
YK103-U	99.5	0.29	0.22	0.86	**4.2.3.2-5**	26-Week Repeated Dose Toxicity in Rats
					4.2.3.2-11	39-Week Repeated Dose Toxicity in Monkeys
					4.2.3.4.3-1	Mechanistic Study for Urinary Bladder Tumor in Rats (1)
YK202	99.2	<0.03	0.04	0.46	**4.2.3.4.1-3**	104-Week Carcinogenicity in Mice
					4.2.3.4.1-4	104-Week Carcinogenicity in Rats
					4.2.3.4.3-2	Mechanistic Study for Urinary Bladder Tumor in Rats (2)
					4.2.3.4.3-3	Mechanistic Study for Urinary Bladder Tumor in Rats (3)
					4.2.3.5.3-1	Preliminary Pre- and Postnatal Development in Rats
					4.2.3.5.3-2	Pre- and Postnatal Development in Rats

—: Not applicable
a: Analyzed by GLP-compliant method
b: The values refer to batch analyses in Table 2.3.S.4.4-1 which were analyzed using GMP-compliant method.
c: the enantiomer of mirogabalin

＊新薬承認情報提供時に置換

4. 毒性試験：被験物質（バッチ毎）一覧 (4/4)

				Test Article: 不純物A* -spiked mirogabalin besylate
Batch No.	Purity (%)	Specified Impurities (%)	Attachment Number	Type of Study
		不純物A*		
PROPOSED SPECIFICATION (Drug Product):	—	[redacted]		
YK101D1	96.7	2.335	4.2.3.7.6-1	2-Week Repeated Dose Toxicity in Rats with 不純物A* -Spiked Sample
			4.2.3.7.6-2	Bacterial Reverse Mutation with 不純物A* - Spiked Sample
			4.2.3.7.6-3	Chromosome Aberration with 不純物A* -Spiked Sample

Purity and impurity were analyzed by GLP-compliant method.
不純物A* is referred to as [redacted] in the study Attachments.
—: Not applicable

			Test Article: Mirogabalin related compounds
Batch No.	Purity (%) [a]	Attachment Number	Type of Study
HPO1-1101 (Lot of 不純物B*)	99.2	4.2.3.7.6-4	Bacterial Reverse Mutation with 不純物B* -Spiked Sample
HPO2-1101 (Lot of 不純物C*)	95.5	4.2.3.7.6-5	Bacterial Reverse Mutation with 不純物C* -Spiked Sample
HPO3-1101 (Lot of 不純物D*)	96.0	4.2.3.7.6-6	Bacterial Reverse Mutation with 不純物D* -Spiked Sample
B01320 (Lot of 物質A*)	99.5	4.2.3.7.6-7	Bacterial Reverse Mutation with 物質A*
0332-15 (Lot of 物質C*)	97.5	4.2.3.7.6-9	Bacterial Reverse Mutation with 物質C*
TN1-35-127-7 (Lot of 物質D*)	99.5	4.2.3.7.6-10	Bacterial Reverse Mutation with 物質D*
0332-11 (Lot of 物質B*)	99.9	4.2.3.7.6-8	Bacterial Reverse Mutation with 物質B*

a: Analyzed by GLP-compliant method.

＊新薬承認情報提供時に置換

5. 単回投与毒性試験

本申請で該当する試験は実施していない。

6. 反復投与毒性試験：重要な試験以外の試験

					Test Article: Mirogabalin besylate		
Species/Strain	**Method of Administration (Vehicle/ Formulation)**	**Duration of Dosing**	**Doses (mg/kg/day)**	**Gender and No. Per Group**	**NOAEL (mg/kg/day)**	**Noteworthy Findings**	**Attachment Number**
Rat/F344/ DuCrlCrlj	Oral, gavage (0.5% methylcellulose solution/Suspension)	2 weeks	0, 100, 300, 2000	M:5, F:5	Less than 100	≥100: Prone position, hypoactivity, gait disturbance, staggering gait, soiled fur, decreased fecal volume ≥300: Erosion in the glandular stomach 2000: Death, hypotonia, irregular respiration, hypothermia, food consumption ↓, body weight (male)↓, erosion and thickening of mucosa in the forestomach, focal hemorrhage and myocardial necrosis in the heart	**4.2.3.2-1, 4.2.3.2-2**
Cynomolgus monkey	Oral, gavage (0.5% methylcellulose solution/Suspension)	2 weeks	0, 30, 300, 2000	M:2, F:2	30	≥300: Decrease in activity, ataxia, vomitus 2000: Death, clonic convulsion, loose stool, food consumption↓, body weight↓, fibrinogen↑, C-reactive protein↑, electrolytes↓, total protein↓, albumin↓, albumin/globulin ratio↓, myocardial degeneration, hydropic degeneration of squamous epithelium in cardiac region, atrophy of mucosa and submucosal hemorrhage in the stomach	**4.2.3.2-7, 4.2.3.2-8**

7. 反復投与毒性試験：重要な試験

7.1 ラット 4 週間反復投与毒性試験及び 8 週間回復性試験 (1/7)

Report Title: Repeated Dose Toxicity Study in Rats Treated Orally with DS-5565 for 28 Days Followed by a 56-Day Recovery Period			Test Article: Mirogabalin besylate							
Species/Strain: Rat/F344/DuCrlCrlj			Duration of Dosing: 4 weeks			Attachment No.: 4.2.3.2-3				
Initial Age: 9 weeks			Duration of Postdose: 8 weeks			Location in CTD: 4.2.3.2				
Date of First Dose: [redacted]			Method of Administration: Oral, gavage							
			Vehicle/Formulation: 0.5% methylcellulose solution/Suspension			GLP Compliance: Yes				
Special Features: Post dose recovery period (56 days) was set for the control, 100 and 1000 mg/kg/day groups (five animals for each group of each sex). The dose levels are expressed as mirogabalin, a free form of mirogabalin besylate. Toxicokinetics study was done on Day 1 and Day 28. Blood collection was done at 1, 3, 6, and 24 hours after treatment on Day 1, and prior to dosing and at 1, 3, 6, and 24 hours after treatment on Day 28										
No Observed Adverse Effect Level: 10 mg/kg/day for males and females										
Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**		**10**		**30**		**100**		**1000**	
Number of Animals	M:4	F:4	M:4	F:4	M:4	F:4	M:4	F:4	M:4	F:4
Toxicokinetics (Mirogabalin)										
Cmax (μg/mL)										
Day 1	NE	NE	2.76	2.85	8.94	8.48	19.1	17.4	34.9	34.7
Day 28	NE	NE	2.79	2.88	7.63	7.98	21.0	20.0	83.3	137[a]
Tmax (h)										
Day 1	NE	NE	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	4.0	3.5
Day 28	NE	NE	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	2.5	3.0[a]
$AUC_{0\text{-}24h}$ (μg·h/mL)										
Day 1	NE	NE	7.83	6.63	25.3	21.0	98.4	79.7	546	456
Day 28	NE	NE	8.13	6.55	25.4	21.6	108	77.0	1070	1260[a]

NE: Not examined
a: N=3 (One female in the 1000 mg/kg/day group was found dead on Day 27.)

7.1　ラット 4 週間反復投与毒性試験及び 8 週間回復性試験 (2/7)－毒性観察群

					Attachment No.: 4.2.3.2-3 (Continued)					
Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**		**10**		**30**		**100**		**1000**	
Number of Animals	M:15	F:15	M:10	F:10	M:10	F:10	M:15	F:15	M:15	F:15
Noteworthy Findings:										
Dead or Sacrificed Moribund	0	0	0	0	0	0	0	0	1[a]	1[b]
Body Weight (%)[c]	264.9 g	158.4 g	+3	+2	+5	+2	+7**	+4*	0[d]	+11**[d]
Food Consumption (%)[c]	14.1 g	9.4 g	+6	+1	+12#	+6	+18##	+10*	+9#[d]	+34**[d]
Clinical Observations										
Staggering gait	0	0	9[e]	2[b]	10	10	15	15	14[d]	14[d]
Prone position	0	0	5[e]	0	10	2	15	15	14[d]	14[d]
Hypoactivity	0	0	2[e]	0	10	9	15	15	14[d]	14[d]
Soiled perineal region	0	0	0	0	0	0	0	0	9[d]	9[d]
Decreased fecal volume	0	0	0	0	0	0	1	0	14[d]	14[d]
Irregular respiration	0	0	0	0	0	0	0	0	2[d]	1[d]
Ophthalmoscopy	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

NE: Not examined
Statistics (vs. Control): #$P < 0.05$, ##$P < 0.01$ (Nonparametric Dunnett test/Joint ranking method), *$P < 0.05$, **$P < 0.01$ (Dunnett test)
a: One male died on Day 3 during the dosing period.
b: One female died on Day 2 during the dosing period.
c: Values at the end of dosing period. For the control group, group means are shown. For the treated groups, percent differences from the controls are shown. Statistical significance is based on actual data (not on the percent differences).
d: N=14
e: The abnormal clinical signs observed in males and females of the 10 mg/kg/day group disappeared after Day 11 and 7, respectively.

7.1　ラット 4 週間反復投与毒性試験及び 8 週間回復性試験 (3/7)－毒性観察群

Attachment No. 4.2.3.2-3 (Continued)

Daily Dose (mg/kg)	0 (Control)		10		30		100		1000	
Number of Animals	M:10	F:10	M:10	F:10	M:10	F:10	M:10	F:10	M:9[a]	F:9[b]
Hematology										
RBC (M/μL)	8.698	8.092	8.737	8.239	8.643	8.351*	8.713	8.366**	8.723	8.343*
HB (g/dL)	14.55	14.18	14.69	14.41	14.68	14.68**	14.81	14.78**	14.93	14.83**
HT (%)	42.01	40.64	42.43	41.14	42.36	42.10**	42.90	42.37**	43.58**	43.29**
MCH (pg)	16.73	17.52	16.80	17.49	16.98#	17.60	16.98#	17.66	17.11##	17.78**
MCV (fL)	48.31	50.23	48.57	49.94	49.02**	50.42	49.23**	50.63	49.97**	51.89**
MCHC (%)	34.61	34.87	34.64	35.04	34.63	34.90	34.50	34.87	34.26	34.27**
RET (%)	1.39	2.06	1.50	2.11	1.46	1.90	1.56	1.88	1.83**	2.44
WBC (K/μL)	5.994	4.394	6.039	5.096	5.530	4.820	6.558	5.566##	7.730**	5.611#
AEO (K/μL)	0.052	0.055	0.060	0.066	0.052	0.057	0.067	0.078*	0.073**	0.073
ANE (K/μL)	1.097	0.671	1.356	0.904	1.246	1.052#	1.603**	1.403##	2.271**	1.443##
AMO (K/μL)	0.120	0.074	0.141	0.092	0.113	0.079	0.156	0.122#	0.204**	0.168##
FIB (mg/dL)	303.74	230.23	299.79	243.82#	300.17	242.63	293.61	247.21#	364.99#	256.53##
Blood Chemistry										
T.CHO (mg/dL)	60.6	68.5	63.0	69.2	62.9	67.7	66.2*	66.5	72.8**	79.6**
PL (mg/dL)	138.0	130.9	135.2	130.3	130.0	129.2	140.3	124.8	146.1	165.0**
UN (mg/dL)	20.79	20.86	21.20	19.33	21.11	19.67	21.29	19.97	24.47##	21.50
IP (mg/dL)	4.691	3.466	4.954	3.872	5.241	4.127**	5.290	4.202**	5.607**	4.732**
Cl (mEq/L)	102.9	104.4	102.2	105.1	101.8	104.3	101.2*	103.8	98.6**	101.4**
Urinalysis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

-: No noteworthy findings
Statistics (vs. Control): #$P < 0.05$, ##$P < 0.01$ (Nonparametric Dunnett test/Joint ranking method), *$P < 0.05$, **$P < 0.01$ (Dunnett test)
a: One male died on Day 3 during the dosing period.
b: One female died on Day 2 during the dosing period.

7.1　ラット 4 週間反復投与毒性試験及び 8 週間回復性試験 (4/7)－毒性観察群

					Attachment No.: 4.2.3.2-3 (Continued)					
Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**		**10**		**30**		**100**		**1000**	
Number of Animals	M:10	F:10	M:10	F:10	M:10	F:10	M:10	F:10	M:9[a]	F:9[b]
Organ Weight (%)[c]										
Brain										
Absolute Weight	1.971 g	1.843 g	0	-2	+1	-1	-1	-1	-5**	-5**
Relative Weight	0.749 g%	1.162 g%	-3	-3	-4	-3	-8**	-6*	-5	-14**
Thymus										
Absolute Weight	0.214 g	0.196 g	+7	+1	+10	-4	+16*	+1	-12	-12
Relative Weight	0.081 g%	0.123 g%	+1	-1	+5	-6	+10	-3	-14	-21**
Liver										
Absolute Weight	8.835 g	4.958 g	+1	-3	0	-5	+7	0	+12**	+25**
Relative Weight	3.350 g%	3.121 g%	-3	-4*	-5*	-6**	-1	-5*	+12**	+13**
Adrenals										
Absolute Weight	38.37 mg	47.01 mg	+6	+4	+11	+8	+24**	+13**	+45**	+23**
Relative Weight	14.60 mg%	29.60 mg%	+2	+3	+5	+6	+15	+8	+45**	+11**
Kidneys										
Absolute Weight	1.746 g	1.162 g	+2	0	+6*	+2	+7*	+4	+7*[d]	+9**
Relative Weight	0.662 g%	0.732 g%	-2	-1	+1	0	-1	-1	+6**[d]	-1
Uterus										
Absolute Weight		0.428 g		-5		-1		-8		-21
Relative Weight		0.269 g%		-7		-2		-12		-29**
Testes										
Absolute Weight	2.879 g		+2		+1		+2		-1	
Relative Weight	1.096 g%		-2		-4		-6*		-1	

-: No noteworthy findings
Statistics (vs. Control): $*P < 0.05$, $**P < 0.01$ (Dunnett test)
a: One male died on Day 3 during the dosing period.
b: One female died on Day 2 during the dosing period.
c: Values at the end of dosing period. For the control group, group means are shown. For the treated groups, percent differences from the controls are shown. Statistical significance is based on actual data (not on the percent differences).
d: N=8 (A measurement of the kidney weight in 1 male of the 1000 mg/kg/day group was not conducted because urine accumulated in the left kidney with hydronephrosis was flowed out during the necropsy.)

7.1　ラット 4 週間反復投与毒性試験及び 8 週間回復性試験 (5/7)－毒性観察群

							Attachment No.: 4.2.3.2-3 (Continued)			
Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**		**10**		**30**		**100**		**1000**	
Number of Animals	M:10	F:10	M:10	F:10	M:10	F:10	M:10	F:10	M:9	F:9
Gross Pathology										
Forestomach: Colored focus	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Forestomach: Thickening	0	0	0	0	0	0	0	0	3	3
Glandular stomach: Colored focus	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0
Cecum: Distention	0	0	0	0	0	0	0	0	4	3
Histopathology										
Lung: Foreign body granuloma	0	0	0	0	0	0	0	0	3	2
Lung: Inflammation, focal	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
Kidney: Increased hyaline droplet in tubular epithelium	0	0	0	0	0	0	0	0	6	0
Kidney: Necrosis of tubular epithelium, focal	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Adrenal: Hypertrophy of zona fasciculata cell	0	0	0	0	0	0	0	0	6	1
Spleen: Increased extramedullary hematopoiesis	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
Thymus: Atrophy of cortex	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0
Forestomach: Thickening of mucosal epithelium	0	0	0	0	0	0	0	0	4	7
Forestomach: Erosion	0	0	0	0	0	0	0	0	4	2
Glandular stomach: Erosion	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Glandular stomach: Ulcer	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0

Statistics (vs. Control): *P < 0.05, **P < 0.01 (Dunnett test)
a: Values at the end of dosing period. For the control group, group means are shown. For the treated groups, percent differences from the controls are shown. Statistical significance is based on actual data (not on the percent differences).
b: N=8 (A measurement of the kidney weight in 1 male of the 1000 mg/kg group was not conducted because urine accumulated in the left kidney with hydronephrosis was flowed out during the necropsy.)

7.1　ラット 4 週間反復投与毒性試験及び 8 週間回復性試験 (6/7)－死亡又は瀕死期屠殺例

Dead or Sacrificed Moribund Animals					Attachment No.: 4.2.3.2-3 (Continued)					
Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**		**10**		**30**		**100**		**1000**	
Number of Animals	M:0	F:0	M:0	F:0	M:0	F:0	M:0	F:0	M:1[a]	F:1[b]
Clinical observations										
Prone position									1	1
Hypoactivity									1	1
Staggering gait									1	1
Irregular respiration									1	0
Decreased fecal volume									1	0
Gross Pathology									1	0
Glandular stomach: Colored focus									1	0
Ileum: Retention of gas									1	0
Cecum: Retention of gas									1	0
Colon: Retention of gas									1	0
Urinary bladder: Retention of urine									0	1
Histopathology										
Heart: Mineralization at subendocardium, focal									0	1
Lung: Alveolar edema									0	1
Liver: Atrophy of hepatocyte									1	0
Adrenal:Hypertrophy of zona fasciculata cell									1	1
Spleen: Atrophy of white pulp									1	0
Thymus: Atrophy of cortex									1	0
Submandibular lymph node: Atrophy of cortex									1	0
Salivary gland: Hypertrophy of acinar cell									1	0
Glandular stomach: Erosion									1	0
Duodenum: Erosion									1	0
Harderian gland: Increased secretory product									1	0
Uterus: Atrophy of uterus										1

a: One male died on Day 3 during the dosing period.
b: One female died on Day 2 during the dosing period.

7.1　ラット 4 週間反復投与毒性試験及び 8 週間回復性試験 (7/7)－回復群

Recovery Group					Attachment No.: 4.2.3.2-3 (Continued)					
Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**		**10**		**30**		**100**		**1000**	
Number of Animals	M:5	F:5	M:0	F:0	M:0	F:0	M:5	F:5	M:5	F:5
Body Weight (%)[a]	333.2 g	180.8 g					0	-3	-3	-6
Food Consumption (%)[a]	14.2 g	10.4 g					+4	-4	+3	-6
Clinical Observations[b]										
Staggering gait	0	0					0	0	5	5
Hypoactivity	0	0					0	0	1	0
Hematology										
RET (%)	1.78	1.62					1.88	1.72	1.66	2.24**
Blood Chemistry	-	-					-	-	-	-
Organ Weight	-	-					-	-	-	-
Gross Pathology	-	-					-	-	-	-
Histopathology										
Lung: Foreign body granuloma	0	0					0	0	1	0

-: No noteworthy findings
Statistics (vs. Control): **P < 0.01 (Dunnett test)
a: Values at the end of recovery period. For the control group, group means are shown. For the treated groups, percent differences from the controls are shown.
b: The clinical signs were seen on Day 1 of recovery.

7.2　ラット 13 週間反復投与毒性試験 (1/3)

Report Title: Repeated Dose Toxicity Study in Rats Treated Orally with DS-5565 for 3 Months				**Test Article: Mirogabalin besylate**			
Species/Strain: Rat/F344/DuCrlCrlj		**Duration of Dosing: 13 weeks**		**Attachment No.: 4.2.3.2-4**			
Initial Age: 9 weeks		**Duration of Postdose: None**		**Location in CTD: 4.2.3.2**			
Date of First Dose: [redacted]		**Method of Administration: Oral, gavage**					
		Vehicle/Formulation: 0.5% methylcellulose solution/Suspension		**GLP Compliance: Yes**			
Special Features: Dose levels are described as mirogabalin, the free form of mirogabalin besylate. Toxicokinetics study was done on Day 1, Day 28, and Day 91. Blood collection was done before dosing (except for Day 1), at 1, 3, 6, and 24 hours after dosing.							
No Observed Adverse Effect Level: 10 mg/kg/day for males and females							
Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**		**10**		**100**		**300**	
Number of Animals	M:4	F:4	M:4	F:4	M:4	F:4	M:4	F:4
Toxicokinetics (Mirogabalin)[a]								
Cmax (μg/mL)								
Day 1	NE	NE	2.60	2.45	17.5	16.7	21.0	22.2
Day 28	NE	NE	3.02	2.95	18.0	17.8	27.3	34.5
Day 91	NE	NE	2.79	3.07	19.1	19.5	27.5	32.4
Tmax (h)								
Day 1	NE	NE	1.0	1.0	1.0	1.0	2.7	1.7
Day 28	NE	NE	1.0	1.0	1.0	1.0	1.7	1.0
Day 91	NE	NE	1.0	1.0	1.0	1.0	2.7	1.0
$AUC_{0\text{-}24h}$ (μg·h/mL)								
Day 1	NE	NE	7.46	6.69	88.0	81.8	289	265
Day 28	NE	NE	7.90	7.44	89.5	75.4	286	226
Day 91	NE	NE	7.66	8.74	114	89.4	323	278

NE: Not examined
a: Mean values of 3 animals/sex/group/examined date

7.2 ラット 13 週間反復投与毒性試験 (2/3)

					Attachment No.: 4.2.3.2-4 (Continued)			
Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**		**10**		**100**		**300**	
Number of Animals	M:10	F:10	M:10	F:10	M:10	F:10	M:10	F:10
Noteworthy Findings:								
Dead or Sacrificed Moribund	0	0	0	0	0	0	0	0
Body Weight (%)[a]	352.4 g	176.0 g	0	+3	-1	+9 **	+2	+16 **
Food Consumption (%)[a]	16.99 g	10.05 g	+4	+1	+15 **	+20 **	+17 **	+36 **
Clinical Observations								
Decrease in locomotor activity	0	0	0	0	10	10	10	10
Staggering gait	0	0	0	0	10	10	10	10
Lacrimation	0	0	0	0	0	5	0	5
Reddish tear	0	0	0	0	0	0	3	2
Soiled perineal region	0	0	0	0	0	0	1	2
Ophthalmology	-	-	-	-	-	-	-	-
Hematology	-	-	-	-	-	-	-	-
Blood Chemistry								
T-Chol (mg/dL)	65.4	61.7	69.5	63.0	75.5 **	59.0	78.5 **	71.7 *
TG (mg/dL)	73.2	8.4	41.6 #	8.6	22.3 ##	7.8	22.7 ##	12.5 **
FFA (mmol/L)	0.4710	0.4413	0.5973 **	0.5245	0.6506 **	0.5830	0.6912 **	0.6785 **
Urinalysis								
Urine specific gravity	1.0703	1.0706	1.0662	1.0613	1.0592 **	1.0537 **	1.0530 **	1.0556 *
Urine volume (mL/20h)	6.68	4.60	7.36	6.12	9.26 **	7.70 ##	10.68 **	7.82 ##
Organ Weight (%) [a]								
Liver								
Absolute Weight	8.224 g	3.815 g	-5	3	-8 #	13 **	0	+27 **
Relative Weight	2.481 g%	2.336 g%	-7 **	-4	-9 **	1	-4	+7 **
Gross Pathology	-	-	-	-	-	-	-	-

-: No noteworthy findings
Statistics (vs. Control): *P < 0.05, **P < 0.01 (Dunnett test), #P < 0.05, ##P < 0.01 (Steel test)
a: Values at the end of dosing period. For the control group, group means are shown. For the treated groups, percent differences from the controls are shown. Statistical significance is based on actual data (not on the percent differences)

7.2　ラット 13 週間反復投与毒性試験 (3/3)

			Attachment No.: 4.2.3.2-4 (Continued)					
Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**		**10**		**100**		**300**	
Number of Animals	M:10	F:10	M:10	F:10	M:10	F:10	M:10	F:10
Histopathology								
Stomach: Thickening, limiting ridge	0	0	0	0	0	0	6	5
Salivary gland, submandibular: Atrophy, acinus	0	0	0	0	7	7	4	5
Salivary gland, sublingual: Atrophy, acinus	0	0	0	0	0	6	0	5
Liver: Hypertrophy, hepatocyte	0	0	0	0	0	0	6	6
Kidney: Hyaline droplet, proximal tubular epithelium	3	0	2	NE	4	NE	10	0
Urinary bladder: Hypertrophy, detrusor muscle/ transitional epithelium	0	0	0	0	8	10	10	9
Adrenal: Increase, lipid droplet, cortical cell, fascicular zone	0	0	0	0	0	0	2	7

NE: Not examined

7.3　ラット 26 週間反復投与毒性試験 (1/2)

Report Title: Repeated Dose Toxicity Study in Rats Treated Orally with DS-5565 for 6 Months					Test Article: Mirogabalin besylate			
Species/Strain: Rat/F344/DuCrlCrlj	Duration of Dosing: 26 weeks				Attachment No.: 4.2.3.2-5, 4.2.3.2-6			
Initial Age: 9 weeks	Duration of Postdose: None				Location in CTD: 4.2.3.2			
Date of First Dose: [redacted]	Method of Administration: Oral, gavage							
	Vehicle/Formulation: 0.5% methylcellulose solution/Suspension				GLP Compliance: Yes			
Special Features: Dose levels are described as mirogabalin, the free form of mirogabalin besylate. Toxicokinetics study was done on Day 1, Day 91, and Day 180. Blood collection was done before dosing (except for Day 1), at 1, 3, 6, and 24 hours after dosing on Days 1 and 180 and 1 and 24 hours after dosing on Day 91. A204-4455 was analyzed as non-GLP study.								
No Observed Adverse Effect Level: 10 mg/kg/day for males and females								
Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**		**10**		**30**		**100**	
Number of Animals	M:4	F:4	M:4	F:4	M:4	F:4	M:4	F:4
Toxicokinetics (Mirogabalin)[a]								
Cmax (μg/mL)								
Day 1	NE	NE	3.01	2.90	8.20	8.26	14.3	17.9
Day 180	NE	NE	3.02	3.19	7.56	7.73	23.3	22.5
Tmax (h)								
Day 1	NE	NE	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Day 180	NE	NE	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
$AUC_{0\text{-}24h}$ (μg·h/mL)								
Day 1	NE	NE	9.84	9.19	25.3	24.3	96.1	109
Day 180	NE	NE	10.2	10.1	29.6	29.0	108	107
Toxicokinetics (A204-4455)[a]								
Cmax (μg/mL)								
Day 1	NE	NE	0.0490	0.0861	0.118	0.244	0.228	0.500
Day 180	NE	NE	0.0767	0.153	0.184	0.348	0.542	0.725
Tmax (h)								
Day 1	NE	NE	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Day 180	NE	NE	1.7	1.0	1.7	1.0	1.7	1.0
$AUC_{0\text{-}24h}$ (μg·h/mL)								
Day 1	NE	NE	0.195	0.314	0.488	0.848	1.765	3.821
Day 180	NE	NE	0.392	0.607	1.043	1.513	3.753	4.752

NE: Not examined　　a: Mean values of 3 animals/sex/group/examined date

7.3 ラット 26 週間反復投与毒性試験 (2/2)

					Attachment No.: 4.2.3.2-5, 4.2.3.2-6 (Continued)			
Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**		**10**		**30**		**100**	
Number of Animals	M:10	F:10	M:10	F:10	M:10	F:10	M:10	F:10
Noteworthy Findings:								
Dead or Sacrificed Moribund	0	0	0	0	0	0	0	0
Body Weight (%)[a]	389.8 g	191.1 g	-1	1	1	0	-1	7
Food Consumption (%)[a]	16.58 g	10.09 g	-3	0	-1	+3	+1	+11**
Water Consumption (%)[a]	12.50 g	15.10 g	+4	+3	+30#	+7	+40##	+13
Clinical Observations								
Decrease in locomotor activity	0	0	0	0	0	0	10	10
Staggering gait	0	0	0	0	10	10	10	10
Ophthalmology	-	-	-	-	-	-	-	-
Hematology	-	-	-	-	-	-	-	-
Blood Chemistry								
ALP (U/L)	311.6	177.4	322.9	225.6**	325.8	259.3**	301.5	250.6**
Urinalysis								
Urine volume (mL/20h)	6.62	6.78	8.00*	5.92	8.96*	6.62	9.58**	6.26
Organ Weight[a]								
Thyroid								
Absolute Weight	0.02033 g	0.01419 g	+3	-11	+33**	+8	+28**	+13
Relative Weight	5.55 mg%	7.94 mg%	+3	-13*	+29**	+6	+27**	+4
Gross Pathology	-	-	-	-	-	-	-	-
Histopathology								
Salivary gland, submandibular: Atrophy, acinus	0	0	0	0	0	0	8	6
Salivary gland, sublingual: Atrophy, acinus	0	0	0	0	0	0	4	7
Urinary bladder: Hypertrophy, detrusor muscle/ transitional epithelium	0	0	4	1	9	7	9	8

-: No noteworthy findings
Statistics (vs. Control): #$P < 0.05$, ##$P < 0.01$ (Steel test), *$P < 0.05$, **$P < 0.01$ (Dunnett test)
a: Values at the end of dosing period. For the control group, group means are shown. For the treated groups, percent differences from the controls are shown. Statistical significance is based on actual data (not on the percent differences).

7.4　サル 4 週間反復投与毒性試験及び 8 週間回復性試験 (1/7)

Report Title: Repeated Dose Toxicity Study in Monkeys Treated Orally with DS-5565 for 28 Days followed by a 56-Day Recovery Period		**Test Article: Mirogabalin besylate**
Species/Strain: Cynomolgus monkey	**Duration of Dosing: 4 weeks**	**Attachment No.: 4.2.3.2-9**
Initial Age: 5 to 7 years	**Duration of Postdose: 8 weeks**	**Location in CTD: 4.2.3.2**
Date of First Dose: [redacted]	**Method of Administration: Oral, gavage**	
	Vehicle/Formulation: 0.5% methylcellulose solution/Suspension	**GLP Compliance: Yes**

Special Features:
Post dose recovery period (56 days) was set for 1000 mg/kg/day group (two animals for each sex).
The dose levels are expressed as mirogabalin, a free form of mirogabalin besylate. Toxicokinetics study was done on Days 1 and 28.
Blood collection was done at 1, 2, 4, 7, and 24 hours after treatment on Day 1, and prior to dosing, at 1, 2, 4, 7, and 24 hours after treatment on Day 28.

No Observed Adverse Effect Level: 30 mg/kg/day for males and females

Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**		**30**		**100**		**1000**	
Number of Animals	M:3	F:3	M:3	F:3	M:3	F:3	M:5	F:5
Toxicokinetics (Mirogabalin)								
Cmax (μg/mL)								
Day 1	NE	NE	9.02	8.44	19.0	17.2	120	42.4
Day 28	NE	NE	9.37	14.8	32.5	22.8	152	124
Tmax (h)								
Day 1	NE	NE	2.0	1.0	1.0	3.0	3.4	1.2
Day 28	NE	NE	1.0	1.0	1.3	2.0	4.0	2.2
$AUC_{0\text{-}24h}$ (μg·h/mL)								
Day 1	NE	NE	53.5	41.0	195	137	1330	357
Day 28	NE	NE	50.1	40.6	167	135	1700	1240

NE: Not examined

7.4　サル 4 週間反復投与毒性試験及び 8 週間回復性試験 (2/7)－毒性観察群

					Attachment No.: 4.2.3.2-9 (Continued)			
Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**		**30**		**100**		**1000**	
Number of Animals	M:3	F:3	M:3	F:3	M:3	F:3	M:5	F:5
Noteworthy Findings:								
Dead or Sacrificed Moribund	0	0	0	0	0	0	0	0
Body Weight (%)[a]	5.690 kg	3.340 kg	−1	+12	−4	+10	−1	+14
Food Consumption (%)[a]	102.0 g	106.0 g	+6	+2	+6	+2	+6	+2
Clinical Observations								
Decrease in spontaneous activity	0	0	0	0	3	3	5	5
Ataxia	0	0	0	0	0	0	5	5
Twitch	0	0	0	0	0	0	1	0
Vomiting	0	0	0	0	0	0	5	5
Salivation	0	0	0	0	0	0	5	3
Ophthalmology	-	-	-	-	-	-	-	-
Electrocardiography	-	-	-	-	-	-	-	-
Hematology								
Neutrophil ($\times 10^3/mm^3$)								
Day 14	5.800	3.837	10.297	3.953	5.200	4.137	7.170	2.312
	5.96	*2.28*	*2.67*	*2.29*	*2.77*	*4.58*	*3.75*	*2.16*
	5.49	*5.38*	*10.99*	*2.22*	*7.40*	*4.87*	*5.30*	*1.85*
	5.95	*3.85*	*17.23*	*7.35*	*5.43*	*2.96*	*12.17*	*1.52*
							5.33	*2.52*
							9.30 [+]	*3.51*
Day 27	5.387	2.953	6.570	3.493	3.147	3.453	4.802	3.242
	6.17	*1.82*	*4.85*	*1.77*	*2.02*	*2.72*	*2.11*	*2.67*
	5.03	*4.04*	*9.63*	*1.53*	*2.64*	*4.10*	*3.52*	*3.51*
	4.96	*3.00*	*5.23*	*7.18*	*4.78*	*3.54*	*4.04*	*3.17*
							4.77	*2.68*
							9.57 [+]	*4.18*

-: No noteworthy findings
a: Values at the end of dosing period. For the control group, group means are shown. For the treated groups, percent differences from the controls are shown.
Individual values were expressed in italic font.
[+]: Increase in when compared with the control group, pre-dosing values and background data

7.4　サル 4 週間反復投与毒性試験及び 8 週間回復性試験 (3/7)－毒性観察群

Attachment No.: 4.2.3.2-9 (Continued)

Daily Dose (mg/kg)	0 (Control)		30		100		1000	
Number of Animals	M:3	F:3	M:3	F:3	M:3	F:3	M:5	F:5
Hematology								
Large unstained cell ($\times 10^3/mm^3$)								
Day 27	0.100	0.080	0.100	0.123	0.103	0.053	0.212	0.084
	0.09	*0.05*	*0.08*	*0.04*	*0.17*	*0.06*	*0.19*	*0.08*
	0.15	*0.09*	*0.11*	*0.11*	*0.08*	*0.08*	*0.57 [+]*	*0.05*
	0.06	*0.10*	*0.11*	*0.22*	*0.06*	*0.02*	*0.04*	*0.10*
							0.10	*0.12*
							0.16	*0.07*
Fibrinogen (mg/dL)								
Day 14	167.30	129.70	379.77**	143.37	215.77	148.80	300.36*	160.54
	157.0	*144.7*	*375.0*	*136.9*	*196.7*	*138.7*	*260.6*	*99.7*
	171.7	*114.6*	*276.2*	*139.7*	*217.8*	*166.1*	*230.2*	*152.3*
	173.2	*129.8*	*488.1*	*153.5*	*232.8*	*141.6*	*354.2*	*164.7*
							289.0	*189.3*
							367.8[+]	196.7
Day 27	198.40	148.27	236.90	123.57	202.60	150.70	223.20	144.86
	182.5	*151.2*	*211.0*	*102.4*	*179.3*	*142.6*	*143.7*	*108.2*
	187.6	*134.1*	*272.1*	*111.3*	*193.0*	*15.83*	*159.5*	*154.6*
	225.1	*159.5*	*227.6*	*157.0*	*235.5*	*151.2*	*198.6*	*158.3*
							284.6	*131.5*
							329.6 [+]	*171.7*

Individual values were expressed in italic font.
Statistics (vs. Control): $*P < 0.05$, $**P < 0.01$ (Dunnett test)
[+]: Increase in when compared with the control group, pre-dosing values and background data

7.4　サル 4 週間反復投与毒性試験及び 8 週間回復性試験 (4/7)ー毒性観察群

Attachment No.: 4.2.3.2-9 (Continued)

Daily Dose (mg/kg)	0 (Control)		30		100		1000	
Number of Animals	M:3	F:3	M:3	F:3	M:3	F:3	M:5	F:5
Blood Chemistry								
Albumin (g/dL)								
Day 14	3.97	3.93	3.20*	3.53	3.63	3.47	3.18**	3.12*
	4.2	*4.1*	*3.4*	*3.4*	*3.6*	*3.6*	*3.5*	*3.7*
	4.0	*3.8*	*2.9*	*3.4*	*3.8*	*2.9 [-]*	*3.4*	*3.2*
	3.7	*3.9*	*3.3*	*3.8*	*3.5*	*3.9*	*3.2*	*2.9*
							3.1	*2.8 [-]*
							2.7[-]	*3.0*
Day 27	4.03	3.70	3.47	3.57	3.60	3.43	3.44	3.28
	4.4	*3.9*	*3.9*	*3.4*	*3.7*	*3.5*	*3.7*	*3.6*
	4.0	*3.6*	*3.2*	*3.4*	*3.7*	*3.0 [-]*	*3.8*	*3.3*
	3.7	*3.6*	*3.3*	*3.9*	*3.4*	*3.8*	*3.2*	*3.3*
							3.5	*3.0 [-]*
							3.0 [-]	*3.2*
Albumin/globulin ratio								
Day 14	1.213	1.027	0.767**	1.063	0.927*	0.960	0.944*	0.822
	1.31	*1.17*	*0.87*	*1.03*	*0.95*	*1.00*	*1.06*	*1.03*
	1.14	*0.88*	*0.60*	*1.10*	*1.00*	*0.88*	*1.00*	*0.78*
	1.19	*1.03*	*0.83*	*1.06*	*0.83*	*1.00*	*0.94*	*0.81*
							0.97	*0.76*
							0.75 [-]	*0.73 [-]*
Day 27	1.167	1.090	0.840	1.153	0.880	1.000	0.982	0.912
	1.26	*1.26*	*1.05*	*1.03*	*0.93*	*1.06*	*1.12*	*1.00*
	1.08	*0.95*	*0.67*	*1.17*	*1.00*	*0.91*	*1.15*	*0.92*
	1.16	*1.06*	*0.80*	*1.26*	*0.71*	*1.03*	*0.94*	*0.94*
							0.95	*0.88*
							0.75 [-]	*0.82 [-]*

Statistics (vs. Control): *$P < 0.05$, **$P < 0.01$ (Dunnett test), [-]: Decrease in when compared with the control group, pre-dosing values and background data
Individual values were expressed in italic font.

7.4　サル 4 週間反復投与毒性試験及び 8 週間回復性試験 (5/7)ー毒性観察群

Attachment No.: 4.2.3.2-9 (Continued)

Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**		**30**		**100**		**1000**	
Number of Animals	M:3	F:3	M:3	F:3	M:3	F:3	M:5	F:5
Blood Chemistry								
Sodium (mEq/L)								
Day 14	148.7	150.0	144.3	148.7	144.7	148.7	145.6	147.2
	149	*150*	*146*	*148*	*143*	*149*	*148*	*150*
	149	*149*	*139*	*148*	*144*	*147*	*147*	*147*
	148	*151*	*148*	*150*	*147*	*150*	*146*	*145*
							146	*144*
							141	*150*
Day 27	152.3	145.7	146.0	151.3	142.3*	146.3	146.0	145.4
	157	*148*	*150*	*148*	*143*	*145*	*141 [-]*	*149*
	150	*144*	*140*	*150*	*138*	*148*	*149*	*142 [-]*
	150	*145*	*148*	*156*	*146*	*146*	*144*	*145*
							150	*145*
							146	*146*
Urinalysis	-	-	-	-	-	-	-	-

-: No noteworthy findings, Statistics (vs. Control): *$P < 0.05$, [-]: Decrease in when compared with the control group, pre-dosing values and background data
Individual values were expressed in italic font.

7.4　サル 4 週間反復投与毒性試験及び 8 週間回復性試験 (6/7)－毒性観察群

	Attachment No.: 4.2.3.2-9 (Continued)							
Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**		**30**		**100**		**1000**	
Number of Animals	M:3	F:3	M:3	F:3	M:3	F:3	M:3	F:3
Organ Weight	-	-	-	-	-	-	-	-
Gross Pathology								
Stomach: white attachment, mucosa, cardia	0	0	0	0	0	0	3	0
Lung: Brown discoloration	0	0	0	0	0	0	1	0
Lung: Red focus	0	0	0	0	0	0	1	0
Lung: Red discoloration	0	0	0	0	0	0	1	0
Histopathology								
Stomach (cardia): Hydropic degeneration, squamous epithelium	0	0	0	0	0	0	3	0
Lung: Foreign body bronchopneumonia	0	0	0	0	0	0	2	0
Lung: Congestion/hemorrhage, alveolus	0	0	0	0	0	0	2	0
Lung (gross abnormal site): Foreign body bronchopneumonia	0	0	0	0	0	0	1	0
Lung (gross abnormal site): Microgranuloma, foreign body	0	0	0	0	0	0	1	0
Adrenal: Depletion, lipid, zona fasciculata cell	0	0	0	0	1	0	1	0
Adrenal: Hypertrophy, zona fasciculata and reticularis, diffuse	0	0	0	0	0	0	1	0
Heart: Atrophy, serous, coronary adipose tissue	0	0	0	0	0	0	1	0
Femoral bone marrow: Atrophy, serous, adipose tissue	0	0	0	0	0	0	1	0

-: No noteworthy findings

7.4　サル 4 週間反復投与毒性試験及び 8 週間回復性試験 (7/7)－回復群

Recovery Group			Attachment No.: 4.2.3.2-9 (Continued)					
Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**		**30**		**100**		**1000**	
Number of Animals	M:0	F:0	M:0	F:0	M:0	F:0	M:2	F:2
Body Weight							-	-
Food Consumption							-	-
Clinical Observations								
Decrease in spontaneous activity[a]							2	2
Ophthalmology							-	-
Electrocardiography							-	-
Urinalysis							-	-
Hematology							-	-
Blood Chemistry							-	-
Organ Weight							-	-
Gross Pathology							-	-
Histopathology							-	-

-: No noteworthy findings
a: The clinical sign was seen from Day 1 to 6 of recovery.

7.5　サル 13 週間反復投与毒性試験 (1/2)

Report Title: Repeated Dose Toxicity Study in Monkeys Treated Orally with DS-5565 for 3 Months		**Test Article: Mirogabalin besylate**
Species/Strain: Cynomolgus monkey	**Duration of Dosing: 13 weeks**	**Attachment No.: 4.2.3.2-10**
Initial Age: 4 to 6 years	**Duration of Postdose: None**	**Location in CTD: 4.2.3.2**
Date of First Dose: [redacted]	**Method of Administration: Oral, gavage**	
	Vehicle/Formulation: 0.5% methylcellulose solution/Suspension	**GLP Compliance: Yes**

Special Features:
The dose levels are expressed as mirogabalin, a free form of mirogabalin besylate. Toxicokinetics study was done on Days 1, 28, and 91.
Blood collection was done at 1, 2, 4, 7, and 24 hours after treatment on Day 1, and prior to dosing, at 1, 2, 4, 7, and 24 hours after treatment on Days 28 and 91.

No Observed Adverse Effect Level: 10 mg/kg/day for males and females

Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**		**10**		**100**		**300**	
Number of Animals	M:3	F:3	M:3	F:3	M:3	F:3	M:3	F:3
Toxicokinetics (Mirogabalin)								
Cmax (μg/mL)								
Day 1	NE	NE	5.72	3.72	26.5	12.4	23.3	48.6
Day 28	NE	NE	4.22	2.48	27.8	23.6	63.5	51.5
Day 91	NE	NE	4.62	3.93	38.1	27.7	81.0	71.1
Tmax (h)								
Day 1	NE	NE	1.0	1.0	2.3	3.3	5.0	5.0
Day 28	NE	NE	1.0	1.3	2.7	1.7	3.3	2.7
Day 91	NE	NE	1.0	1.0	1.0	1.3	4.0	2.7
$AUC_{0\text{-}24h}$ (μg·h/mL)								
Day 1	NE	NE	20.0	11.5	185	111	257	454
Day 28	NE	NE	15.5	8.40	188	114	531	338
Day 91	NE	NE	20.0	12.4	230	130	765	487

NE: Not examined

7.5　サル 13 週間反復投与毒性試験 (2/2)

Attachment No.: 4.2.3.2-10 (Continued)

Daily Dose (mg/kg)	0 (Control)		10		100		300	
Number of Animals	M:3	F:3	M:3	F:3	M:3	F:3	M:3	F:3
Noteworthy Findings:								
Dead or Sacrificed Moribund	0	0	0	0	0	0	0	0
Body Weight (%)[a]	5.793 kg	3.213 kg	−1	+15	+5	+20	+2	+23
Food Consumption (%)[a]	108.00 g	82.87 g	0	+23	0	+30	0	+30
Clinical Observations								
Decrease in spontaneous activity	0	0	0	0	3	3	3	3
Ataxia	0	0	0	0	1	0	0	2
Lateral position	0	0	0	0	1	0	0	0
Hypothermia	0	0	0	0	1	0	0	0
Vomiting	0	0	0	0	0	0	2	0
Salivation	0	0	0	0	0	0	3	1
Ophthalmology	-	-	-	-	-	-	-	-
Electrocardiography	-	-	-	-	-	-	-	-
Urinalysis	-	-	-	-	-	-	-	-
Hematology	-	-	-	-	-	-	-	-
Blood Chemistry	-	-	-	-	-	-	-	-
Organ Weight	-	-	-	-	-	-	-	-
Gross Pathology	-	-	-	-	-	-	-	-
Histopathology								
Adrenal: Hypertrophy, zona fasciculata cell	0	0	0	0	1	0	1	1

−: No noteworthy findings
a: Values at the end of dosing period. For the control group, group means are shown. For the treated groups, percent differences from the controls are shown.

7.6　サル 39 週間反復投与毒性試験 (1/3)

Report Title: Repeated Dose Toxicity Study in Monkeys Treated Orally with DS-5565 for 9 Months		**Test Article: Mirogabalin besylate**
Species/Strain: Cynomolgus monkey	**Duration of Dosing: 39 weeks**	**Attachment No.: 4.2.3.2-11, 4.2.3.2-12**
Initial Age: 3 to 7 years	**Duration of Postdose: None**	**Location in CTD: 4.2.3.2**
Date of First Dose: [redacted]	**Method of Administration: Oral, gavage**	
	Vehicle/Formulation: 0.5% methylcellulose solution/Suspension	**GLP Compliance: Yes**

Special Features:
The dose levels are expressed as mirogabalin, a free form of mirogabalin besylate.
Toxicokinetics study was done on Days 1, 91, and 273. Blood collection was done at 1, 2, 4, 7, and 24 hours after treatment on Day 1, and prior to dosing, at 1, 2, 4, 7, and 24 hours after treatment on Days 91 and 273. A204-4455 was analyzed as non-GLP study.

No Observed Adverse Effect Level: 30 mg/kg/day for males and females

Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**		**10**		**30**		**100**	
Number of Animals	M:4	F:4	M:4	F:4	M:4	F:4	M:4	F:4
Toxicokinetics (Mirogabalin)								
Cmax (μg/mL)								
Day 1	NE	NE	4.24	4.49	7.71	12.1	17.2	13.4
Day 91	NE	NE	3.55	4.42	9.21	11.0	25.2	23.1
Day 273	NE	NE	3.72	5.30	13.9	12.2	28.4	32.2
Tmax (h)								
Day 1	NE	NE	1.0	1.0	1.8	1.0	3.3	2.5
Day 91	NE	NE	1.0	1.0	1.3	1.3	1.3	1.8
Day 273	NE	NE	1.3	1.3	1.0	1.5	1.3	2.0
$AUC_{0\text{-}24h}$ (μg·h/mL)								
Day 1	NE	NE	19.2	15.6	57.0	44.2	182	103
Day 91	NE	NE	16.7	13.7	46.8	40.7	162	126
Day 273	NE	NE	18.0	18.6	58.1	52.4	195	171

NE: Not examined

7.6　サル 39 週間反復投与毒性試験 (2/3)

				Attachment No.: 4.2.3.2-11, 4.2.3.2-12 (Continued)				
Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**		**10**		**30**		**100**	
Number of Animals	M:4	F:4	M:4	F:4	M:4	F:4	M:4	F:4
Toxicokinetics (A204-4455)								
Cmax (μg/mL)								
Day 1	NE	NE	0.0687	0.0476	0.106	0.154	0.274	0.140
Day 91	NE	NE	0.0612	0.0569	0.114	0.122	0.251	0.193
Day 273	NE	NE	0.0508	0.0591	0.136	0.116	0.275	0.227
Tmax (h)								
Day 1	NE	NE	1.5	1.5	2.3	1.3	5.5	3.3
Day 91	NE	NE	1.5	1.5	1.8	1.8	2.0	2.5
Day 273	NE	NE	1.3	1.8	1.8	2.0	2.3	2.5
$AUC_{0\text{-}24h}$ (μg·h/mL)								
Day 1	NE	NE	0.462	0.246	0.966	0.624	3.309	1.252
Day 91	NE	NE	0.340	0.235	0.713	0.553	2.193	1.416
Day 273	NE	NE	0.282	0.280	0.796	0.586	2.321	1.529

NE: Not examined

7.6　サル 39 週間反復投与毒性試験 (3/3)

	Attachment No.: 4.2.3.2-11, 4.2.3.2-12 (Continued)							
Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**		**10**		**30**		**100**	
Number of Animals	M:4	F:4	M:4	F:4	M:4	F:4	M:4	F:4
Noteworthy Findings:								
Dead or Sacrificed Moribund	0	0	0	0	0	0	0	0
Body Weight (%) [b]	6.540 kg	3.393 kg	−4	+40*	−12	+19	−4	+34
Food Consumption (%) [a]	108.00 g	105.43 g	0	−5	0	−1	0	+2
Water Consumption (%) [a]	695.0 mL	455.0 mL	+67	−35	+109*	−19	+118*	+11
Clinical Observations								
Decrease in spontaneous activity	0	0	0	0	0	0	4	4
Ataxia	0	0	0	0	0	0	1	1
Ophthalmology	-	-	-	-	-	-	-	-
Electrocardiography	-	-	-	-	-	-	-	-
Hematology	-	-	-	-	-	-	-	-
Blood Chemistry								
Na (mEq/L)	148.5	147.8	144.5	150.8	139.0*	149.3	143.5	147.8
Cl (mEq/L)	110.0	110.0	109.0	111.0	101.0*	109.0	105.5	110.5
Urinalysis	-	-	-	-	-	-	-	-
Organ Weight	-	-	-	-	-	-	-	-
Gross Pathology	-	-	-	-	-	-	-	-
Histopathology	-	-	-	-	-	-	-	-

-: No noteworthy findings
Statistics (vs. Control): * $P<0.05$ (Dunnett test)
a: Values at the end of dosing period. For the control group, group means are shown. For the treated groups, percent differences from the controls are shown. Statistical significance is based on actual data (not on the percent differences).

8. In Vitro 遺伝毒性試験

8.1 細菌を用いた復帰突然変異試験 (1/3)

Report Title: Bacterial Reverse Mutation Study of DS-5565			**Test Article: Mirogabalin besylate**
Test for Induction of: Reverse mutation in bacterial cells		**No. of Independent Assays: 2**	**Attachment No.: 4.2.3.3.1-1**
Strains: *S. typhimurium* and *E. coli*		**No. of Replicate Cultures: 4**	**Location in CTD: 4.2.3.3.1**
Metabolizing System: PB/BNF induced rat liver S9, 7.1%		**No. of Cells Analyzed/Culture: -**	
Vehicles:	**For Test Article: DMSO**	**For Positive Controls: DMSO or water for injection**	**GLP Compliance: Yes**
Treatment: Preincubation method. The dose levels are expressed as mirogabalin, a free form of mirogabalin besylate.			Date of Treatment: [redacted] and [redacted]
Cytotoxic Effects: None			
Genotoxic Effects: None			

Assay 1: Dose range-finding test

Metabolic Activation	**Test Article**	**Concentration (μg/plate)**	**Number of Revertants/Plate (Mean ± Standard Deviation)**				
			TA1535	**TA1537**	**TA98**	**TA100**	**WP2*uvrA***
Without Activation	Vehicle	0	9 ± 0.7	12 ± 4.2	22 ± 2.1	145 ± 5.7	33 ± 2.8
	Mirogabalin besylate	9.77	11 ± 0.7	7 ± 3.5	24 ± 0.7	155 ± 2.8	37 ± 5.7
		19.5	10 ± 1.4	6 ± 2.1	27 ± 9.9	142 ± 2.8	30 ± 7.1
		39.1	12 ± 2.1	6 ± 0.0	24 ± 0.7	123 ± 12.0	34 ± 1.4
		78.1	9 ± 1.4	8 ± 1.4	22 ± 9.9	147 ± 20.5	33 ± 0.0
		156	9 ± 2.1	7 ± 0.7	22 ± 0.7	143 ± 15.6	36 ± 4.2
		313	8 ± 0.0	11 ± 2.8	21 ± 4.2	143 ± 1.4	41 ± 2.8
		625	8 ± 2.1	6 ± 3.5	28 ± 7.1	131 ± 1.4	30 ± 7.1
		1250	9 ± 2.8	7 ± 1.4	22 ± 0.7	145 ± 24.0	31 ± 0.7
		2500	10 ± 1.4	6 ± 3.5	21 ± 5.7	128 ± 12.0	25 ± 0.0
		5000	7 ± 0.0	6 ± 4.9	25 ± 2.1	139 ± 6.4	29 ± 0.7
	AF2	0.01				702 ± 38.2*	
		0.02					377 ± 77.1*
		0.1			556 ±19.8*		
	Sodium azide	0.5	369 ± 43.1**				
	ICR-191	1		3872 ± 136.5**			

PB: Phenobarbital, BNF: 5,6-benzoflavone, AF2: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide
*: Increased to more than twice the value for the vehicle control (for TA100, TA98 and WP2*uvrA*)
**: Increased to more than three times the value for the vehicle control (for TA1535 and TA1537)

8.1　細菌を用いた復帰突然変異試験 (2/3)

Attachment No.: 4.2.3.3.1-1 (Continued)

Assay 1: Dose range-finding test

Metabolic Activation	Test Article	Concentration (μg/plate)	Number of Revertants/Plate (Mean ± Standard Deviation)				
			TA1535	TA1537	TA98	TA100	WP2*uvrA*
With Activation	Vehicle	0	8 ± 1.4	11 ± 1.4	28 ± 7.1	138 ± 12.0	31 ± 4.2
	Mirogabalin besylate	9.77	10 ± 0.7	10 ± 2.1	30 ± 4.9	140 ± 14.1	26 ± 0.7
		19.5	12 ± 8.5	10 ± 4.2	36 ± 0.7	144 ± 2.1	37 ± 4.2
		39.1	13 ± 3.5	13 ± 2.1	30 ± 8.5	140 ± 2.1	42 ± 1.4
		78.1	8 ± 1.4	11 ± 0.0	31 ± 2.8	151 ± 7.8	40 ± 1.4
		156	10 ± 2.8	8 ± 1.4	24 ± 3.5	143 ± 19.8	44 ± 13.4
		313	6 ± 4.9	15 ± 8.5	33 ± 6.4	155 ± 8.5	43 ± 12.7
		625	14 ± 0.7	9 ± 1.4	32 ± 1.4	138 ± 10.6	35 ± 9.9
		1250	6 ± 4.2	12 ± 1.4	34 ± 2.8	155 ± 8.5	52 ± 2.1
		2500	12 ± 0.7	10 ± 4.2	31 ± 12.7	132 ± 2.1	45 ± 4.9
		5000	6 ± 2.8	10 ± 2.8	28 ± 2.1	134 ± 24.0	39 ± 3.5
	Benzo[a]pyrene	5			189 ± 0.0*	891 ± 33.9*	
	2-Aminoanthracene	2	214 ± 9.2**	132 ± 20.5**			
		20					622 ± 22.6*

*: Increased to more than twice the value for the vehicle control (for TA100, TA98 and WP2*uvrA*)
**: Increased to more than three times the value for the vehicle control (for TA1535 and TA1537)

8.1　細菌を用いた復帰突然変異試験 (3/3)

Attachment No.: 4.2.3.3.1-1 (Continued)

Assay 2: Definitive test

Metabolic Activation	Test Article	Concentration (μg/plate)	Number of Revertants/Plate (Mean ± Standard Deviation)				
			TA1535	TA1537	TA98	TA100	WP2*uvrA*
Without Activation	Vehicle	0	10 ± 4.5	5 ± 4.6	23 ± 4.9	140 ± 8.2	34 ± 3.5
	Mirogabalin besylate	313	8 ± 3.3	9 ± 5.1	21 ± 5.2	138 ± 5.6	41 ± 3.4
		625	9 ± 3.4	7 ± 4.2	23 ± 8.3	148 ± 17.7	38 ± 5.2
		1250	9 ± 2.7	5 ± 4.6	21 ± 2.1	155 ± 20.2	34 ± 7.5
		2500	7 ± 3.4	7 ± 3.1	23 ± 2.2	142 ± 18.1	36 ± 3.0
		5000	9 ± 1.0	6 ± 1.0	25 ± 5.4	144 ± 11.9	37 ± 8.9
	AF2	0.01				742 ± 39.0*	
		0.02					435 ± 39.7*
		0.1			581 ± 13.5*		
	Sodium azide	0.5	370 ± 18.8**				
	ICR-191	1		2826 ± 365.5**			
			TA1535	TA1537	TA98	TA100	WP2*uvrA*
With activation	Vehicle	0	10 ± 1.0	9 ± 3.9	32 ± 8.7	139 ± 14.8	35 ± 9.9
	Mirogabalin besylate	313	11 ± 3.7	8 ± 5.4	25 ± 2.5	153 ± 8.5	41 ± 5.5
		625	12 ± 2.5	11 ± 3.3	25 ± 5.7	150 ± 9.2	44 ± 2.8
		1250	7 ± 2.9	10 ± 1.0	29 ± 5.7	149 ± 9.0	45 ± 6.8
		2500	13 ± 0.5	11 ± 1.3	26 ± 4.1	153 ± 10.2	38 ± 2.8
		5000	5 ± 1.5	12 ± 2.4	29 ± 4.7	137 ± 15.2	42 ± 5.0
	Benzo[a]pyrene	5			179 ± 13.5*	804 ± 22.0*	
	2-Aminoanthracene	2	187 ± 21.1**	119 ± 5.9**			
		20					623 ± 40.0*

AF2: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide
*: Increased to more than twice the value for the vehicle control (for TA100, TA98 and WP2*uvrA*)
**: Increased to more than three times the value for the vehicle control (for TA1535 and TA1537)

8.2 染色体異常試験

Report Title: Chromosome Aberration Study of DS-5565 Using Mammalian Cultured Cells			**Test Article: Mirogabalin besylate**
Test for Induction of: Chromosome aberration		**No. of Independent Assays: 1**	**Attachment No.: 4.2.3.3.1-2**
Strains: CHL cell		**No. of Replicate Cultures: 2**	**Location in CTD: 4.2.3.3.1**
Metabolizing System: PB/BNF induced rat liver S9, 5%		**No. of Cells Analyzed/Culture: 100**	
Vehicles:	**For Test Article: DMSO**	**For Positive Controls: DMSO or physiological saline**	**GLP Compliance: Yes**
Treatment: Short treatment for 6 hours with and without S9; continuous treatment for 24 hours without S9.			Date of Treatment: [redacted]
Cytotoxic Effects: Dose-dependent decrease in relative cell numbers in the continuous treatment			
Genotoxic Effects: None			

Treatment Time (h)	Metabolic Activation	Test Article	Dose (mmol/L)	Relative Cell Number (%)	Polyploid Cell Number (%)	Aberrant Cell Number (%)
6	Without Activation	Vehicle	0	100.0	0.0	0.0
		Mirogabalin besylate	2.50	94.8	0.0	1.5
			5.00	96.1	0.0	1.0
			10.0	73.4	0.0	0.0
		Mitomycin C	0.1	NE	0.0	24.5 ++
6	With Activation	Vehicle	0	100.0	0.0	0.0
		Mirogabalin besylate	2.50	81.8	0.0	0.0
			5.00	86.1	0.0	0.0
			10.0	70.9	0.0	1.0
		Benzo[a]pyrene	10	NE	0.0	14.0 +
24	Without Activation	Vehicle	0	100.0	0.0	0.0
		Mirogabalin besylate	2.50	92.3	0.0	1.0
			5.00	72.2	0.0	0.5
			10.0	42.0	0.0	0.0
		Mitomycin C	0.05	NE	0.0	24.5 ++

PB: Phenobarbital, BNF: 5,6-benzoflavone, NE: Not examined
Unit of mitomycin C and benzo[a]pyrene: μg/mL,
Positive result: + 10% ≤ aberrant cells < 20%, ++ 20% ≤ aberrant cells < 50%

9. In Vivo 遺伝毒性試験

Report Title: Micronucleus Study of DS-5565 in Rats Bone Marrow				**Test Article: Mirogabalin besylate**		
Test for Induction of: Micronucleated immature erythrocytes		**Treatment Schedule: Single administration**			**Attachment No.: 4.2.3.3.2-1**	
Species/Strain: Rat/F344/DuCrlCrlj		**Sampling Time: 24 and 48 hours after administration**			**Location in CTD: 4.2.3.3.2**	
Age: 9 Weeks		**Method of Administration: Oral, gavage**				
Cells Evaluated: Immature erythrocytes		**Vehicle/Formulation: 0.5% methylcellulose solution/Suspension**			**GLP Compliance: Yes**	
No. of Cells Analyzed/Animal: 2000					**Date of Dosing:** [redacted]	
Special Features: The dose levels are expressed as mirogabalin, a free form of mirogabalin besylate.						
Toxic/Cytotoxic Effects: Abnormal clinical signs (prone position, hypoactivity, staggering gait, soiled perineal region, decreased fecal volume) were observed in the groups treated with mirogabalin besylate.						
Genotoxic Effects: None						
Evidence of Exposure: The exposure of rats to mirogabalin besylate was confirmed in a repeated dose toxicity study of mirogabalin besylate (4.2.3.2-1).						
Test Article	**Dose (mg/kg)**	**24 hours after administration**			**48 hours after administration**		
		No. of Animals	**IE (%) (Mean ± S.D.)**	**MNIE (%) (Mean ± S.D.)**	**No. of Animals**	**IE (%) (Mean ± S.D.)**	**MNIE (%) (Mean ± S.D.)**
Vehicle	0	M:6	48.83 ± 7.010	0.10 ± 0.077	M:6	46.00 ± 2.455	0.14 ± 0.111
Mirogabalin besylate	500	M:6	53.43 ± 5.733	0.13 ± 0.082	M:6	46.92 ± 4.830	0.13 ± 0.082
	1000	M:6	51.10 ± 3.999	0.15 ± 0.095	M:6	49.58 ± 6.351	0.14 ± 0.059
	2000	M:6	50.50 ± 4.062	0.08 ± 0.113	M:6	46.38 ± 4.022	0.12 ± 0.052
Cyclophosphamide	20	M:6	35.93 ± 2.250#	1.28 ± 0.258*	NE	NE	NE

IE: Percentage of immature erythrocytes to total erythrocytes in bone marrow, MNIE: Percentage of micronucleated immature erythrocytes to total immature erythrocytes, S.D.: Standard Deviation, NE: not examined
#$P < 0.01$ (Dunnett test), *$P < 0.01$ (Kastenbaum&Bowman table)

10. がん原性試験

10.1 マウス 2 週間用量設定試験（予備試験）(1/4)

Report Title: Preliminary Dose Range-Finding Study for Carcinogenicity Study in Mice Treated Orally with DS-5565 for 14 Days			**Test Article: Mirogabalin besylate**					
Species/Strain: Mouse/B6C3F1/Crlj		**Duration of Dosing: 2 weeks**			**Attachment No.: 4.2.3.4.1-1**			
Initial Age: 9 weeks		**Method of Administration: Oral, gavage**			**Location in CTD: 4.2.3.4.1**			
Date of First Dose: [redacted]		**Vehicle/Formulation: 0.5% methylcellulose solution/Suspension**			**GLP Compliance: No**			
Special Features: The dose levels are expressed as mirogabalin, a free form of mirogabalin besylate. Toxicokinetics study was done on Day 1 and Day 14. Blood collection was done at 1, 3, 6, and 24 hours after dosing on Day 1, and before dosing, at 1, 3, 6, and 24 hours after dosing on Day 14.								
Maximum Tolerated Dose: 300 mg/kg/day for males and females								
Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**		**100**		**300**		**1500**	
Number of Animals/Time Point	M:5	F:5	M:4	F:4	M:4	F:4	M:4	F:4
Toxicokinetics (Mirogabalin)								
Cmax (μg/mL)								
Day 1	NE	NE	19.6	19.4	45.2	41.2	58.4	38.9
Day 14	NE	NE	16.4	20.0	40.4	44.8	82.2 [a]	74.8
Tmax (h)								
Day 1	NE	NE	1.0	1.0	1.0	1.0	3.0	1.0
Day 14	NE	NE	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0[a]	1.0
$AUC_{0\text{-}24h}$ (μg·h/mL)								
Day 1	NE	NE	41.4	39.6	123	116	810	468
Day 14	NE	NE	34.4	43.8	109	105	504[a]	610

NE: Not examined
a: N=3 at 6 hours after dosing because of animal death.

10.1 マウス 2 週間用量設定試験（予備試験）(2/4)

Attachment No.: 4.2.3.4.1-1 (Continued)

Daily Dose (mg/kg)	0 (Control)		100		300		1500	
Number of Animals	M:5	F:5	M:5	F:5	M:5	F:5	M:5	F:5
Noteworthy Findings:								
Dead or Sacrificed Moribund	0	0	0	0	0	0	1 [a]	0
Body Weight (%)[b]	25.8 g	22.7 g	-1	-2	0	-1	+4[a]	+4
Food Consumption (%)[b]	3.9 g	4.1 g	+10	+2	+3	+7	+18*[a]	+10
Clinical Observations								
Prone position	0	0	5	5	5	5	4 [a]	5
Decrease, spontaneous movement	0	0	5	5	5	5	4 [a]	5
Staggering gait	0	0	0	0	0	0	1 [a]	0
Smudged fur, lower abdomen	0	0	0	0	1	0	2 [a]	0
Hematology	-	-	-	-	-	-	-	-
Blood Chemistry	-	-	-	-	-	-	-	-
Organ Weight	-	-	-	-	-	-	-	-
Gross Pathology	-	-	-	-	-	-	-	-
Histopathology								
Forestomach: Thickening, mucosal epithelium, multifocal	0	0	0	0	0	0	4 [c]	3

-: No noteworthy findings
Statistics (vs. Control): * $P \leq 0.05$ (Dunnett test); Statistical significance is based on actual data (not on the percent differences).
a: One male died on Day 4.
b: Values at the end of dosing period. For the control group, group means are shown. For the treated groups, percent differences from the controls are shown. Statistical significance is based on actual data (not on the percent differences).
c: N=4

10.1 マウス 2 週間用量設定試験（予備試験）(3/4)

					Attachment No.: 4.2.3.4.1-1 (Continued)			
Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**		**100**		**300**		**1500**	
Number of Animals	M:4	F:4	M:4	F:4	M:4	F:4	M:4	F:4
Drug Metabolizing Enzyme[a]								
Cytochrome P450 content (nmol/mg protein)	0.458	0.403	0.498	0.388	0.493	0.413	0.640**	0.493*
7-methoxycoumarin O-demethylase activity (nmol/min/mg protein)	0.493	0.605	0.468	0.573	0.543	0.728	0.788**	0.990**
7-ethoxycoumarin O-deethylase activity (nmol/min/mg protein)	0.795	1.120	0.788	1.028	0.908	1.263	1.308**	1.565**
7-propoxycoumarin O-depropylase activity (nmol/min/mg protein)	0.438	0.638	0.415	0.598	0.503	0.713	0.623**	0.750
CYP2B[b]	-	-	NE	NE	NE	NE	++	++
CYP4A[b]	-	-	NE	NE	NE	NE	-	+
NADPH P450 reductase[b]	-	-	NE	NE	NE	NE	++	-

NE: Not examined, -: Not changed, +: Slight increase, ++: Moderate increase
Statistics (vs. Control): *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$ (Dunnett test); Statistical significance is based on actual data (not on the percent differences).
a: Mean values of 4 animals/sex/group/examined date
b: Western blot analysis

10.1 マウス 2 週間用量設定試験（予備試験） (4/4)－死亡例

Dead or Sacrificed Moribund Animal					**Attachment No.: 4.2.3.4.1-1 (Continued)**			
Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**		**100**		**300**		**1500**	
Number of Animals	M:0	F:0	M:0	F:0	M:0	F:0	M:1[a]	F:0
Noteworthy Findings:								
Clinical Observations								
Prone position							1	
Staggering gait							1	
Smudged fur, lower abdomen							1	
Hypothermia							1	
Gross Pathology								
Jejunum: retention gas							1	
Ileum: retention gas							1	
Cecum: retention gas							1	
Glandular stomach: raised focus							1	
Histopathology							P	

P: Histopathological changes considered to be due to deteriorated general condition of animals were observed in the adrenal, glandular stomach, liver, mesenteric lymph node, Peyer's patch, submandibular lymph node, thymus, pancreas, and spleen.
a: One male died on Day 4.

10.2 マウス 13 週間用量設定試験 (1/3)

Report Title: Dose Range-Finding Study for Carcinogenicity Study in Mice Treated Orally with DS-5565 for 3 Months			**Test Article: Mirogabalin besylate**					
Species/Strain: Mouse/B6C3F1/Crlj			**Duration of Dosing: 13 weeks**			**Attachment No.: 4.2.3.4.1-2**		
Initial Age: 7 weeks			**Method of Administration: Oral, gavage**			**Location in CTD: 4.2.3.4.1**		
Date of First Dose: [redacted]			**Vehicle/Formulation: 0.5% methylcellulose solution/Suspension**			**GLP Compliance: Yes**		
Special Features: Dose levels are described as mirogabalin, the free form of mirogabalin besylate. Toxicokinetics study was done on Days 1 and 91. Blood collection was done before dosing (except for Day 1), at 1, 3, 6, and 24 hours after dosing.								
Maximum Tolerated Dose: 100 mg/kg/day in males and females								
Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**		**100**		**300**		**1000**	
Number of Animals/Time Point	M:4	F: 4	M:4	F:4	M:4	F:4	M:4	F:4
Toxicokinetics (Mirogabalin)								
Cmax (μg/mL)								
Day 1	NE	NE	13.8	14.8	20.7	17.2	34.3	37.3
Day 91	NE	NE	15.8	16.9	49.3	42.4	67.9	109[a]
Tmax (h)								
Day 1	NE	NE	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Day 91	NE	NE	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0[a]
$AUC_{0\text{-}24h}$ (μg·h/mL)								
Day 1	NE	NE	32.6	42.6	80.3	79.3	252	252
Day 91	NE	NE	40.2	35.8	162	136	552	404[a]

NE: Not examined
a: N = 3 before dosing and at 1 and 3 hours after dosing because of animal death.

10.2 マウス 13 週間用量設定試験 (2/3)

				Attachment No.: 4.2.3.4.1-2 (Continued)				
Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**		**100**		**300**		**1000**	
Number of Animals	M:10	F:10	M:10	F:10	M:10	F:10	M:10	F:10
Noteworthy Findings:								
Dead or Sacrificed Moribund	0	0	0	0	0	0	2[a]	3[b]
Body Weight (%)[c]	-	-	-	-	-	-	-	-
Food Consumption (%)[c]	4.4 g	4.1 g	-2	+27**	0	+22**	+5	+20*
Clinical Observations								
Decrease, spontaneous movement	0	0	10	10	10	10	8[d]	7[e]
Prone position	0	0	8	9	10	10	8[d]	7[e]
Crust formation, perineum	0	0	0	0	0	0	1[d]	0[e]
Ophthalmology	-	-	-	-	-	-	-	-
Number of Animals	M:10	F:10	M:10	F:10	M:10	F:10	M:8[a]	F:7[b]
Hematology	-	-	-	-	-	-	-	-
Blood Chemistry	-	-	-	-	-	-	-	-
Number of Animals	M:10	F:10	M:10	F:10	M:10	F:10	M:10	F:7[b]
Urinalysis								
pH >8.0	10	8	8	1	5	1	2	0
6.5 to 7.5	0	2	2	8	4	4	6	1
6.0	0	0	0	1	1	5	2	6
Protein <1+	10	10	9	10	6	7	4	7
2+	0	0	1	0	4	3	6	0
Urine volume (%)[c]	1.3 mL/24 h	1.6 mL/24 h	0	+6	-31	+19	+69	+206##

-: No noteworthy findings
Statistics (vs. Control): * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ (Dunnett test), ## $P < 0.01$ (Steel test)
a: Two male died in week13 during the dosing period.
b: Three female died from week 5 to 12 during the dosing period.
c: Values at the end of dosing period. For the control group, group means are shown. For the treated groups, percent differences from the controls are shown. Statistical significance is based on actual data (not on the percent differences).
d: N = 8 because of animal death.
e: N = 7 because of animal death.

10.2 マウス 13 週間用量設定試験 (3/3)

Attachment No.: 4.2.3.4.1-2 (Continued)

Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**		**100**		**300**		**1000**	
Number of Animals	M:10	F:10	M:10	F:10	M:10	F:10	M:8[a]	F:7[b]
Organ Weight								
Heart								
Absolute Weight (%)[c]	147 mg	121 mg	-3	+11**	-2	+9*	-5	+14**
Relative Weight (%)[c]	464 mg/100 g	436 mg/100 g	-8	+14**	-8	+11**	-12*	+11*
Kidneys								
Absolute Weight (%)[c]	506 mg	342 mg	+3	+13**	+2	+8**	-6	+9**
Relative Weight (%)[c]	1596 mg/100 g	1236 mg/100 g	-1	+16**	-4	+10**	-13**	+5
Gross Pathology								
Urinary bladder: Dilatation	0	0	0	0	1	0	1	0
Skin (perineal): Crust formation	0	0	0	0	0	0	1	0
Histopathology								
Forestomach: Thickening of mucosal epithelium	0	0	NE	0	NE	0	0	2
Salivary gland: Atrophy of acinar cell in submandibular gland	0	0	NE	0	NE	0	0	2
Number of Animals (Dead)	M:0	F:0	M:0	F:0	M:0	F:0	M:2[a]	F:3[b]
Gross Pathology								
Duodenum: Dilatation							1	1
Jejunum: Dilatation							1	1
Ileum: Dilatation							1	1
Cecum: Dilatation							1	1
Spleen: Small							1	1
Thymus: Small							2	0
Stomach: Dilatation							0	1
Histopathology							P	P

NE: Not examined-: No noteworthy findings, P: Histopathological abnormalities considered to be due to deteriorated general condition of animals were observed in the adrenal, liver, mesenteric lymph node, Peyer's patch, salivary gland, spleen, and thymus in males and females, and glandular stomach, urinary bladder, and uterus in females.
Statistics (vs. Control): * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ (Dunnett test)
a: Two male died in week13 during the dosing period. b: Three female died from week 5 to 12 during the dosing period. c: Values at the end of dosing period. For the control group, group means are shown. For the treated groups, percent differences from the controls are shown. Statistical significance is based on actual data (not on the percent differences).

10.3 マウス 104 週間がん原性試験 (1/7)

Report Title: Oral Carcinogenicity Study in Mice Treated with DS-5565 for 24 Months							Test Article: Mirogabalin besylate	
Species/Strain: Mouse/B6C3F1/Crlj		Duration of Dosing: 104 Weeks					Attachment No.: 4.2.3.4.1-3	
Initial Age: 6 weeks		Method of Administration: Oral, gavage					Location in CTD: 4.2.3.4.1	
Date of First Dose: [redacted]		Vehicle/Formulation: 0.5% methylcellulose solution/Suspension						
		Treatment of Controls: Vehicle					GLP Compliance: Yes	
Basis for High-Dose Selection: Based on the result of a 13-week dose range finding study. The maximum tolerated dose (MTD) served as the criteria for dose selection.								
Special Features: Dose levels are described as mirogabalin, the free form of mirogabalin besylate. Toxicokinetic evaluations were done on Days 1, 89 and 177. Blood collection was done before dosing (except for Day 1), at 1, 3, 6, and 24 hours after dosing.								
Carcinogenicity: None								
Daily Dose (mg/kg)	0 (Control)		10		30		100	
Number of Animals/Time Point	M:4	F:4	M:4	F:4	M:4	F:4	M:4	F:4
Toxicokinetics (Mirogabalin)								
Cmax (μg/mL)								
Day 1	NE	NE	2.34	2.41	6.32	6.87	17.6	23.9
Week 13 (Day 89)	NE	NE	1.60	1.63	4.71	4.96	13.7	19.1
Week 26 (Day 177)	NE	NE	2.16	1.81	5.51	4.98	15.2	18.5
Tmax (h)								
Day 1	NE	NE	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Week 13 (Day 89)	NE	NE	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Week 26 (Day 177)	NE	NE	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
$AUC_{0\text{-}24h}$ (μg·h/mL)								
Day 1	NE	NE	5.00	5.46	14.0	16.7	44.5	68.2
Week 13 (Day 89)	NE	NE	3.36	3.20	9.80	10.0	37.8	38.3
Week 26 (Day 177)	NE	NE	3.80	3.69	9.95	9.45	28.7	34.4

NE: Not examined

10.3 マウス 104 週間がん原性試験 (2/7)

					Attachment No.: 4.2.3.4.1-3 (Continued)			
Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**		**10**		**30**		**100**	
Number of Animals	M60	F60	M60	F60	M60	F60	M60	F60
Dead or Sacrificed Moribund	14	17	17	22	25	14	14	28
Accidental Deaths	0	0	0	0	1	0	0	0
Terminal Sacrifice	46	43	43	38	35	46	46	32
Survival (%) unadjusted	76.7	71.7$	71.7	63.3	58.3*	76.7	76.7	53.3*
Survival (%) adjusted[a]	76.7	71.7	71.7	63.3	59.3	76.7	76.7	53.3
Body Weight (%)[b]	36.3 g	30.1 g	+1.9	0.0	+1.4	+0.3	+0.3	−2.7 S2*
Food Consumption (%)[b]	4.4 g	4.7 g	+2.3	+2.1	+6.8 D2**	+12.8 D2**	+6.8 D2**	+12.8 D2**
Number of Animals with Neoplastic Lesions:[c]								
Abdominal cavity								
Lipoma	0/4	0/0	0/0	0/3	1/1	0/0	0/0	0/1
Hemangiosarcoma	1/4	0/0	0/0	0/3	0/1	0/0	0/0	0/1
Mesothelioma, malignant	1/4	0/0	0/0	0/3	0/1	0/0	0/0	0/1
Rhabdomyosarcoma	0/4	0/0	0/0	1/3	0/1	0/0	0/0	0/1
Adrenal								
Adenoma, subcapsular cell	0/60	0/60	0/60	0/60	1/60	1/60	0/60	0/60
Pheochromocytoma	1/60	0/60	0/60	0/60	0/60	0/60	1/60	1/60
Pheochromocytoma, malignant	0/60	0/60	0/60	0/60	0/60	0/60	0/60	1/60
Bone marrow, femoral								
Hemangioma	2/60	0/60	2/60	0/60	3/60	0/60	1/60	0/60
Mastocytoma	0/60	0/60	0/60	0/60	0/60	0/60	0/60	1/60
Hemangiosarcoma	0/60	1/60	0/60	0/60	1/60	1/60	0/60	0/60
Bone marrow, sternal								
Hemangioma	0/60	1/60	0/60	0/60	0/60	1/60	0/60	0/60

NE: Not examined
Statistics (vs. Control): $ $P < 0.05$ (Tarone test), * $P < 0.05$ (log-rank test), D2** $P < 0.01$ (Dunnett test two-side), S2* $P < 0.05$ (Steel test two-side)
a: Adjusted survival excludes accidental deaths (i.e., denominator is adjusted by excluding the number of accidental deaths from the total number of animals)
b: Values at Day 182 of dosing period. For the control group, group means are shown. For the treated groups, percent differences from the controls are shown. Statistical significance is based on actual data (not on the percent differences).
c: Incidence presented as animals with findings/total number of animals examined.

10.3 マウス 104 週間がん原性試験 (3/7)

Attachment No.: 4.2.3.4.1-3 (Continued)

Daily Dose (mg/kg)	0 (Control)		10		30		100	
Number of Animals	M:60	F:60	M:60	F:60	M:60	F:60	M:60	F:60
Number of Animals with Neoplastic Lesions:[a]								
Cerebrum								
Meningioma	0/60	0/60	0/60	0/60	0/60	1/60	0/60	0/60
Harderian gland								
Adenoma	7/60	4/60	10/60	3/60	2/60	2/60	4/60	4/60
Adenocarcinoma	3/60	0/60	0/60	1/60	1/60	0/60	0/60	0/60
Heart								
Hemangioma	1/60	0/60	0/60	0/60	0/60	0/60	1/60	0/60
Hemolymphoreticular (all sites)								
Lymphoma, malignant	13/60	23/60	12/60	23/60	3/60	22/60	12/60	21/60
Sarcoma, histiocytic	0/60	4/60$$	4/60	4/60	1/60	0/60	3/60	10/60
Intestine, duodenum								
Adenoma	1/60	1/59	0/59	0/58	0/58	0/59	1/57	0/59
Adenocarcinoma	0/60	0/59	0/59	0/58	2/58	0/59	1/57	0/59
Intestine, jejunum								
Hemangioma	0/60	1/58	0/59	0/57	0/59	0/58	0/57	0/57
Adenocarcinoma	0/60	0/58	0/59	0/57	1/59	0/58	0/57	1/57
Intestine, ileum(Peyer's patch)								
Hemangioma	0/60	1/58	0/60	0/60	0/57	0/58	0/57	0/59
Kidney								
Carcinoma, renal cell	0/60	0/60	0/60	0/60	0/60	0/60	1/60	0/60
Liver								
Adenoma, hepatocellular	21/60	12/60	28/60	14/60	26/60	12/60	25/60	10/60
Adenoma, hepatocholangiocellular	0/60	0/60	0/60	0/60	0/60	0/60	1/60	0/60
Hemangioma	0/60	1/60	2/60	2/60	4/60	1/60	2/60	0/60
Ito cell tumor	0/60	0/60	0/60	0/60	0/60	0/60	0/60	1/60

Statistics (positive trend): $$ $P<0.005$ (Peto's test), common tumor
a: Incidence presented as animals with findings/total number of animals examined.

10.3 マウス 104 週間がん原性試験 (4/7)

Attachment No.: 4.2.3.4.1-3 (Continued)

Daily Dose (mg/kg)	0 (Control)		10		30		100	
Number of Animals	M:60	F:60	M:60	F:60	M:60	F:60	M:60	F:60
Number of Animals with Neoplastic Lesions:[a]								
Liver								
Carcinoma, hepatocellular	11/60	3/60	19/60	3/60	17/60	3/60	16/60	4/60
Carcinoma, hepatocholangiocellular	0/60	0/60	1/60	0/60	0/60	0/60	0/60	0/60
Hemangiosarcoma	1/60	1/60	4/60	2/60	4/60	0/60	0/60	0/60
Adenoma + Carcinoma, hepatocellular	27/60	14/60	36/60	17/60	38/60**	15/60	35/60	12/60
Carcinoma, hepatocellular	11/60	3/60	19/60	3/60	17/60	3/60	16/60	4/60
Carcinoma, hepatocholangiocellular	0/60	0/60	1/60	0/60	0/60	0/60	0/60	0/60
Hemangiosarcoma	1/60	1/60	4/60	2/60	4/60	0/60	0/60	0/60
Adenoma + Carcinoma, hepatocellular	27/60	14/60	36/60	17/60	38/60**	15/60	35/60	12/60
Lung(bronchus)								
Adenoma, bronchiolo-alveolar	5/60	4/60	14/60	6/60	8/60	1/60	12/60	3/60
Carcinoma, bronchiolo-alveolar	2/60	0/60	11/60**	0/60	6/60	1/60	7/60	3/60
Adenoma+Carcinoma, bronchiolo-alveolar	7/60	4/60	24/60**	6/60	13/60	2/60	18/60**	6/60
Lymph node, mesenteric								
Hemangioma	0/60	0/59	1/59	0/60	0/59	0/60	3/60	0/60
Mammary gland								
Adenocarcinoma	NA	1/60	NA	1/60	NA	1/60	NA	3/60
Mandible								
Osteoma	0/0	1/1	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
Mesometrium								
Hemangioma	0/0	1/1	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
Ovary								
Adenoma, tubulostromal	NA	0/60	NA	0/60	NA	1/60	NA	1/60
Cystadenoma	NA	0/60	NA	2/60	NA	1/60	NA	1/60
Sex cord stromal tumor	NA	0/60	NA	0/60	NA	1/60	NA	0/60

NA: Not applicable
Statistics (vs. Control): ** $P<0.01$ (Peto's test), common tumor
a: Incidence presented as animals with findings/total number of animals examined.

10.3 マウス 104 週間がん原性試験 (5/7)

			Attachment No.: 4.2.3.4.1-3 (Continued)					
Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**		**10**		**30**		**100**	
Number of Animals	M:60	F:60	M:60	F:60	M:60	F:60	M:60	F:60
Number of Animals with Neoplastic Lesions:[a]								
Ovary								
Carcinoma, yolk sac	NA	0/60	NA	0/60	NA	0/60	NA	1/60
Teratoma, malignant	NA	0/60	NA	1/60	NA	0/60	NA	0/60
Pancreas								
Adenoma, islet cell	1/60	0/60	0/60	1/60	1/60	0/60	1/60	1/60
Carcinoma, acinar cell	0/60	0/60	0/60	0/60	0/60	0/60	1/60	0/60
Carcinoma, islet cell	0/60	0/60	1/60	1/60	0/60	0/60	0/60	0/60
Parathyroid								
Carcinoma	1/58	0/56	0/59	0/56	0/56	0/60	0/54	0/58
Penis								
Papilloma, squamous cell	0/1	NA	0/2	NA	1/5	NA	0/3	NA
Pituitary								
Adenoma, pars distalis	0/60	14/60	0/60	10/60	0/60	6/60	0/60	8/60
Adenoma, pars intermedia	0/60	0/60	0/60	1/60	1/60	1/60	0/60	2/60
Skin + Subcutis								
Carcinoma, basal cell	0/60	0/60	0/60	1/60	0/60	0/60	0/60	0/60
Carcinoma, squamous cell	1/60	0/60	0/60	0/60	0/60	0/60	0/60	0/60
Fibrosarcoma	0/60	1/60	0/60	1/60	0/60	1/60	0/60	1/60
Hemangiosarcoma	0/60	0/60	0/60	0/60	0/60	1/60	0/60	1/60
Liposarcoma	0/60	1/60	0/60	0/60	0/60	0/60	0/60	1/60
Rhabdomyosarcoma	0/60	0/60	0/60	1/60	0/60	0/60	0/60	1/60
Sarcoma, nos	0/60	1/60	0/60	0/60	0/60	0/60	0/60	1/60
Spleen								
Hemangioma	2/60	1/60	2/60	0/60	0/60	0/60	0/60	0/60
Mastocytoma	0/60	0/60	0/60	0/60	1/60	0/60	0/60	0/60
Hemangiosarcoma	2/60	2/60	1/60	0/60	2/60	2/60	1/60	0/60

NA: Not applicable
a: Incidence presented as animals with findings/total number of animals examined.

10.3 マウス 104 週間がん原性試験 (6/7)

					Attachment No.: 4.2.3.4.1-3 (Continued)			
Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**		**10**		**30**		**100**	
Number of Animals	M:60	F:60	M:60	F:60	M:60	F:60	M:60	F:60
Number of Animals with Neoplastic Lesions:[a]								
Stomach								
Adenoma	0/60	1/60	0/60	0/60	0/60	0/60	0/60	0/60
Neuroendocrine tumor, benign	0/60	0/60	0/60	0/60	0/60	0/60	0/60	1/60
Hemangioma	0/60	0/60	0/60	0/60	2/60	0/60	0/60	0/60
Papilloma, squamous cell	0/60	0/60	0/60	0/60	1/60	1/60	0/60	0/60
Neuroendocrine tumor, malignant	0/60	1/60	0/60	0/60	0/60	0/60	1/60	0/60
Thyroid								
Adenoma, follicular cell	2/60	0/60	2/60	0/60	0/60	0/60	1/60	0/60
Carcinoma, follicular cell	0/60	0/60	1/60	0/60	0/60	0/60	0/60	0/60
Uterus								
Hemangioma	NA	1/60	NA	1/60	NA	0/60	NA	0/60
Leiomyoma	NA	0/60	NA	0/60	NA	1/60	NA	0/60
Polyp, endometrial stromal	NA	3/60	NA	2/60	NA	2/60	NA	3/60
Adenocarcinoma	NA	0/60	NA	0/60	NA	0/60	NA	1/60
Hemangiosarcoma	NA	0/60	NA	0/60	NA	1/60	NA	0/60
Leiomyosarcoma	NA	0/60	NA	0/60	NA	0/60	NA	1/60
Sarcoma, endometrial stromal	NA	0/60	NA	0/60	NA	3/60	NA	2/60
Vagina								
Carcinoma, squamous cell	NA	0/60	NA	0/60	NA	0/60	NA	1/60
Vertebra								
Hemangioma	0/0	0/0	0/0	1/2	0/0	0/0	0/0	0/0
Osteosarcoma	0/0	0/0	0/0	1/2	0/0	0/0	0/0	0/0

NA: Not applicable
a: Incidence presented as animals with findings/total number of animals examined.

10.3 マウス 104 週間がん原性試験 (7/7)

					Attachment No.: 4.2.3.4.1-3 (Continued)			
Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**		**10**		**30**		**100**	
Number of Animals	M:60	F:60	M:60	F:60	M:60	F:60	M:60	F:60
Noteworthy Findings:								
Hematology[a]								
Red Blood Cell Count (%)	$937 \times 10^4/\mu L$	$856 \times 10^4/\mu L$	+3.4	+4.2	+6.7	+4.8 S2*	+10.9 D2*	+7.1 S2*
Hemoglobin (%)	13.9 g/dL	13.0 g/dL	+1.4	+3.8	+7.2	+5.4 S2**	+10.8 D2**	+9.2 S2**
Hematocrit (%)	45.5%	42.7%	+3.7	+3.7	+7.7	+5.4 S2**	+11.0 D2**	+8.9 S2**
Platelet Count (%)	$143.6 \times 10^4/\mu L$	$85.8 \times 10^4/\mu L$	−4.0	−2.4	−3.3	−7.7	−16.9 S2**	−9.9
Lymphocyte Count (%)	$31.7 \times 10^2/\mu L$	$63.3 \times 10^2/\mu L$	+151.1	−63.2	−14.5	−68.1	−39.4 S2*	−63.8
Lymphocyte Ratio (%)	62.9%	63.9%	−9.5	−3.6	+3.7	−0.5	−13.5 D2**	+1.4
Gross pathology - Non-Neoplastic Lesions[b]								
Urinary bladder: Dilatation	4/60	2/60	12/60	1/60	20/60	4/60	26/60	4/60
Histopathology - Non-Neoplastic Lesions								
Urinary bladder: Dilatation, lumina	6/60	3/60	15/60	3/60	25/60	5/60	26/60	11/60

Statistics (vs. Control): D2* $P < 0.05$, D2** $P < 0.01$ (Dunnet test two-side), S2* $P < 0.05$, S2** $P < 0.01$ (Steel test two-side)

a: Values at Week 104 of dosing period. For the control group, group means are shown. For the treated groups, percent differences from the controls are shown. Statistical significance is based on actual data (not on the percent differences).

b: Incidence presented as animals with findings/total number of animals examined.

10.4 ラット 104 週間がん原性試験 (1/9)

Report Title: Oral Carcinogenicity Study in Rats Treated with DS-5565 for 24 Months		Test Article: Mirogabalin besylate
Species/Strain: Rat/F344/DuCrlCrlj	Duration of Dosing: 104 Weeks	Attachment No.: 4.2.3.4.1-4
Initial Age: 6 Weeks	Method of Administration: Oral, gavage	Location in CTD: 4.2.3.4.1
Date of First Dose: [redacted]	Vehicle/Formulation: 0.5% methylcellulose solution/Suspension	
	Treatment of Controls: Vehicle	GLP Compliance: Yes

Basis for High-Dose Selection: Based on the result of a 13-week oral gavage toxicity study in rats. The maximum tolerated dose (MTD) served as the criteria for dose selection. Also the expected maximum exposure level in human of mirogabalin besylate was included in the decision for dose level selection.

Special Features: Dose levels are described as mirogabalin, the free form of mirogabalin besylate. Toxicokinetic evaluations were done on Days 1 and 182. Blood collection was done before dosing (except for Day 1), at 1, 3, 6, and 24 hours after dosing.

Carcinogenicity: In the urinary bladder, statistically significant increase in the incidence of transitional cell papilloma was noted in males receiving 100 mg/kg/day.

Daily Dose (mg/kg)	0 (Control)		10		30		100	
Number of Animals	M:4	F:4	M:4	F:4	M:4	F:4	M:4	F:4
Toxicokinetics (Mirogabalin)[a]								
Cmax (μg/mL)								
Day 1	NE	NE	2.91	3.26	8.70	9.94	18.7	20.7
Week 26 (Day 182)	NE	NE	6.44	5.23	14.9	15.4	32.5	30.4
Tmax (h)								
Day 1	NE	NE	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Week 26 (Day 182)	NE	NE	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
$AUC_{0\text{-}24h}$ (μg·h/mL)								
Day 1	NE	NE	9.70	9.39	30.7	29.2	102	120
Week 26 (Day 182)	NE	NE	16.1	15.4	46.9	44.9	112	113

NE: Not examined
a: Mean values of 3 animals/sex/group/examined date

10.4 ラット 104 週間がん原性試験 (2/9)

Attachment No.: 4.2.3.4.1-4 (Continued)

Daily Dose (mg/kg)	0 (Control)		10		30		100	
Number of Animals	M:120	F:120	M:60	F:60	M:60	F:60	M:60	F:60
Dead or Sacrificed Moribund	30	39	19	13	18	20	20	25
Accidental Deaths	1	1	0	0	0	0	0	1
Terminal Sacrifice	90	81	41	47	42	40	40	35
Survival (%) Unadjusted	75	68	68	78	70	67	67	58
Survival (%) Adjusted[a]	76	68	68	78	70	67	67	59
Body Weight (%)[b]	367.25 g	196.30 g	+2.77**	-2.81**	+0.43	-1.41	-1.21	+1.59
Food Consumption (%)[b]	15.10 g	10.40 g	-1.06	-7.02**	+1.79	-0.10	+5.30**	+8.27**
Number of Animals with Neoplastic Lesions:[c]								
Urinary bladder								
Transitional cell papilloma; Benign	0/120#	0/120	2/60	0/60	1/60	2/60	3/60$	1/59
Transitional cell carcinoma; Malignant	0/120	0/120	0/60	0/60	0/60	0/60	0/60	1/59
Adenocarcinoma; Malignant	0/120	0/120	0/60	1/60	0/60	0/60	0/60	0/59
Endometrial stromal sarcoma; Malignant	0/120	1/120	0/60	0/60	0/60	0/60	0/60	0/59
Abdominal cavity								
Adenocarcinoma; Malignant	0/3	1/5	NE	1/1	0/1	NE	0/2	NE
Mesothelioma; Malignant[d]	3/3	0/5	NE	0/1	1/1	NE	1/2	NE
Schwannoma; Malignant	0/3	1/5	NE	0/1	0/1	NE	0/2	NE
Adrenal								
Cortical adenoma; Benign	1/120	0/120	2/60	3/60$	0/60	0/60	1/60	0/60
Nephroblastoma; Malignant	0/120	0/120	0/60	0/60	0/60	0/60	1/60	0/60
Pheochromocytoma; Benign	13/120	7/120	6/60	2/60	4/60	3/60	8/60	0/60
Pheochromocytoma; Malignant[e]	0/120	0/120	0/60	0/60	0/60	0/60	0/60	2/60

Statistics (vs. Control): ** $P<0.01$ (Dunnett test), #: Significantly positive trend; $P<0.025$ (Trend test, Peto test, rare tumor)
$: Significantly different from the control group; $P<0.05$ (Pairwise comparison test, Peto test, rare tumor)
a Adjusted survival excludes accidental deaths (i.e., denominator is adjusted by excluding the number of accidental deaths from the total number of animals)
b: Values at Day 183 of dosing period. For the control group, group means are shown. For the treated groups, percent differences from the controls are shown. Statistical significance is based on actual data (not on the percent differences).
c: Incidence presented as animals with findings/total number of animals examined.
d: Incidences of primary fatal tumor and secondary incidental tumor are added.
e: Incidences of tumor with and without metastasis are added.

10.4 ラット 104 週間がん原性試験 (3/9)

				Attachment No.: 4.2.3.4.1-4 (Continued)				
Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**		**10**		**30**		**100**	
Number of Animals	M:120	F:120	M:60	F:60	M:60	F:60	M:60	F:60
Number of Animals with Neoplastic Lesions:[a]								
Bone								
Meningioma; Malignant	1/2	NE	NE	NE	NE	NE	0/1	NE
Osteosarcoma; Malignant	0/2	NE	NE	NE	NE	NE	1/1	NE
Brain								
Adenocarcinoma; Malignant [b]	2/120	4/120	2/60	1/60	0/60	1/60	0/60	3/60
Astrocytoma; Malignant	1/120	1/120	0/60	0/60	0/60	0/60	0/60	0/60
Hemangioma; Benign	0/120	0/120	0/60	1/60	0/60	0/60	0/60	0/60
Meningioma; Benign	0/120	0/120	1/60	0/60	0/60	0/60	0/60	0/60
Meningioma; Malignant	1/120	0/120	0/60	0/60	0/60	0/60	0/60	0/60
Mixed Glioma; Malignant	0/120	1/120	0/60	0/60	0/60	0/60	0/60	0/60
Oligodendroglioma; Malignant [b]	0/120	0/120	0/60	1/60	1/60	0/60	0/60	0/60
Clitoral gland								
Adenoma; Benign	NA	2/3	NA	1/1	NA	1/1	NA	NE
Carcinoma; Malignant	NA	1/3	NA	0/1	NA	0/1	NA	NE
Diaphragm								
Adenocarcinoma; Malignant	NE	NE	NE	2/3	NE	NE	NE	NE
Cystadenocarcinoma; Malignant	NE	NE	NE	1/3	NE	NE	NE	NE
Femur								
Osteosarcoma; Malignant	0/120	1/120	0/60	0/60	1/60	0/60	0/60	0/60
Heart								
Schwannoma; Benign	0/120	0/120	2/60	0/60	1/60	1/60	0/60	0/60
Adenocarcinoma; Malignant	0/120	0/120	0/60	1/60	0/60	0/60	0/60	0/60
Jejunum								
Leiomyosarcoma; Malignant	0/110	0/114	1/51	0/56	0/53	0/52	0/50	0/54

NE: Not examined
a: Incidence presented as animals with findings/total number of animals examined.
b: Incidences of fatal and incidental tumor are added.

10.4 ラット 104 週間がん原性試験 (4/9)

					Attachment No.: 4.2.3.4.1-4 (Continued)			
Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**		**10**		**30**		**100**	
Number of Animals	M:120	F:120	M:60	F:60	M:60	F:60	M:60	F:60
Number of Animals with Neoplastic Lesions:[a]								
Kidney								
Nephroblastoma; Malignant	0/120	0/120	0/60	0/60	0/60	0/60	1/60	0/60
Adenoma; Benign	1/120	0/120	0/60	0/60	0/60	0/60	0/60	0/60
Adenocarcinoma; Malignant[b]	1/120	0/120	0/60	0/60	0/60	1/60	0/60	0/60
Liver								
Hemangiosarcoma; Malignant	1/120	0/120	0/60	0/60	0/60	0/60	0/60	0/60
Hepatocellular adenoma; Benign	2/120	3/120	0/60	0/60	0/60	1/60	0/60	0/60
Hepatocellular carcinoma; Malignant[c]	1/120	0/120	1/60	0/60	0/60	0/60	0/60	0/60
Adenocarcinoma; Malignant[c]	0/120	0/120	0/60	1/60	0/60	1/60	0/60	0/60
Lungs (and bronchus)								
Bronchiolar/Alveolar adenoma; Benign	1/120	0/120	0/60	0/60	0/60	0/60	0/60	0/60
Hemangiosarcoma; Malignant	1/120	0/120	0/60	0/60	0/60	0/60	0/60	0/60
Adenocarcinoma; Malignant	0/120	1/120	0/60	1/60	0/60	0/60	0/60	0/60
Carcinoma; Malignant	2/120	0/120	0/60	0/60	0/60	0/60	0/60	0/60
Endometrial stromal sarcoma; Malignant	0/120	1/120	0/60	0/60	0/60	0/60	0/60	0/60
Lymph node								
Adenocarcinoma; Malignant	0/1	0/5	0/1	1/3	0/1	0/3	NE	0/1
Mammary gland								
Adenocarcinoma; Malignant	0/2	0/120	0/2	0/60	1/3	0/60	NE	0/60
Adenoma; Benign	0/2	7/120	0/2	2/60	0/3	2/60	NE	2/60
Fibroadenoma; Benign[c]	2/2	28/120	0/2	7/60	1/3	5/60	NE	7/60
Mesenteric lymph node								
Adenocarcinoma; Malignant	0/120	0/120	0/60	1/60	0/60	0/60	0/60	0/59

NE: Not examined, NA: Not applicable
a: Incidence presented as animals with findings/total number of animals examined.
b: Incidences of tumor with and without metastasis are added.
c: Incidences of fatal and incidental tumor are added.

10.4 ラット 104 週間がん原性試験 (5/9)

					Attachment No.: 4.2.3.4.1-4 (Continued)			
Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**		**10**		**30**		**100**	
Number of Animals	M:120	F:120	M:60	F:60	M:60	F:60	M:60	F:60
Number of Animals with Neoplastic Lesions:[a]								
Multi-centric tumours								
Histiocytic sarcoma; Malignant [b]	1/120	1/120	1/60	0/60	0/60	0/60	0/60	0/60
LGL leukemia; Malignant [b]	16/120	18/120	6/60	13/60	6/60	15/60	3/60	14/60
Malignant lymphoma; Malignant [b]	0/120	2/120	0/60	0/60	0/60	1/60	0/60	0/60
Oral cavity								
Squamous cell carcinoma; Malignant	NE	1/1	NE	NE	NE	NE	NE	NE
Ovary								
Adenocarcinoma; Malignant	NA	0/120	NA	1/60	NA	0/60	NA	0/60
Granulosa cell tumor; Benign	NA	2/120	NA	1/60	NA	0/60	NA	0/60
Granulosa cell tumor; Malignant	NA	1/120	NA	0/60	NA	0/60	NA	0/60
Mixed sex cord stromal tumor; Benign	NA	0/120	NA	0/60	NA	1/60	NA	0/60
Cystadenocarcinoma; Malignant	NA	0/120	NA	1/60	NA	0/60	NA	0/60
Pancreas								
Islet cell carcinoma; Malignant	0/120	0/120	0/60	0/60	0/60	0/60	1/60	0/60
Acinar cell adenoma; Benign	0/120	0/120	0/60	0/60	1/60	0/60	0/60	0/60
Islet cell adenoma; Benign [b]	10/120	1/120	8/60	1/60	4/60	1/60	7/60	1/60
Parathyroid								
Adenoma; Benign	1/120	0/119	1/59	2/60$	0/60	0/60	0/60	0/60
Pinna								
Amelanotic melanoma; Benign	NE	NE	NE	NE	NE	NE	1/1	NE
Pituitary								
Adenoma; Anterior lobe; Benign [b]	38/120	26/120	14/60	18/60	21/60	13/60	14/60	15/60
Adenoma; Intermediate lobe; Benign	0/120	0/120	1/60	1/60	0/60	0/60	0/60	0/60
Adenocarcinoma; Anterior lobe; Malignant [c]	5/120	9/120	6/60	3/60	2/60	1/60	0/60	3/60

NE: Not examined, NA: Not applicable
a: Incidence presented as animals with findings/total number of animals examined.
b: Incidences of fatal and incidental tumor are added.
c: Incidences of tumor with and without metastasis and fatal and incidental tumor are added.

10.4 ラット 104 週間がん原性試験 (6/9)

				Attachment No.: 4.2.3.4.1-4 (Continued)				
Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**		**10**		**30**		**100**	
Number of Animals	M:120	F:120	M:60	F:60	M:60	F:60	M:60	F:60
Number of Animals with Neoplastic Lesions:[a]								
Preputial gland								
Carcinoma; Malignant	1/5	NA	0/2	NA	0/4	NA	0/1	NA
Adenoma; Benign [b]	4/5	NA	1/2	NA	4/4	NA	1/1	NA
Rectum								
Adenoma; Benign	0/115	0/117	1/55	0/58	0/54	0/57	0/50	0/54
Scrotal cavity								
Mesothelioma; Malignant [b]	3/3	NA	1/1	NA	2/2	NA	1/1	NA
Skeletal muscle								
Rhabdomyosarcoma; Malignant	NE	2/2	NE	NE	1/1	NE	NE	NE
Skin								
Basal cell adenoma; Benign	0/120	0/120	0/60	1/60	0/60	2/60	0/60	0/60
Keratoacanthoma; Benign	1/120	0/120	2/60	0/60	1/60	0/60	2/60	0/60
Squamous cell carcinoma; Malignant	0/120	0/120	0/60	1/60	0/60	0/60	0/60	0/60
Sebaceous cell adenoma; Benign	0/120	1/120	0/60	0/60	0/60	0/60	0/60	0/60
Melanoma; Benign	1/120	0/120	1/60	0/60	0/60	0/60	0/60	0/60
Trichoepithelioma; Benign	1/120	0/120	0/60	0/60	0/60	0/60	0/60	0/60
Spinal Cord								
Astrocytoma; Malignant	0/120	0/120	0/60	0/60	0/60	1/60	0/60	0/60
Spleen								
Hemangiosarcoma; Malignant	1/120	0/120	0/60	0/60	0/60	0/60	0/60	0/60
Hemangioma; Benign	0/120	0/120	0/60	0/60	1/60	0/60	0/60	0/60
Stomach								
Squamous cell carcinoma; Malignant	1/120	0/120	0/56	0/59	0/56	0/58	0/54	0/57

NE: Not examined, NA: Not applicable
a: Incidence presented as animals with findings / total number of animals examined.
b: Incidences of fatal and incidental tumor are added.

10.4 ラット 104 週間がん原性試験 (7/9)

					Attachment No.: 4.2.3.4.1-4 (Continued)			
Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**		**10**		**30**		**100**	
Number of Animals	M:120	F:120	M:60	F:60	M:60	F:60	M:60	F:60
Number of Animals with Neoplastic Lesions:[a]								
Subcutis								
Rhabdomyosarcoma; Malignant	0/8	0/4	0/11	0/1	1/9	0/2	1/6	0/3
Schwannoma; Malignant	0/8	0/4	0/11	0/1	0/9	0/2	1/6	0/3
Fibroma; Benign [b]	5/8	0/4	10/11&	0/1	7/9	0/2	3/6	0/3
Fibrosarcoma; Malignant [c]	0/8	0/4	0/11	1/1	0/9	2/2	1/6	0/3
Lipoma; Benign	1/8	0/4	0/11	0/1	1/9	0/2	0/6	0/3
Malignant fibrous histiocytoma; Malignant	1/8	0/4	0/11	0/1	0/9	0/2	0/6	0/3
Basal cell carcinoma; Malignant	0/8	0/4	0/11	0/1	0/9	0/2	0/6	1/3
Extraskeletal osteosarcoma; Malignant	0/8	0/4	0/11	0/1	0/9	0/2	0/6	1/3
Endometrial stromal sarcoma; Malignant	0/8	1/4	0/11	0/1	0/9	0/2	0/6	0/3
Sublingual gland								
Schwannoma; Malignant	0/120	0/120	0/60	0/60	0/60	0/60	1/60	0/60
Submandibular gland								
Adenocarcinoma; Malignant	0/120	0/120	1/60	0/60	0/60	0/60	0/60	0/60
Schwannoma; Malignant	0/120	0/120	0/60	0/60	0/60	0/60	1/60	0/60
Testis								
Interstitial cell tumor; Benign	105/120	NA	47/60	NA	46/60	NA	51/60	NA
Thoracic Cavity								
Schwannoma; Malignant	0/2	0/1	0/1	NE	NE	1/1	NE	0/1
Thymus								
Thymoma; Benign	0/120	0/119	1/60	1/60	0/60	0/60	1/60	0/60
Fibrosarcoma; Malignant	0/120	0/119	0/60	0/60	0/60	1/60	0/60	0/60
Schwannoma; Malignant	0/120	0/119	0/60	0/60	0/60	1/60	0/60	0/60

NE: Not examined, NA: Not applicable
&: Significantly different from the control group (incidental and fatal); $P < 0.01$ (Pairwise comparison test, Peto test, common tumor)
a: Incidence presented as animals with findings/total number of animals examined.
b: Incidences of fatal and incidental tumor are added.
c: Incidences of tumor with and without metastasis and fatal and incidental tumor are added.

10.4 ラット 104 週間がん原性試験 (8/9)

				Attachment No.: 4.2.3.4.1-4 (Continued)				
Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**		**10**		**30**		**100**	
Number of Animals	M:120	F:120	M:60	F:60	M:60	F:60	M:60	F:60
Number of Animals with Neoplastic Lesions:[a]								
Thyroid								
C-cell adenoma; Benign	42/120	24/120	25/60	17/60	16/60	9/60	21/60	11/60
C-cell carcinoma; Malignant [b]	4/120	2/120	1/60	1/60	1/60	1/60	1/60	0/60
Follicular cell adenoma; Benign	1/120	0/120	0/60	0/60	1/60	2/60	1/60	0/60
Tongue								
Papilloma; Benign	1/120	1/120	0/60	0/60	0/60	0/60	0/60	0/60
Squamous cell carcinoma; Malignant	1/120	0/120	0/60	0/60	0/60	0/60	0/60	0/60
Schwannoma; Malignant	0/120	0/120	0/60	0/60	0/60	0/60	1/60	0/60
Uterus								
Adenocarcinoma; Malignant [c]	NA	4/120	NA	1/60	NA	3/60	NA	1/58
Endometrial stromal polyp; Benign [b]	NA	16/120	NA	4/60	NA	3/60	NA	4/58
Endometrial stromal sarcoma; Malignant[b]	NA	3/120	NA	1/60	NA	2/60	NA	0/58
Glandular polyp; Benign[b]	NA	1/120	NA	1/60	NA	0/60	NA	0/58
Leiomyosarcoma; Malignant	NA	1/120	NA	0/60	NA	1/60	NA	0/58
Adenoma; Benign	NA	1/120	NA	0/60	NA	0/60	NA	1/58
Vagina								
Stromal polyp; Benign	NA	1/118	NA	1/57	NA	0/57	NA	0/58
Leiomyosarcoma; Malignant	NA	1/118	NA	0/57	NA	0/57	NA	0/58
Squamous cell carcinoma; Malignant	NA	0/118	NA	1/57	NA	0/57	NA	0/58
Granular cell tumor; Malignant	NA	1/118	NA	0/57	NA	0/57	NA	0/58
Papilloma, Benign	NA	0/118	NA	0/57	NA	0/57	NA	1/58
Stromal sarcoma; Malignant	NA	1/118	NA	0/57	NA	0/57	NA	1/58
Endometrial stromal sarcoma; Malignant	NA	1/118	NA	0/57	NA	0/57	NA	0/58

NA: Not applicable
a: Incidence presented as animals with findings/total number of animals examined.
b: Incidences of fatal and incidental tumor are added.
c: Incidences of tumor with and without metastasis and fatal and incidental tumor are added.

10.4 ラット 104 週間がん原性試験 (9/9)

	Attachment No.: 4.2.3.4.1-4 (Continued)							
Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**		**10**		**30**		**100**	
Number of Animals	M:120	F:120	M:60	F:60	M:60	F:60	M:60	F:60
Number of Animals with Neoplastic Lesions:[a]								
Zymbal's gland								
Adenoma; Benign	0/2	NE	NE	NE	1/2	NE	1/1	NE
Carcinoma; Malignant[b]	1/2	NE	NE	NE	1/2	NE	0/1	NE
Noteworthy Findings:								
Hematology	-	-	-	-	-	-	-	-
Gross Pathology [a]								
Eyeball: Opacity	9/120	9/120	2/60	2/60	11/60	11/60	16/60	29/60
Histopathology - Non-Neoplastic Lesions[a]								
Eyeball: Mineralization, cornea, focal	7/120	7/120	2/60	4/60	15/60	19/60	34/59	40/60
Eyeball: Pannus, cornea	0/120	0/120	0/60	1/60	0/60	1/60	2/59	9/60
Submandibular gland: atrophy	0/120	0/120	1/60	0/60	9/60	10/60	20/60	19/60
Sublingual gland: atrophy	1/120	1/120	2/60	0/60	11/60	15/60	23/60	24/60

NE: Not examined, -: No noteworthy findings
a: Incidence presented as animals with findings/total number of animals examined.
b: Incidences of fatal and incidental tumor are added.

10.5 ラットにおける膀胱腫瘍発生機序試験 1

Report Title: Mechanistic Study for Urinary Bladder Tumor in Rats (1) - Mitogenesis Examination of Urothelium in the Urinary Bladder using Specimen of Repeated Dose Toxicity Study in Rats Treated Orally with DS-5565 for 3 Months or 6 Months –				**Test Article: Mirogabalin besylate**			
Species/Strain: Rat/F344/DuCrlCrlj		**Duration of Dosing: 13 or 26 weeks**		**Attachment No.: 4.2.3.4.3-1**			
Initial Age: 9 weeks		**Duration of Postdose: None**		**Location in CTD: 4.2.3.4.3**			
Date of First Dose: [redacted]		**Method of Administration: Oral, gavage**					
		Vehicle/Formulation: 0.5% methylcellulose solution/Suspension		**GLP Compliance: No**			
Special Features: Dose levels are described as mirogabalin, the free form of mirogabalin besylate. Proliferative activity of epithelial cells in the urinary bladder obtained from 4.2.3.2-4 and 4.2.3.2-5 was assessed.							
Conclusion: Mirogabalin besylate did not induce the proliferative activity of epithelial cells in the urinary bladder of rats treated orally for 13 or 26 weeks.							
Duration of Dosing	**13 weeks**			**26 weeks**			
Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**	**10**	**100**	**0 (Control)**	**10**	**30**	**100**
Number of Animals	M:10	M:10	M:10	M:10	M:10	M:10	M:10
Immunohistochemistry							
Ki-67 positive cells (%)	0.11	0.03 *	0.12	0.14	0.20	0.18	0.30

Statistics (vs. Control): *$P<0.05$ (Dunnett test)

10.6 ラットにおける膀胱腫瘍発生機序試験 2 (1/3)

Report Title: Mechanistic Study for Urinary Bladder Tumor in Rats (2) - Examination of Effect on Urine and Urothelium in the Urinary Bladder in Repeated Dose Toxicity Study in Rats Treated Orally with DS-5565 for 28 days –			**Test Article: Mirogabalin besylate**
Species/Strain: Rat/F344/DuCrlCrlj		**Duration of Dosing: 4 weeks**	**Attachment No.: 4.2.3.4.3-2**
Initial Age: 6 weeks		**Duration of Postdose: None**	**Location in CTD: 4.2.3.4.3**
Date of First Dose: [redacted]		**Method of Administration: Oral, gavage**	
		Vehicle/Formulation: 0.5% methylcellulose solution/Suspension	**GLP Compliance: No**

Special Features:
Dose levels are described as mirogabalin, the free form of mirogabalin besylate.
Mirogabalin and A204-4455 (metabolite lactam body) concentrations in plasma and urine were measured after a single dose at the same age at the end of the 28-day dosing period (9 weeks age).

Effect on Urine and Urothelium in the Urinary Bladder:
Urinary microcrystals increased at 10 mg/kg/day and above; however, no clear dose-dependency was observed in the incidence or severity. Neither cytotoxicity nor proliferative activity in the urinary bladder urothelium was noted up to 100 mg/kg/day.

Daily Dose (mg/kg)		**0 (Control)**	**10**	**30**	**100**
Number of Animals/Time Point		M:0	M:4	M: 4	M:4
Plasma Concentration					
Mirogabalin (μg/mL)	1 hour		2.66	7.77	17.8
	4 hours		0.497	1.23	5.98
	8 hours		0.0977	0.364	1.88
A204-4455 (μg/mL)	1 hour		0.0749	0.214	0.470
	4 hours		0.0385	0.128	0.222
	8 hours		0.00715	0.0243	0.0705
Urine Concentration					
Mirogabalin (μg/mL)	1 hour		649	1360	3850
	4 hours		782	1730	4500
	8 hours		274	997	2150
A204-4455 (μg/mL)	1 hour		0.625	1.32	2.71
	4 hours		0.934	1.80	2.99
	8 hours		0.293	0.795	1.600

10.6 ラットにおける膀胱腫瘍発生機序試験 2 (2/3)

		Attachment No.: 4.2.3.4.3-2 (Continued)			
		0 (Control)	**10**	**30**	**100**
Number of Animals		M:10	M:9[a]	M:10	M:10
Noteworthy Findings					
Dead or Sacrificed Moribund		0	0	0	0
Clinical Observations					
Decrease in locomotor activity		0	0	2	10
Staggering Gait		0	0	10	10
Body Weight (%)[b]		226.09 g	+2	0	+1
Food Consumption (%)[c]		15.05 g/day	+1	+2	+8
Urinalysis: Scanning electron microscope analysis of urinary microcrystals[d]					
Small	Minimal	0	2	1	0
	Mild	0	0	1	0
	Moderate	0	0	0	0
Usual	Minimal	0	0	1	1
	Mild	0	1	3	2
	Moderate	0	1	0	1
Large	Minimal	0	1	2	1
	Mild	0	0	1	0
	Moderate	0	0	0	0
Rod	Minimal	0	0	0	0
	Mild	0	1	0	1
	Moderate	0	2	2	0
Needle-like	Minimal	0	0	0	0
	Mild	0	0	0	0
	Moderate	0	0	1	0

a: All data obtained from 1 male at 10 mg/kg/day were omitted from evaluation because they were inappropriate for evaluation due to the presence of abnormalities related to incidental urinary system lesions.
b: Values at Day 28. For the control group, group means are shown. For the treated groups, percent differences from the controls are shown.
c: Values at Day 25. For the control group, group means are shown. For the treated groups, percent differences from the controls are shown.
d: N=9 for control and 100 mg/kg/day groups.

10.6 ラットにおける膀胱腫瘍発生機序試験 2 (3/3)

		Attachment No.: 4.2.3.4.3-2 (Continued)			
Daily Dose (mg/kg)		**0 (Control)**	**10**	**30**	**100**
Number of Animals		M:10	M:9[a]	M:10	M:10
Urinalysis: Scanning electron microscope analysis of urinary microcrystals[b]					
Scale-like	Minimal	0	0	0	0
	Mild	0	0	0	0
	Moderate	0	0	0	0
Unclassified	Minimal	1	1	2	3
	Mild	0	0	0	0
	Moderate	0	0	0	0
Urine Volume (mL)		6.08	6.20	7.18	7.80**
Blood Chemistry		-	-	-	-
Gross Pathology		-	-	-	-
Histopathology of the Urinary Bladder		-	-	-	-
BrdU index of the Urinary Bladder Urothelial Cells (%)		0.0799	0.1000	0.1066	0.1600
Scanning Electron Microscope Analysis of the Urinary Bladder		-	-	-	-

-: No noteworthy findings, BrdU: 5-bromo-2'-deoxyuridine
Statistics (vs. Control): ** $P < 0.01$ (Dunnett test) Statistical significance is based on actual data (not on the percent differences)
a: All data obtained from 1 male at 10 mg/kg/day were omitted from evaluation because they were inappropriate for evaluation due to the presence of abnormalities related to incidental urinary system lesions.
b: N=9 for control and 100 mg/kg/day groups.

10.7 ラットにおける膀胱腫瘍発生機序試験 3

Report Title: Mechanistic Study for Urinary Bladder Tumor in Rats (3) - Mitogenesis examination of urothelium in the urinary bladder using specimen of oral carcinogenicity study in rats treated with DS-5565 for 24 months -			**Test Article: Mirogabalin besylate**	
Species/Strain: Rat/F344/DuCrlCrlj	**Duration of Dosing: 104 weeks**		**Attachment No.: 4.2.3.4.3-3**	
Initial Age: 6 weeks	**Duration of Postdose: None**		**Location in CTD: 4.2.3.4.3**	
Date of First Dose: [redacted]	**Method of Administration: Oral, gavage**			
	Vehicle/Formulation: 0.5% methylcellulose solution/Suspension		**GLP Compliance: No**	
Special Features: Dose levels are described as mirogabalin, the free form of mirogabalin besylate. Proliferative activity of epithelial cells in the urinary bladder obtained from 4.2.3.4.1-4 was assessed. In each group twenty animals without any histopathological findings in the urinary bladders were selected randomly.				
Conclusion: Mirogabalin besylate did not induce the proliferative activity of epithelial cells in the urinary bladder of rats treated orally for 104 weeks.				
Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**	**10**	**30**	**100**
Number of Animals	M:20	M:20	M:20	M:20
Immunohistochemistry				
Ki-67 positive cells mean (%)	1.896	0.156	0.202	0.073
Ki-67 positive cells median (%)	0.053	0.054	0.076	0.039

11. 生殖発生毒性試験：重要な試験以外の試験

				Test Article: Mirogabalin besylate		
Species/ Strain	**Method of Administration (Vehicle/ Formulation)**	**Dosing Period**	**Doses mg/kg**	**No. per Group**	**Noteworthy Findings**	**Attachment Number**
Rat/Crl:CD(SD)	Oral, gavage (0.5% methylcellulose solution/Suspension)	Day 7 to Day 17 of pregnancy	0, 100, 300, 1000	6 to 8 Pregnant females	≥100: hypoactivity, staggering gait, gait disturbance ≥300: Soiled perineal region 1000: Lower body weight (dams and fetuses), lower food consumption, smudge of perinasal area	**4.2.3.5.2-1**
Rabbit/Kbl:NZW	Oral, gavage (0.5% methylcellulose solution/Suspension)	Day 6 to Day 18 of pregnancy	0, 30, 100, 300, 1000	7 Pregnant females	≥30: Lower body weight (dams) and food consumption, hypoactivity, staggering gait ≥100: Lower body weight (fetuses) ≥300: Gait disturbance 100 and 1000: Abortion 1000: Deaths	**4.2.3.5.2-4**
Rat/Crl:CD(SD)	Oral, gavage (0.5% methylcellulose solution/Suspension)	Day 7 of pregnancy to Day 21 of lactation	0, 10, 30, 100	7 or 8 Pregnant females	≥30: Decrease in spontaneous activity 100: Impossible gait, severe change in gait, parturient abnormality with external genital bleeding and total litter loss, prolongation of the pregnancy period, low number of live pups and live birth index	**4.2.3.5.3-1**

12. 生殖発生毒性試験：受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験

12.1 ラット受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験 (1/4)

Report Title: Study for Effects of DS-5565 Administered Orally on Fertility and Early Embryonic Development to Implantation in Rats									**Test Article: Mirogabalin besylate**
Design similar to ICH 4.1.1: Yes	**Duration of Dosing: M: 2 weeks before mating to copulation, F: 2 weeks before mating to Day 7 of Pregnancy**								**Attachment No.: 4.2.3.5.1-1**
Species/Strain: Rat/Crl:CD(SD)	**Day of Mating: Day 0 of Pregnancy**								**Location in CTD: 4.2.3.5.1**
Initial Age: M: 11 weeks, F: 8 weeks	**Day of C-Section: Day 14 of Pregnancy**								
Date of First Dose: [redacted]	**Method of Administration: Oral, Gavage**								**GLP Compliance: Yes**
	Vehicle/Formulation: 0.5% methylcellulose solution/Suspension								
Special Features: Dose levels are described as mirogabalin, the free form of mirogabalin besylate. Toxicokinetics study was done on first day of dosing and final day of dosing. Blood collection was done prior to dosing (final day of dosing only) and at 1, 3, 6, and 24 hours after dosing.									
No Observed Adverse Effect Level: F0 Male and Female General Toxicity: 30 mg/kg/day F0 Male Reproduction: 100 mg/kg/day F0 Female Reproduction: 30 mg/kg/day F1 Litters: 100 mg/kg/day									
Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**		**10**		**30**		**100**		
Number of Animals	M:5	F:5	M:5	F:5	M:5	F:5	M:5	F:5	
Toxicokinetics (Mirogabalin)									
Cmax (μg/mL)									
First day of Dosing	NE	NE	3.15	3.14	7.68	8.38	16.9	15.0	
Final day of Dosing	NE	NE	3.04	3.54[a]	7.68	7.16	17.3[a]	18.8[a]	
Tmax (h)									
First day of Dosing	NE	NE	1.0	1.0	1.0	1.0	1.8	1.0	
Final day of Dosing	NE	NE	1.0	1.0[a]	1.0	1.0	2.0[a]	2.0[a]	
$AUC_{0\text{-}24h}$ (μg·h/mL)									
First day of Dosing	NE	NE	8.51	6.75	26.3	23.1	119	69.6	
Final day of Dosing	NE	NE	8.54	7.94[a]	26.8	26.5	105[a]	105[a]	

NE: Not examined
a: N = 4

12.1 受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験 (2/4)

					Attachment No.: 4.2.3.5.1-1 (Continued)			
Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**		**10**		**30**		**100**	
Number of Animals	M:20	F:20	M:20	F:20	M:20	F:20	M:20	F:20
Dead or Sacrificed Moribund	0	0	0	0	0	0	0	0
Clinical Observations								
Decreased Activity	0	0	0	0	9	8	19	17
Staggering Gait	0	0	0	0	2	10	15	16
Gait Disturbance	0	0	0	0	0	0	1	6
Body Weight (%) Day 14 of Dosing[a]	453.7 g	237.6 g	0	0	0	−2	−2	0
Body Weight (%) Day 14 of Pregnancy[a]		333.2 g		+1		−3[b]		−5*[b]
Food Consumption (%) Day 14 of Dosing[a]	24.2 g	18.5 g	−2	−1	+5	−8	+1	−2
Food Consumption (%) Day 14 of Pregnancy[a]		24.1 g		−4		−12**[b]		−14**[b]
Necropsy Findings	-	-	-	-	-	-	-	-

-: No noteworthy findings
Statistics (vs. Control): $*P < 0.05$, $**P < 0.01$ (Dunnett test)
a: For the control group, group means are shown. For the treated groups, percent differences from the controls are shown. Statistical significance is based on actual data (not on the percent differences).
b: N = 19

12.1 受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験 (3/4)

		Attachment No.: 4.2.3.5.1-1 (Continued)		
Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**	**10**	**30**	**100**
Males				
Number of Animals	20	20	20	20
Mean Number of Days Prior to Mating	2.4	2.5	3.3	1.7
Number of Males that Mated	20	20	20	20
Number of Fertile Males	20	20	19	19
Fertility index (%)	100.0	100.0	95.0	95.0
Organ Weight				
Testes				
Absolute Weight (%)[a]	3.104 g	+1	+5	+4
Relative Weight (%)[a]	0.690 g%	+2	+4	+6
Epididymides				
Absolute Weight (%)[a]	0.994 g	+3	+9*	+7
Relative Weight (%)[a]	0.221 g%	+3	+8	+8
Number of Sperm ($\times 10^6$/g Testis)	110.57	104.04	99.26#	100.96#
Sperm Motility (%)	84.2	80.8	83.6	86.9
Sperm Abnormality (%)	5.26	6.75	5.78	6.11

Statistics (vs. Control): $*P < 0.05$ (Dunnett test), $\#P < 0.05$ (Nonparametric Dunnett test/Joint ranking method)
a: For the control group, group means are shown. For the treated groups, percent differences from the controls are shown. Statistical significance is based on actual data (not on the percent differences).

12.1 受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験 (4/4)

		Attachment No.: 4.2.3.5.1-1 (Continued)		
Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**	**10**	**30**	**100**
Females				
Number of Animals	20	20	20	20
Estrous Cycle				
Persistent diestrus (pseudopregnant)	0	0	1	0
Persistent Proestrous or Estrous	0	0	0	4
Mean Number of Estrous Cycle/14 Days	4.1	4.2	4.4	4.9
Mean Number of Days Prior to Mating	2.4	2.5	3.3	1.7
Number of Females Sperm-Positive	20	20	20	20
Number of Pregnant Females	20	20	19	19
Fertility index (%)	100.0	100.0	95.0	95.0
Number of Aborted or Total Resorption of Litter	0	0	0	0
Mean Number of Corpora Lutea	16.4	16.8	16.6	17.1
Mean Number of Implantations	15.8	16.0	14.6	16.2
Mean % Preimplantation Loss	3.6	4.5	12.9	5.4
Mean Number of Live Embryos	15.1	15.1	14.1	15.3
Mean Number of Resorptions	0.7	1.0	0.5	0.8
Number of Dead Embryos	14	19	9	16
Mean % Postimplantation Loss	4.7	6.0	2.9	5.3

13. 生殖発生毒性試験：胚・胎児発生に関する試験

13.1 ラット胚・胎児発生に関する試験 (1/3)

Report-Title: Study for Effects of DS-5565 Administered Orally on Embryo-fetal Development in Rats				**Test Article: Mirogabalin besylate**
Design similar to ICH 4.1.3: Yes	**Duration of Dosing: Day 7 to Day 17 of Pregnancy**			**Attachment No.: 4.2.3.5.2-2**
	Day of Mating: Day 0 of Pregnancy			
Species/Strain: Rat/Crl:CD(SD)	**Day of C-Section: Day 20 of Pregnancy**			**Location in CTD: 4.2.3.5.2**
Initial Age: 10 weeks	**Method of Administration: Oral, Gavage**			
Date of First Dose: [redacted]	**Vehicle/Formulation: 0.5% methylcellulose solution/Suspension**			**GLP Compliance: Yes**
Special Features: Dose levels are described as mirogabalin, the free form of mirogabalin besylate. Toxicokinetics study was done on Day 7 and Day 17 of pregnancy. Blood collection was done prior to dosing (Day 17 of pregnancy only) and at 1, 3, 6, and 24 hours after dosing.				
No Observed Adverse Event Level: F0 Female General Toxicity: less than 100 mg/kg/day F0 Female Reproduction: 1000 mg/kg/day F1 Litters: less than 100 mg/kg/day				
Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**	**100**	**300**	**1000**
Number of animals	5	5	5	4
Toxicokinetics (Mirogabalin)				
Cmax (μg/mL)				
Day 7 of Pregnancy	NE	17.5	26.1	42.1
Day 17 of Pregnancy	NE	21.5	35.7[a]	84.3
Tmax (h)				
Day 7 of Pregnancy	NE	1.4	2.2	2.5
Day 17 of Pregnancy	NE	1.8	3.8[a]	4.5
$AUC_{0\text{-}24h}$ (μg·h/mL)				
Day 7 of Pregnancy	NE	125	267	558
Day 17 of Pregnancy	NE	171	429[a]	1120

NE: Not examined
a: N = 4. One animal died on Day 11 of pregnancy.

13.1 ラット胚・胎児発生に関する試験 (2/3)

		Attachment No.: 4.2.3.5.2-2 (Continued)		
Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**	**100**	**300**	**1000**
Number of Pregnant	21	22	21	21
Dead or Sacrificed Moribund	0	0	0	2[a]
Aborted	0	0	0	0
Clinical Observations				
Prone Position	0	0	0	1
Hypoactivity	0	18	20	21
Gait Disturbance	0	9	10	14
Staggering Gait	0	20	17	20
Irregular respiration	0	0	0	2
Smudge of Perinasal Area	0	0	0	2
Soiled Perineal Region	0	0	1	16
Necropsy Observations	-	-	-	-
Body Weight (%)[b,c]: Day 17 of Pregnancy	368.2 g	0	0	−5
Body Weight (%)[c]: Day 20 of Pregnancy	418.8 g	−6*	−9**	−13**
Food Consumption (%)[b,c]: Day 17 of Pregnancy	25.0 g	8#	10#	4
Food Consumption (%)[c]: Day 20 of Pregnancy	25.2 g	−40##	−56##	−40##
Number of Litters Evaluated	21	22	21	19
Number of Total Resorption of Litter	0	0	0	0
Mean Number of Corpora Lutea	15.9	16.2	16.8	16.1
Mean Number of Implantations	14.1	14.6	15.9	15.4
Mean % Preimplantation Loss	11.0	10.7	4.7	4.0
Placental Findings	-	-	-	-

-: No noteworthy findings
Statistics (vs. Control): * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ (Dunnett test), # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ (Nonparametric Dunnett test/Joint ranking method)
a: Two animals died on Day 8 or Day 9 of pregnancy.
b: At end of dosing period.
c: For the control group, group means are shown. For the treated groups, percent differences from the controls are shown. Statistical significance is based on actual data (not on the percent differences).

13.1 ラット胚・胎児発生に関する試験 (3/3)

	Attachment No.: 4.2.3.5.2-2 (Continued)			
Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**	**100**	**300**	**1000**
Number of Litters Evaluated	21	22	21	19
Number of Live Fetuses (Mean)	288 (13.7)	314 (14.3)	315 (15.0)	255 (13.4)
Number of Resorptions (Mean)	9 (0.4)	6 (0.3)	18 (0.9)	35 (1.8)
Number of Dead Fetuses (Mean)	0 (0.0)	1 (0.0)	1 (0.0)	2 (0.1)
Number of Litters with No Live Fetuses	0	0	0	0
Number of Litters with Dead Fetuses	0	1	1	2
Mean % Postimplantation Loss	2.9	2.3	5.6	12.5
Mean Fetal Body Weight (%)[a]: Male	4.21 g	−7##	−9##	−18##
Mean Fetal Body Weight (%)[a]: Female	3.97 g	−6*	−9**	−16**
Fetal Sex Ratios (% males)	54.0	54.7	52.2	50.0
External Observation				
Number of Fetuses Examined	288	314	315	255
Anomalies	-	-	-	-
Visceral Observation				
Number of Fetuses Examined	139	NE	NE	124
Anomalies	-	-	-	-
Skeletal Observation				
Number of Fetuses Examined	149	NE	NE	131
Anomalies	-			-
Variations	-			-
Number of Fetuses (%)	13 (8.1)			28 (27.5)@
Number of Litters (%)	8 (38.1)			12 (63.2)
Unossified thoracic centrum				
Number of Fetuses (%)	0 (0.0)			14 (11.0) @
Number of Litters (%)	0 (0.0)			5 (26.3)
Ossifications				
Number of Sacrocaudal Vertebrae	8.4			7.5##

-: No noteworthy findings, NE: Not examined
Statistics (vs. Control): * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ (Dunnett test), ## $P < 0.01$ (Nonparametric Dunnett test/Joint ranking method), @ $P < 0.05$ (Wilcoxon test)
a: For the control group, group means are shown. For the treated groups, percent differences from the controls are shown. Statistical significance is based on actual data (not on the percent differences).

13.2 ラット胚・胎児発生に関する試験（低用量追加試験）(1/3)

Report Title: Study for Effects of DS-5565 Administered Orally on Embryo-fetal Development in Rats (Additional Low Dose Study)			**Test Article: Mirogabalin besylate**
Design similar to ICH 4.1.3: Yes	**Duration of Dosing: Day 7 to Day 17 of Pregnancy**		**Attachment No.: 4.2.3.5.2-3**
	Day of Mating: Day 0 of Pregnancy		
Species/Strain: Rat/Crl:CD(SD)	**Day of C-Section: Day 20 of Pregnancy**		**Location in CTD: 4.2.3.5.2**
Initial Age: 10 weeks	**Method of Administration: Oral, Gavage**		
Date of First Dose: [redacted]	**Vehicle/Formulation: 0.5% methylcellulose solution/Suspension**		**GLP Compliance: Yes**
Special Features: Dose levels are described as mirogabalin, the free form of mirogabalin besylate. Toxicokinetics study was done on Day 7 and Day 17 of pregnancy. Blood collection was done prior to dosing (Day 17 of pregnancy only) and at 1, 3, 6, and 24 hours after dosing.			
No Observed Adverse Event Level: F0 Female General Toxicity: 30 mg/kg/day F1 Litters: 10 mg/kg/day			
Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**	**10**	**30**
Number of Animals	5	5	5
Toxicokinetics (Mirogabalin)			
Cmax (μg/mL)			
Day 7 of Pregnancy	NE	3.02	7.92
Day 17 of Pregnancy	NE	4.57	7.88
Tmax (h)			
Day 7 of Pregnancy	NE	1.0	1.0
Day 17 of Pregnancy	NE	1.0	1.4
$AUC_{0\text{-}24h}$ (μg·h/mL)			
Day 7 of Pregnancy	NE	12.8	33.3
Day 17 of Pregnancy	NE	15.5	46.0

NE: Not examined

13.2 ラット胚・胎児発生に関する試験（低用量追加試験）(2/3)

		Attachment No.: 4.2.3.5.2-3 (Continued)	
Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**	**10**	**30**
Number of Pregnant	22	22	22
Dead or Sacrificed Moribund	0	0	0
Aborted	0	0	0
Clinical Observations	-	-	-
Necropsy Observations	-	-	-
Body Weight (%)[a,b] Day 17 of Pregnancy	360.0 g	+4*	+4*
Food Consumption (%)[a,b] Day 17 of Pregnancy	24.1 g	+7*	+12**
Food Consumption (%)[b] Day 20 of Pregnancy	23.8 g	−5	−18**
Number of Litters Evaluated	22	22	22
Number of Total Resorption of Litter	0	0	0
Mean Number of Corpora Lutea	15.8	17.0	16.1
Mean Number of Implantations	14.7	16.6*	15.0
Mean % Preimplantation Loss	6.5	2.5 #	6.0
Placental Findings	-	-	-

-: No noteworthy findings
Statistics (vs. Control): * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ (Dunnett test), # $P < 0.05$ (Nonparametric Dunnett test/Joint ranking method)
a: At end of dosing period.
b: For the control group, group means are shown. For the treated groups, percent differences from the controls are shown. Statistical significance is based on actual data (not on the percent differences).

13.2 ラット胚・胎児発生に関する試験（低用量追加試験）(3/3)

		Attachment No.: 4.2.3.5.2-3 (Continued)	
Daily Dose (mg/kg)	0 (Control)	10	30
Number of Litters Evaluated	22	22	22
Number of Live Fetuses (Mean)	304 (13.8)	338 (15.4)	322 (14.6)
Number of Resorptions (Mean)	20 (0.9)	26 (1.2)	8 (0.4)
Number of Dead Fetuses (Mean)	0 (0.0)	1 (0.0)	1 (0.0)
Number of Litters with No Live Fetuses	0	0	0
Number of Litters with Dead Fetuses	0	1	1
Mean % Postimplantation Loss	6.3	7.4	2.8
Mean Fetal Body Weight (%)[a]: Male	4.17 g	−3	−5#
Mean Fetal Body Weight (%)[a]: Female	3.94 g	−3	−2
Fetal Sex Ratios (% males)	49.4	48.9	48.7
External Observation			
Number of Fetuses Examined	304	338	322
Number of Litters Evaluated	22	22	22
Anomalies	-	-	-

-: No noteworthy findings
Statistics (vs. Control): # $P < 0.05$ (Nonparametric Dunnett test/Joint ranking method)
a: For the control group, group means are shown. For the treated groups, percent differences from the controls are shown. Statistical significance is based on actual data (not on the percent differences).

13.3 ウサギ胚・胎児発生に関する試験 (1/3)

Report Title: Study for Effects of DS-5565 Administered Orally on Embryo-fetal Development in Rabbits				**Test Article: Mirogabalin besylate**
Design similar to ICH 4.1.3: Yes	**Duration of Dosing: Day 6 to Day 18 of Pregnancy**			**Attachment No.: 4.2.3.5.2-5**
	Day of Mating: Day 0 of Pregnancy			
Species/Strain: Rabbit/Kbl:NZW	**Day of C-Section: Day 28 of Pregnancy**			**Location in CTD: 4.2.3.5.2**
Initial Age: 19 weeks age	**Method of Administration: Oral, Gavage**			
Date of First Dose: [redacted]	**Vehicle/Formulation: 0.5% methylcellulose solution/Suspension**			**GLP Compliance: Yes**
Special Features: Dose levels are described as mirogabalin, the free form of mirogabalin besylate. Toxicokinetics study was done on Day 6 and Day 18 of pregnancy. Blood collection was done prior to dosing (Day 18 of pregnancy only) and at 1, 2, 4, 7, and 24 hours after dosing.				
No Observed Adverse Event Level: F0 Female General Toxicity: less than 10 mg/kg/day F0 Female Reproduction: 30 mg/kg/day F1 Litters: 10 mg/kg/day				
Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**	**10**	**30**	**100**
Number of Animals	5	5	5	5
Toxicokinetics (Mirogabalin)				
Cmax (μg/mL)				
Day 6 of Pregnancy	NE	3.46	9.89	27.8
Day 18 of Pregnancy	NE	3.07	9.21[a]	26.4
Tmax (h)				
Day 6 of Pregnancy	NE	1.0	1.0	1.0
Day 18 of Pregnancy	NE	1.0	1.0[a]	1.0
$AUC_{0\text{-}24h}$ (μg·h/mL)				
Day 6 of Pregnancy	NE	10.3	28.8	101
Day 18 of Pregnancy	NE	9.25	21.1[a]	69.3

NE: Not examined
a: N = 4. One animal died on Day 18 of pregnancy.

13.3 ウサギ胚・胎児発生に関する試験 (2/3)

		Attachment No.: 4.2.3.5.2-5 (Continued)		
Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**	**10**	**30**	**100**
Number of Pregnant	19	18	18	18
Dead or Sacrificed Moribund	0	0	1	0
Aborted	0	0	0	1
Clinical Observations				
Hypoactivity	0	0	1	10
Staggering Gait	0	0	16	18
Necropsy Observations	-	-	-	-
Body Weight (%)[a,b]: Day 18 of Pregnancy	3.7633 kg	+2	+3	+1
Body Weight (%)[b]: Day 24 of Pregnancy	3.8493 kg	−3	−4	−7**
Food Consumption (%)[a,b]: Day 18 of Pregnancy	140.6 g	+7	+1	+7
Food Consumption (%)[b]: Day 24 of Pregnancy	128.0 g	−28*	−54**	−-69**
Number of Litters Evaluated	19	18	17	17
Number of Total Resorption of Litter	0	0	0	0
Mean Number of Corpora Lutea	10.4	9.9	10.8	9.4
Mean Number of Implantations	9.7	9.6	10.1	9.0
Mean % Preimplantation Loss	5.7	4.0	6.0	4.0
Placental Findings	-	-	-	-

-: No noteworthy findings
Statistics (vs. Control): * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ (Dunnett test)
a: At end of dosing period.
b:. For the control group, group means are shown. For the treated groups, percent differences from the controls are shown. Statistical significance is based on actual data (not on the percent differences).

13.3 ウサギ胚・胎児発生に関する試験 (3/3)

		Attachment No.: 4.2.3.5.2-5 (Continued)		
Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**	**10**	**30**	**100**
Number of Litters Evaluated	19	18	17	17
Number of Live Fetuses (Mean)	170 (8.9)	156 (8.7)	167 (9.8)	143 (8.4)
Number of Resorptions (Mean)	7 (0.4)	5 (0.3)	2 (0.1)	1 (0.1)
Number of Dead Fetuses (Mean)	8 (0.4)	11 (0.6)	3 (0.2)	9 (0.5)
Number of Litters with No Live Fetuses	0	0	0	0
Number of Litters with Dead Fetuses	5	4	3	6
Mean % Postimplantation Loss	7.7	8.5	2.9	5.8
Mean Fetal Body Weight (%)[a]: Male	35.7 g	−5	−14 **	−13*
Mean Fetal Body Weight (%)[a]: Female	33.9 g	−2	−10	−10
Fetal Sex Ratio (% Males)	53.7	47.6	51.3	54.2
External Observation				
Number of Fetuses Examined	170	156	167	143
Anomalies	-	-	-	-
Visceral Observation				
Number of Fetuses Examined	170	NE	NE	143
Anomalies	-			-
Skeletal Observation				
Number of Fetuses Examined	170	NE	NE	143
Anomalies	-			-
Variations	-			-
Ossifications	-			-

NE: Not examined, -: No noteworthy findings
Statistics (vs. Control): * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ (Dunnett test)
a: For the control group, group means are shown. For the treated groups, percent differences from the control are shown. Statistical significance is based on actual data (not on the percent differences).

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

14.1 ラット出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験 (1/5)

Report Title: Study for Effects of DS-5565 Administered Orally on Pre- and Postnatal Development, Including Maternal Function, in Rats				**Test Article: Mirogabalin besylate**
Design similar to ICH 4.1.2: Yes	**Duration of Dosing: Day 7 of Pregnancy to Day 21 of Lactation**			**Attachment No.: 4.2.3.5.3-2**
Species/Strain: Rat/Crl:CD(SD)	**Day of Mating: Day 0 of Pregnancy**			**Location in CTD: 4.2.3.5.3**
Initial Age: 12-13 weeks	**Method of Administration: Oral, Gavage**			**GLP Compliance: Yes**
Date of First Dose: [redacted]	**Vehicle/Formulation: 0.5% methylcellulose solution/Suspension**			
Special Features: Dose levels are described as mirogabalin, the free form of mirogabalin besylate. Toxicokinetics study was done on Day 7 of pregnancy and Day 21 of lactation. Blood collection was done prior to dosing (Day 21 of lactation only) and at 1, 3, 6, and 24 hours after dosing.				
No Observed Adverse Event Level: F0 Female General Toxicity: 10 mg/kg/day F0 Female Reproduction: 30 mg/kg/day F1 Animals: 10 mg/kg/day				
Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**	**10**	**30**	**100**
Number of Animals	5	5	5	5
Toxicokinetics (Mirogabalin)				
Cmax (μg/mL)				
Day 7 of Pregnancy	NE	4.08	8.11	19.9
Day 21 of Lactation	NE	3.42	7.94	19.9
Tmax (h)				
Day 7 of Pregnancy	NE	1.0	1.0	1.4
Day 21 of Lactation	NE	1.0	1.0	2.6
$AUC_{0\text{-}24h}$ (μg·h/mL)				
Day 7 of Pregnancy	NE	13.9	31.5	133
Day 21 of Lactation	NE	11.0	25.0	129

NE: Not examined

14.1 出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験 (2/5)

		Attachment No.: 4.2.3.5.3-2 (Continued)		
Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**	**10**	**30**	**100**
Number of Pregnant	18	19	18	18
Dead or Sacrificed Moribund	0	0	0	0
Aborted	0	0	0	0
Total Litter Loss	0	0	0	0
Clinical Observations				
Pregnancy Period				
Decrease in Spontaneous Activity	0	0	12	18
Ataxic Gait	0	0	3	10
Lactation Period				
Decrease in Spontaneous Activity	0	0	7	8
Necropsy Observations	-	-	-	-
Body Weight (%)[a]: Day 21 of Pregnancy	430.7 g	0	−1	+1
Body Weight (%)[a,b]: Day 22 of Lactation	343.0 g	−3	−3	−4
Food Consumption (%)[a]: Day 20 of Pregnancy	27.1 g	−1	+3	+8
Food Consumption (%)[a,b]: Day 22 of Lactation	84.0 g	+1	0	−4
Mean Duration of Pregnancy (Days)	21.92	22.26*	22.28*	22.39**
Abnormal Parturition	-	-	-	-
Delivery Index (%)	100.0	100.0	100.0	100.0

-: No noteworthy findings
Statistics (vs. Control): $*P < 0.05$, $**P < 0.01$ (Dunnett test)
a: For the control group, group means are shown. For the treated groups, percent differences from the controls are shown. Statistical significance is based on actual data (not on the percent differences).
b: At birth

14.1 出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験 (3/5)

		Attachment No.: 4.2.3.5.3-2 (Continued)		
Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**	**10**	**30**	**100**
F1 Litters (Before Weaning)				
Number of Litters Evaluated	18	19	18	18
Mean Number of Implantations	14.2	14.4	15.1	14.7
Number of Pups (Mean)	250 (13.9)	256 (13.5)	243 (13.5)	235 (13.1)
Number of Live Pups (Mean)	244 (13.6)	253 (13.3)	230 (12.8)	221 (12.3)
Number of Litters with Stillborn Pups	5	2	5	9
Postnatal Survival to Day 4 (%)	98.42	99.27	97.92	96.68
Postnatal Survival to Weaning (%)	98.61	100.00	99.31	96.53
Number of Litters with Total Litter Loss	0	0	0	0
Mean Pup Body Weight (%)[a,b]: Male	6.76 g	+6	+7*	+8*
Mean Pup Body Weight (%)[a,b]: Female	6.30 g	+7	+12**	+9**
Number of Pups with External Abnormalities	0	0	0	0
Mean Pup Body Weight (%)[a,c]: Male	62.58 g	+6	+7	+3
Mean Pup Body Weight (%)[a,c]: Female	59.76 g	+5	+9	+3
Change in Pup Body Weights (%)[a,d]: Male	55.82 g	+6	+7	+2
Change in Pup Body Weights (%)[a,d]: Female	53.46 g	+5	+8	+3
Pup Sex Ratios (Male/Total)	0.47	0.48	0.51	0.54
Pup Clinical Signs	-	-	-	-
Physical Development	-	-	-	-
Functional Development	-	-	-	-
External Findings[c]	-	-	-	-
Visceral Findings[c]	-	-	-	-
Skeletal Findings[c]	-	NE	NE	-

-: No noteworthy findings, NE: Not examined.
Statistics (vs. Control): $*P < 0.05$, $**P < 0.01$ (Dunnett test)
a: For the control group, group means are shown. For the treated groups, percent differences from the controls are shown. Statistical significance is based on actual data (not on the percent differences).
b: At birth
c: At weaning
d: At birth to at weaning

14.1 出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験 (4/5)

		Attachment No.: 4.2.3.5.3-2 (Continued)		
Daily Dose (mg/kg)	**0 (Control)**	**10**	**30**	**100**
F1 Males (After Weaning)				
Number of Animals Evaluated	36	38	36	36
Dead or Sacrificed Moribund	0	0	0	0
Clinical Observations	-	-	-	-
Necropsy Observations	-	-	-	-
Body Weights (%)[a,b]: Day 70 after Birth	464.3 g[c]	+3[d]	+4[c]	−1[c]
Body Weights (%)[b,e]: Day 70 after Birth	472.3 g[c]	0[d]	+1[c]	−1[c]
Cleavage of the Balano-preputial Gland	-	-	-	-
Behavioral Examination	-	-	-	-
Learning Examination	-	-	-	-
Mean Days Until Copulation	3.1	3.7	4.1	3.4
Number of Males that Mated (Copulation Rate, %)	17 (94.4)	19 (100.0)	16 (88.9)	18 (100.0)
Number of Fertile Males (Fertility Rate, %)	15 (88.2)	18 (94.7)	14 (87.5)	16 (88.9)
F1 Females (After Weaning)				
Number of Animals Evaluated	36	38	36	36
Dead or Sacrificed Moribund	0	0	0	0
Clinical Observations	-	-	-	-
Necropsy Observations	-	-	-	-
Body Weights (%)[a,b]: Day 70 after Birth	282.2 g[c]	0[d]	+5[c]	+4[c]
Body Weights (%)[b,e]: Day 70 after Birth	284.2 g[c]	+2[d]	+6[c]	+2[c]
Vaginal Opening	-	-	-	-
Behavioral Examination	-	-	-	-
Learning Examination	-	-	-	-
Mean Days Until Copulation	3.1	3.7	4.1	3.4
Number of Females that Mated (Copulation Rate, %)	17 (94.4)	19 (100.0)	16 (88.9)	18 (100.0)
Number of Fertile Females (Fertility Rate, %)	15 (88.2)	18 (94.7)	14 (87.5)	16 (88.9)

-: No noteworthy findings
a: Animals used for reproductive performance test.
b: For the control group, group means are shown. For the treated groups, percent differences from the controls are shown. Statistical significance is based on actual data (not on the percent differences).
c: N = 18, d: N = 19, e: Animals used for behavioral and learning examinations.

14.1 出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験 (5/5)

		Attachment No.: 4.2.3.5.3-2 (Continued)		
Daily Dose (mg/kg)	0 (Control)	10	30	100
F1 Dams				
Number of Animals Evaluated	15	18	14	16
Body Weight (%)[a]: Day 15 of pregnancy	380.9 g	+2	+3	+5
Number of Litters Evaluated	15	18	14	16
Mean Number of Corpora Lutea	12.7	14.3	13.8	15.5
Mean Number of Implantations	12.0	13.1	12.9	14.7
Mean % Preimplantation Loss	6.5	9.3	9.1	5.9
F2 Litters				
Number of Litters Evaluated	15	18	14	16
Number of Live Embryos (Mean)	166 (11.1)	219 (12.2)	172 (12.3)	220 (13.8)
Mean % Embryonic Viability	92.1	93.9	94.4	93.3
Number of Dead Embryos (Mean)	1 (0.1)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
Number of with Total Resorption of Litter	0	0	0	0
Mean % Postimplantation Loss	8.1	6.1	5.7	6.8
Number of Resorptions (Mean)	13 (0.9)	16 (0.9)	9 (0.6)	15 (0.9)
Number of. Litters with Dead Embryos	1	0	0	0

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

15. 新生児を用いた試験

本申請で該当する試験は実施していない。

16. 局所刺激性試験

本申請で該当する試験は実施していない。

17. その他の毒性試験

17.1 依存性試験 (1/2)

				Test Article: Mirogabalin besylate		
Species/ Strain	**Method of Administration**	**Duration of Dosing**	**Doses**	**Gender and No. per Group**	**Noteworthy Findings**	**Attachment Number**
Drug Discrimination						
Rat/F344/ DuCrlCrlj	Intraperitoneal (0.1% sodium dihydrogenphosphate saline solution/Solution)	Single	3, 6, 10, 15, 20, 30 mg/kg	M:3	≥15: Hyporeactivity	4.2.3.7.4-1
			0, 10, 15 mg/kg	M:3	Definitive study 15: Suppressed lever pressing	
	Oral, Gavage (0.5% methylcellulose solution/ Suspension)		0, 10, 20, 30 mg/kg	M:3	≥20: Suppressed lever pressing	
Rat/F344/ DuCrlCrlj	Oral, Gavage (0.5% methylcellulose solution/ Suspension)	Single	0, 3, 10, 30 mg/kg	M:8	Discriminative stimulus effect of mirogabalin besylate was unlikely to resemble to that of midazolam	4.2.3.7.4-2
Physical Dependence						
Rat/F344/ DuCrlCrlj	Oral, Gavage (0.5% methylcellulose solution/ Suspension)	4 weeks	0, 30, 100, 300 mg/kg/day	M:10	≥30: Ataxia, hypoactivity, prone position, decrease in food consumption, decreased body weight gain (transiently) ≥100: Decreased body weight gain (sustainably) 300: Hyper reactivity to handling, decreased body weight	4.2.3.7.4-3

17.1 依存性試験 (2/2)

				Test Article: Mirogabalin besylate		
Species/ Strain	**Method of Administration**	**Duration of Dosing**	**Doses**	**Gender and No. per Group**	**Noteworthy Findings**	**Attachment Number**
Psychological Dependence						
Rhesus monkey	Intravenous (0.1% sodium dihydrogenphosphate saline solution)	Single	0, 0.3, 1, 3, 6, 10 mg/kg/infusion	M:3, F:3	10: Ataxia, slowed motion	4.2.3.7.4-4
Rhesus monkey	Intravenous (0.1% sodium dihydrogenphosphate saline solution)	2 hours procedure 4 days/dose	0, 0.1, 0.3, 1, 3, 6 mg/kg/infusion	M:4	6: Generalized tremors	4.2.3.7.4-5
		24 hours procedure 2 weeks/dose	0, 0.3, 1, 3 mg/kg/infusion	M:2 F:2	3: Frequent self-administrations in 2 of 4 animals	

17.2 不純物の安全性試験 (1/3)

				Test Article: 不純物A* -spiked mirogabalin besylate		
Species/Strain	**Method of Administration**	**Duration of Dosing**	**Doses**	**Gender and No. per Group**	**Noteworthy Findings**	**Attachment Number**
Rat/F344/DuCrlCrlj	Oral, Gavage (0.5% methylcellulose solution/ Suspension)	2 weeks	0, 10, 300 mg/kg	M:10, F:10	300: Decreased activity, Increased body weight and food consumption There were no clear differences in the toxicities between both groups, suggesting that the spiked 不純物A* had no effects on the toxicities of mirogabalin besylate.	**4.2.3.7.6-1**
S. typhimurium and *E. coli*	In vitro	-	Initial: 78.1-5000 µg/plate Confirmatory: 313-5000 µg/plate	-	No mutagenic effect	**4.2.3.7.6-2**
CHL cells	In vitro	-	2.5, 5, 10 mmol/L	-	No mutagenic effect	**4.2.3.7.6-3**

＊新薬承認情報提供時に置換

17.2 不純物の安全性試験 (2/3)

				Test Article: 不純物B* -spiked mirogabalin besylate		
Species/Strain	**Method of Administration**	**Duration of Dosing**	**Doses**	**Gender and No. per Group**	**Noteworthy Findings**	**Attachment Number**
S. typhimurium and *E. coli*	In vitro	-	Initial: 9.77-5000 µg/plate Confirmatory: 156-5000 µg/plate	-	No mutagenic effect	4.2.3.7.6-4
				Test Article: 不純物C* -spiked mirogabalin besylate		
Species/Strain	**Method of Administration**	**Duration of Dosing**	**Doses (mg/kg)**	**Gender and No. per Group**	**Noteworthy Findings**	**Attachment Number**
S. typhimurium and *E. coli*	In vitro	-	Initial: 9.77-5000 µg/plate Confirmatory: 156-5000 µg/plate	-	No mutagenic effect	4.2.3.7.6-5
				Test Article: 不純物D* -spiked mirogabalin besylate		
Species/Strain	**Method of Administration**	**Duration of Dosing**	**Doses (mg/kg)**	**Gender and No. per Group**	**Noteworthy Findings**	**Attachment Number**
S. typhimurium and *E. coli*	In vitro	-	Initial: 78.1-5000 µg/plate Confirmatory: 156-5000 µg/plate	-	No mutagenic effect	4.2.3.7.6-6

＊新薬承認情報提供時に置換

17.2 不純物の安全性試験 (3/3)

				Test Article: 物質A*		
Species/Strain	**Method of Administration**	**Duration of Dosing**	**Doses**	**Gender and No. per Group**	**Noteworthy Findings**	**Attachment Number**
S. typhimurium and *E. coli*	In vitro	-	Initial: 0.305-5000 µg/plate Confirmatory: 313-5000 µg/plate	-	No mutagenic effect	4.2.3.7.6-7
				Test Article: 物質B*		
Species/Strain	**Method of Administration**	**Duration of Dosing**	**Doses (mg/kg)**	**Gender and No. per Group**	**Noteworthy Findings**	**Attachment Number**
S. typhimurium and *E. coli*	In vitro	-	Initial: 1.22-5000 µg/plate Confirmatory: 4.88-5000 µg/plate	-	No mutagenic effect	4.2.3.7.6-8
				Test Article: 物質C*		
Species/Strain	**Method of Administration**	**Duration of Dosing**	**Doses (mg/kg)**	**Gender and No. per Group**	**Noteworthy Findings**	**Attachment Number**
S. typhimurium and *E. coli*	In vitro	-	Initial: 0.305-5000 µg/plate Confirmatory: 156-5000 µg/plate	-	No mutagenic effect	4.2.3.7.6-9
				Test Article: 物質D*		
Species/Strain	**Method of Administration**	**Duration of Dosing**	**Doses (mg/kg)**	**Gender and No. per Group**	**Noteworthy Findings**	**Attachment Number**
S. typhimurium and *E. coli*	In vitro	-	Initial: 0.305-5000 µg/plate Confirmatory: 4.88-1250 µg/plate	-	No mutagenic effect	4.2.3.7.6-10

＊新薬承認情報提供時に置換