2.6.6 毒性試験の概要文

小野薬品工業株式会社

目次

2.6.6 毒性試験の概要文 3
2.6.6.1 まとめ 4
2.6.6.2 単回投与毒性試験 10
2.6.6.3 反復投与毒性試験 12
2.6.6.4 遺伝毒性試験 25
2.6.6.5 がん原性試験 28
2.6.6.6 生殖発生毒性試験 32
2.6.6.7 局所刺激性試験 40
2.6.6.8 その他の毒性試験 41
2.6.6.9 考察及び結論 47
2.6.6.10 図表 59
2.6.6.11 参考文献 60

2.6.6 毒性試験の概要文

各試験において，イバブラジンの塩酸塩を使用したが，本資料では，用量及び薬物濃度はイバブラジン塩酸塩と特記しない限り，すべてフリー体の量として表記した.

本項で使用した用語及び略号を表 2.6.6-1 に示す.

表 2.6.6-1 用語及び略号一覧

用語及び略号	内容又は日本語名称
ALP	アルカリフォスファターゼ
ALT	アラニンアミノトランスフェラーゼ
ANP	心房性ナトリウム利尿ペプチド
AST	アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ
AUC24h	投与後 24 時間までの濃度－時間曲線下面積
cGMP	環状グアノシン一リン酸
CK	クレアチンキナーゼ
Cmax	最高濃度
DNA	デオキシリボ核酸
ERG	網膜電図
GABA	γ-アミノ酪酸
GLP	医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準
HCN チャネル	過分極活性化環状ヌクレオチド依存性チャネル
ICH	医薬品規制調和国際会議
I_h	過分極活性化陽イオン電流（心臓以外）
K	カリウム
LUC	大型非染色細胞
Na	ナトリウム
NNG	正味核粒子数
NZW	New Zealand White
OECD	経済協力開発機構
OF1	Oncins France 1
PR 間隔	心電図 PR 間隔（房室伝導時間）
SI	刺激指数
SD	Sprague-Dawley
tk	チミジンキナーゼ遺伝子
TK	トキシコキネティクス
TTC	毒性学的懸念の閾値

2.6.6.1 まとめ

イバブラジン塩酸塩（以下，本薬）の安全性を評価するため，ICH ガイドラインに基づき，表 2.6.6.1-1 に示す毒性試験を実施した．反復投与毒性試験では，げっ歯類はラットを，非げっ歯類は本薬の *in vivo* 代謝プロファイルがヒトと類似しているイヌを使用した［2.6.4.5.1］．これら動物種で本薬の主たる薬理作用である心拍数減少が認められることから，毒性学的評価に適切な動物種と考えられた．重要な試験は GLP 適用で実施した．

表 2.6.6.1-1 主な毒性試験プログラム

試験の種類及び期間	投与経路	動物種／系統	GLP
単回投与毒性試験			
	経口	マウス／OF1	適用
	静脈内	マウス／OF1	適用
	経口	ラット／SD	適用
	静脈内	ラット／SD	適用
	経口	ビーグル犬	適用
	静脈内	ビーグル犬	適用
反復投与毒性試験：げっ歯類			
4 週間	経口	ラット／Wistar	適用
13 週間	経口	ラット／Wistar	適用
26 週間 [a]	経口	ラット／Wistar	適用
52 週間 [a]	経口	ラット／Wistar	適用
反復投与毒性試験：非げっ歯類			
4 週間	経口	ビーグル犬	適用
13 週間	経口	ビーグル犬	適用
26 週間 [a]	経口	ビーグル犬	適用
53 週間 [a]	経口	ビーグル犬	適用
遺伝毒性試験：*In vitro* 試験			
復帰突然変異試験	*In vitro*	*S. typhimurium*，*E. coli*	適用
マウスリンフォーマ *tk* 試験	*In vitro*	マウスリンパ腫 L5178Y 細胞	適用
不定期 DNA 合成試験	*In vitro*	ラット肝細胞	適用
染色体異常試験	*In vitro*	ヒト末梢血リンパ球	適用
遺伝毒性試験：*In vivo* 試験			
不定期 DNA 合成試験	経口	ラット／Wistar	適用
染色体異常試験	経口	ラット／Wistar	適用
小核試験	経口	マウス／OF1	非適用
がん原性試験：マウス			
13 週間予備試験	混餌	マウス／CD-1	適用
104 週間	混餌	マウス／CD-1	適用
がん原性試験：ラット			
13 週間予備試験	混餌	ラット／Wistar	適用
104 週間	混餌	ラット／Wistar	適用

a：1 日 2 回投与

表 2.6.6.1-1　主な毒性試験プログラム（続き）

試験の種類及び期間	投与経路	動物種／系統	GLP
生殖発生毒性試験			
受胎能・初期胚発生試験	経口	ラット／Wistar	適用
胚・胎児発生予備試験	経口	ラット／Wistar	非適用
胚・胎児発生試験 1	経口	ラット／Wistar	適用
胚・胎児発生試験 2	経口	ラット／Wistar	適用
胚・胎児発生予備試験	経口	ウサギ／NZW	非適用
胚・胎児発生試験 1	経口	ウサギ／NZW	適用
胚・胎児発生試験 2	経口	ウサギ／NZW	非適用
出生前後発生試験	経口	ラット／Wistar	適用
新生児を用いた予備試験	経口	ラット／Wistar	非適用
新生児を用いた試験	経口	ラット／Wistar	適用
局所刺激性試験			
溶血性試験	*In vitro*	ヒト血液	非適用
局所刺激性試験	動脈内，静脈内 静脈周囲	ウサギ／NZW	適用
皮膚刺激性試験	経皮	ウサギ／NZW	適用
眼刺激性試験	眼投与	ウサギ／NZW	適用
その他の毒性試験			
免疫毒性試験			
T 細胞依存性抗体産生 [a]	経口	ラット／Wistar	適用
毒性発現の機序に関する試験			
心毒性	経口	ラット／Wistar	適用 [b]
不純物の毒性試験			
復帰突然変異試験	*In vitro*	*S. typhimurium*，*E. coli*	適用
小核試験	経口	ラット／Wistar	適用
4 週間反復投与毒性試験	経口	ラット／Wistar	適用
その他の試験			
光毒性試験	*In vitro*	Balb/c 3T3 細胞	適用
局所リンパ節試験	経皮	マウス／CBA/J	適用
潜在的不純物復帰突然変異試験	*In vitro*	*S. typhimurium*，*E. coli*	適用

a：1 日 2 回投与
b：TK 測定は GLP 非適用

2.6.6.1.1 単回投与毒性試験

マウス，ラット及びイヌを用いた経口投与による単回投与毒性試験を実施した．なお，イヌの単回経口投与毒性試験では最低用量でも死亡例が認められたことから，より低用量で漸増法による 2 又は 3 日間の反復経口投与毒性試験を実施した．

マウス及びラットの単回経口投与毒性試験では，371 mg/kg 以上で自発運動の減少，振戦又は間代性痙攣などの中枢神経症状が認められ，マウスでは 742 mg/kg 以上，ラットでは 557 mg/kg 以上で死亡例が認められた．

イヌの単回経口投与毒性試験及び漸増法による 2 又は 3 日間の反復経口投与毒性試験では，11 mg/kg 以上で嘔吐，自発運動の減少や振戦などの中枢神経症状が認められ，22 mg/kg で一般状態の悪化による切迫剖検例が認められた．

以上より，各動物種における経口投与による概略の致死量は，マウスで 742 mg/kg，ラットで 557 mg/kg，イヌで 22 mg/kg であった．

2.6.6.1.2 反復投与毒性試験

ラットを用いた 52 週間までの反復投与毒性試験及びイヌを用いた 53 週間までの反復投与毒性試験を経口投与により実施した．

ラットでは，本薬の心拍数減少作用に伴う影響として，6 mg/kg/日以上で心臓重量の高値及び心臓の肉芽腫などの自然発生性にみられる病理組織学的変化の発現頻度又は程度の増悪が認められた．これらの変化は 4 週間反復投与時から認められ，52 週間反復投与毒性試験では 32 mg/kg/日以上で心室の変性／壊死の発現頻度又は程度の増悪や腱索の変性なども認められた．また，過度な心拍数減少に伴い，ANP の高値及び尿電解質の変動も認められた．これらの変化は基礎心拍数の高いげっ歯類特有の変化であり，ヒトへの外挿性に乏しいと考えられた．上記の変化以外に，32 mg/kg/日以上で眼瞼下垂，58 mg/kg/日以上で自発運動の減少などの一般状態変化が認められ，げっ歯類特有の変化を除いた無毒性量は雌雄ともに 6 mg/kg/日であった．

イヌでは，本薬の心拍数減少作用に伴う影響として，3 mg/kg/日以上で洞性徐脈，4 mg/kg/日以上で洞房／房室ブロック，7 mg/kg/日以上で洞停止などの心電図異常が認められたが，いずれも血圧の変動を伴わない変化であった．また，10 mg/kg/日以上で振戦，14 mg/kg/日以上で筋緊張亢進，30 mg/kg/日以上で運動失調，痙攣などの中枢神経症状が認められた．これらの心電図異常及び中枢神経症状は投与初期から認められ，投与期間の延長による増悪又は低用量化は認められなかった．53 週間反復投与毒性試験で実施した ERG 検査では，最低用量である 2 mg/kg/日以上で光刺激に対する反応の低下が認められたが，本薬の薬理作用に基づく可逆的な視機能への影響であり，網膜の病理組織学的変化は認められな

かった．臨床試験における視機能への影響は日常生活に影響を及ぼさない程度の軽度なものであり，53 週間反復投与毒性試験における ERG の変化を除く無毒性量は 7 mg/kg/日であった．

2.6.6.1.3 遺伝毒性試験

In vitro 遺伝毒性試験として，細菌を用いた復帰突然変異試験，マウスリンフォーマ *tk* 試験，ラット初代培養肝細胞を用いた不定期 DNA 合成試験及び培養ヒトリンパ球を用いた染色体異常試験を実施した．また，*In vivo* 遺伝毒性試験として，ラット不定期 DNA 合成試験，ラット染色体異常試験及びマウス小核試験を実施した．

In vitro 遺伝毒性試験のうち，マウスリンフォーマ *tk* 試験，ラット初代培養肝細胞を用いた不定期 DNA 合成試験，培養ヒトリンパ球を用いた染色体異常試験において本薬の遺伝毒性が示唆されたが，臨床最大用量における Cmax よりもはるかに高い濃度域（1300 倍以上）での変化であった．また，細菌を用いた復帰突然変異試験において遺伝子突然変異誘発性は認められなかった．*In vivo* 遺伝毒性試験では，いずれの試験においても，臨床最大用量における Cmax の 97 倍以上の Cmax となる用量を投与しても陰性であった．以上のことから，臨床において本薬が遺伝毒性を示す可能性は低いと考えられた．

2.6.6.1.4 がん原性試験

マウス及びラットを用いた 104 週間のがん原性試験を実施した．その結果，マウス及びラットともに最大耐量まで投与したが，本薬はがん原性を示さなかった．

2.6.6.1.5 生殖発生毒性試験

ラット又はウサギを用いて，受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験，胚・胎児発生に関する試験，出生前及び出生後の発生並びに母体機能に関する試験，新生児を用いた試験を実施した．本薬を着床後の妊娠ラット又は妊娠ウサギに投与した結果，着床後胚死亡率及び出生後死亡率の高値，心臓形態異常及び欠指症などが臨床最大用量における血漿曝露量付近から認められた．また，新生児ラットに投与した結果，最低用量である 2 mg/kg/日以上で心拍数減少，15 mg/kg/日以上で心臓の病理組織学的変化など，成獣と同様の所見が認められたが，出生後の発達や受胎能及び着床までの初期胚発生に対する影響は認められなかった．

2.6.6.1.6 局所刺激性試験

In vitro 試験としてヒト血液を用いた溶血性試験，*in vivo* 試験としてウサギを用いた局所刺激性試験を実施した．その結果，19 mg/mL 以上の濃度で溶血性が認められた．また，皮膚刺激性及び眼刺激性が認められたが，いずれも軽度な変化であった．

2.6.6.1.7 その他の毒性試験

2.6.6.1.7.1 免疫毒性試験

ラットを用いたT細胞依存性抗体産生試験の結果，本薬は免疫毒性を示さなかった．

2.6.6.1.7.2 依存性試験

本薬は依存性に関与する受容体に結合せず，脳内移行性も低かった．また，これまでに実施した国内外の臨床試験において薬物乱用や退薬症候を示唆する変化は認められていない．以上より，本薬が依存性を有する可能性はないと判断し，依存性試験は実施しなかった．

2.6.6.1.7.3 代謝物の毒性試験

本薬をヒトに投与した際に認められる 6 種の代謝物について，イヌ 53 週間反復投与毒性試験及びマウスがん原性試験を用いて評価した結果，無毒性量及びがん原性を示さなかった用量における各代謝物の曝露量はヒト血漿中での曝露量を上回っており，各代謝物の一般毒性及び発がんに関する懸念はないと考えられた．

なお，代謝物の胚・胎児発生毒性については，親化合物である本薬が胚・胎児発生毒性を示すことから，代謝物を用いた胚・胎児発生毒性試験は実施しなかった．

2.6.6.1.7.4 不純物の毒性試験

原薬又は製剤中に含まれる可能性のある不純物のうち，規格値上限が ICH Q3A「新有効成分含有医薬品のうち原薬の不純物に関するガイドライン」又は ICH Q3B「新有効成分含有医薬品のうち製剤の不純物に関するガイドライン」の安全性確認の閾値を超える不純物は，原薬中の　　不純物A*　　である．申請規格値を上回る不純物A*を含有した本薬のラットを用いた 4 週間反復投与毒性試験の無毒性量において，不純物A*の投与量は臨床での 1 日摂取量を上回ることが確認された．また，申請規格値を上回る不純物A*を含有した本薬の細菌を用いた復帰突然変異試験及びラットを用いた小核試験はいずれも陰性であった．以上より，不純物A*の規格値上限における安全性に問題はないと考えられた．

上記の他，原薬中に含まれる可能性のある潜在的不純物 不純物B*について，細菌を用いた復帰突然変異試験を実施した結果，遺伝子突然変異誘発性を示したため，不純物B*の規格値を

＊新薬承認情報提供時に置換

ICH M7「潜在的発がんリスクを低減するための医薬品中 DNA 反応性（変異原性）不純物の評価及び管理ガイドライン」に定める許容限度値である TTC 以下に設定した.

2.6.6.1.7.5 光毒性試験

Balb/c 3T3 細胞を用いた光毒性試験の結果，紫外線照射による細胞生存率の変化が認められなかったことから，本薬は光毒性を有さないと判断した.

2.6.6.1.7.6 皮膚感作性試験

マウスを用いた局所リンパ節増殖試験の結果，皮膚感作性は認められなかった.

2.6.6.2 単回投与毒性試験

OF1 系マウス，SD 系ラット及びビーグル犬を用いて，それぞれ経口又は静脈内投与による単回投与毒性試験を実施した．

2.6.6.2.1 マウス

2.6.6.2.1.1 マウスにおける経口投与による単回投与毒性試験

［評価資料：4.2.3.1-1］

6 週齢の OF1 系マウス（雌雄各 6 例／群）に本薬を 371，557，742，928 及び 1114 mg/kg の用量で単回経口投与し，14 日間の観察後に動物を剖検した．本薬は注射用水に溶解し，投与容量は 20 mL/kg とした．

その結果，一般状態の変化として，371 mg/kg 以上で投与後 15 分以降に自発運動の減少，振戦及び閉眼などが認められた．また，742 mg/kg の雄 3 例，928 mg/kg の雄 2 例及び雌 3 例，1114 mg/kg の雄 4 例及び雌 5 例が投与翌日までに死亡し，死亡直前には間代性痙攣が認められた．928 mg/kg 以上の雌で体重増加抑制が認められた．剖検では，死亡動物のみで腺胃の退色が認められた．

概略の致死量は，雄が 742 mg/kg，雌が 928 mg/kg であった．

2.6.6.2.1.2 マウスにおける静脈内投与による単回投与毒性試験

［参考資料：4.2.3.1-2］

6 週齢の OF1 系マウス（雌雄各 6 例／群）に本薬を 19，37，56，74 及び 93 mg/kg の用量で単回静脈内投与し，14 日間の観察後に動物を剖検した．本薬は生理食塩液に溶解し，投与容量は 20 mL/kg とした．

その結果，一般状態の変化として，19 mg/kg 以上の雄及び 37 mg/kg 以上の雌で自発運動の減少，37 mg/kg 以上の雌雄で振戦及び閉眼などが投与直後から認められ，56 mg/kg の雄 1 例，74 mg/kg の雄 5 例及び雌 4 例，93 mg/kg の雄全例及び雌 5 例が投与直後から投与後 15 分以内に死亡し，死亡直前には衰弱及び間代性痙攣が認められた．体重推移及び剖検において，異常は認められなかった．

概略の致死量は，雄が 56 mg/kg，雌が 74 mg/kg であった．

2.6.6.2.2 ラット

2.6.6.2.2.1 ラットにおける経口投与による単回投与毒性試験

［評価資料：4.2.3.1-3］

6 週齢の SD 系ラット（雌雄各 6 例／群）に本薬を 371，557，742，928 及び 1114 mg/kg の用量で単回経口投与し，14 日間の観察後に動物を剖検した．本薬は注射用水に溶解し，投与容量は 10 mL/kg とした．

その結果，一般状態の変化として，371 mg/kg 以上で投与後 15 分以降に自発運動の減少，振戦及び閉眼が認められ，557 mg/kg の雌 2 例，742 mg/kg の雄 3 例及び雌 1 例，928 mg/kg の雄 5 例及び雌 3 例，1114 mg/kg の全例が投与翌日までに死亡した．371 mg/kg 以上の雌雄で体重減少又は体重増加抑制が投与翌日に認められた．剖検では，死亡動物のみで腺胃の退色が認められた．

概略の致死量は，雄が 742 mg/kg，雌が 557 mg/kg であった．

2.6.6.2.2.2 ラットにおける静脈内投与による単回投与毒性試験

［参考資料：4.2.3.1-4］

6 週齢の SD 系ラット（雌雄各 6 例／群）に本薬を 37，56，74，84 及び 93 mg/kg の用量で単回静脈内投与し，14 日間の観察後に動物を剖検した．本薬は生理食塩液に溶解し，投与容量は 10 mL/kg とした．

その結果，一般状態変化として，37 mg/kg 以上で投与直後から自発運動の減少，振戦及び閉眼などが認められ，74 mg/kg の雌雄各 2 例，84 mg/kg の雄 3 例及び雌 2 例，93 mg/kg の雄全例及び雌 5 例が投与後 15 分以内に死亡し，死亡直前には衰弱及び間代性痙攣が認められた．体重推移に異常は認められなかった．剖検では，死亡動物のみで腺胃の退色が認められた．

概略の致死量は，雌雄ともに 74 mg/kg であった．

2.6.6.2.3 イヌ

2.6.6.2.3.1 イヌにおける経口投与による単回又は漸増投与毒性試験

［評価資料：4.2.3.1-5］

10 又は 11 カ月齢のビーグル犬（雌雄各 1 例／群）に本薬を 37 及び 70 mg/kg の用量で単回経口投与した．本薬はカプセルに充填し投与した．

その結果，37 mg/kg の雌雄及び 70 mg/kg の雄で嘔吐，振戦，後肢強直，足元のふらつき，筋攣縮，痙攣又は横臥位などが認められ，投与後約 1 時間に切迫剖検した．70 mg/kg の雌でも振戦，後肢強直及び足元のふらつきなどが認められたが，その程度は切迫剖検例と比べ軽

度であった．本例では，投与後 3 及び 5 時間にそれぞれ不整脈及び心拍数減少が認められた．切迫剖検例及び生存例ともに，剖検において消化管の赤色化又は暗赤色化が認められた．

低用量での急性毒性を検討するため，10 又は 11 カ月齢のビーグル犬（雌雄各 1 例／群）に本薬を 2.8，5.6，11 及び 22 mg/kg の用量で漸増法により，1 日 1 回，2 又は 3 日間反復経口投与した．本薬はカプセルに充填して投与した．

その結果，11 mg/kg 以上で嘔吐並びに軽度な自発運動の減少，振戦又は便潜血などが認められ，摂餌量の減少及び体重減少も認められた．22 mg/kg ではより強い一般状態の変化が認められ，投与後 1 時間付近より運動失調，強直，円背，点頭や聴覚過敏などが，2 回目の投与後には浅速呼吸や起立困難などの一般状態の悪化が認められたため，雌雄ともに切迫剖検した．11 mg/kg 以上では心電図検査において不整脈が認められ，22 mg/kg では洞停止が認められた．剖検では消化管の退色が認められた．5.6 mg/kg/日以下の雌雄では嘔吐が散見されたが，体重推移に異常は認められなかった．

概略の致死量は，雌雄ともに 22 mg/kg であった．

2.6.6.2.3.2　　イヌにおける静脈内投与による単回投与毒性試験

［参考資料：4.2.3.1-6］

9～12 カ月齢のビーグル犬（雌雄各 1 例／群）に本薬を 4.6 及び 9.3 mg/kg の用量で単回静脈内投与し，15 日間の観察後に動物を剖検した．本薬は生理食塩液に溶解し，投与容量は 1 mL/kg とした．また，投与後に TK 採血を行い，血漿中イバブラジン濃度を測定した．

その結果，いずれの用量においても死亡は認められなかった．一般状態変化として，4.6 mg/kg 以上で投与後 40 分以降に運動失調，四肢強直，振戦，9.3 mg/kg で投与後 10 分以降に側臥位，後肢強直，歩行異常，強直性及び間代性痙攣などが認められた．また，4.6 mg/kg 以上で心拍数減少，PR 間隔延長，9.3 mg/kg で体重減少及び体温上昇が認められた．なお，9.3 mg/kg における投与後 5 分の血漿中イバブラジン濃度は，雄では 5170 ng/mL，雌では 4710 ng/mL であった．

概略の致死量は，雌雄ともに 9.3 mg/kg を超える量であった．

2.6.6.3　　反復投与毒性試験

げっ歯類はラットを，非げっ歯類は本薬の *in vivo* 代謝プロファイルがヒトと類似しているビーグル犬を使用し［2.6.4.5.1］，それぞれ 52 週間及び 53 週間までの反復経口投与毒性試験を実施した．

2.6.6.3.1 ラット

ラットの反復投与毒性試験は当初 SD 系ラットを用いて実施したが，SD 系ラットを用いた 4 週間反復投与毒性試験において炎症細胞浸潤を特徴とする心臓病理所見が対照群を含めて認められた．本薬の標的臓器は心臓であり，自然発生性の心臓病理所見 [1)] が高頻度に認められる系統では毒性評価に影響する可能性が考えられたため，より適した系統のラットを検討する目的で，SD 系，Fischer 系及び Wistar 系ラットにおける心臓の病理組織学的検査を実施した（2.6.6.3.1.6）．その結果，対照群における心臓病理所見の発生頻度は Wistar 系ラットが最も低かったことから，Wistar 系ラットが本薬の評価に最も適していると判断し，以降の反復投与毒性試験には Wistar 系ラットを用いた．

2.6.6.3.1.1 Wistar 系ラットにおける経口投与による 4 週間反復投与毒性試験

［評価資料：4.2.3.2-12］

8 週齢の Wistar 系ラット（雌雄各 10 例／群）に本薬を 6.5，19，58 及び 175 mg/kg の用量で 1 日 1 回，4 週間反復経口投与した．投与容量は 10 mL/kg とし，対照群には媒体である脱塩水を投与した．また，TK サテライト動物（雌雄各 2 例／群）を設け，血漿中イバブラジン濃度を測定した．

本薬の投与に起因した死亡は認められなかった．

一般状態の変化として，58 mg/kg/日以上の雌雄で自発運動の減少が認められた．その他，19 mg/kg/日以上の雌雄で流涎が認められたが，顎下腺に病理組織学的変化は認められず，血漿中イバブラジン濃度がより高かった 4 週間反復静脈内投与毒性試験の 37 mg/kg/日において流涎は認められなかったことから［2.6.7.6］，当該試験で認められた流涎は全身曝露を介したものではなく，投与液の味などに対する影響の可能性が考えられ，毒性とは判断しなかった．いずれの用量においても体重及び摂餌量の推移に異常は認められなかった．

19 mg/kg/日以上の雌及び 58 mg/kg/日以上の雄で摂水量の高値又は高値傾向が認められ，尿検査において 6.5 mg/kg/日以上の雌雄で尿量の高値傾向，6.5 mg/kg/日以上の雄及び 175 mg/kg/日の雌で尿中 Na 排泄量の高値が認められたが，血中電解質の変動や腎臓に病理組織学的変化を伴わない軽度な影響であり，毒性学的意義に乏しい変化と判断した．

血液化学的検査において，6.5 mg/kg/日以上の雌で対照群に比べ最大 33％の総コレステロールの高値又は高値傾向が認められたが，トリグリセリド，アルブミン，AST 又は ALT などの変動や肝臓の病理組織学的変化などは認められなかったことから，毒性とは判断しなかった．

器官重量測定において 58 mg/kg/日以上の雌雄で心臓重量の高値が認められ，剖検において 19 mg/kg/日以上の雄及び 175 mg/kg/日の雌で心肥大が認められた．また，病理組織学的

検査において，19 mg/kg/日以上の雄及び 175 mg/kg/日の雌で，対照群でもみられる心臓（主に左心室の心内膜下）の小肉芽腫及び肉芽腫の発現頻度又は程度の増悪が認められた．なお，19 mg/kg/日以下の雌でも心臓重量の高値が認められたが，対照群に比べ 10%以下の変動であり，心臓に病理組織学的変化を伴っていなかったことから，毒性とは判断しなかった．

眼科学的検査及び血液学的検査において，本薬の投与に起因した変化は認められなかった．

TK 測定では，イバブラジンの Cmax 及び AUC24h は雌雄ともに用量の増加に伴って増加し，雄に比べ雌で高値を示した．反復投与後の Cmax 及び AUC24h は初回投与時に比べ高い値を示した．

以上より，19 mg/kg/日以上の雄で心臓の病理組織学的変化，58 mg/kg/日以上の雌雄で自発運動の減少が認められたことから，無毒性量は雄が 6.5 mg/kg/日，雌が 19 mg/kg/日と判断した．

2.6.6.3.1.2 Wistar 系ラットにおける経口投与による 13 週間反復投与毒性試験及び 6 週間回復性試験

［評価資料：4.2.3.2-13］

6 週齢の Wistar 系ラット（雌雄各 15 例／群）に本薬を 7，35 及び 175 mg/kg の用量で 1 日 1 回，13 週間反復経口投与した．投与容量は 10 mL/kg とし，対照群には媒体である脱塩水を投与した．各群雌雄 5 例については投与終了後 6 週間の休薬期間を設定し，毒性変化の回復性について検討した．また，TK サテライト動物（雌雄各 2 例／群）を設け，血漿中イバブラジン及びその活性代謝物である ONO-IN-306 濃度を測定した．

本薬の投与に起因した死亡は認められなかった．

一般状態の変化として，175 mg/kg/日の雌雄で自発運動の減少が認められた．その他，7 mg/kg/日以上の雌及び 35 mg/kg/日以上の雄で流涎が認められたが，4 週間反復投与毒性試験（2.6.6.3.1.1）と同様に投与液の味などに対する影響の可能性が考えられ，毒性とは判断しなかった．

175 mg/kg/日の雄で体重増加抑制が認められ，175 mg/kg/日の雌雄で摂餌量の低値傾向が認められた．

7 mg/kg/日以上の雌及び 35 mg/kg/日の雄で摂水量の高値又は高値傾向が認められ，尿検査において 7 mg/kg/日以上の雌雄で尿中 Na 排泄量の高値又は高値傾向が認められたが，血中電解質の変動や腎臓に病理組織学的変化を伴わない軽度な影響であり，毒性学的意義に乏しい変化と判断した．

血液学的検査において，175 mg/kg/日の雌で白血球数の高値が認められた．

血液化学的検査において，7 mg/kg/日以上の雌で総コレステロール及び尿素の高値又は高値傾向並びにグルコースの低値傾向，35 mg/kg/日以上の雌で ALT 及びトリグリセリドの高値又は高値傾向が認められた．しかし，グルコースについては対照群に比べ 10%未満，その他のパラメータについては対照群に比べ 1.5 倍以下の軽度な変化であり，アルブミン，クレアチニン又は AST などの変動や肝臓及び腎臓の病理組織学的変化は認められなかったことから，毒性とは判断しなかった．

器官重量測定において，35 mg/kg/日以上の雌雄で心臓重量の高値が認められた．また，病理組織学的変化を伴わない変動として，175 mg/kg/日の雌で副腎重量の高値傾向が認められた．

剖検において 35 mg/kg/日以上の雌雄で心肥大が認められ，病理組織学的検査において 35 mg/kg/日以上の雌雄で対照群でもみられる心臓（主に左心室の心内膜下）の小肉芽腫及び肉芽腫の発現頻度又は程度の増悪，175 mg/kg/日の雌雄で心臓の線維化，腺胃のびらん／潰瘍が認められた．なお，7 mg/kg/日の雄でも心肥大が認められたが，心臓重量に変化がなく，心臓に病理組織学的変化を伴っていなかったことから，毒性とは判断しなかった．

眼科学的検査において，本薬の投与に起因した変化は認められなかった．

いずれの変化も 6 週間の休薬により回復性を示した．

TK 測定では，イバブラジン及び ONO-IN-306 の Cmax 及び AUC24h は雌雄ともに用量の増加に伴って増加し，雄に比べ雌で高値を示した．

以上より，35 mg/kg/日以上で心臓の病理組織学的変化が認められたことから，無毒性量は雌雄とも 7 mg/kg/日と判断した．

2.6.6.3.1.3 Wistar 系ラットにおける経口投与による 26 週間反復投与毒性試験及び 6 週間回復性試験

［評価資料：4.2.3.2-14］

8 週齢の Wistar 系ラット（雌雄各 20 例／群）に本薬を 6，32 及び 180 mg/kg/日（3，16 及び 90 mg/kg の 1 日 2 回投与，約 7 時間間隔）の用量で 26 週間反復経口投与した．投与容量は 10 mL/kg とし，対照群には媒体である脱塩水を投与した．各群雌雄 5 例については投与終了後 6 週間の休薬期間を設定し，毒性変化の回復性について検討した．また，TK サテライト動物（雌雄各 4 例／群）を設け，血漿中イバブラジン及び ONO-IN-306 濃度を測定した．なお，血液化学的検査では通常の検査項目に加え，4 週間及び 13 週間反復投与毒性試験（2.6.6.3.1.1，2.6.6.3.1.2）で認められた尿量又は尿中 Na 排泄量の高値と本薬との関連性を評価するため，ANP の測定も行った．

本薬の投与に起因した死亡は認められなかった．

一般状態の変化として，32 mg/kg/日以上の雌雄で眼瞼下垂，180 mg/kg/日の雌雄で立毛が認められた．その他，6 mg/kg/日以上の雌及び 32 mg/kg/日以上の雄で流涎が認められたが，より短期の試験と同様，投与液の味などに対する影響の可能性が考えられ，毒性とは判断しなかった．いずれの用量においても体重及び摂餌量の推移に異常は認められなかった．

6 mg/kg/日以上の雌及び 180 mg/kg/日の雄で摂水量の高値が認められ，尿検査において 180 mg/kg/日の雌で尿中 Na 排泄量の高値が認められたが，血中電解質の変動や腎臓に病理組織学的変化を伴わない軽度な影響であり，毒性学的意義に乏しい変化と判断した．

血液化学的検査において，180 mg/kg/日の雌雄で ANP の高値が認められた．なお，統計学的に有意な差ではなかったが，6 mg/kg/日以上の雌でも ANP の高値傾向が認められた．

器官重量測定において，32 mg/kg/日以上の雌雄で心臓重量の高値が認められた．また，病理組織学的変化を伴わない変動として，180 mg/kg/日の雌で副腎重量の高値が認められた．その他，32 mg/kg/日以上の雌雄で肝臓重量の高値が認められたが，対照群に比べ 1.2 倍未満の軽度な変化であり，AST や ALT などの変動や肝臓の病理組織学的変化などは認められなかったことから，毒性とは判断しなかった．

剖検において 32 mg/kg/日以上の雌雄で腺胃のびらん，180 mg/kg/日の雌雄で心肥大が認められ，病理組織学的検査において 32 mg/kg/日以上の雌雄で腺胃のびらん，32 mg/kg/日以上の雄及び 180 mg/kg/日の雌で対照群でもみられる心臓（主に左心室の心内／外膜下）の小肉芽腫又は肉芽腫の発現頻度又は程度の増悪，180 mg/kg/日の雌雄で心臓の線維化及び軟骨化生が認められた．

眼科学的検査，血液学的検査及び肝臓の電子顕微鏡検査において，本薬の投与に起因した変化は認められなかった．

6 週間の休薬後の変化として，32 mg/kg/日以上の雌で心臓重量の高値，180 mg/kg/日の雌で ANP の高値が認められた．しかし，いずれの変化も投与期間終了時点より低下しており，心臓の病理組織学的変化は 6 週間の休薬により回復性を示していることから，これらの変化も回復過程にあると考えられた．その他の変化は，いずれも 6 週間の休薬により回復性を示した．

TK 測定では，イバブラジン及び ONO-IN-306 の Cmax 及び AUC24h は雌雄ともに用量の増加に伴って増加し，イバブラジンでは雄に比べ雌で高値を示した．

以上より，32 mg/kg/日以上の雌雄で一般状態の変化，心臓及び胃の病理組織学的変化が認められたことから，無毒性量は雌雄とも 6 mg/kg/日と判断した．

2.6.6.3.1.4 Wistar 系ラットにおける経口投与による 52 週間反復投与毒性試験

［評価資料：4.2.3.2-15］

6 週齢の Wistar 系ラット（雌雄各 40 例／群）に本薬を 6，32 及び 180 mg/kg/日（3，16 及び 90 mg/kg の 1 日 2 回投与，約 7 時間間隔）の用量で 52 週間反復経口投与した．投与容量は 5 mL/kg とし，対照群には媒体である注射用水を投与した．主試験群のうち各群雌雄 6 例から TK 採血を行い，血漿中イバブラジン及び ONO-IN-306 濃度を測定した．

32 mg/kg/日の雄 1 例，180 mg/kg の雄 8 例及び雌 16 例が投与 27 週以降に死亡又は切迫剖検され，死亡又は状態悪化の原因と考えられる変化として，心室の線維化や変性などの病理組織学的変化が認められた．

一般状態の変化として，6 mg/kg/日以上の雌雄で流涎が認められたが，より短期の試験と同様，投与液の味などに対する影響の可能性が考えられ，毒性とは判断しなかった．

180 mg/kg/日の雌雄で体重増加抑制に伴い体重推移が低値を示し，180 mg/kg/日の雌で摂餌量の低値傾向が認められた．

血液化学的検査において，180 mg/kg/日の雌雄で ALP の高値又は高値傾向，180 mg/kg/日の雌でカルシウムの高値が認められたが，骨に病理組織学的変化は認められなかった．

器官重量測定において，6 mg/kg/日以上の雌及び 32 mg/kg/日以上の雄で心臓重量の高値が認められた．また，病理組織学的変化を伴わない変動として，32 mg/kg/日以上の雄及び 180 mg/kg/日の雌で副腎重量の高値が認められた．その他，32 mg/kg/日以上の雌雄で肝臓重量の高値が認められたが，対照群に比べ 1.3 倍未満の軽度な変化であり，AST や ALT などの変動や肝臓の病理組織学的変化などは認められなかったことから，毒性とは判断しなかった．

剖検において，180 mg/kg/日の雌雄で心臓の色調の変化及び心肥大が認められ，病理組織学的検査では 6 mg/kg/日以上の雌及び 32 mg/kg/日以上の雄で対照群でもみられる心室の線維化の発現頻度又は程度の増悪，32 mg/kg/日以上の雌雄で腱索の変性，32 mg/kg/日以上の雄及び 180 mg/kg/日の雌で心房／心室の肥大又は拡張，対照群でもみられる心室の変性／壊死の発現頻度又は程度の増悪，180 mg/kg/日の雌雄で心房／心室の血栓が認められた．

血液学的検査において，本薬の投与に起因した変化は認められなかった．

TK 測定では，イバブラジン及び ONO-IN-306 の Cmax 及び AUC24h は雌雄ともに用量の増加に伴って増加し，イバブラジンでは雄に比べ雌で高値を示した．

以上より，最低用量である 6 mg/kg/日以上の雌及び 32 mg/kg/日以上の雄で心臓の病理組織学的変化が認められたことから，無毒性量は雄が 6 mg/kg/日，雌が 6 mg/kg/日未満と判断した．

2.6.6.3.1.5 Wistar 系ラットにおける 1 日 2 回 4 週間反復経口投与による毒性検討

［参考資料：4.2.3.2-4］

1 日 2 回投与による本薬の毒性を検討する目的で，Wistar 系ラット（雌雄各 5 例／群）に本薬を 60，120，180 及び 250 mg/kg/日（30，60，90 及び 125 mg/kg の 1 日 2 回投与，約 7 時間間隔）の用量で 4 週間反復経口投与した．対照群には媒体である脱塩水を投与した．また，TK サテライト動物（雌雄各 4 例／群）を設け，血漿中イバブラジン及び ONO-IN-306 濃度を測定した．

本薬の投与に起因した死亡は認められなかった．

一般状態の変化として，180 mg/kg/日以上の雌及び 250 mg/kg/日の雄で自発運動の減少が認められた．その他，120 mg/kg/日以上の雌及び 180 mg/kg/日以上の雄で流涎が認められたが，4 週間反復投与毒性試験（2.6.6.3.1.1）と同様に投与液の味などに対する影響の可能性が考えられ，毒性とは判断しなかった．いずれの用量においても体重及び摂餌量の推移に異常は認められなかった．

60 mg/kg/日以上の雌及び 120 mg/kg/日以上の雄で摂水量の高値傾向が認められた．

尿検査において，60 mg/kg/日以上の雌及び 120 mg/kg/日以上の雄で尿中 Na 排泄量の高値傾向，250 mg/kg/日の雌で尿中 K 排泄量の高値傾向及び尿中尿素排泄量の高値が認められた．

血液学的検査において，60 mg/kg/日以上の雌でリンパ球数の高値，250 mg/kg/日の雌で単球数の高値が認められたが，いずれも投与前の対照群における範囲内の変動であることから，毒性とは判断しなかった．

血液化学的検査において，60 mg/kg/日以上の雄で無機リンの低値，120 mg/kg/日以上の雌で Na の低値又は低値傾向が認められた．

器官重量測定において，60 mg/kg/日以上の雌雄で心臓重量の高値が認められた．また，病理組織学的変化を伴わない変動として，180 mg/kg/日以上の雌で副腎重量の高値が認められた．その他，250 mg/kg/日の雌で肝臓重量の高値が認められたが，対照群に比べ 1.3 倍未満の軽度な変化であり，AST や ALT などの変動や肝臓の病理組織学的変化などは認められなかったことから，毒性とは判断しなかった．

剖検において，180 mg/kg/日以上の雄及び 180 mg/kg/日の雌で心肥大が認められた．

病理組織学的検査において，60 mg/kg/日以上の雌及び 120 mg/kg/日以上の雄で対照群でもみられる心臓（主に左心室の心内膜下）の小肉芽腫又は肉芽腫の発現頻度又は程度の増悪，120 mg/kg/日以上の雌及び 180 mg/kg/日の雄で腺胃のびらん／潰瘍が認められた．

TK 測定では，イバブラジン及び ONO-IN-306 の Cmax 及び AUC24h は，250 mg/kg の投与 1 回目の Cmax を除き，雌雄ともに用量の増加に伴って増加し，イバブラジンでは雄に比べ雌で高値を示した．

以上，1 日 2 回 4 週間反復投与により最低用量の 60 mg/kg/日以上で尿電解質変動及び心臓の病理組織学的変化が認められた．これらの変化は 1 日 1 回投与による 4 週間反復投与毒性試験（2.6.6.3.1.1）でも同様に認められており，その他の検査も含め，1 日の投与回数による毒性プロファイルに明らかな差は認められなかった．

2.6.6.3.1.6 各系統のラットにおける 4 週間反復経口投与による毒性検討

［参考資料：4.2.3.2-1，4.2.3.2-6］

SD 系ラットを用いた 4 週間反復経口投与毒性試験において，炎症性細胞浸潤を特徴とする心臓病理所見が対照群を含めて認められた．本薬の標的臓器は心臓であり，自然発生性の心臓病理所見が高頻度に認められる系統では毒性評価に影響する可能性が考えられた．本試験では，本薬の評価に適したラットの系統を検討する目的で，SD 系（供給源が異なる 2 種），Fischer 系又は Wistar 系のラット（雄 10 例／群）に，本薬を 223 mg/kg の用量で 1 日 1 回，4 週間反復経口投与した．投与容量は 10 mL/kg とし，各系統の対照群には媒体である脱塩水を投与した．また，TK サテライト動物（雄 2 又は 4 例／群）を設け，血漿及び心臓中イバブラジン濃度を測定した．

本薬の投与に起因した死亡は認められなかった．

Fischer 系及び Wistar 系ラットで各対照群に比べ体重増加抑制が認められた．

器官重量測定において，すべての系統で各対照群に比べ心臓重量の高値が認められた．

剖検において，供給源が異なる 2 種の SD 系ラットで心室に白色点（斑）が認められた．

病理組織学的検査において，対照群を含めたすべての群で心筋に自然発生性の小肉芽腫又は肉芽腫が認められた（表 2.6.6.3.1.6-1）．対照群では，Wistar 系ラットの半数例に小肉芽腫のみが認められたが，その他の系統では小肉芽腫又は肉芽腫がほぼ全例に認められた．本薬投与群では，各系統の対照群よりも小肉芽腫及び肉芽腫の頻度／程度ともに高かった．

TK 測定では，血漿中イバブラジンの AUC24h は各系統においてほぼ同等の値を示した．

以上より，いずれの系統の対照群及び本薬投与群においても心臓に病理組織学的変化が認められたが，その発現頻度及び程度は対照群の Wistar 系ラットが最も低かったことから，Wistar 系ラットが本薬の評価に最も適していると考えられた．

表 2.6.6.3.1.6-1　各系統のラットにおける 4 週間反復経口投与時の心臓病理組織学的変化

用量	SD 系 1[a]		SD 系 2[a]		Fischer 系		Wistar 系	
（mg/kg/日）	0	223	0	223	0	223	0	223
例数	10	10	10	10	10	10	10	10
心臓[b]								
小肉芽腫	9	10	9	9	10	10	5	9
肉芽腫	2	9	1	8	4	10	0	4

a：供給源が異なる 2 種
b：所見が認められた例数

2.6.6.3.2　イヌ

2.6.6.3.2.1　イヌにおける経口投与による 4 週間反復投与毒性試験

［評価資料：4.2.3.2-16，参考資料：4.2.3.2-20］

8～8.5 カ月齢のビーグル犬（雌雄各 3 例／群）に本薬を 4.6，14 及び 42 mg/kg の用量で 1 日 1 回，4 週間反復経口投与した．投与容量は 1 mL/kg とし，対照群には媒体である脱塩水を投与した．試験動物から TK 採血を行い，血漿中イバブラジン濃度を測定した．

本薬の投与に起因した死亡は認められなかった．

一般状態の変化として，14 mg/kg/日以上の雌雄で嘔吐，振戦，筋緊張亢進又は後肢弛緩，姿勢異常，歩行異常，42 mg/kg/日の雌雄で腹臥位及び横臥位，後弓反張及び痙攣が認められた．これらの多くは血漿中イバブラジン濃度が高かった投与後 1 時間以内から発現する一過性の変化であり，投与期間の初期に頻発する傾向が認められた．その他，4.6 mg/kg/日で嘔吐が散見されたが，雌雄各 1 例のみで低頻度に認められる変化であることから，毒性学的意義のない変化と判断した．いずれの用量においても体重及び摂餌量の推移に異常は認められなかった．

投与 3 及び 24 日目に実施した心電図検査において，4.6 及び 14 mg/kg/日の雌雄で心拍数減少，4.6 mg/kg/日以上の雄及び 14 mg/kg/日以上の雌で洞房ブロック，4.6 mg/kg/日以上の雄及び 42 mg/kg/日の雌で洞性徐脈，第 1 度又は第 2 度房室ブロック，42 mg/kg/日の雌で洞停止が認められた．42 mg/kg/日では心拍数の明らかな変動は認められなかったが，その原因として中枢神経症状による影響の可能性が考えられた．これらの心電図異常は本薬の薬理作用の延長線上の変化と考えられ，血圧の変動は認められなかった．一般状態変化も認められない 4.6 mg/kg/日での心電図異常は毒性と判断しなかった．

尿検査において，42 mg/kg/日の雄で尿中 Na 排泄量の高値傾向，42 mg/kg/日の雌で尿中 Na 排泄量の低値傾向が認められたが，同用量の雌雄で相反した変化であったこと，腎臓に病理組織変化は認められなかったことから，毒性とは判断しなかった．

器官重量測定において 14 mg/kg/日以上の雌雄で胸腺重量の低値傾向が認められ，病理組織学的検査において 14 mg/kg/日以上の雌雄で胸腺の萎縮が認められた．14 mg/kg/日以上で

は嘔吐や振戦，筋緊張亢進などの一般状態変化が認められていることから，胸腺の変化はストレスによる二次的変化である可能性が考えられた．

体温，血圧，眼科学的検査，血液学的検査，血液化学的検査及び剖検において，本薬の投与に起因した変化は認められなかった．

TK 測定では，イバブラジンの Cmax 及び AUC24h は雌雄ともに用量の増加に伴って増加した．反復投与による影響は認められなかった．

以上より，14 mg/kg/日以上で一般状態の変化が認められたことから，無毒性量は雌雄とも 4.6 mg/kg/日と判断した．

2.6.6.3.2.2 イヌにおける経口投与による 13 週間反復投与毒性試験及び 6 週間の回復性試験

［評価資料：4.2.3.2-17，参考資料：4.2.3.2-20］

6.5～7.5 カ月齢のビーグル犬（雌雄各 5 例／群）に本薬を 3，10 及び 30 mg/kg の用量で 1 日 1 回，13 週間反復経口投与した．投与容量は 1 mL/kg とし，対照群には媒体である脱塩水を投与した．各群雌雄 2 例については投与終了後 6 週間の休薬期間を設定し，毒性変化の回復性について検討した．試験動物から TK 採血を行い，血漿中イバブラジン及び ONO-IN-306 濃度を測定した．なお，投与期間中，3 mg/kg/日の雄 1 例，10 mg/kg/日の雌 2 例及び 30 mg/kg/日の雌 1 例に 20%以上の体重減少が認められたことから，当該動物への給餌量を重量として 1.5 倍に増量した．

本薬の投与に起因した死亡は認められなかった．

一般状態の変化として，10 mg/kg/日以上で嘔吐，振戦又は後肢固縮，30 mg/kg/日で姿勢異常，運動失調，横臥位及び痙攣が認められた．これらは血漿中イバブラジン濃度が高かった投与後 1 時間以内から発現する一過性の変化であり，投与期間の初期に頻発する傾向が認められた．

10 mg/kg/日以上の雌で体重の減少が認められた．その他，3 mg/kg/日の雄 1 例で 20%以上の体重減少が認められたが，最低用量の 1 例のみの変化であり，他の動物及び平均値の変動は対照群と同程度であったことから，偶発的な変動と判断した．

投与 4，8 及び 13 週目に実施した心電図検査において，3 mg/kg/日以上の雌雄で心拍数減少及び洞性徐脈，10 mg/kg/日以上の雌雄で洞房ブロック，第 1 度又は第 2 度房室ブロック，10 mg/kg/日以上の雄及び 30 mg/kg/日の雌で洞停止，10 mg/kg/日以上の雌及び 30 mg/kg/日の雄で心室補充収縮，30 mg/kg/日の雌で心室融合収縮が認められた．これらの心電図異常は本薬の薬理作用の延長線上の変化と考えられ，血圧の変動は認められなかった．一般状態変化も認められない 3 mg/kg/日での心電図異常は毒性と判断しなかった．

器官重量測定において 10 mg/kg/日以上の雌で胸腺重量の低値傾向が認められ，病理組織学的検査において 10 mg/kg/日以上の雌及び 30 mg/kg/日の雄で胸腺の萎縮が認められた．10 mg/kg/日以上では体重の減少，嘔吐や振戦，後肢固縮などの一般状態変化が認められていることから，胸腺の変化はストレスによる二次的変化である可能性が考えられた．その他，3 mg/kg/日の雌でも胸腺重量の低値傾向が認められたが，施設背景値の範囲内の変動であり，胸腺に病理組織学的変化は認められなかったことから，毒性とは判断しなかった．

体温，血圧，眼科学的検査，尿検査，血液学的検査及び血液化学的検査において，本薬の投与に起因した変化は認められなかった．

いずれの変化も 6 週間の休薬により回復性を示した．

TK 測定では，イバブラジン及び ONO-IN-306 の Cmax 及び AUC24h は雌雄ともに用量の増加に伴って増加した．

以上より，10 mg/kg/日以上で一般状態の変化及び体重減少が認められたことから，無毒性量は雌雄とも 3 mg/kg/日と判断した．

2.6.6.3.2.3 イヌにおける経口投与による 26 週間反復投与毒性試験及び 8 週間の回復性試験

［評価資料：4.2.3.2-18，参考資料：4.2.3.2-20］

5～8 カ月齢のビーグル犬（雌雄各 6 例／群）に本薬を 4，12.5 及び 40 mg/kg/日（2，6.25 及び 20 mg/kg の 1 日 2 回投与，約 7 時間間隔）の用量で 26 週間反復経口投与した．投与容量は 1 mL/kg とし，対照群には媒体である脱塩水を投与した．各群雌雄 2 例については投与終了後 8 週間の休薬期間を設定し，毒性変化の回復性について検討した．試験動物から TK 採血を行い，血漿中イバブラジン及び ONO-IN-306 濃度を測定した．

本薬の投与に起因した死亡は認められなかった．

一般状態の変化として，12.5 mg/kg/日以上で振戦，40 mg/kg/日で嘔吐，姿勢異常，運動失調及び後肢の筋緊張亢進，40 mg/kg/日の雄 1 例で痙攣が認められた．嘔吐を除くこれらの多くは血漿中イバブラジン濃度が高かった投与後 1 時間以内から発現する一過性の変化であり，投与期間の初期に頻発する傾向が認められた．いずれの用量においても体重及び摂餌量の推移に異常は認められなかった．

投与 12 及び 25 週目に実施した心電図検査において，4 mg/kg/日以上の雌雄で心拍数減少，第 1 度及び第 2 度房室ブロック，4 mg/kg/日以上の雄及び 40 mg/kg/日の雌で洞性徐脈及び洞房ブロック，40 mg/kg/日の雌雄で洞停止，40 mg/kg/日の雄で心房／心室性期外収縮が認められた．これらの心電図異常は本薬の薬理作用の延長線上の変化と考えられ，血圧の変動は

認められなかった．一般状態変化も認められない 4 mg/kg/日以下での心電図異常は毒性と判断しなかった．

体温，血圧，眼科学的検査，尿検査，血液学的検査，血液化学的検査，器官重量，剖検及び病理組織学的検査において，本薬の投与に起因した変化は認められなかった．

いずれの変化も 8 週間の休薬により回復性を示した．

TK 測定では，イバブラジン及び ONO-IN-306 の Cmax 及び AUC24h は雌雄ともに用量の増加に伴って増加した．

以上より，12.5 mg/kg/日以上で一般状態の変化が認められたことから，無毒性量は雌雄とも 4 mg/kg/日と判断した．

2.6.6.3.2.4 イヌにおける経口投与による 53 週間反復投与毒性試験及び 12 週間の回復性試験

［評価資料：4.2.3.2-19］

6～7 カ月齢のビーグル犬（雌雄各 6 例／群）に本薬を 2，7 及び 24 mg/kg/日（1，3.5 及び 12 mg/kg の 1 日 2 回投与，約 8 時間間隔）の用量で 53 週間反復経口投与した．投与容量は 2 mL/kg とし，対照群には媒体である注射用水を投与した．各群雌雄 2 例については投与終了後 12 週間の休薬期間を設定し，毒性変化の回復性を検討した．試験動物から TK 採血，心臓及び眼球の採取を行い，血漿中，心臓及び眼球中のイバブラジン及び ONO-IN-306 濃度を測定した．なお，臨床試験において視覚障害（光視）が報告されたことから，本薬の視機能に及ぼす影響について評価するため，投与 26～27 週目，投与 50～51 週目及び休薬期間中に ERG 検査を行った．

24 mg/kg/日の雌 1 例が投与 341 日目（投与 49 週目）に死亡した．剖検や病理組織学的検査において死亡につながる所見は認められなかったが，この動物では投与 26 週以降，高度な徐脈（投与前期間：120～130 回／分，投与 26 週以降：40～60 回／分）が継続して認められた．

一般状態の変化として，24 mg/kg/日の雌雄で流涎，嘔吐及び液状便が認められた．いずれの用量においても体重及び摂餌量の推移に異常は認められなかった．

心電図検査において，投与 1 週目以降の 24 mg/kg/日の雄及び投与 13 週目以降の 7 mg/kg/日以上の雌雄で心拍数減少が認められた．また，投与 41～42 週目以降には 7 mg/kg/日以上の雌雄で洞房ブロック，洞停止及び第 2 度房室ブロック，7 mg/kg/日以上の雄及び 24 mg/kg/日の雌で洞性徐脈が認められた．これらの心電図異常は本薬の薬理作用の延長線上の変化と考えられ，血圧の変動は認められなかった．死亡例や一般状態変化も認められない 7 mg/kg/日での心電図異常は毒性と判断しなかった．

ERG 検査において，2 mg/kg/日以上で明順応下での b 波振幅の低下，7 mg/kg/日以上で暗順応開始後 4 分までの杆体 b 波振幅の低下が認められた．どちらの変化も 26～27 週検査時と 50～51 週検査時で変化の程度に明らかな差は認められなかった．また，b 波の潜時及び暗順応開始後 6～12 分の杆体 b 波の振幅に変動は認められなかった．

血圧，眼科学的検査，尿検査，血液学的検査，血液化学的検査，器官重量，剖検，病理組織学的検査及び電子顕微鏡を用いた眼の病理組織学的検査において，本薬の投与に起因した変化は認められなかった．

一般状態の変化は休薬とともに消失し，心電図検査及び ERG 検査において認められた変化はそれぞれ 8 週間及び 1 週間以上の休薬により回復性を示した．

TK 測定では，イバブラジン及び ONO-IN-306 の Cmax 及び AUC24h は雌雄ともに用量の増加に伴って増加した．眼球中濃度測定では，イバブラジン及び ONO-IN-306 は雌雄ともに用量の増加に伴って増加し，12 週間の休薬により減少した．心臓中濃度測定では，イバブラジン及び ONO-IN-306 のどちらも検出されなかった．

ERG 検査において認められた変化は本薬の薬理作用である HCN チャネル阻害作用に起因する変化と考えられた．投与期間に応じた増悪又は低用量化は認められず，1 週間の休薬により回復性が認められた．また，眼科学的検査，病理組織学的検査及び電子顕微鏡を用いた眼の病理組織学的検査において，網膜及び視神経に異常は認められなかった．したがって，本薬が視機能に及ぼす影響は重篤ではないと考えられた．

以上より，最低用量である 2 mg/kg/日から雌雄ともに ERG 検査において光刺激に対する反応性（b 波振幅）の低下が認められたことから，無毒性量は 2 mg/kg/日未満であった．なお，臨床試験における視機能への影響は日常生活に影響を及ぼさない程度の軽度なものであり，本薬の薬理作用に基づく ERG の変化を除く無毒性量は，24 mg/kg/日の雌雄で嘔吐などの一般状態の変化，24 mg/kg/日の雌で死亡が認められたことから，7 mg/kg/日と判断した．

2.6.6.3.2.5 イヌにおける 1 日 2 回 12 週間反復経口投与による毒性検討

［参考資料：4.2.3.2-7］

1 日 2 回投与による本薬の毒性を検討する目的で，ビーグル犬（雌雄各 2 又は 4 例／群）に本薬を 10，20 及び 40 mg/kg/日（5，10 及び 20 mg/kg の 1 日 2 回投与，約 7 時間間隔）の用量で 12 週間反復経口投与した．投与容量は 1 mL/kg とした．試験動物から TK 採血を行い，血漿中イバブラジン及び ONO-IN-306 濃度を測定した．

本薬の投与に起因した死亡は認められなかった．

一般状態の変化として，20 mg/kg/日以上で嘔吐，振戦，後肢硬直，40 mg/kg/日で姿勢異常，筋緊張亢進及び運動失調が認められた．これらの多くは投与 2 週間までの毎日，投与後

4 時間以内に認められたが，投与 9 日目以降は程度が弱くなる傾向が認められた．いずれの用量においても体重及び摂餌量の推移に異常は認められなかった．

心電図検査において，投与 1 日目から 10 mg/kg/日以上で心拍数減少及び洞停止，10 mg/kg/日の雌及び 20 mg/kg/日以上の雄で第 1 度又は第 2 度房室ブロック，20 mg/kg/日以上の雄及び 40 mg/kg/日の雌で心房期外収縮が認められた．これらの心電図異常は本薬の薬理作用の延長線上の変化と考えられ，血圧の変動は認められなかった．一般状態変化も認められない 10 mg/kg/日での心電図異常は毒性と判断しなかった．

尿検査において，投与 4 週目から 10 mg/kg/日以上で尿量の高値傾向が認められたが，投与 12 週目では程度が弱くなる傾向が認められ，13 週間反復投与毒性試験の対照群における範囲内の変動であること，その他の尿検査値や副腎又は腎臓の病理組織学的変化は認められなかったことから，毒性とは判断しなかった．

体温，血圧，便潜血検査，血液学的検査，血液化学的検査，器官重量，剖検及び病理組織学的検査において，本薬の投与に起因した変化は認められなかった．

TK 測定では，イバブラジン及び ONO-IN-306 の Cmax 及び AUC24h は雌雄ともに用量の増加に伴って増加した．

以上，1 日 2 回 12 週間反復投与により最低用量の 5 mg/kg（10 mg/kg/日）以上で心拍数減少及び心電図異常，10 mg/kg（20 mg/kg/日）以上で嘔吐，振戦などの一般状態変化が認められた．これらの変化は 1 日 1 回投与による 13 週間反復投与毒性試験（2.6.6.3.2.2）でも同様に認められており，その他の検査も含め，1 日の投与回数による毒性プロファイルに明らかな差は認められなかった．

2.6.6.4 遺伝毒性試験

2.6.6.4.1 *In vitro* 試験

2.6.6.4.1.1 細菌を用いた復帰突然変異試験

［評価資料：4.2.3.3.1-1，参考資料：4.2.3.3-1］

Salmonella typhimurium TA98，TA100，TA1535，TA1537 及び *Escherichia coli* WP2*uvrA*，WP2*uvrA*（pKM101）を用い，プレート法により代謝活性化による場合（S9mix 存在下）及び代謝活性化によらない場合（S9mix 非存在下）について試験を実施した．本薬は注射用水に溶解し，用量はイバブラジン塩酸塩量として 50～5000 μg/plate とした．

その結果，代謝活性化の有無に関わらず，いずれの菌株においても復帰変異コロニー数の増加は認められなかった．

以上，本薬は遺伝子突然変異誘発性を有さないと判断した．

2.6.6.4.1.2 マウスリンフォーマ *tk* 試験

［評価資料：4.2.3.3.1-3，参考資料：4.2.3.3.1-2，4.2.3.3-1］

マウスリンフォーマ細胞 L5178Y（$tk^{+/-}$）を用い，代謝活性化による場合（S9mix 存在下で 3 時間処理）及び代謝活性化によらない場合（S9mix 非存在下で 3 時間処理）について試験を実施した．本薬はフィッシャー培地又は精製水に溶解し，終濃度は S9mix 存在下で 87～1624 μg/mL，S9mix 非存在下では 87～1856 μg/mL とした．

その結果，S9mix 存在下の 464 μg/mL 以上及び S9mix 非存在下の 696 μg/mL 以上で遺伝子突然変異頻度（MF）の高値が認められた．

以上，本薬はマウスリンフォーマ細胞に対して遺伝毒性誘発性を有すると判断した．

2.6.6.4.1.3 ラット初代培養肝細胞を用いた不定期 DNA 合成試験

［評価資料：4.2.3.3.1-4，参考資料：4.2.3.3-1］

ラットより得られた初代培養肝細胞を用い，^{3}H-チミジンを含む培地で 20 時間処理して試験を実施した．本薬は注射用水に溶解し，濃度は試験 1 で 55～550 μg/mL，試験 2 で 100～550 μg/mL とした．核内への ^{3}H-チミジン取り込みの指標であるネット核グレイン数（NNG）及び DNA 修復細胞の出現頻度を求めた．

その結果，試験 1 及び試験 2 ともに 550 μg/mL で NNG 及び DNA 修復細胞の出現頻度が増加した．なお，その際の相対生存率（媒体対照を 100%としたときの細胞の生存率）は試験 1 で 41.0%，試験 2 で 54.2%であった．

以上，本薬はラット初代培養肝細胞に対して DNA 損傷性を有すると判断した．

2.6.6.4.1.4 培養ヒトリンパ球を用いた染色体異常試験

［評価資料：4.2.3.3.1-5，参考資料：4.2.3.3-1］

健康成人より得られた末梢血リンパ球を用い，代謝活性化による場合（S9mix 存在下で 2 時間処理）及び代謝活性化によらない場合（S9mix 非存在下で 24 時間連続処理）について試験を実施した．本薬は培養液に溶解し，濃度は S9mix 存在下では 260～2088 μg/mL，S9mix 非存在下では 46～139 μg/mL を設定した．標本観察は S9mix 存在下では 487，882 及び 1670 μg/mL，S9mix 非存在下では 46，79 及び 116 μg/mL について実施した．

その結果，S9mix 非存在下の 46 μg/mL で染色体構造異常を有する細胞の出現数の増加が認められた．より高用量では染色体構造異常を有する細胞の明らかな出現数の増加は認められず，用量相関性を伴わない変化であったが，再現性が認められたことから本薬による変化と判断した．なお，S9 mix 存在下の 487 及び 882 μg/mL で染色体構造異常を有する細胞の出現数の増加が認められたが，用量相関性を伴わず，再現性の認められない変化であった．

以上，本薬はヒトリンパ球に対して染色体構造異常誘発性を有すると判断した．

2.6.6.4.2 *In vivo* 遺伝毒性試験

2.6.6.4.2.1 ラットを用いた不定期 DNA 合成試験

［評価資料：4.2.3.3.2-1，参考資料：4.2.3.3-1］

6～8 週齢の Wistar 系ラット（雌雄各 10 例／群）に本薬を単回経口投与し，試験を実施した．用量設定試験において雄では 928 mg/kg まで死亡例は認められず，雌では 928 mg/kg で死亡例が認められたことから，本試験における本薬の用量は，雄が 278 及び 928 mg/kg，雌が 181 及び 603 mg/kg とした．投与容量は 20 mL/kg とし，対照群には媒体である精製水を投与した．投与後 2～4 及び 12～14 時間に肝細胞を採取し，^{3}H-チミジン存在下，37℃で 4 時間培養後に標本を作製し，核内への ^{3}H-チミジン取り込みの指標である NNG 及び DNA 修復細胞の出現頻度を求めた（雌雄各 3 例／群／時点）．また，TK サテライト動物（雌雄各 3 例／群）を設け，投与後 2 及び 12 時間における血漿及び肝臓中のイバブラジン及び ONO-IN-306 濃度を測定した．

その結果，NNG の増加及び DNA 修復細胞数の増加は認められなかった．なお，928 mg/kg の雄及び 603 mg/kg の雌の各 1 例が死亡した．TK 測定において，雌 603 mg/kg におけるイバブラジン及び ONO-IN-306 の血漿中 Cmax はそれぞれ 29000 及び 420 ng/mL，肝臓中 Cmax はそれぞれ 421000 及び 13000 ng/mL であった．

以上，本薬は生体においては DNA 損傷性を有さないと判断した．

2.6.6.4.2.2 ラットを用いた染色体異常試験

［評価資料：4.2.3.3.2-2，参考資料：4.2.3.3-1］

6～9 週齢の Wistar 系ラット（対照群は雌雄各 10 例，最高用量群は雌雄各 15 例，その他の群は雌雄各 5 例／群）に本薬を単回経口投与し，試験を実施した．用量設定試験において雄では 928 mg/kg まで死亡例は認められず，雌では 928 mg/kg で死亡例が認められたことから，本試験における本薬の用量は，雄が 232，464 及び 928 mg/kg，雌が 151，302 及び 603 mg/kg とした．投与容量は 20 mL/kg とし，対照群には媒体である精製水を投与した．投与後 18 時間（全群）及び 42 時間（対照群及び最高用量群）に骨髄を採取し，骨髄塗抹標本を作製して分裂中期像を観察した（雌雄各 5 例／群／時点）．また，TK サテライト動物（雌雄各 2 例／群）を設け，投与後 10 分及び 2 時間における血漿中イバブラジン及び ONO-IN-306 濃度を測定した．

その結果，いずれの投与群においても染色体構造異常を有する細胞の出現頻度の増加は認められなかった．なお，928 mg/kg の雄及び 603 mg/kg の雌において，各 4 例の死亡又は切

迫剖検例が認められた．TK 測定において，雌 603 mg/kg におけるイバブラジンの血漿中 Cmax は 18000 ng/mL，雄 928 mg/kg における ONO-IN-306 の血漿中 Cmax は 390 ng/mL であった．

以上，本薬は生体においては染色体異常誘発性を有さないと判断した．

2.6.6.4.2.3 マウスを用いた小核試験

［参考資料：4.2.3.3.2-3，4.2.3.3-1］

5～6 週齢の OF1 系マウス（雌雄各 10 例／群）に本薬を単回経口投与し，試験を実施した．用量設定試験において 742 mg/kg 以上で死亡例が認められたが，464 mg/kg では死亡例は認められなかったことから，本試験における本薬の用量は 116，232 及び 464 mg/kg とした．投与容量は 25 mL/kg とし，対照群には媒体である蒸留水を投与した．投与後 24 及び 48 時間に骨髄を採取し，骨髄塗抹標本を作製して幼若赤血球を観察した（雌雄各 5 例／群／時点）．

その結果，いずれの投与群においても小核を有する幼若赤血球の出現頻度の増加は認められなかった．なお，いずれの投与群においても成熟赤血球数に対する幼若赤血球数の比率の低下が認められたことから，骨髄は本薬に曝露されていると考えられた．

以上，本薬は小核誘発性を有さないと判断した．

2.6.6.5 がん原性試験

CD-1 系マウス及び Wistar 系ラットを用いて，13 週間混餌投与による用量設定試験及び 104 週間混餌投与によるがん原性試験を実施した．

2.6.6.5.1 マウスにおける 13 週間混餌投与による用量設定試験

［評価資料：4.2.3.4.1-2］

5 週齢の CD-1 系マウス（雌雄各 10 例／群）に本薬を 13 週間混餌投与し，がん原性試験の用量設定試験を実施した．4 週間の予備試験（30 及び 300 mg/kg/日で実施）ではいずれの群においても毒性徴候が認められなかったことから［2.6.7.10A］，本試験では 0（対照群），30，100，300 及び 600 mg/kg/日を設定した．TK 測定群として雌雄各 16 例／群のサテライト動物を設け，雌雄各 4 例／時点で採血を行い，血漿中イバブラジン及び ONO-IN-306 濃度を測定した．

本薬の投与に起因した死亡は認められず，一般状態にも変化は認められなかった．

100 mg/kg/日以上の雄及び 600 mg/kg/日の雌で体重増加抑制が認められたが，体重の変動は対照群に対して 10％未満であり，いずれの用量においても摂餌量の変動は認められな

かった．また，300 mg/kg/日の雄の体重推移が対照群に比べ低値であったが，用量に応じない変化であることから，偶発的な変動と判断した．

血液化学的検査において，300 mg/kg/日以上の雄で ALP の高値又は高値傾向，100 mg/kg/日以上の雄及び 300 mg/kg/日の雌でビリルビンの高値が認められた．

器官重量測定において 30 mg/kg/日以上の雌雄で用量に応じない心臓重量の高値又は高値傾向が認められ，病理組織学的検査において 30 及び 300 mg/kg/日以上の雄及び 600 mg/kg/日の雌で心室壁の心筋細胞の軽微な肥大が認められたが，いずれも本薬の薬理学的作用によるものと考えられた．

血液学的検査及び剖検において，本薬の投与に起因した変化は認められなかった．

TK 測定では，イバブラジンの AUC24h は 30 mg/kg/日から 300 mg/kg/日の雄では用量比未満の増加が認められたが，30 mg/kg/日以上の雌及び 300 mg/kg/日以上の雄では用量の増加に伴って増加した．また，ONO-IN-306 の AUC24h は雌雄ともに用量の増加に伴って増加した．イバブラジンの AUC24h が臨床最大用量における AUC24h（352 ng･h/mL）の 25 倍以上となる用量は，雌雄とも 300 mg/kg/日以上であった．

以上より，マウスがん原性試験の最大用量は，イバブラジンの AUC24h が臨床最大用量における AUC24h の 25 倍以上に達すると考えられる 300 mg/kg/日以上が適当と判断した．

2.6.6.5.2 マウスにおける 104 週間混餌投与によるがん原性試験

［評価資料：4.2.3.4.1-3，4.2.3.4.1-4］

5 週齢の CD-1 系マウス（雌雄各 50 例／群）に本薬を 20，90 及び 405 mg/kg の用量で 104 週間混餌投与し，がん原性について検討した．また，雌雄各 50 例の対照群を 2 群設置した．なお，405 mg/kg/日群については死亡率が上昇したため，投与 81 週以降に用量を 180 mg/kg/日に変更したが，405/180 mg/kg/日群の雄は投与 94 週に生存率が 20%まで低下したため，投与を終了して剖検した．TK 測定群として雌雄各 26 例／群のサテライト動物を設け，雌雄各 6 例／時点で採血を行い，血漿中イバブラジン及び ONO-IN-306 濃度を測定した．

405/180 mg/kg/日の死亡例では，心臓の病理組織学的変化として心筋の変性，空胞化及び線維化，心室拡張，心筋肥大，心房血栓が認められたが，腫瘍によると考えられる死亡率の上昇は認められなかった．

20 mg/kg/日以上の雌及び 405/180 mg/kg/日の雄で体重増加抑制が認められ，投与 80 週における 405/180 mg/kg/日の雌雄の体重増加量は対照群に対して約 30%低い値を示した．

病理組織学的検査において，いずれの投与群でも本薬の投与に起因すると考えられる腫瘍性変化は認められなかった．非腫瘍性変化として 90 又は 405/180 mg/kg/日で心筋変性，肝細

胞の空胞化，類洞拡張及びうっ血，肺胞中隔の線維化，変性及び肥厚，胸腺の退縮及び萎縮，脾臓のヘモジデリン沈着が認められた．

TK 測定では，イバブラジン及び ONO-IN-306 の Cmax 及び AUC24h は雌雄ともに用量の増加に伴って増加した．

以上より，本薬を CD-1 系マウスの雌雄に 104 週間混餌投与した結果，本薬は最大耐量である 405/180 mg/kg/日においてもがん原性を示さなかった．

2.6.6.5.3 ラットにおける 13 週間混餌投与による用量設定試験

［評価資料：4.2.3.4.1-6］

6 週齢の Wistar 系ラット（雌雄各 10 例／群）に本薬を 13 週間混餌投与し，がん原性試験の用量設定試験を実施した．6 週間の予備試験（20 及び 200 mg/kg/日で実施）では 20 mg/kg/日以上の雌雄で薬理作用に関連した心拍数減少，200 mg/kg/日の雌雄で体重増加抑制（-27～-39%），摂餌量の低値（-15～-21%），心臓重量の増加及び小肉芽腫が認められた．また，20 mg/kg/日では心拍数減少以外，本薬投与の影響は認められなかった［2.6.7.10D］．これらのことから本試験では，軽度な毒性変化が期待される 200 mg/kg/日を最高用量として，0（対照群），20，50，100，150 及び 200 mg/kg/日を設定した．また，各群雌雄 3 例について投与前，投与 8，29，85 日に心拍数を測定した．TK 測定群として雌雄各 8 例／群のサテライト動物を設け，雌雄各 4 例／時点で採血を行い，血漿中イバブラジン及び ONO-IN-306 濃度を測定した．

本薬の投与に起因した死亡は認められなかった．

一般状態の変化として 20 mg/kg/日以上の雄及び 50 mg/kg/日以上の雌で，主に頭部，頸部及び肩部に脱毛が認められた．

20 mg/kg/日以上の雄及び 100 mg/kg/日以上の雌で体重増加抑制が認められ，100 mg/kg/日以上の雄及び 150 mg/kg/日以上の雌で対照群に対して 10%以上低い体重推移を示した．また，150 mg/kg/日以上の雄及び 100 mg/kg/日以上の雌で摂餌量の低値が認められた．

心拍数測定において，20 mg/kg/日以上の雌雄で心拍数の低値が認められた．

血液学的検査において，20 mg/kg/日以上の雄及び 200 mg/kg の雌で赤血球数，ヘマトクリット値及びヘモグロビン濃度の高値又は高値傾向が認められた．

血液化学的検査において，50 mg/kg/日以上の雌で ALP の高値，200 mg/kg/日の雌でコレステロールの高値が認められた．

器官重量測定において 20 mg/kg/日以上の雌雄で心臓重量の高値又は高値傾向が認められ，病理組織学的検査において 20 mg/kg/日以上の雌雄で心筋炎，150 mg/kg/日以上の雄及び 200 mg/kg/日の雌で心室の心筋線維の肥大が認められたが，いずれも本薬の薬理作用に起因

するものと考えられた．また，20 mg/kg/日以上の雄で肝臓重量の高値，200 mg/kg/日の雄で副腎及び精嚢重量の低値，200 mg/kg/日の雌で子宮重量の低値が認められた．更に，200 mg/kg/日の雌で子宮筋層及び子宮内膜の萎縮が認められた．

TK 測定では，イバブラジン及び ONO-IN-306 の AUC24h は雌雄ともに用量の増加に伴って増加したが，150 mg/kg/日以上の雄では飽和が認められた．また，イバブラジンの AUC24h は雌のほうが高かったが，ONO-IN-306 では性差は認められなかった．100 mg/kg/日以上の雌でイバブラジンの AUC24h が臨床最大用量における AUC24h の 25 倍以上となったが，150 mg/kg/日以上の雄では AUC24h の頭打ちが認められ，その際の AUC24h は臨床最大用量における AUC24h の 24 倍であった．

以上，150 mg/kg/日以上で雌雄ともに対照群に対して 10%以上低い体重推移を示したことから，ラットがん原性試験の最大用量は 150 mg/kg/日未満が適当と判断した．

2.6.6.5.4 ラットにおける 104 週間混餌投与によるがん原性試験

［評価資料：4.2.3.4.1-7，4.2.3.4.1-8］

6 週齢の Wistar 系ラット（雌雄各 50 例／群）に本薬を 7.5，30 及び 120 mg/kg の用量で 104 週間混餌投与し，がん原性について検討した．また，雌雄各 50 例の対照群を 2 群設置した．なお，120 mg/kg/日群については体重増加抑制（-26～-36%）及び摂餌量の低値（-16～-22%）が認められたため，53 週目以降は用量を 60 mg/kg/日に変更した．TK 測定群として雌雄各 6 例／群のサテライト動物を設け，雌雄各 5 例／時点で採血を行い，血漿中イバブラジン濃度を測定した．

本薬の投与に起因した死亡率の上昇は認められなかった．

7.5 mg/kg/日以上で体重増加抑制及び摂餌量の低値が認められ，120/60 mg/kg/日の雌雄における投与 104 週時の体重増加量は対照群に対して約 30～40%低い値を示した．また，30 mg/kg/日以上の雌及び 120/60 mg/kg/日の雄で摂水量の低値が認められた．

血液学的検査において，30 mg/kg/日以上の雄で白血球数の低値が認められた．

病理組織学的検査において，120/60 mg/kg/日の雌で子宮の上皮性腫瘍（子宮内膜腺癌及び腺腫）が 9/50 例に認められたが，対照群でも認められる変化であり，統計学的有意差は認められなかったことから，偶発的な変化と判断した．その他，いずれの投与群でも本薬の投与に起因すると考えられる腫瘍性変化は認められなかった．非腫瘍性変化として，30 mg/kg/日以上の雌及び 120/60 mg/kg/日の雄で心筋の線維化，腱索の異栄養性鉱質化及び軟骨化生，120/60 mg/kg/日の雄で肺胞中隔の肥厚を伴うマクロファージの集簇が認められた．

TK 測定では，イバブラジン及び ONO-IN-306 の Cmax 及び AUC24h は雌雄ともに用量の増加に伴って増加した．

以上より，本薬を Wistar 系ラットの雌雄に 104 週間混餌投与した結果，本薬は最大耐量である 120/60 mg/kg/日においてもがん原性を示さなかった．

2.6.6.6 生殖発生毒性試験

Wistar 系ラットを用いて，受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験，出生前及び出生後の発生並びに母体機能に関する試験，新生児を用いた試験を実施した．また，Wistar 系ラット及び NZW 系ウサギを用いて，胚・胎児発生に関する試験を実施した．

2.6.6.6.1 ラットにおける受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験

［評価資料：4.2.3.5.1-2］

7 週齢の Wistar 系雄ラット及び 11 週齢の Wistar 系雌ラット（雌雄各 20 例／群）に，本薬を 7，35 及び 175 mg/kg/日の用量で，雄には交配 63 日前から無処置雌との交配期間を経て剖検前日まで（最長 94 日間），雌には交配 14 日前から無処置雄との交配期間を経て妊娠 6 日まで（最長 45 日間），1 日 1 回反復経口投与した．投与容量は 10 mL/kg とし，対照群には媒体である脱塩水を投与した．雄は交配期間終了後に剖検を行い，精巣及び精巣上体重量，精巣上体精子数及び精子生存率について評価した．雌は妊娠 14 日に帝王切開し，交尾率，交配所要日数，受胎率，黄体数，着床数，生存胚数及び胚・胎児生存率について評価した．

一般状態の変化として，35 mg/kg/日以上の雌で立毛及び咀嚼，35 mg/kg/日以上の雌及び 175 mg/kg/日の雄で自発運動の減少及び眼瞼下垂，175 mg/kg/日の雌で腹臥位が認められた．自発運動の減少は 35 mg/kg/日以下の雄でも認められたが，1 又は 2 例のみで低頻度に認められる変化であることから，毒性学的意義のない変化と判断した．その他，7 mg/kg/日以上の雌雄で流涎が認められたが，投与液の味などに対する影響の可能性が考えられ，毒性とは判断しなかった．

175 mg/kg/日の雌で体重増加抑制及び摂餌量の低値が認められた．

精巣及び精巣上体重量，精巣上体精子数，精子生存率，交尾率，交配所要日数，受胎率，黄体数，着床数，生存胚数及び胚・胎児生存率に本薬の投与に起因した変化は認められなかった．

以上より，35 mg/kg/日以上の雌及び 175 mg/kg/日の雄で一般状態の変化が認められたことから，親動物に対する一般毒性学的な無毒性量は雄が 35 mg/kg/日，雌が 7 mg/kg/日と判断した．また，受胎能及び初期胚発生に対して 175 mg/kg/日まで影響は認められなかったことから，受胎能及び初期胚発生に対する無毒性量は雌雄ともに 175 mg/kg/日と判断した．

2.6.6.6.2 胚・胎児発生に関する試験

2.6.6.6.2.1 ラットにおける胚・胎児発生に関する用量設定試験

［参考資料：4.2.3.5.2-1］

Wistar 系妊娠ラット（10 例／群）に，本薬を 14，56，111 及び 223 mg/kg/日の用量で，器官形成期である妊娠 6～15 日に 1 日 1 回，反復経口投与し，母動物及び胚・胎児の発生に及ぼす影響を予備的に検討した．投与容量は 10 mL/kg とし，対照群には媒体である脱塩水を投与した．妊娠 20 日に帝王切開し，母動物の剖検及び胎児の観察を行った．TK 測定群として各群 5 例のサテライト動物を設け，その内各群 3 例について血漿中イバブラジン濃度を測定した．

母動物に対する影響では，一般状態の変化として 14 mg/kg/日以上で自発運動の減少，111 mg/kg/日以上で呼吸促拍，腹臥位，223 mg/kg/日で咀嚼，眼瞼下垂及び立毛が認められた．また，14 mg/kg/日以上で体重増加抑制及び摂餌量の低値，14，56 及び 111 mg/kg/日で摂水量の高値が認められた．

胎児に対する影響では，56 mg/kg/日以上で後期吸収胚数が，111 mg/kg/以上で早期吸収胚数が増加し，その結果，56 mg/kg/日以上で胎児数が減少し，223 mg/kg/日では生存胎児が得られなかった．また，56 mg/kg/日以上で胎児体重及び胎盤重量が減少した．骨格及び内臓観察では 14 mg/kg/日以上で骨化遅延，動脈近位部の変異を伴う心臓の形態変化，56 mg/kg 以上で心室中隔欠損，右側大動脈弓及び動脈管遺残などが認められた．

TK 測定では，初回投与時（妊娠 6 日），最終投与時（妊娠 15 日）ともに，本薬の用量の増加に伴う AUC24h の増加が認められた．

以上より，14 mg/kg/日以上で母動物に自発運動の減少が認められたことから，本試験の最高用量は 14 mg/kg/日付近に設定すべきと考えられた．

2.6.6.6.2.2 ラットにおける胚・胎児発生に関する試験 1

［評価資料：4.2.3.5.2-3］

10～11 週齢の Wistar 系妊娠ラット（20～23 例／群）に，本薬を 2.3，4.6，9.3 及び 19 mg/kg/日の用量で，器官形成期である妊娠 6～15 日に 1 日 1 回，反復経口投与し，母動物及び胚・胎児の発生に及ぼす影響を検討した．投与容量は 10 mL/kg とし，対照群には媒体である脱塩水を投与した．妊娠 20 日に帝王切開し，母動物の剖検及び胎児の観察を行った．TK 測定群として各群 3 例のサテライト動物を設け，血漿中イバブラジン濃度を測定した．

母動物に対する影響として，19 mg/kg/日で投与期間の初期に体重増加抑制及び摂餌量の低値傾向が認められた．その他，死亡例は認められず，一般状態観察及び剖検においても本薬の投与に起因した変化は認められなかった．

胚・胎児に対する影響として，2.3 mg/kg/日以上で動脈近位部の変異を伴う心臓の形態変化，4.6 mg/kg/日以上で動脈近位部の複合異常を伴う心臓形態異常，9.3 mg/kg/日以上で心室中隔欠損，19 mg/kg/日で胎児体重の低値が認められた．その他，生存胎児数，死亡胎児数，早期・後期吸収胚数，早期・後期吸収胚率及び胎児の骨格検査に本薬の投与に起因した変化は認められなかった．

TK 測定では，初回投与時（妊娠 6 日），最終投与時（妊娠 15 日）ともに，本薬の用量の増加に伴う AUC24h の増加が認められた．

以上より，母動物では 19 mg/kg/日で体重増加抑制及び摂餌量の低値傾向が認められたことから，母動物の無毒性量は 9.3 mg/kg/日と判断した．胚・胎児発生では 2.3 mg/kg/日以上で動脈近位部の変異を伴う心臓の形態変化が認められ，4.6 mg/kg/日以上で催奇形性を示唆する心臓形態異常が認められたことから，胚・胎児発生に対する無毒性量は 2.3 mg/kg/日未満，催奇形性に対する無毒性量は 2.3 mg/kg/日と判断した．

2.6.6.6.2.3 ラットにおける胚・胎児発生に関する試験２

［評価資料：4.2.3.5.2-4］

ラットにおける胚・胎児発生に関する試験 1（2.6.6.6.2.2）では，最低用量とした 2.3 mg/kg/日から動脈近位部の変異を伴う心臓の形態変化が認められたため，胚・胎児発生に対する無毒性量を判断できなかった．本試験では，無毒性量を明らかにする目的で，13 週齢の Wistar 系妊娠ラット（20～23 例／群）に本薬を 0.5，1.5 及び 9.3 mg/kg/日の用量で，妊娠 6～17 日に 1 日 1 回，反復経口投与した．投与容量は 10 mL/kg とし，対照群には媒体である精製水を投与した．妊娠 20 日に帝王切開し，胎児の心血管系の観察を行った．TK 測定群として各群 5 例のサテライト動物を設け，血漿中イバブラジン及び ONO-IN-306 濃度を測定した．

母動物に対する影響として，本薬の投与に起因した変化は認められなかった．

胚・胎児に対する影響として，9.3 mg/kg/日で施設背景値の上限を超える頻度で動脈近位部の変異を伴う心臓の形態変化が認められた．一方，1.5 mg/kg/日以下における動脈近位部の変異を伴う心臓の形態変化の発現頻度は媒体群と同程度又は施設背景値の範囲内であり，本薬の影響はないと判断した．

TK 測定では，本薬の用量の増加に伴うイバブラジン及び ONO-IN-306 の AUC24h の増加が認められた．

以上より，9.3 mg/kg/日で催奇形性を示唆する動脈近位部の変異を伴う心臓の形態変化が認められたことから，胚・胎児発生に対する無毒性量は 1.5 mg/kg/日と判断した．

2.6.6.6.2.4 ウサギにおける胚・胎児発生に関する用量設定試験

［参考資料：4.2.3.5.2-2］

NZW 系妊娠ウサギ（4～9 例／群）に，本薬を 28，56，111，167 及び 223 mg/kg/日の用量で，器官形成期である妊娠 6～18 日に 1 日 1 回，反復経口投与し，母動物及び胚・胎児の発生に及ぼす影響を予備的に検討した．投与容量は 3 mL/kg とし，対照群には媒体である 1%ヒドロキシエチルセルロースを投与した．妊娠 30 日に帝王切開し，母動物の剖検及び胎児の観察を行った．各群 3 例の母動物を用いて血漿中イバブラジン濃度を測定した．

母動物に対する影響では，56 mg/kg/日以上で死亡例が認められ，223 mg/kg/日では全例が死亡した．一般状態の変化として 28 mg/kg/日以上で眼瞼下垂，56 mg/kg/日以上で呼吸促拍，全身性の振戦及び腹臥位が認められ，56 mg/kg/日の 1 例では痙攣も認められた．また，28 mg/kg/日以上で体重増加抑制，28 mg/kg/日以上で摂餌量及び摂水量の減少が認められた．

胎児に対する影響では，28 mg/kg/日以上で早期吸収胚数が増加し，その結果，生存胎児数の減少が認められた．また，28 mg/kg/日以上で胎児体重及び胎盤重量が減少した．骨格又は内臓観察において，本薬の投与に起因した変化は認められなかった．

TK 測定では，初回投与時（妊娠 6 日），最終投与時（妊娠 18 日）ともに，本薬の用量の増加に伴う AUC24h の増加が認められた．いずれの用量においても，最終投与時の AUC24h は初回投与時に比べ高値を示した．

以上より，28 mg/kg/日以上で母動物に眼瞼下垂，体重増加抑制，早期吸収胚数の増加及び生存胎児数の減少などが認められ，56 mg/kg/日以上では母動物の死亡も認められたことから，本試験の最高用量は 28 mg/kg/日付近に設定すべきと考えられた．

2.6.6.6.2.5 ウサギにおける胚・胎児発生に関する試験 1

［評価資料：4.2.3.5.2-5］

15～19 週齢の NZW 系妊娠ウサギ（17～19 例／群）に，本薬を 7，14 及び 28 mg/kg/日の用量で，器官形成期である妊娠 6～18 日に 1 日 1 回，反復経口投与し，母動物及び胚・胎児の発生に及ぼす影響を検討した．投与容量は 1 mL/kg とし，対照群には媒体である脱塩水を投与した．妊娠 30 日に帝王切開し，母動物の剖検及び胎児の観察を行った．各群 3 例の母動物を用いて血漿中イバブラジン濃度を測定した．

母動物に対する影響として，14 mg/kg/日以上で眼瞼下垂，28 mg/kg/日で投与期間の初期に体重減少及び摂餌量の低値が認められた．母動物の死亡や本薬の投与に起因した流産は認められず，剖検においても変化は認められなかった．

胎児に対する影響として，7 mg/kg/日以上で着床後胚死亡率の高値，28 mg/kg/日で胎児及び胎盤重量の低値が認められ，骨格観察では 28 mg/kg/日で欠指症（2 例，1.4%）が認められた．内臓観察において本薬の投与に起因した変化は認められなかった．

TK 測定では，初回投与時（妊娠 6 日），最終投与時（妊娠 18 日）ともに，本薬の用量の増加に伴う AUC24h の増加が認められた．いずれの用量においても，最終投与時の AUC24h は初回投与時に比べ高値を示した．

以上より，母動物では 14 mg/kg/日以上で眼瞼下垂が認められたことから，母動物に対する無毒性量は 7 mg/kg/日と判断した．胚・胎児発生については 7 mg/kg/日以上で着床後胚死亡率の高値が認められ，28 mg/kg/日以上で催奇形性を示唆する欠指症が認められたことから，胚・胎児発生に対する無毒性量は 7 mg/kg/日未満，催奇形性に対する無毒性量は 14 mg/kg/日と判断した．

2.6.6.6.2.6 ウサギにおける胚・胎児発生に関する試験 2

［参考資料：4.2.3.5.2-6］

ウサギにおける胚胎児発生に関する試験 1（2.6.6.6.2.5）では，最高用量とした 28 mg/kg/日で欠指症が認められた．本試験では，より高用量における欠指症の発現頻度を確認する目的で，16 週齢以上の NZW 系妊娠ウサギ（対照群 24 例，投与群 45 例）に本薬を器官形成期である妊娠 6～18 日に 42 mg/kg/日の用量で 1 日 1 回，反復経口投与した．投与容量は 1 mL/kg とし，対照群には媒体である精製水を投与した．妊娠 30 日に帝王切開し，胎児重量，胎盤重量，胎児の外表，骨格及び内臓観察を行った．

母動物に対する影響として，半眼，自発運動の減少，呼吸促拍，体重増加抑制，摂餌量及び摂水量の低値が認められた．

胎児に対する影響として，投与群において欠指症（1 例，0.3%）が認められたが，対照群にも認められる変化（1 例，0.6%）であった．また，1 母体あたりの早期吸収胚数及び着床後胚死亡率の増加が認められたが，胎児重量及び胎盤重量に変化は認められなかった．また，胎児の外表，骨格及び内臓観察において本薬の投与に起因した変化は認められなかった．

以上より，本試験ではウサギにおける胚・胎児発生に関する試験 1（2.6.6.6.2.5）よりも高用量の本薬を投与し，かつ多数の動物を用いて検討したが，欠指症の発現頻度の増加や胎児重量及び胎盤重量の変化は認められなかった．

2.6.6.6.3 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

2.6.6.6.3.1 ラットにおける出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験

［評価資料：4.2.3.5.3-1］

14 週齢の Wistar 系妊娠ラット（22～24 例／群）に，本薬を妊娠 6 日～哺育 20 日に 1 日 1 回，反復経口投与し，出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に及ぼす影響を検討した．用量設定試験では，37 mg/kg/日で F1 の着床後及び出生後死亡率の高値が認められたことから，本試験における用量は 2.5，7 及び 20 mg/kg/日とした．投与容量は 10 mL/kg とし，対照群には媒体である脱塩水を投与した．母動物は哺育 21 日に剖検した．出生児は身体発達，反射，行動，性成熟について観察した後，11～13 週齢で交配させ，生殖能について評価した．TK 測定群として各群 5 例のサテライト動物を設け，その内各群 3 例について母動物の血漿中イバブラジン濃度を測定した．

母動物に対する影響として，2.5 mg/kg/日以上で摂水量の増加及び心肥大，7 mg/kg/日以上で自発運動の減少，20 mg/kg/日で腹臥位，不規則呼吸，眼瞼下垂及び立毛が認められた．その他，7 mg/kg/日以上で流涎が認められたが，投与液の味などに対する影響の可能性が考えられ，毒性とは判断しなかった．

出生児に対する影響として，7 mg/kg/日以上で心肥大，20 mg/kg/日で出生後死亡率の高値及び心臓形態異常が認められた．死亡児では心臓の形態変化及び心室中隔欠損が認められた．出生時生存児数，出生時死亡児数，出生時体重，性比，体重推移，身体発達，反射，記憶及び学習を含む行動機能，性成熟，受胎能及び F2 世代の発生に本薬の投与に起因した変化は認められなかった．

母動物の TK 測定では，妊娠 17 日及び哺育 5 日ともに，本薬の用量の増加に伴う AUC24h の増加が認められた．いずれの用量においても，妊娠 17 日と哺育 5 日の AUC24h はほぼ同程度であった．

以上より，母動物では，2.5 mg/kg/日以上で心肥大が認められたことから，母動物の無毒性量は 2.5 mg/kg/日未満と判断した．出生児では，7 mg/kg/日以上で心肥大が認められたが，記憶及び学習を含む行動機能，受胎能及び F2 世代の発生には 20 mg/kg/日まで影響が認められなかったことから，出生前及び出生後の発生に対する無毒性量は 2.5 mg/kg/日，出生児の行動機能及び生殖能に対する無毒性量は 20 mg/kg/日と判断した．

2.6.6.6.4 新生児を用いた試験

2.6.6.6.4.1 新生児ラットにおける出生後の発達に関する用量設定試験

［参考資料：4.2.3.5.4-2］

新生児ラットにおける出生後の発達に関する試験の予備検討として，生後 7 日齢の Wistar 系ラット（雌雄各 10 例／群）に，本薬を 2，8 及び 16 mg/kg の用量で 1 日 1 回，15 又は 28 日間反復経口投与し，新生児ラットの心拍数に対する影響を検討した．投与容量は 2 mL/kg とし，対照群には媒体である精製水を投与した．投与 1，8，15，22 又は 27 日目に，心電計を用いて投与後 3～4 時間の心拍数を測定した．TK 測定として，投与 28 日目（生後 34 日）に 16 mg/kg/日群から各 2 例／時点について採血し，血漿中イバブラジン及び ONO-IN-306 濃度を測定した．

本薬の投与に起因した死亡は認められなかった．いずれの用量においても，一般状態並びに体重及び摂餌量の推移に異常は認められなかった．

心拍数測定において，投与 1 日目から 2 mg/kg/日以上の雌雄で本薬の薬理作用である心拍数減少が認められ，16 mg/kg の雌で心臓重量の高値が認められた．その他，16 mg/kg/日の雌で腎臓相対重量の高値が認められたが，ごく軽度（6%）の変化であり，病理組織学的変化を伴わないことから，毒性とは判断しなかった．

剖検及び病理組織学的検査に本薬の投与に起因した変化は認められなかった．

TK 測定では，イバブラジン及び ONO-IN-306 の Cmax 及び AUC24h は，雄に比べて雌で高値を示した．

以上，新生児ラットに 15 又は 28 日間反復投与した結果，最低用量である 2 mg/kg/日以上で本薬の薬理作用である心拍数減少が認められたが，毒性変化は 16 mg/kg/日まで認められなかった．このことから，実施する本試験の最高用量は 16 mg/kg/日以上に設定すべきと考えられた．

2.6.6.6.4.2 新生児ラットにおける出生後の発達に関する試験

［参考資料：4.2.3.5.4-3］

生後 7 日齢の Wistar 系ラット（雌雄各 30 例／群）に本薬を 7.5，15 及び 30 mg/kg の用量で 1 日 1 回，10 週間反復経口投与した．投与容量は 3 mL/kg とし，対照群には媒体である精製水を投与した．雌雄各 5 例／群については投与終了後 3 週間の休薬期間を設定し，毒性変化の回復性について検討した．TK 測定群として TK サテライト動物（媒体群は雌雄各 2 例，イバブラジン投与群は雌雄各 20 例／群）を設け，初回投与時（生後 7 日），投与 28 日（生後 34 日）及び投与 71 日（生後 77 日）に各 2 例／時点について採血し，血漿中イバブラジン及び ONO-IN-306 濃度を測定した．

本薬の投与に起因した死亡は認められなかった.

一般状態の変化として，7.5 mg/kg/日以上の雌雄で流涎が認められたが，投与液の味などに対する影響の可能性が考えられ，毒性とは判断しなかった．いずれの用量においても体重及び摂餌量の推移に異常は認められなかった.

心拍数測定において，7.5 mg/kg/日以上の雌雄で心拍数減少が投与 1 日目から認められた.

血液学的検査において，30 mg/kg/日の雌でリンパ球数及び LUC の低値に関連した白血球数の低値が認められた．なお，血液化学的検査において，30 mg/kg/日の雄でクレアチニン及びアルブミンの高値が認められたが，用量に応じない 10%未満の軽度な変化であり，摂餌量の変動や肝臓及び腎臓の病理組織学的変化は認められなかったことから，偶発的な変動と判断した．また，30 mg/kg/日の雌で Na 及び無機リンの低値が認められたが，無機リンの変動は 10%未満，Na の変動は 1%未満といずれも軽度であったことから，偶発的な変動と判断した.

器官重量測定において 30 mg/kg の雌で心臓重量の高値が認められ，病理組織学的検査において 15 mg/kg/日以上の雄で心臓間質の単核球浸潤が認められた.

いずれの変化も 3 週間の休薬により回復性を示した.

剖検において本薬の投与に起因した変化は認められなかった.

離乳までの発育及び脛骨の成長，包皮分離又は膣開口の時期，自発運動量，学習及び記憶，行動観察又は機能観察総合評価に変化は認められなかった．また，生殖能力の評価において，交尾能，交配に要した期間，受胎能及び着床に変化は認められなかった.

TK 測定では，イバブラジン及び ONO-IN-306 の Cmax 及び AUC24h は，雌雄ともに用量の増加に伴って増加した．反復投与後（投与 28 及び 71 日）のイバブラジンの Cmax 及び AUC24h は，雄に比べて雌で高値を示した．また，反復投与後（投与 71 日）のイバブラジンの雌における Cmax 及び AUC24h は，初回投与時に比べ高い値を示した.

以上より，新生児ラットでは，15 mg/kg/日以上の雄で心臓の病理組織学的変化，30 mg/kg/日の雌で白血球数の低値及び心臓重量の高値が認められたが，記憶及び学習を含む行動機能，受胎能及び着床には 30 mg/kg/日まで影響が認められなかったことから，一般毒性学的な無毒性量は雄が 7.5 mg/kg/日，雌が 15 mg/kg/日，新生児ラットの発達，行動機能及び生殖能に対する無毒性量は 30 mg/kg/日と判断した.

2.6.6.7 局所刺激性試験

2.6.6.7.1 *In vitro* 試験

2.6.6.7.1.1 ヒト血液を用いた溶血性試験

［参考資料：4.2.3.6-1］

ヒト血液（全血，1 例）を用い，溶血性について検討した．19 又は 93 mg/mL に調製した本薬に対して等量～8 倍量のヒト全血を添加し，37℃で 2 分間インキュベートした．遠心分離後の沈渣に，添加した全血の量に応じた水を加えて溶血させ，540 nm の吸光度を測定した．

その結果，終濃度 19 mg/mL 以上で溶血が認められ，無影響量は 15 mg/mL であった．

2.6.6.7.2 *In vivo* 試験

2.6.6.7.2.1 ウサギを用いた局所刺激性試験

［参考資料：4.2.3.6-2］

NZW 系ウサギ（雄 6 例／群）の耳介の静脈内，静脈周囲又は動脈内に本薬を 2 mg/mL の濃度で単回投与した．投与容量は耳介片側あたり 0.1 mL（静脈周囲）又は 0.2 mL（静脈内又は動脈内）とし，対照群には媒体である生理食塩液を投与した．投与部位は毎日観察し，投与後 3 及び 13 日に各群 3 例を剖検及び病理組織学的検査を行った．

その結果，いずれの投与部位においても本薬投与に起因した肉眼的又は病理組織学的変化は認められず，本薬の静脈，静脈周囲又は動脈に対する刺激性は認められなかった．

2.6.6.7.2.2 ウサギを用いた急性皮膚刺激性／腐食性試験

［参考資料：4.2.3.6-3］

NZW 系ウサギ（雄 3 例）の背部を除毛し，0.4 mL の水で湿らせた 0.46 g の本薬を皮膚に半閉塞性包帯を用いて塗布した．初めの 1 例には，異なる塗布部位にそれぞれ 3 分間，1 及び 4 時間塗布し，重度の刺激性がみられないことを確認した．その後，残る 2 例には 4 時間塗布した．塗布終了後 1，24，48，72 時間及び 7 日に塗布部位の肉眼的観察を行った．

その結果，1 時間以上の塗布によりごく軽度の紅斑が認められたが，7 日間以内に回復する変化であった．また，いずれの塗布部位においても腐食作用を示唆する皮膚反応は認められなかった．

以上より，本薬は水で湿らせて皮膚に塗布した場合において軽度な刺激性を示した．

2.6.6.7.2.3 ウサギを用いた急性眼刺激性／腐食性試験

［参考資料：4.2.3.6-4］

NZW 系ウサギ（雄 3 例）の片眼（結膜嚢）に本薬 30 mg（容積：約 0.1 mL）を投与した．他眼は無処置とし，対照群とした．投与後 1，24，48 及び 72 時間に角膜，虹彩及び結膜の肉眼的観察を行った．角膜上皮に対する傷害性は，投与後 24 時間の観察終了直後に 2%フルオレセインを点眼し，評価した．

その結果，結膜に軽度な発赤，浮腫及び眼脂が認められたが，浮腫及び眼脂は 24 時間以内に回復し，発赤は 72 時間以内に回復した．一方，角膜及び虹彩に対する刺激性は認められず，腐食作用を示唆する変化は認められなかった．

以上より，本薬は眼に投与した場合において軽度な刺激性を示した．

2.6.6.8 その他の毒性試験

2.6.6.8.1 免疫毒性試験

2.6.6.8.1.1 ラットを用いた T 細胞依存性抗体産生試験

［評価資料：4.2.3.7.2-1］

8～9 週齢の Wistar 系ラット（雌雄各 8 例／群）に本薬を 6，32 及び 180 mg/kg/日（3，16 及び 90 mg/kg の 1 日 2 回，約 7 時間間隔）の用量で 4 週間反復経口投与した．投与容量は 5 mL/kg（雄の投与初日のみ 1 mL/kg）とし，対照群には媒体である注射用水を投与した．投与 25 日にヒツジ赤血球を静脈内投与し，投与 29 日に脾臓を採取し，プラーク法により T 細胞依存性抗体産生能を評価した．また，投与 23 日にリンパ球サブセット検査，投与 29 日の脾臓採取時に血液学的検査並びに脾臓，胸腺及び副腎の重量測定を実施した．

その結果，180 mg/kg/日の雌雄で体重及び摂餌量の推移が低値であったが，いずれの用量においても T 細胞依存性抗体産生能に対する影響は認められなかった．180 mg/kg/日の雄で B 細胞分画の減少に伴うと考えられる白血球数の低値が認められたが，より高曝露されていた 180 mg/kg/日の雌では同様の変化は認められず，免疫毒性に関連する変化ではないと判断した．

以上より，本薬は 180 mg/kg/日まで免疫毒性を示さないと判断した．

2.6.6.8.2 毒性発現の機序に関する試験

2.6.6.8.2.1 ラットにおける 4 週間反復経口投与による心臓への影響

［評価資料：4.2.3.7.3-1］

ラットにおける反復投与毒性試験において心臓に器質的変化が認められており，本試験では本薬をラットに反復投与した際の心拍数及び血圧への影響を確認すると共に，心臓の器質的変化と同時に生じる検査値の変動について詳細に検討した．8～9 週齢の Wistar 系ラット

（雄 6 例／群）に本薬を 7，35 及び 175 mg/kg の用量で 1 日 1 回，4 週間反復経口投与した．投与容量は 10 mL/kg とし，対照群には媒体である脱塩水を投与した．テレメトリーシステムを用いて，投与前並びに投与 3，14 及び 28 日における心拍数及び血圧を経時的に測定した．また，尿検査（尿量，クレアチニン，尿素，Na，K 及び cGMP 排泄量）及び血液化学的検査（クレアチニン，尿素，Na，K，AST，ALT，CK，トロポニン I 及び ANP）を実施した．最終投与翌日に心臓を採取し，対照群及び 175 mg/kg/日投与群において心臓の病理組織学的検査を実施した．また，投与 22 日に各群 3 例／時点となるように採血し，血漿中イバブラジン及び ONO-IN-306 濃度を測定した．

その結果，7 mg/kg/日以上で用量に応じた心拍数減少が投与 3 日以降で認められ，平均心拍数の変動率は投与期間を通じてほぼ一定であった（表 2.6.6.8.2.1-1）．一方，投与期間を通じて血圧の明らかな変動は認められなかった．

器官重量測定において 35 mg/kg/日以上で左心室重量の高値，175 mg/kg/日で心臓及び右心室重量の高値が認められた．病理組織学的検査を実施した 175 mg/kg/日では，心臓（主に左心室の心内膜下）の小肉芽腫（<0.05 mm^2）及び肉芽腫（>0.05 mm^2）が認められ，対照群と比較して頻度及び程度の増悪が認められた．175 mg/kg/日の 2 例における心臓の肉芽腫の発生頻度は顕著に高く，これらの例における心拍数の減少率は 6 例の中で最も高い 2 例であった（表 2.6.6.8.2.1-2）．

尿検査及び血液化学的検査において，175 mg/kg/日で ANP の高値及び尿中 cGMP 排泄量の高値傾向が認められた．また，175 mg/kg/日でトロポニン I が高値を示す例も認められた．

TK 測定では，イバブラジン及び ONO-IN-306 の Cmax 及び AUC24h は雌雄ともに用量の増加に伴って増加した．

以上より，本薬の高用量投与により心臓での肉芽腫の発生頻度及び程度の増悪が認められたが，これらの例では顕著な心拍数の減少が認められた．また，同用量では心容量負荷のマーカーである ANP 及び cGMP や心筋細胞傷害のマーカーであるトロポニン I の変動が認められた．したがって，過度な心拍数減少により心臓への負荷が生じ，肉芽腫などの病理組織学的変化を生じさせた可能性が考えられた．

表 2.6.6.8.2.1-1　ラットにおける 4 週間反復経口投与時の平均心拍数の変動率（%）の推移

	用量（mg/kg/日）			
	0	**7**	**35**	**175**
投与 3 日	-1	-15***	-27***	-45***
投与 14 日	-1	-17**	-30***	-49***
投与 28 日	-6	-13	-33***	-48***

データは，投与後 20 時間までの平均心拍数について，投与前値からの変化率（各群 6 例）で示す．
** p≤0.01，*** p≤0.001：平均心拍数を対照群と比較（Dunnett 検定）

表 2.6.6.8.2.1-2 ラットにおける 4 週間反復経口投与時の個体毎の心拍数と心臓への影響

用量 (mg/kg/日)	心拍数 (回／分) [a]	心拍数 (%) [b]	心臓重量 (mg/BW g) [c]	小肉芽腫 (個数)	肉芽腫 (個数)
0	389	-4	2.43	3	0
	364	-7	2.59	1	3
	358	-14	2.46	5	0
	404	+3	2.29	5	0
	341	-1	2.23	14	0
	362	-10	2.45	15	0
175	235	-45	2.88	4	0
	248	-38	2.73	7	0
	195	-51	3.14	9	0
	227	-45	2.80	28	3
	175	-57	2.85	30	11
	175	-54	3.05	47	24

データは，個体値（各群 6 例）で示す.
a：投与 28 日の投与後 20 時間までの平均心拍数
b：投与前値からの変化率
c：体重に対する相対重量

2.6.6.8.3 不純物の毒性試験

原薬中に含まれる可能性のある不純物のうち，規格値上限が ICH Q3A「新有効成分含有医薬品のうち原薬の不純物に関するガイドライン」の安全性確認の閾値を超える不純物は，

不純物A* である．なお，本薬の製剤中に含まれる可能性のある不純物のうち，規格値上限が ICH Q3B「新有効成分含有医薬品のうち製剤の不純物に関するガイドライン」の安全性確認の閾値を超える不純物はなかった.

申請規格値を上回る不純物A*を [redacted] %含有する原薬を用いて，細菌を用いた復帰突然変異試験，ラットを用いた小核試験及びラットを用いた 4 週間反復経口投与毒性試験を GLP 適用で実施した．上記の他，原薬中に含まれる可能性のある潜在的不純物の不純物B*について，細菌を用いた復帰突然変異試験を実施し，別項に記載した（2.6.6.8.4.3）.

2.6.6.8.3.1 不純物を含有する原薬の細菌を用いた復帰突然変異試験

［評価資料：4.2.3.7.6-1，参考資料：4.2.3.3-1］

不純物A* を含有する本薬について，*Salmonella typhimurium* TA98，TA100，TA1535，TA1537 及び *Escherichia coli* WP2（pKM101），WP2*uvrA*（pKM101）を用い，プレインキュベーション法及びプレート法により，代謝活性化による場合（S9mix 存在下）及び代謝活性化によらない場合（S9mix 非存在下）について試験を実施した．不純物を含有する本薬は注射用水に溶解し，用量は不純物含有のイバブラジン量として 50～5000 μg/plate とした.

その結果，代謝活性化の有無に関わらず，いずれの菌株においても復帰変異コロニー数の増加は認められなかった．なお，菌の生育阻害又は復帰変異コロニー数の減少が，S9mix 存

在下ではTA1535，TA1537及びWP2*uvrA*（pKM101）の5000 μg/plateで，S9mix非存在下では TA100 及び TA98 の 3000 μg/plate 以上，TA1535，TA1537，WP2（pKM101）及びWP2*uvrA*（pKM101）の5000 μg/plateでそれぞれ認められた．

以上，不純物を含有する本薬は遺伝子突然変異誘発性を有さないと判断した．

2.6.6.8.3.2 不純物を含有する原薬のラットを用いた小核試験

［評価資料：4.2.3.7.6-2，参考資料：4.2.3.3-1］

9 週齢の Wistar 系ラット（雌雄各 12 例／群）に　不純物A*　を含有する本薬を単回経口投与し，試験を実施した．ラットを用いた単回経口投与毒性試験（2.6.6.2.2.1）において雌では 557 mg/kg 以上，雄では 742 mg/kg 以上で死亡例が認められたことから，本試験における不純物を含有する本薬の用量は 125，250，500 及び 750 mg/kg とした．投与容量は 10 mL/kg とし，対照群には媒体である脱塩水を投与した．投与後 24 及び 48 時間に骨髄を採取し，骨髄塗抹標本を作製して幼若赤血球を観察した．観察は 250，500 及び 750 mg/kg について実施した（雌雄各 5 例／群／時点）．

その結果，いずれの投与群においても小核を有する幼若赤血球の出現頻度の増加は認められなかった．なお，750 mg/kg の雌 2 例で死亡例が認められ，125 mg/kg 以上で自発運動の減少，250 mg/kg 以上で眼瞼下垂などが認められた．

以上，不純物を含有する本薬は小核誘発性を有さないと判断した．

2.6.6.8.3.3 不純物を含有する原薬のラットにおける経口投与による 4 週間反復投与毒性試験

［評価資料：4.2.3.7.6-3］

6 週齢の Wistar 系ラット（雌雄各 10 例／群）に　不純物A*　を含有する本薬を 6.5，20，59 及び 175 mg/kg の用量で 1 日 1 回，4 週間反復経口投与した．投与容量は 10 mL/kg とし，対照群には媒体である脱塩水を投与した．

不純物を含有する本薬の投与に起因した死亡は認められなかった．

一般状態の変化として，20 mg/kg/日以上の雄及び 59 mg/kg/日以上の雌で自発運動の減少，59 mg/kg/日以上の雌雄で立毛が認められた．自発運動の減少は，本薬のラット 4 週間反復投与毒性試験（2.6.6.3.1.1）で認められた用量（59 mg/kg/日）よりも低用量から認められたが，20 mg/kg/日では投与初期に雄 1/10 例で認められたのみであった．6.5 mg/kg/日以上の雌及び 20 mg/kg/日以上の雄では流涎が認められたが，本薬のラット 4 週間反復投与毒性試験（2.6.6.3.1.1）と同様に投与液の味などに対する影響の可能性が考えられ，毒性とは判断し

なかった．175 mg/kg/日の雌では摂餌量の低値が投与 1 週のみで一時的に認められたが，いずれの用量においても体重推移に異常は認められなかった．

175 mg/kg/日の雌雄で摂水量の高値が認められた．

尿検査において 59 mg/kg/日以上の雌で尿中 K 排泄量の高値，175 mg/kg/日の雌で尿中 Cl 排泄量の高値が認められた．

器官重量測定において，20 mg/kg/日以上の雌及び 175 mg/kg/日の雄で心臓重量の高値が認められた．また，59 mg/kg/日以上の雌で肝臓重量の高値が認められたが，病理組織学的変化を伴わない軽度な変動であった．

剖検において，59 mg/kg/日以上の雌で心肥大が認められた．

病理組織学的検査において，20 mg/kg/日以上の雌及び 59 mg/kg/日の以上の雄で心臓の心筋線維消失／壊死を伴う炎症細胞浸潤が認められた．

眼科学的検査において，本薬の投与に起因した変化は認められなかった．その他，175 mg/kg/日の雌雄で ALT の高値，雌でリンパ球数の高値が認められたが，いずれも軽度な検査値の変動であった．

以上，　不純物A*　を含有する本薬のラット 4 週間反復投与毒性試験における無毒性量は雌雄とも 6.5 mg/kg/日であった．不純物A*を含有しない本薬のラット 4 週間反復投与毒性試験（2.6.6.3.1.1）と比較して，ほぼ同等の用量で同様の変化が認められ，無毒性量も同等であった．

2.6.6.8.4　その他の試験

2.6.6.8.4.1　Balb/c 3T3 細胞を用いた光毒性試験

［評価資料：4.2.3.7.7-1］

OECD ガイドラインに準拠した Balb/c 3T3 細胞による *in vitro* 評価系を用いて，本薬の光毒性を評価した．本薬の濃度は 0.026～2000 μmol/L（0.012～937 μg/mL）とし，紫外線非照射及び照射（UV-A 光量：5 J/cm^2）条件下で細胞生存率を算出した．

その結果，紫外線非照射及び照射のいずれの条件下においても細胞毒性は認められず，本薬は光毒性を有さないと判断した．

2.6.6.8.4.2　マウスを用いた局所リンパ節増殖試験

［参考資料：4.2.3.7.7-2］

CBA/J 系マウス（雌 5 例／群）の耳介皮膚に本薬を 10，25 及び 50 w/w%の濃度で 1 日 1 回，3 日間反復塗布した．投与容量は耳介片側あたり 25 μL とし，対照群には媒体であるアセトン及びオリーブ油の混合液（4:1 v/v）を塗布した．最終塗布の 3 日後に ^{3}H で放射性標

識したメチルチミジンを静脈内投与し，5 時間後に耳介リンパ節を採取した．各個体のリンパ節に取り込まれた放射能量をリンパ球細胞増殖活性とした．また，各塗布濃度におけるリンパ球細胞増殖活性を対照群と比較し，その変化量を刺激指数（SI）とした．

その結果，いずれの濃度においても皮膚刺激性は認められなかった．10，25 及び 50 w/w%における SI はそれぞれ 1.4，1.0 及び 0.8 であり，SI が皮膚感作性試験における陽性反応の基準である 3 未満であったことから，本薬は皮膚感作性を有さないと判断した．

2.6.6.8.4.3　　潜在的不純物の規格設定のための細菌を用いた復帰突然変異試験

［評価資料：4.2.3.7.7-3］

原薬中に含まれる可能性のある　不純物B*　について，*Salmonella typhimurium* TA98，TA100，TA1535，TA1537，TA102 及び *Escherichia coli* WP2*uvrA*（pKM101）を用い，プレインキュベーション法により，代謝活性化による場合（S9mix 存在下）及び代謝活性化によらない場合（S9mix 非存在下）について試験を実施した．不純物B*はジメチルスルホキシドに溶解し，用量は 52～5000 μg/plate とした．

その結果，不純物B*は，WP2*uvrA*（pKM101）の S9mix 存在下及び非存在下において復帰変異コロニー数をそれぞれ媒体対照値の 2.2 倍及び 2.7 倍に増加させた．

以上，不純物B*は遺伝子突然変異誘発能を有すると判断した．

2.6.6.9 考察及び結論

2.6.6.9.1 急性毒性

マウス及びラットに単回経口投与した結果，投与後 15 分より 371 mg/kg 以上で自発運動の減少，振戦又は間代性痙攣などの症状が認められ，マウスでは 742 mg/kg 以上，ラットでは 557 mg/kg 以上で死亡例が認められた．また，イヌに単回経口投与又は漸増法により 2～3 日間反復経口投与した結果，11 mg/kg 以上で嘔吐，自発運動の減少や振戦などの症状が認められ，22 mg/kg ではこれらの症状がより強く発現し切迫剖検例が認められた．いずれの動物種においても死亡又は切迫剖検の前に自発運動の減少，振戦又は間代性痙攣などの中枢神経症状が発現していることから，中枢神経症状又はそれに伴う著しい状態悪化が死因である可能性が考えられた．

以上より，各動物種における経口投与による概略の致死量は，マウスで 742 mg/kg，ラットで 557 mg/kg，イヌで 22 mg/kg であった．

その他，マウス及びラットの静脈内投与の結果，経口投与と同様の中枢神経症状が認められ，静脈内投与による概略の致死量は，マウスで 56 mg/kg，ラットで 74 mg/kg であった．一方，イヌでは最高用量である 9.3 mg/kg まで死亡例が認められなかったことから，イヌにおける静脈内投与による概略の致死量は 9.3 mg/kg を超える量と判断した．

2.6.6.9.2 反復投与毒性

ラットを用いた 52 週間までの反復投与毒性試験及びイヌを用いた 53 週間までの反復投与毒性試験を経口投与により実施した．毒性変化の回復性については，ラットでは 13 及び 26 週間反復投与毒性試験，イヌでは 13，26 及び 53 週間反復投与毒性試験に休薬群を設定し検討した．

ラット及びイヌ共に，本薬の薬理作用である心拍数減少が低用量から用量に応じて認められた．ラットでは心臓重量の高値及び心臓の肉芽腫などの自然発生性にみられる病理組織学的変化の発現頻度又は程度の増悪が認められた他，尿電解質の変動も認められた．ラット 52 週間反復投与毒性試験では心室の変性／壊死の発現頻度又は程度の増悪や腱索の変性などの病理組織学的変化なども認められた．イヌでは，本薬の薬理作用の延長線上の変化として洞性徐脈や洞房／房室ブロック，洞停止などの心電図異常が認められたが，心臓に病理組織学的変化は認められず，血圧の変動も認められなかった．また，高用量投与時には，ラットにおいて眼瞼下垂，自発運動の減少，立毛，イヌにおいて嘔吐，振戦，筋緊張亢進，運動失調，痙攣などの中枢神経症状が認められたが，投与期間の延長による明らかな増悪又は低用量化は認められなかった．その他，イヌ 53 週間反復投与毒性試験で実施した ERG 検査において，光刺激に対する反応の低下が認められた．

以下に，反復投与毒性試験で認められた，心臓，尿電解質，視機能及び中枢神経症状に関する考察を記載した．

2.6.6.9.2.1 心臓に対する影響

ラットの反復投与毒性試験において，6 mg/kg/日以上で心臓重量の高値が認められ，病理組織学的検査では，自然発生性にみられる心臓の肉芽腫（主に左心室の心内膜下），線維化，変性／壊死などの発現頻度又は程度の増悪が認められた．これらの心臓の病変は，基礎心拍数の高いげっ歯類では自然発生性に生じることが報告されており [1)]，対照群にも認められている．本薬のラットで認められた心臓病変の発現頻度又は程度の増悪は，心拍数減少作用を有するβ遮断薬のラット反復投与毒性試験においても同様に認められ，薬理作用による心拍数減少により冠動脈血流が低下し，酸素供給の影響を受けやすい心室や心尖部に病変が好発したと考えられている [2)~4)]．本薬は 1 mg/kg より心拍数減少作用を有し［2.6.2.2.1.1］，ラットの心毒性の機序検討試験では，心拍数減少作用が大きかった個体において心臓の小肉芽腫及び肉芽腫が顕著に認められた．このことから，本薬投与で認められた心臓の肉芽腫，線維化，変性／壊死などは，高用量の本薬投与により過度な心拍数減少が生じ，心筋への酸素供給量が低下したことにより，げっ歯類に生じる自然発生性の心臓病変を増悪させたものと考えられた．また，心臓重量の高値及び心肥大については，本薬の薬理作用である心拍数減少に伴う一回拍出量の増加による二次的変化と考えられた．したがって，ラットで認められた心臓重量の高値及び病理組織学的変化は，本薬の心拍数減少作用に伴う二次的変化と考えられた．

一方，β遮断薬を投与したイヌではラットでみられるような心臓の病理組織学的変化は認められないことが報告されている [5)]．本薬においても，イヌにおいて 3 mg/kg/日以上で心拍数減少及び洞性徐脈，4 mg/kg/日以上で洞房／房室ブロック，7 mg/kg/日以上で洞停止などが認められたが，心臓の病理組織学的変化は認められていない．以上のことから，ラットの心臓で認められた器質的変化は，基礎心拍数の高いラットで過度な心拍数減少が発現した結果，心臓への負荷により生じたげっ歯類特有の変化であると推察され，ヒトへの外挿性の乏しい変化と考えられた．

2.6.6.9.2.2 尿電解質に対する影響

ラット反復投与毒性試験において，6 mg/kg/日以上で摂水量の高値，6.5 mg/kg/日以上で尿中 Na 排泄量の高値が認められた．尿電解質の変動は血中電解質に影響しない程度の変化であり，腎臓に病理組織学的変化は認められなかった．更に，同様の変化がラットを用いた安全性薬理試験においても認められた［2.6.2.6.3.5］．本薬は 1 mg/kg より心拍数減少作用を有

し，その代償反応として一回拍出量を増加させる［2.6.2.2.1.1，2.6.2.2.1.2］．一回拍出量の増加は心房の伸展刺激により利尿作用を有する ANP の分泌を増加させることが知られており [6]，β遮断薬を投与したラットにおいても ANP の高値が報告されている [7]．そこで，ラット 26 週間反復投与毒性試験において血清中 ANP 濃度を測定した結果，180 mg/kg/日で ANP の高値が認められ，同用量で尿 Na 排泄量の高値が認められた．また，有意な変化ではなかったが，雌の 6 mg/kg/日以上で ANP の高値傾向が認められた．したがって，尿 Na 排泄量の高値は，心拍数減少に伴う ANP 濃度の上昇により生じた可能性が考えられた．尿量又は尿電解質の変動はイヌで認められなかったことから，基礎心拍数の高いラットで過度な心拍数減少が発現した結果，心臓への負荷により生じたラット特有の変化であると推察された．また，これまでに実施した国内外の臨床試験において，腎機能への影響を示唆する変化は認められていないことから［2.5.5］，臨床においてイバブラジンが腎機能に影響を及ぼす可能性は低いと考えられた．

2.6.6.9.2.3　　視機能に対する影響

臨床試験において視覚障害（光視）が報告されたことから，本薬の視機能に及ぼす影響について評価するため，イヌ 53 週間反復投与毒性試験において ERG 検査を実施した．その結果，明順応下及び暗順応中（暗順応直後～4 分間）において，それぞれ 2 mg/kg/日以上及び 7 mg/kg/日以上で光刺激に対する反応（b 波振幅）の低下が認められた．

本薬の標的である HCN チャネルは網膜にも発現しており [8]，マウス網膜の視細胞に HCN1 チャネル，双極細胞に HCN1 及び HCN2 チャネルの分布が確認されている［2.6.2.4.4.1］．このうち，HCN1 チャネルは網膜電流 I_h を介して視細胞における光刺激後の脱分極過程に関与しており [9] [10]，HCN1 遺伝子欠損マウスでは視細胞における光刺激後の脱分極を抑制することが報告されている [11] [12]．このことから，イヌで認められた視機能に対する影響は，本薬の薬理作用である HCN チャネル阻害作用により視細胞での光刺激後の脱分極が抑制され発現したと考えられた．イヌの視機能に対する影響は最低用量の 2 mg/kg/日から認められたが，投与期間の延長による増悪は認められず，休薬により速やかに回復すること，眼科学的検査及び病理組織学的検査において網膜に異常は認められず，網膜の電子顕微鏡による検査においても異常は認められなかった．以上のことから，本薬で認められた視機能に対する影響は器質的変化を伴うものではなく，薬理作用に関連した可逆的な変化と考えられた．なお，臨床試験において認められた光視の多くは軽度であり，日常生活に影響を及ぼす可能性は低いと考えられている［2.5.5］．

一方，本薬及び ONO-IN-306 はメラニンと可逆的に結合することが示唆されており，メラニン含有眼組織における本薬の分布はアルビノラットと比べ有色ラットの方が高かったが

［2.6.4.4.4］，網膜機能に及ぼす影響は有色及びアルビノラットとの間に差はなかった［2.6.2.4.4.3］．また，メラニンを有するイヌを用いた 53 週間反復投与毒性試験において，網膜を含む硝子体後部のイバブラジン及び ONO-IN-306 濃度は投与終了後 12 週間の休薬時でも残存していたが，ERG 検査で認められた変化は 1 週間の休薬により回復性を示した．更に，これまでに実施した国内外の臨床試験において，網膜含む眼の構造及び機能に異常は認められていない［2.5.5］．以上のことから，本薬はメラニン含有眼組織に蓄積する性質を有するものの，メラニン含有組織への蓄積によって視機能に対する影響が増強される可能性は低いと考えられた．

2.6.6.9.2.4 中枢神経症状

イヌ反復投与毒性試験において，10 mg/kg/日以上で振戦，14 mg/kg/日以上で筋緊張亢進，30 mg/kg/日以上で運動失調，痙攣などの中枢神経症状が投与初日から認められた．ラット反復投与毒性試験においても，32 mg/kg/日以上で眼瞼下垂，58 mg/kg/日以上で自発運動の減少などが認められた．類似した変化はマウス，ラット及びイヌを用いた単回投与毒性試験でも認められており，ラットを用いた安全性薬理試験においては鎮静及び体温低下も認められた［2.6.2.4.1.5］．イヌで認められた中枢神経症状は血漿中イバブラジン濃度が高かった投与後 1 時間付近で発現する一過性の変化であり，病理組織学的検査において，中枢及び末梢神経，骨格筋に異常は認められなかった．中枢神経症状は単回投与毒性試験においても投与後短時間から発現し，特に静脈内投与においてより早期から認められた．また，1 日 2 回投与により 1 回あたりの用量を減量することで，中枢神経症状が軽減された．以上より，中枢神経症状は本薬の Cmax に応じた変化と考えられた．

本薬の標的受容体である HCN チャネルは中枢神経系に発現しており，膜電位を制御することで神経伝達に関与することが知られている [13) 14)]．また，HCN チャネルが発現低下又は欠損したラット又はマウスにおいて運動失調又は癲癇などの症状が報告されている [13) ~ 15)]．以上のことから，本薬の高用量投与時に認められた中枢神経症状は，本薬の薬理作用である HCN チャネル阻害作用により発現した可能性が考えられた．

本薬の脳内移行性は低く［2.6.4.9.2］，ラット及びイヌで中枢神経症状が認められなかった用量（6 及び 7 mg/kg/日）におけるイバブラジンの Cmax はそれぞれ 94～226 ng/mL 及び 1174～1252 ng/mL であり，臨床最大用量における Cmax（35 ng/mL）との間には 2.7 及び 34 倍の安全域が存在する．また，これまでに実施した国内外の臨床試験において，中枢神経系への影響を示唆する成績は得られていないことから［2.5.5］，臨床において本薬が中枢神経系に影響を及ぼす可能性は低いと考えられた．

その他，イヌの単回及び反復経口投与毒性試験において 10 mg/kg/日以上で嘔吐が認められたが，より高曝露されたイヌの単回静脈内投与試験で認められない変化であることから，全身曝露を介した中枢神経系への影響ではなく，経口投与による投与液の直接刺激に伴う変化と考えられた．イヌの反復経口投与毒性試験において嘔吐が認められなかった 1 回用量 6.25 mg/kg と臨床最大用量（体重 60 kg として 0.125 mg/kg）との間には 50 倍の用量差が存在する．また，これまでに実施した国内外の臨床試験において悪心又は嘔吐の発現率の増加は認められていない［2.5.5］．以上のことから，臨床において本薬が嘔吐を引き起こす可能性は低いと考えられた．

2.6.6.9.2.5 反復投与毒性試験における曝露量及びヒトとの曝露量比

反復投与毒性試験の投与終了時における血漿中イバブラジンの Cmax 及び AUC24h 並びにヒトとの曝露比を表 2.6.6.9.2-1 に示した．

ラット 52 週間反復投与毒性試験において雌の無毒性量は捉えられなかったが，ヒトへの外挿性に乏しいと考えられる心臓の器質的変化を除くと，無毒性量は雄が 6 mg/kg/日，雌が 32 mg/kg/日と考えられた．しかし，ラット 26 週間反復投与毒性試験において 32 mg/kg/日以上の雌雄で眼瞼下垂が認められたことを踏まえ，本薬のラットにおける無毒性量は雌雄ともに 6 mg/kg/日と判断した．イヌ 53 週間反復投与毒性試験においては，最低用量である 2 mg/kg/日以上の雌雄で本薬の薬理作用に基づく ERG の変化が認められたが，臨床試験における視機能への影響は日常生活に影響を及ぼさない程度の軽度なものであり，ERG の変化を除く無毒性量は 7 mg/kg/日であった．上記の用量における血漿中イバブラジンの AUC24h はそれぞれ 935～2386 及び 3890～4650 ng･h/mL であり，臨床最大用量における AUC24h との安全域はラットで 2.7 倍，イヌで 11 倍であった．

表 2.6.6.9.2-1 反復投与毒性試験における血漿曝露量及びヒトとの曝露比

種	用量（mg/kg/日）	性別	Cmax（ng/mL）	AUC24h（ng･h/mL）	曝露比（動物／ヒト[a]）	
					Cmax	AUC24h
ラット	6	雄 雌	94 226	935 2386	2.7 6.5	2.7 6.8
イヌ	7	雄 雌	1252 1174	4650 3890	36 34	13 11

a：臨床最大用量（7.5 mg，1 日 2 回投与）における Cmax（35 ng/mL）及び AUC24h（352 ng･h/mL）

2.6.6.9.3 遺伝毒性

In vitro 遺伝毒性試験において，本薬は細菌を用いた復帰突然変異試験では遺伝子突然変異誘発性を示さなかったが，マウスリンフォーマ *tk* 試験，ラット初代培養肝細胞を用いた

不定期 DNA 合成試験及び培養ヒトリンパ球を用いた染色体異常試験で陽性を示し，*in vitro* における本薬の遺伝毒性が示唆された．一方，*in vivo* 遺伝毒性試験において，本薬はラット不定期 DNA 合成試験，ラット染色体異常試験，マウス小核試験及び不純物を含有する原薬を用いたラット小核試験のすべてで陰性を示した．

遺伝毒性試験におけるイバブラジン濃度と臨床最大用量における血漿中イバブラジンの Cmax との曝露比を表 2.6.6.9.3-1 及び表 2.6.6.9.3-2 に示した．*In vitro* 遺伝毒性試験で陽性を示したときのイバブラジン濃度は臨床最大用量における Cmax の 1300 倍以上と極めて高濃度であり，*in vivo* 遺伝毒性試験では臨床最大用量における Cmax の 97 倍以上の Cmax（3400～29000 ng/mL）になる用量を投与しても陰性であった．更に，本薬はマウス及びラットがん原性試験において発がん性を示さなかった．以上のことから，臨床において本薬が遺伝毒性を示す可能性は低いと考えられた．

表 2.6.6.9.3-1　*In vitro* 遺伝毒性試験におけるイバブラジン濃度及びヒトとの曝露比

試験の種類	濃度 （μg/mL）	濃度比 （*In vitro*／ヒト Cmax[a]）
マウスリンフォーマ *tk* 試験	464	13257
不定期 DNA 合成試験	550	15714
染色体異常試験	46	1314

a：臨床最大用量（7.5 mg，1 日 2 回投与）における Cmax（35 ng/mL）

表 2.6.6.9.3-2　*In vivo* 遺伝毒性試験における血漿曝露量及びヒトとの曝露比

動物種	試験の種類	性別	用量 （mg/kg/日）	Cmax （ng/mL）	Cmax 比 （動物／ヒト[a]）
ラット	不定期 DNA 合成試験	雄	928	3400[b]	97
		雌	603	29000[b]	829
	染色体異常試験	雄	928	9100[c]	260
		雌	603	18000[c]	514
	小核試験[d]	雄	750	4000[ce]	114
		雌	750	18000[ce]	514

a：臨床最大用量（7.5 mg，1 日 2 回投与）における Cmax（35 ng/mL）
b：投与後 2 又は 12 時間のいずれか高い方
c：投与後 10 分又は 2 時間のいずれか高い方
d：不純物を含有する原薬を用いたラット小核試験（純度：93.3%）
e：ラット染色体異常試験（雄：464 mg/kg/日，雌：603 mg/kg/日）における値

2.6.6.9.4　　がん原性

マウス及びラットを用いた 104 週間のがん原性試験を混餌投与により実施した．その結果，マウス及びラットともに最大耐量まで投与したが，本薬の投与に起因すると考えられる腫瘍性変化は認められず，がん原性を示さなかった．

がん原性試験の投与終了時における血漿中イバブラジンの AUC24h 及びヒト AUC24h との比を表 2.6.6.9.4-1 に示した．マウス及びラットがん原性試験の最高用量における血漿中イバブラジンの AUC24h は 7920～14331 及び 7950～8436 ng･h/mL であり，臨床最大用量における AUC24h との安全域はともに 23 倍であった．

表 2.6.6.9.4-1　がん原性試験における血漿曝露量及びヒトとの曝露量比

動物種	投与期間	用量 （mg/kg/日）	性別	AUC24h （ng･h/mL）	AUC 比 （動物／ヒト[a]）
マウス	104 週間	405/180[b]	雄 雌	7920[d] 14331	23 41
ラット	104 週間	120/60[c]	雄 雌	7950 8436	23 24

a：臨床最大用量（7.5 mg，1 日 2 回投与）における AUC24h（352 ng･h/mL）
b：81 週目より投与用量を 405 mg/kg/日から 180 mg/kg/日に減量
c：53 週目より投与用量を 120 mg/kg/日から 60 mg/kg/日に減量
d：投与 93 週時の値

2.6.6.9.5　　生殖発生毒性

ラット又はウサギを用いて，受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験，胚・胎児発生に関する試験，出生前及び出生後の発生並びに母体機能に関する試験，新生児を用いた試験を経口投与により実施した．各生殖発生毒性試験の無毒性量における血漿中イバブラジンの AUC24h 及びヒトとの曝露比を表 2.6.6.9.5-1 に示した．

ラット又はウサギを用いて生殖発生毒性について検討した結果，本薬を着床後の母動物に投与した際に着床後胚死亡率及び出生後死亡率の高値，催奇形性を示す心臓形態異常及び欠指症などが認められた．また，母動物への影響として体重増加抑制及び摂餌量の低値，自発運動の減少又は眼瞼下垂などの一般状態変化が認められた．一方，受胎能及び着床までの初期胚発生に対する影響は認められなかった．更に，新生児ラットに投与した結果，心拍数減少及び心臓の病理組織学的変化など，成獣と同様の所見が認められたが，出生後の発達や受胎能及び着床までの初期胚発生に対する影響は認められなかった．

本薬の生殖発生毒性は臨床最大用量における血漿曝露量付近から認められており，本薬は哺育中のラットの乳汁中に移行することが確認されていることから［2.6.4.6.4］，妊娠中又はその可能性のある女性への本薬の投与並びに本薬服用中の授乳は避けるべきと考えられた．

表 2.6.6.9.5-1　生殖発生毒性試験における血漿曝露量及びヒトとの曝露比

試験の種類	動物種	評価項目		無毒性量（mg/kg/日）	AUC24h（ng･h/mL）	AUC 比（動物／ヒト[a]）
受胎能・初期胚発生	ラット	雄		175	11027[b]	31
		雌		175	33059[b]	94
胚・胎児発生	ラット	母動物		9.3	1857	5.3
		胚・胎児		1.5	482	1.4
	ウサギ	母動物		7	455	1.3
		胚・胎児		<7[c]	<455	<1.3
出生前後発生	ラット	母動物		<2.5[d]	<608	<1.7
		児の発達		2.5	608	1.7
		児の生殖能		20	5037	14
新生児	ラット	発達・生殖能	雄	30	3222	9.2
			雌	30	6417	18

a：臨床最大用量（7.5 mg，1 日 2 回投与）における AUC24h（352 ng･h/mL）
b：ラット 4 週間反復経口投与毒性試験（1 日 1 回投与）における初回投与時の値
c：着床後胚死亡率の高値が認められた用量
d：心肥大が認められた用量

2.6.6.9.6　局所刺激性

本薬の溶血性及び局所刺激性を評価するため，*in vitro* 試験としてヒト血液を用いた溶血性試験，*in vivo* 試験としてウサギを用いた局所刺激性試験を実施した．その結果，19 mg/mL 以上の濃度で溶血性が認められた．また，皮膚刺激性及び眼刺激性が認められたが，いずれも軽度な変化であった．

2.6.6.9.7　免疫毒性

ラットを用いた T 細胞依存性抗体産生試験の結果，本薬は免疫毒性を示さなかった．

2.6.6.9.8　依存性

依存性評価の必要性について検討した結果，本薬が依存性を有する可能性はないと考えられたため，依存性試験は実施しなかった．

本薬は受容体結合実験において，アドレナリン受容体，セロトニン受容体，ドパミン受容体，GABA 受容体，アセチルコリン受容体及びオピオイド受容体などの依存性に関与する受容体に結合しなかった［2.6.2.3.1］．また，全身オートラジオグラフィーを用いたラット組織中放射濃度測定において，脳中イバブラジン濃度は血漿中濃度の 3%未満であり，イバブラジンの脳内移行性は非常に低いと考えられた［2.6.4.9.2］．更に，ラット 26 週間及びイヌ 53 週間反復投与毒性試験において，回復期間中に退薬症候を示唆する変化は認められず，ラットを用いた出生前後発生試験及び新生児ラットを用いた出生後の発達に関する試験において，出生児の記憶及び学習を含む行動機能に対する影響は認められなかった．非臨床試験

での行動／症状観察所見として，ラットを用いた安全性薬理試験の 119 mg/kg 以上及びラット及びイヌを用いた一般毒性試験のそれぞれ 32 及び 10 mg/kg/日以上において鎮静，体温低下及び振戦などの中枢神経症状が観察されたが，これらの所見が認められなかった用量（6 及び 7 mg/kg/日）におけるラット及びイヌ血漿中イバブラジンの Cmax と臨床最大用量における Cmax との間にはそれぞれ 2.7 倍及び 34 倍の安全域が存在する．また，非臨床試験で中枢神経症状が認められた血漿曝露量では，心拍数減少や体重減少など，他の作用による生体への影響が現れることから，中枢神経症状が認められた用量を乱用することは困難と考えられた．これは，「薬物依存性に関する動物実験と臨床観察の適用範囲について（薬麻第 383 号 昭和 53 年 6 月 7 日）」で定める「その用量の薬物を適用することが困難な場合」に該当すると考えられ，依存性試験が必要な薬物に該当しないと考えられた．また，これまでに実施した国内外の臨床試験において，薬物乱用や退薬症候を示唆する変化は認められていない［2.5.5］．以上のことから，本薬が依存性を有する可能性はないと判断した．

2.6.6.9.9 代謝物

ヒトに 20 mg/日（10 mg の 1 日 2 回投与）の用量で反復投与した際，血漿中に 6 種類の代謝物（M3，M10，M28，M29，M31 及び M32）が認められた［2.6.4.5.2.2］．

イヌ，マウス，ラット及びヒトにおける各代謝物の曝露比較を表 2.6.6.9.9-1 に示した．

一般毒性及びがん原性評価について，イヌ 53 週間反復投与毒性試験の無毒性量 7 mg/kg/日及びがん原性を示さなかったマウス 104 週間がん原性試験の最高用量 405 mg/kg/日において，各代謝物の曝露量がヒト血漿中での曝露量を上回ったことから，代謝物の一般毒性及び発がんについての懸念はないと考えられた．

胚・胎児発生毒性評価について，ラットを用いた試験において M10 及び M31 に対する十分な曝露（ヒトでの曝露量の 50%以上）は得られていないが，親化合物である本薬が胚・胎児発生毒性を有することから，代謝物の胚・胎児発生毒性について評価する必要はないと判断し，代謝物を用いた胚・胎児発生に関する試験は実施しなかった．

表 2.6.6.9.9-1　ヒト及び毒性試験におけるイバブラジン及び代謝物の血漿曝露量

試験の種類	用量（mg/kg/日）	性別	AUC24h（ng･h/mL）						
			イバブラジン	代謝物					
				M3	M10	M28	M29[d]	M31	M32
ヒト：20 mg[a] （10 mg の 1 日 2 回投与）	-	男性 女性	249 255	50 89	72 79	40 42	92 102	12 12	23 22
一般毒性試験 イヌ 53 週間反復投与毒性試験	7	雄 雌	4650 3890	23655 22665	350 315	460 440	315 389	32 28	76 77
がん原性試験 マウス 104 週間がん原性試験	405/180[b]	雄 雌	7920[c] 14331[c]	125683 36688	1703 1408	1014 1437	3654 3699	35 97	212 326
胚・胎児発生毒性試験 ラット胚・胎児発生毒性試験	1.5	雌	482	267	18	51	11	5	11

毒性試験における代謝物の曝露量は，薬物動態試験［2.6.4.5.2.2］のイバブラジン曝露量より比例計算した.
-：データなし
a：臨床最大用量（15 mg，7.5 mg の 1 日 2 回投与）を上回る用量
b：81 週目より投与用量を 405 mg/kg/日から 180 mg/kg/日に減量
c：投与 93 週時の値
d：ONO-IN-306

2.6.6.9.10　　不純物

原薬又は製剤中に含まれる可能性のある不純物のうち，規格値上限が ICH Q3A「新有効成分含有医薬品のうち原薬の不純物に関するガイドライン」又は ICH Q3B「新有効成分含有医薬品のうち製剤の不純物に関するガイドライン」の安全性確認の閾値を超える不純物は，原薬中の　　不純物A*　　である．申請規格値を上回る不純物A*を含有する原薬を使用して，ラットを用いた 4 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ラットを用いた小核試験を実施した．これら不純物A*を含有する原薬の毒性試験における不純物含量をヒト投与量における不純物含量と比較し，表 2.6.6.9.10-1 に示した．

不純物A*の原薬申請規格値は[redacted]%以下であり，臨床最大用量が 15 mg/日（7.5 mg の 1 日 2 回投与）であることから，ヒト体重を 60 kg とした場合の不純物A*の投与量は体重換算で[redacted]μg/kg，体表面積換算で[redacted]μg/m^2 である．申請規格値を上回る不純物A*を含有した本薬のラットを用いた 4 週間反復投与毒性試験の無毒性量における不純物A*の投与量は，臨床最大用量における不純物A*の 1 日摂取量を上回ることが確認された．また，申請規格値を上回る不純物A*を含有した本薬の細菌を用いた復帰突然変異試験及びラットを用いた小核試験はいずれも陰性であった．

以上より，本薬の原薬中に含まれる可能性のある不純物である不純物A*の規格値上限における安全性に問題はないと考えられた．

表 2.6.6.9.10-1　不純物を含有する原薬の毒性試験における 不純物A* 投与量及び臨床最大用量における 不純物A* 投与量の比較

試験の種類	臨床用量 又は無毒性量 (mg/kg/日)	不純物A* 含量 (%)	不純物A* 投与量		不純物A* 投与量比 (動物／ヒト)	
			体重換算 (μg/kg)	体表面積換算 (μg/m²) [a]	体重換算	体表面積換算
臨床最大用量：15 mg/日 (7.5 mg の 1 日 2 回投与)	0.25[b]	≦[redacted][c]	[redacted]	[redacted]	-	-
ラット 4 週間反復投与毒性試験 Batch No.：FE 349	6.5	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]
ラット小核試験 Batch No.：FE 349	750	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]
細菌を用いた復帰突然変異試験 Batch No.：FE 349	-	[redacted]	-	-	-	-

-：データなし
a：体重換算値に相関係数を乗じて算出（相関係数：ヒト 37，ラット 6）
b：体重 60 kg として算出
c：原薬の申請規格値

上記の他，原薬中に含まれる可能性のある　不純物B*　について，細菌を用いた復帰突然変異試験を実施した結果，遺伝子突然変異を誘発したことから,不純物B*の規格値を ICH M7「潜在的発がんリスクを低減するための医薬品中 DNA 反応性（変異原性）不純物の評価及び管理ガイドライン」に定める許容限度値である TTC 以下に設定した.

2.6.6.9.11　　光毒性

Balb/c 3T3 細胞を用いた光毒性試験の結果，紫外線照射による細胞生存率への影響は認められなかったことから，本薬は光毒性を有さないと判断した.

2.6.6.9.12　　皮膚感作性

マウスを用いた局所リンパ節増殖試験の結果，皮膚感作性は認められなかった.

2.6.6.9.13　　結論

反復投与毒性試験において，本薬の薬理作用である心拍数減少が認められ，これに伴う二次的又は代償的な変化として，ラットでは心臓の器質的変化，ANP の高値，尿電解質の変動，イヌでは洞性徐脈や洞房／房室ブロック，洞停止などの心電図異常が認められた．その他，本薬の標的受容体である HCN チャネルを介した変化として，視機能の異常及び中枢神経症状が認められた．視機能の異常は臨床試験においても認められたが，その多くは軽度であり，日常生活に影響を及ぼす可能性は低いと考えられている．これらはいずれも薬理作用に関連した可逆的な変化であり，ヒトへの外挿性に乏しい心臓の器質的変化，ANP の高値及び尿電解質の変動を除くと，臨床最大用量における AUC24h との安全域はラットで 2.7 倍，イヌで 11 倍であった.

生殖発生毒性試験の結果，胚及び出生後死亡率の高値，催奇形性を示す心臓形態異常及び欠指症などが臨床最大用量における血漿曝露量付近から認められた.

原薬に含まれる可能性のある　不純物B*　が遺伝毒性を示したことから，その規格値を ICH M7「潜在的発がんリスクを低減するための医薬品中 DNA 反応性（変異原性）不純物の評価及び管理ガイドライン」に定める許容限度値である TTC 以下に設定した.

以上の非臨床毒性試験成績より，本薬は過量投与に留意することで，慢性心不全治療薬として臨床において安全に使用可能であると考えられた．また，妊娠中又はその可能性のある女性への本薬の投与並びに本薬服用中の授乳は避けるべきと考えられた.

2.6.6.10　　図表

図表は本文中に記載した.

2.6.6.11 参考文献

1） 各論 I 第 3 章 循環器系. In: 日本毒性病理学会, 毒性病理組織学改訂委員会, editors. 新毒性病理組織学. 初版. 西村書店; 2017. p. 271-286.

2） 柿畑 耕司, 大野 広志, 山田 昌男, 手嶋 典子, 島田 晴美, 野村 護. Carvedilol のラットにおける亜急性毒性試験. 医薬品研究. 1989;20:1191-208.

3） 新保 幸太郎, 富樫 広子, 横井 裕子, 藤原 早苗, 田辺 恒義. α, β-Adrenoceptor-blocking Agent Labetalol Hydrochloride の一般毒性について 第三報 ラットにおける 9 ヶ月間経口慢性毒性試験および回復試験. The Journal of Toxicological Sciences. 1981;6:37-59.

4） Yoshimura S, Hashimoto K. Role of endogenous beta-adrenergic mechanism in the pathogenesis of spontaneous myocardial fibrosis in rats. Tohoku J Exp Med. 1988;155:327-33.

5） 柿畑 耕司, 大野 広志, 鈴木 則男, 山田 昌男, 島田 晴美, 神藤 敏正, ほか. Carvedilol のイヌにおける亜急性毒性試験. 医薬品研究. 1989;20:1209-19.

6） 佐久間 康夫. 24.腎臓, 心臓および松果体の内分泌機能. In: 村田誠四郎, editors. ギャノング生理学. 原書 22 版. 丸善株式会社; 2006.477-489.

7） Yoshimoto T, Naruse M, Tanabe A, Naruse K, Seki T, Imaki T, et al. Potentiation of natriuretic peptide action by the beta-adrenergic blocker carvedilol in hypertensive rats: a new antihypertensive mechanism. Endocrinology. 1998;139:81-8.

8） Kaupp UB, Seifert R. Molecular diversity of pacemaker ion channels. Annu Rev Physiol. 2001;63:235-57.

9） Barrow AJ, Wu SM. Low-conductance HCN1 ion channels augment the frequency response of rod and cone photoreceptors. J Neurosci. 2009;29:5841-53.

10） Cervetto L, Demontis GC, Gargini C. Cellular mechanisms underlying the pharmacological induction of phosphenes. Br J Pharmacol. 2007;150:383-90.

11） Knop GC, Seeliger MW, Thiel F, Mataruga A, Kaupp UB, Friedburg C, et al. Light responses in the mouse retina are prolonged upon targeted deletion of the HCN1 channel gene. Eur J Neurosci. 2008;28:2221-30.

12） Seeliger MW, Brombas A, Weiler R, Humphries P, Knop G, Tanimoto N, et al. Modulation of rod photoreceptor output by HCN1 channels is essential for regular mesopic cone vision. Nat Commun. 2011;2:532.

13） Herrmann S, Stieber J, Ludwig A. Pathophysiology of HCN channels. Pflugers Arch. 2007;454:517-22.

14） Benarroch EE. HCN channels: function and clinical implications. Neurology. 2013;80:304-10.

15） Brennan GP, Baram TZ, Poolos NP. Hyperpolarization-Activated Cyclic Nucleotide-Gated (HCN) Channels in Epilepsy. Cold Spring Harb Perspect Med. 2016;6.

2.6.7 毒性試験の概要表

小野薬品工業株式会社

目次

略号一覧 3
General remarks 4
2.6.7 毒性試験の概要表 5
2.6.7.1 毒性試験：一覧表 5
2.6.7.2 トキシコキネティクス：トキシコキネティクス試験の一覧表 11
2.6.7.3 トキシコキネティクス：トキシコキネティクス試験成績の一覧 13
2.6.7.4 毒性試験：被験物質（バッチ毎）一覧 18
2.6.7.5 単回投与毒性試験 21
2.6.7.6 反復投与毒性試験：重要な試験以外の試験 26
2.6.7.7 反復投与毒性試験：重要な試験 36
2.6.7.8 In vitro 遺伝毒性試験 64
2.6.7.9 *In vivo* 遺伝毒性試験 80
2.6.7.10 がん原性試験 86
2.6.7.11 生殖発生毒性試験：重要な試験以外の試験 106
2.6.7.12 生殖発生毒性試験 109
2.6.7.13 局所刺激性試験 134
2.6.7.14 その他の毒性試験 136

略号一覧

略号	略さない表現又は説明
-	No noteworthy findings
ALT	Alanine aminotransferase
ANP	Atrial Natriuretic Peptide
AUC8	Area under the concentration curve over 8 h
AUC24	Area under the concentration curve over 24 h
b.i.d.	Bis in die (twice daily)
blq	Below the limit of quantitation
C5min	Concentration 5 minutes after the end of injection
Cmax	Maximum concentration
Css	Concentration at steady state
CTD	Common technical document
ECG	Electrocardiogram/-graphy/-graphic
ERG	Electroretinogram/-graphy/-graphic
F	Female
GLP	Good Laboratory Practice
HTD	High oral therapeutic dose (7.5 mg twice daily)
ICH	International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use
ia	Intra-arterial
iv	Intravenous
LDx	Lethal dose in x% of the animals
M	Male
MTD	Maximum Tolerated Dose
n	Sample size
nd	Not determined
NOAEL	No Observed Adverse Effect Level
np	Not performed
NZW	New-Zealand White
PFC	Plaque Forming Cell
pv	Perivenous
S 16257	Ivabradine
S 16257-2, S 16257-02	Ivabradine Hydrochloride
S 18982	ONO-IN-306
SD	Standard deviation
TEM	Transmission Electron Microscopy
tk	Thymidine kinase gene
TK	Toxicokinetic(s)
tmax	Time to maximum concentration
TS	Tabulated summary
vs.	Versus

General remarks

The toxicokinetic parameters of ivabradine are reported as mean values, except when 2 animals are involved; in this case individual data are reported. When available, data on the main active metabolite of ivabradine, ONO-IN-306, are reported in this Summary.

In all studies, ivabradine (S 16257) was administered as the mono-hydrochloride salt (S 16257-2). For consistency, doses are expressed as ivabradine free base throughout this Summary. Consequently, a conversion factor of 0.928 (base/salt ratio; not adjusted for water content (≤ 1.0%)) was applied for the study reports where dose levels were expressed as ivabradine hydrochloride (salt form).

Toxicokinetic data may also be expressed as multiples of human plasma parameters in patients receiving the high oral therapeutic dose of 7.5 mg ivabradine twice daily, as calculated from population pharmacokinetic analysis using Phases III clinical data (Summary of clinical pharmacology studies, [2.7.2.3.3.5] / Report NP30429). The human parameters (as mean ± SD, n=135 for ivabradine and n=139 for ONO-IN-306) used as a reference are tabulated below:

	Ivabradine	**S 18982**
C_{max} (ng/mL)	35 ± 18	7.5 ± 2.2
AUC_{24} (ng.h/mL)	352 ± 202	108 ± 34

2.6.7 毒性試験の概要表

2.6.7.1 毒性試験：一覧表

被験物質：イバブラジン塩酸塩

Type of study	Species and strain	Method of administration	Duration of treatment	Doses (mg/kg) [a]	GLP compliance	Testing Facility	Report number	Location in CTD
Single-dose toxicity								
	OF1 mice	Gavage	Single	0, 371, 557^{Male}, 742^{Female}, 928, 1114	Yes	[redacted] - France	NP03164	4.2.3.1-1
		Slow iv bolus	Single	0, 19, 37^{Male}, 56^{Female}, 74, 93	Yes	[redacted] - France	NP03137	4.2.3.1-2
	Sprague-Dawley rats	Gavage	Single	0, 371 ^{Female}, 557 ^{Male}, 742, 928, 1114	Yes	[redacted] - France	NP03163	4.2.3.1-3
		Slow iv bolus	Single	0, 37, 56, 74, 84, 93	Yes	[redacted] - France	NP03138	4.2.3.1-4
	Beagle dogs	Oral capsules	Single [b]	2.8, 5.6, 11, 22, 37, 70	Yes	[redacted] - UK	NP03165	4.2.3.1-5
		Slow iv bolus	Single	4.6, 9.3	Yes	Biologie Servier - France	NP03143	4.2.3.1-6

a: The maximum nonlethal dose is underlined
b: Including dose-escalation

2.6.7.1 毒性試験：一覧表（続き）

Type of study	Species and strain	Method of administration	Duration of treatment	Doses (mg/kg)[a]	GLP compliance	Testing Facility	Report number	Location in CTD
Repeat-dose toxicity – Nonpivotal studies								
	Sprague-Dawley rats	Gavage	4 weeks	0, 14, 56, 223	Yes	[redacted] - France	NP03169	4.2.3.2-1
		Gavage	4 weeks	0, 2.8, 7	Yes	[redacted] - France	NP03144	4.2.3.2-2
		Slow iv bolus	2 weeks	0, 9.3, 22, 37	No	[redacted] -France	NP03166	4.2.3.2-3
	Wistar rats	Gavage	4 weeks	0, 30, 60, 90, 125 b.i.d.	No	Biologie Servier - France	NP08002	4.2.3.2-4
		Slow iv bolus	4 weeks	0, 2.3, 9.3, 37	Yes	[redacted] - France	NP05181	4.2.3.2-5
	Wistar, Fischer & Sprague-Dawley rats	Gavage	4 weeks	0, 223	No	Biologie Servier - France	NP08000	4.2.3.2-6
	Beagle dogs	Gavage	12 weeks	5, 10, 20 b.i.d.	No	Biologie Servier - France	NP15094	4.2.3.2-7
		Slow iv bolus	2 weeks	4.6, 7	No	Biologie Servier - France	NP15093	4.2.3.2-8
		Slow iv bolus	4 weeks	0, 1.9, 3.7, 7.4	Yes	Biologie Servier - France	NP05108	4.2.3.2-9
		Continuous iv infusion	Up to 2 weeks	6, 12, 24, 48, 50, 70, 100	Yes	[redacted] - France	NP05349	4.2.3.2-10
		Continuous iv infusion	4 weeks	0, 3, 15, 70	Yes	[redacted] - France	NP05514	4.2.3.2-11
Repeat-dose toxicity – Pivotal studies								
	Wistar rats	Gavage	4 weeks	0, 6.5[Male], 19[Female], 58, 175	Yes	Biologie Servier - France	NP05320	4.2.3.2-12
		Gavage	13 weeks	0, 7, 35, 175	Yes	Biologie Servier - France	NP05319	4.2.3.2-13
		Gavage	26 weeks	0, 3, 16, 90 b.i.d.	Yes	Biologie Servier - France	NP06240	4.2.3.2-14
		Gavage	52 weeks	0, 3[Male], 16, 90 b.i.d.	Yes	[redacted] - France	NP07026	4.2.3.2-15
	Beagle dogs	Gavage	4 weeks	0, 4.6, 14, 42	Yes	Biologie Servier - France	NP03162	4.2.3.2-16
		Gavage	13 weeks	0, 3, 10, 30	Yes	Biologie Servier - France	NP05574	4.2.3.2-17
		Gavage	26 weeks	0, 2, 6.25, 20 b.i.d.	Yes	Biologie Servier - France	NP06245	4.2.3.2-18
		Gavage	53 weeks	0, 1, 3.5, 12 b.i.d.	Yes	[redacted] - France	NP15280	4.2.3.2-19
	ECG review	-	-	-	No	[redacted] - USA	NP15161	4.2.3.2-20

a: The highest NOAEL is underlined

2.6.7.1 毒性試験：一覧表（続き）

Type of study	Species and strain	Method of administration	Duration of treatment	Doses (mg/kg)[a]	GLP compliance	Testing Facility	Report number	Location in CTD
Genotoxicity								
Review	-	-	-	-	No	[redacted] - UK	NP08409	4.2.3.3-1
In vitro genotoxicity								
Ames test	*S.typhimurium* *E.coli*	*In vitro*	-	0, 46, 139, 464, 928, 1392, 2320, 4640 µg/plate	Yes	Biologie Servier - France	NP03142	4.2.3.3.1-1
tk mutation	Mouse lymphoma cells	*In vitro*	-	-S9: 87 to 1160 µg/mL +S9: 87 to 1624 µg/mL	No	[redacted] - France	NP05144	4.2.3.3.1-2
	Mouse lymphoma cells	*In vitro*	-	-S9: 116 to 1856 µg/mL +S9: 58 to 1392 µg/mL	Yes	[redacted] - UK	NP05489	4.2.3.3.1-3
Unscheduled DNA synthesis	Rat hepatocytes	*In vitro*	-	0, 55, 100, 180, 300, 400, 550 µg/mL	Yes	Biologie Servier - France	NP05912	4.2.3.3.1-4
Chromosome aberration	Human Lymphocytes	*In vitro*	-	-S9: 46, 79, 116,139 µg/mL +S9: 260, 487, 882, 1670, 2088 µg/mL	Yes	Biologie Servier - France	NP05576	4.2.3.3.1-5
In vivo genotoxicity								
Unscheduled DNA synthesis	Wistar rats	Gavage	-	F: 0, 181, 603 M: 0, 278, 928	Yes	[redacted] - UK	NP05409	4.2.3.3.2-1
Chromosome aberration	Wistar rats	Gavage	-	F: 0, 151, 302, 603 M: 0, 232, 464, 928	Yes	[redacted] - UK	NP05504	4.2.3.3.2-2
Micronucleus	OF1 mice	Gavage	-	0, 116, 232, 464	No	[redacted] - France	NP03141	4.2.3.3.2-3
Carcinogenicity								
Long-term studies								
Palatability	CD-1 mice	Diet	4 weeks	0, 30, 300	Yes	[redacted] - UK	NP05454	4.2.3.4.1-1
Subacute toxicity	CD-1 mice	Diet	13 weeks	0, 30, 100, 300, 600	Yes	[redacted] - UK	NP06393	4.2.3.4.1-2
Tumorigenic potential	CD-1 mice	Diet	104 weeks	0, 20, 90, 405/180[b]	Yes	[redacted] - UK	NP07944	4.2.3.4.1-3
Palatability	Wistar rats	Diet	6 weeks	0, 20, 200	Yes	[redacted] - UK	NP05455	4.2.3.4.1-5
Subacute toxicity	Wistar rats	Diet	13 weeks	0, 20, 50, 100, 150,200	Yes	[redacted] - UK	NP06450	4.2.3.4.1-6
Tumorigenic potential	Wistar rats	Diet	104 weeks	0, 7.5, 30, 120/60[c]	Yes	[redacted] - UK	NP07943	4.2.3.4.1-7

a: Unless otherwise indicated
b: Dosage level lowered from 405 to 180 mg/kg/d from Week 81
c: Dosage level lowered from 120 to 60 mg/kg/d from Week 53

2.6.7.1 毒性試験：一覧表（続き）

Type of study	Species and strain	Method of administration	Duration of treatment	Doses (mg/kg)	GLP compliance	Testing Facility	Report number	Location in CTD
Reproductive and developmental toxicity – Non-pivotal studies								
Fertility, prenatal and postnatal development	Wistar rats	Gavage	[a]	0, 9.3, 19, 37, 58, 117, 175	No	Biologie Servier - France	NP08074	4.2.3.5.1-1
Embryofetal development	Wistar rats	Gavage	F: G6 – G15[b]	0, 14, 56, 111, 223	No	Biologie Servier - France	NP08075	4.2.3.5.2-1
Embryofetal development	NZW rabbits	Gavage	F: G6 – G18[b]	0, 28, 56, 111, 167, 223	No	Biologie Servier - France	NP08076	4.2.3.5.2-2
Reproductive and developmental toxicity – Pivotal studies								
Fertility and early embryonic development								
Fertility	Wistar rats	Gavage	[c]	0, 7, 35, 175[d]	Yes	Biologie Servier - France	NP06673	4.2.3.5.1-2
Embryofetal development								
Embryofetal development	Wistar rats	Gavage	F: G6 - G15[b]	0, 2.3, 4.6, 9.3, 19[e]	Yes	Biologie Servier - France	NP05135	4.2.3.5.2-3
Embryofetal development	Wistar rats	Gavage	F: G6 – G17[b]	0, 0.5, 1.5, 9.3[f]	Yes	Biologie Servier - France	NP26980	4.2.3.5.2-4
Embryofetal development	NZW rabbits	Gavage	F: G6 – G18[b]	0, 7, 14, 28[g]	Yes	Biologie Servier - France	NP05134	4.2.3.5.2-5
Embryofetal development	NZW rabbits	Gavage	F: G6 – G18[b]	0, 42[h]	No	Biologie Servier - France	NP08073	4.2.3.5.2-6
Prenatal and postnatal development								
Pre- and postnatal development	Wistar rats	Gavage	F: G6 –L20[b]	0, 2.5, 7, 20[i]	Yes	Biologie Servier - France	NP07356	4.2.3.5.3-1

a: Males: 14 days prior to pairing; Females: from 14 days prior to pairing to gestation Day 6 (fertility); subgroup- F: gestation Day 6 to lactation Day 21 (pre- and postnatal development)

b: G: gestation day; L: lactation day

c: Males: 63 days prior to pairing; Females: from 14 days prior to pairing to gestation Day 6

d: NOAEL: 7 mg/kg (maternal toxicity), 35 mg/kg (paternal toxicity), 175 mg/kg (F0 male and female fertility, F1 litters)

e: NOAEL: <2.3 mg/kg (embryofetal toxicity and teratogenicity), 9.3 mg/kg (maternal toxicity)

f: NOAEL: 1.5 mg/kg (cardiovascular changes)

g: NOAEL: <7 mg/kg (embryo toxicity), 7 mg/kg (maternal toxicity)

h: NOAEL: Not specified in study report (no evidence of teratogenic potential at 42 mg/kg)

i: NOAEL: <2.5 mg/kg (maternal toxicity), 2.5 mg/kg (F1 pre- and postnatal development), 20 mg/kg (F1 male and female fertility and F2 pre- and early postnatal development)

2.6.7.1 毒性試験：一覧表（続き）

Type of study	Species and strain	Method of administration	Duration of treatment	Doses (mg/kg)	GLP compliance	Testing Facility	Report number	Location in CTD
Studies in juvenile animals – Non-pivotal studies								
Postnatal development								
Postnatal development	Wistar rats	Gavage	4 weeks (PND7 to PND34[b])	0, 1, 2, 4, 8	No	[redacted] - France	NP28601	4.2.3.5.4-1
Pharmacodynamics								
Heart rate recordings	Wistar rats	Gavage	4 weeks (PND7 to PND34[b])	0, 2, 8, 16	No	[redacted] - France	NP28971	4.2.3.5.4-2
Studies in juvenile animals – Pivotal studies								
Postnatal development								
Postnatal development	Wistar rats	Gavage	10 weeks (PND7 to PND77[b])	0, 7.5, 15, 30[a]	Yes	[redacted] - France	NP30966	4.2.3.5.4-3

a: NOAEL: 7.5 mg/kg (male toxicology), 15 mg/kg (female toxicology), 30 mg/kg (pre- and postweaning development, F0 fertility and F1 pre- and early postnatal development)
b: PND: postnatal day

2.6.7.1 毒性試験：一覧表（続き）

Type of study	Species and strain	Method of administration	Duration of treatment	Doses (mg/kg)[a]	GLP compliance	Testing Facility	Report number	Location in CTD
Local Tolerance								
Hemolytic potential	Human blood	*In vitro*	-	19, 93 mg/mL	No	Biologie Servier - France	NP08001	4.2.3.6-1
Local tolerance	NZW rabbits	Slow iv, pv, or ia bolus	Single	2 mg/mL 0.2 mg– 0.4 mg	Yes	Biologie Servier - France	NP22686	4.2.3.6-2
Primary skin irritation/corrosion	NZW rabbits	Semi-occlusive dermal application	Single	1.15 g/mL 0.46 g	Yes	[redacted] - Netherlands	NP32769	4.2.3.6-3
Acute eye irritation/corrosion	NZW rabbits	Ocular instillation	Single	0.3 g/mL 30 mg	Yes	[redacted] - Netherlands	NP32768	4.2.3.6-4
Other toxicity studies								
Immunotoxicity								
Immunotoxicity	Wistar rats	Gavage	4 weeks	0, 3, 16, 90 b.i.d.	Yes	[redacted] - Netherlands	NP15279	4.2.3.7.2-1
Mechanistic Studies								
Telemetry- Heart rate, heart lesions in rat	Wistar rats	Gavage	4 weeks	0, 7, 35, 175	Yes	[redacted] - France	NP15300	4.2.3.7.3-1
Studies on impurities								
Ames test	*S.typhimurium* and *E.coli*	*In vitro*	-	50, 150, 500, 1000, 1500, 2000, 3000, 4000, 5000 µg/plate	Yes	Biologie Servier - France	NP07357	4.2.3.7.6-1
Micronucleus	Wistar rats	Gavage	Single	0, 125, 250, 500, 750	Yes	Biologie Servier - France	NP07671	4.2.3.7.6-2
Repeat-dose toxicity	Wistar rats	Gavage	4 weeks	0, 6.5, 20, 59, 175	Yes	Biologie Servier - France	NP07572	4.2.3.7.6-3
Other studies								
Photo-cytotoxicity	Balb/c 3T3 neutral red uptake assay	*In vitro*	-	0.012, 0.06, 0.3, 1.5, 7.5, 37.5, 187, 937 µg/mL	Yes	[redacted] - Germany	NP08592	4.2.3.7.7-1
Local lymph node assay	CBA/J mice	Open dermal application	3 days	0, 10, 25 and 50% w/w	Yes	[redacted] - Netherlands	NP32767	4.2.3.7.7-2
Ames test	*S.typhimurium* and *E.coli*	*In vitro*	-	1.7, 5.4, 17, 52, 164, 512, 1600, 5000 µg/plate	Yes	[redacted] - Netherlands	NP35658	4.2.3.7.7-3

a: Unless otherwise indicated

2.6.7.2 トキシコキネティクス：トキシコキネティクス試験の一覧表 被験物質：イバブラジン塩酸塩

Type of study	Test system	Method of administration	Doses (mg/kg/d)	GLP compliance	Report number	Location in CTD
Single-dose toxicity						
Single-dose and dose-escalation study	Dogs	Oral capsules	2.8, 5.6, 11, 22, 37, 70	Yes	NP03165	4.2.3.1-5
Single-dose study	Dogs	Slow iv bolus	4.6, 9.3	Yes	NP03143	4.2.3.1-6
Repeat-dose toxicity – Nonpivotal studies						
Four-week study	Rats	Gavage	14, 56, 223	Yes	NP03169	4.2.3.2-1
Four-week study	Rats	Gavage	2.8, 7	Yes	NP03144	4.2.3.2-2
Two-week study	Rats	iv bolus	9.3, 22, 37	Yes	NP03166	4.2.3.2-3
Four-week study	Rats	Gavage	30, 60, 90, 125 b.i.d.	No	NP08002	4.2.3.2-4
Four-week study	Rats	iv bolus	2.3, 9.3, 37	Yes	NP05181	4.2.3.2-5
Four-week study	Rats	Gavage	223	No	NP08000	4.2.3.2-6
Twelve-week study	Dogs	Gavage	5, 10, 20 b.i.d.	No	NP15094	4.2.3.2-7
Two-week study	Dogs	Slow iv bolus	4.6, 7	Yes	NP15093	4.2.3.2-8
Four-week study	Dogs	Slow iv bolus	1.9, 3.7, 7.4	Yes	NP05108	4.2.3.2-9
Two-week study	Dogs	Continuous iv infusion	6, 12, 24, 48, 70, 100	Yes	NP05349	4.2.3.2-10
Four-week study	Dogs	Continuous iv infusion	3, 15, 70	Yes	NP05514	4.2.3.2-11
Repeat-dose toxicity – Pivotal studies						
Four-week study	Rats	Gavage	6.5, 19, 58, 175	Yes	NP05320	4.2.3.2-12
Thirteen-week study	Rats	Gavage	7, 35, 175	Yes	NP05319	4.2.3.2-13
Twenty-six-week study	Rats	Gavage	3, 16, 90 b.i.d.	Yes	NP06240	4.2.3.2-14
One-year study	Rats	Gavage	3, 16, 90 b.i.d.	Yes	NP07026	4.2.3.2-15
Four-week study	Dogs	Gavage	4.6, 14, 42	Yes	NP03162	4.2.3.2-16
Thirteen-week study	Dogs	Gavage	3, 10, 30	Yes	NP05574	4.2.3.2-17
Twenty-six-week study	Dogs	Gavage	2, 6.25, 20 b.i.d.	Yes	NP06245	4.2.3.2-18
One-year study	Dogs	Gavage	1, 3.5, 12 b.i.d.	Yes	NP15280	4.2.3.2-19

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

Type of study	Test system	Method of administration	Doses (mg/kg/d)	GLP compliance	Report number	Location in CTD
In vivo genotoxicity						
Unscheduled DNA synthesis	Rats	Gavage	181, 278[a], 603, 928[a]	Yes	NP05409	4.2.3.3.2-1
Chromosome aberrations	Rats	Gavage	151, 232[a], 302, 464[a], 603, 928[a]	Yes	NP05504	4.2.3.3.2-2
Carcinogenicity						
Four-week study	Mice	Diet	30, 300	Yes	NP05454	4.2.3.4.1-1
Thirteen-week study	Mice	Diet	30, 100, 300, 600	Yes	NP06393	4.2.3.4.1-2
One-hundred-and-four-week study	Mice	Diet	20, 90, 405/180[b]	Yes	NP07946	4.2.3.4.1-4
Six-week study	Rats	Diet	20, 200	Yes	NP05455	4.2.3.4.1-5
Thirteen-week study	Rats	Diet	20, 50, 100, 150, 200	Yes	NP06450	4.2.3.4.1-6
One-hundred-and-four-week study	Rats	Diet	7.5, 30, 120/60[c]	Yes	NP07945	4.2.3.4.1-8
Reproductive and developmental toxicity – Non-pivotal studies						
Fertility / Pre- and postnatal development	Rats	Gavage	9.3, 19, 37	No	NP08074	4.2.3.5.1-1
Embryofetal development	Rats	Gavage	14, 56, 111, 223	No	NP08075	4.2.3.5.2-1
Embryofetal development	Rabbits	Gavage	28, 56, 111, 167, 223	No	NP08076	4.2.3.5.2-2
Reproductive and developmental toxicity – Pivotal studies						
Embryofetal development	Rats	Gavage	2.3, 4.6, 9.3, 19	Yes	NP05135	4.2.3.5.2-3
Embryofetal development	Rats	Gavage	0.5, 1.5, 9.3	Yes	NP26980	4.2.3.5.2-4
Embryofetal development	Rabbits	Gavage	7, 14, 28	Yes	NP05134	4.2.3.5.2-5
Pre- and postnatal development	Rats	Gavage	2.5, 7, 20	Yes	NP07356	4.2.3.5.3-1
Studies in juvenile animals – Non-pivotal studies						
Postnatal development	Rats	Gavage	1, 2, 4, 8	No	NP28601	4.2.3.5.4-1
Heart rate recordings	Rats	Gavage	2, 8, 16	No	NP28971	4.2.3.5.4-2
Studies in juvenile animals – Pivotal studies						
Postnatal development	Rats	Gavage	7.5, 15, 30	Yes	NP30966	4.2.3.5.4-3
Other toxicity studies						
Immunotoxicity	Rats	Gavage	3, 16, 90 b.i.d.	Yes	NP15279	4.2.3.7.2-1
Telemetry – heart rate, heart lesions	Rats	Gavage	7, 35, 175	No	NP15300	4.2.3.7.3-1

a: Doses for males. Other doses relate to females
b: Dosage level lowered from 405 to 180 mg/kg/d from Week 81
c: Dosage level lowered from 120 to 60 mg/kg/d from Week 53

2.6.7.3 トキシコキネティクス：トキシコキネティクス試験成績の一覧 被験物質：イバブラジン塩酸塩

2.6.7.3.1 Ivabradine

Daily dose (mg/kg)*	Ivabradine steady state AUC24 (ng.h/mL) at the last sampling occasion							
	Mouse		Rat		Rabbit	Dog		Human[a]
	M	F	M	F	F	M	F	M + F
5 mg (2 x 2.5)								144
10 mg (2 x 5)								248
15 mg (2 x 7.5)								352
0.5				198[f]				
1			22[l,n]	87[l,n]				
1.5				482[f]				
1.9						*2108*[b]	*1856*[b]	
2			42[l,n]	166[l,n]				
2 (2 x 1)						361[c]	205[c]	
2.3			*593*[b, d]	848[b,d], 565[f]				
2.5				622[g(GD17)], 608[g(LD5)]				
2.8			226[h]	741[h]				
3						2100[e], *1600*[i]	1700[e], *990*[i]	
3.7						*4777*[b]	*5191*[b]	
4			159[l,n]	345[l,n]				
4 (2 x 2)						3993[j]	2086[j]	
4.6				980[f]		5002[k], 3492[h]	3144[k], 1750[h]	
6 (2 x 3)			561[j(13 weeks)], 935[c]	1648[j], 2386[c]				
6.5			*396*[h]	*2579*[h]				
7			515[h], 319[m], *640*[i]	2321[h], *1750*[i], 1460[g(GD17)], 1396[g(LD5)]	1664[f]	5252[k]	3536[k]	
7 (2 x 3.5)						*4650*[e]	*3890*[e]	
7.4						*8635*[b]	*8083*[b]	

Additional information: Figures in italic are mean values not included in original report (only individual values) but calculated afterwards for compliance with CTD format

**: Unless otherwise indicated*
a: Subjects. AUCτ (ng.h/mL) over 12 h multiplied by 2
b: 4-week iv bolus
c: 52/53-week gavage
d: AUC (ng.h/mL) from 0 to infinity
e: 4-week iv infusion
GD: Gestation day, LD: Lactation day
f: Segment II – after 10- or 13-day gavage in rats and rabbits, respectively
g: Segment III – after 21-day gavage
h: 4-week gavage
i: 13-week gavage
j: 26-week gavage
k: 2-week iv bolus (1 animal per dose)
l: AUC_8 (ng.h/mL)
m: 4-week gavage telemetry study
n: 4-week gavage in juvenile

2.6.7.3.1 Ivabradine（続き）

Daily dose (mg/kg)	Ivabradine steady state AUC24 (ng.h/mL) at the last sampling occasion							
	Mouse		Rat		Rabbit	Dog		Human
	M	F	M	F	F	M	F	M + F
7.5			888[a], 696[p]	859[a], 1883[p]				
8			211[o,r]	500[o,r]				
9.3			2758[b], *2782*[c, d]	5073[b], 3815[c,d], 1857[e], 4869[f], 2551[e]				
10						*6800*[g]	*6000*[g]	
10 (2 x 5)						6815[h]	1636[h]	
12.5 (2 x 6.25)						9056[i]	7976[i]	
14			1362[j]	4680[j], 5286[e]	6979[e]	9912[j]	6361[j]	
15			1324[p]	4181[p]		27000[n]	21000[n]	
16			441[r]	1479[r]				
19			*1370*[j]	*5263*[j], 4759[e], 6528[f]				
20	730[a]	1189[a]	*590*[k], 1188[l]	*2600*[k], 3109[l], 7719[f(LD5)], 5037[f(GD 17)]				
20 (2 x 10)						7457[h]	9054[h]	
22			10465[b]	15096[b]				
24 (2 x 12)						17300[m]	14300[m]	
28					11744[e], 11603[e]			
30	*1400*[k], 2277[l]	*430*[k], 1477[l]	6376[a], 3222[p]	3984[a], 6417[p]		*29000*[g]	*21000*[g]	
32 (2 x 16)			4621[i], 4384[m]	10817[i], 12426[m]				
35			1240[q], *2650*[g]	*9850*[g]				
37			15202[b], *20503*[c,d]	18545[b], 17042[c,d], 13719[f]				
40 (2 x 20)						19688[h], 28175[i]	12602[h], 20302[i]	
42						33889[j]	28437[j]	
50			2653[l]	7797[l]				

Additional information: Figures in italic are mean values not included in original report (only individual values) but calculated afterwards for compliance with CTD format
GD: Gestation day, LD: Lactation day
a: 104-week dietary administration
b: 2-week iv bolus
c: AUC (ng.h/mL) from 0 to infinity
d: 4-week iv bolus
e: Segment II – after 10- or 13-day gavage in rats and rabbits, respectively
f: Segment III – after 21-day gavage
g: 13-week gavage
h: 12-week gavage
i: 26-week gavage
j: 4-week gavage
k: 4- and 6-week dietary administration in mice and rats, respectively
l: 13-week dietary administration
m: 52/53-week gavage
n: 4-week iv infusion
o: AUC_8 (ng.h/mL)
p: 10-week gavage in juvenile
q: 4-week gavage telemetry study
r: 4-week gavage in juvenile

2.6.7.3.1 Ivabradine（続き）

Daily dose (mg/kg)	Ivabradine steady state AUC24 (ng.h/mL) at the last sampling occasion							
	Mouse		Rat		Rabbit	Dog		Human
	M	F	M	F	F	M	F	M + F
56			10594[a]	20841[a], 20790[b]	27707[b]			
58			*4391*[a]	*17093*[a]				
60			7950[d(104 weeks)]	8436[d(104 weeks)]				
60 (2 x 30)			8076[a]	13955[a]				
70						110000[c]	65000[c]	
90	6010[d]	8670[d]						
100	5910[e]	5296[e]	4953[e]	15438[e]				
111				40402[b]	60670[b]			
120			6329[d(52 weeks)]	12823[d(52 weeks)]				
120 (2 x 60)			14621[a]	33234[a]				
150			8522[e]	18832[e]				
167					89345[b]			
175			*18016*[a], 14397[j], *16000*[f]	*50215*[a], *46000*[f]				
180	7920[d(93 weeks)]	14331[d(104 weeks)]						
180 (2 x 90)			19829[a], 32867[g], 64479[h]	62094[a], 62216[g], 88276[h]				
200			*7200*[i], 7726[e]	*20000*[i], 23337[e]				
223			56408[a]	116293[a], 98326[b]				
250 (2 x 125)			37839[a]	83692[a]				
300	*6700*[i], 12643[e]	*7700*[i], 16681[e]						
405	25022[d(80 weeks)]	43160[d(80 weeks)]						
600	26786[e]	28862[e]						

Additional information: Figures in italic are mean values not included in original report (only individual values) but calculated afterwards for compliance with CTD format

a: 4-week gavage
b: Segment II – after 10- or 13-day gavage in rats and rabbits, respectively
c: 4-week iv infusion
d: 104-week dietary administration
e: 13-week dietary administration
f: 13-week gavage
g: 26-week gavage
h: 52-week gavage
i: 4- and 6-week dietary administration in mice and rats, respectively
j: 4-week gavage telemetry study

2.6.7.3.2 ONO-IN-306

Daily dose (mg/kg)	ONO-IN-306 steady state AUC24 (ng.h/mL) at the last sampling occasion						
	Mouse		Rat		Dog		Human[a]
	M	F	M	F	M	F	M + F
5 mg (2 x 2.5)							42
10 mg (2 x 5)							74
15 mg (2 x 7.5)							108
0.5				6.7[g]			
1			3.5[i,k]	2.1[i,k]			
1.5				18[g]			
2			7.8[i,k]	4.3[i,k]			
3					61[b], *210*[c]	41[b], *140*[c]	
4			24[i,k]	8.4[i,k]			
4 (2 x 2)					451[d]	241[d]	
6 (2 x 3)							
7			*20*[c]	*17*[c]			
7 (2 x 3.5)					481[e]	536[e]	
7.5			58.8[j]	78.1[j]			
8			52[i,k]	15[i,k]			
9.3				80[g]			
10					*1000*[c]	*900*[c]	
10 (2 x 5)					860[f]	149[f]	
12.5 (2 x 6.25)					1445[d]	1022[d]	
15			125[j]	215[j]	1800[b]	1000[b]	

Additional information: Figures in italic are mean values not included in original report (only individual values) but calculated afterwards for compliance with CTD format

**: Unless otherwise indicated*

a: Subjects. AUCτ (ng.h/mL) over 12 h multiplied by 2
b: 4-week iv infusion
c: 13-week gavage
d: 26-week gavage
e: 52/53-week gavage
f: 12-week gavage
g: Segment II – after 10-day gavage in rat
h: 4-week gavage
i: AUC_8 (ng.h/mL)
j: 10-week gavage in juvenile
k: 4-week gavage in juvenile

2.6.7.3.2 ONO-IN-306（続き）

Daily dose (mg/kg)	ONO-IN-306 steady state AUC24 (ng.h/mL) at the last sampling occasion						
	Mouse		Rat		Dog		Human
	M	F	M	F	M	F	M + F
16			30[k]	44[k]			
20	172[h]	140[h]					
20 (2 x 10)					759[f]	821[f]	
24 (2 x 12)					3240[i]	2580[i]	
30	*290*[a], *599*[b]		239[j]	296[j]	*6500*[c]	*2900*[c]	
32 (2 x 16)							
35			60[d], *149*[c]	*143*[c]			
37							
40 (2 x 20)					3049[e], 5908[f]	1596[e], 3917[f]	
50							
60 (2 x 30)			567[d]	250[d]			
70					15000[g]	8900[g]	
90	1406[h]	1179[h]					
100	1670[b]	1080[b]	425[b]	369[b]			
120		120					
120 (2 x 60)			1205[d]	753[d]			
150			729[b]	585[b]			
175			1287[d], *1588*[c]	*977*[c]			
180 (2 x 90)			1633[d], 2356[f], 8608[i]	2106[d], 2392[f], 2632[i]			
200			663[b]	684[b]			
250 (2 x 125)			4450[d]	3870[d]			
300	4421[b]	3352[b]					
405	9164[h(80 weeks)]	7033[h(80 weeks)]					
600	9992[b]	6244[b]					

Additional information: Figures in italic are mean values not included in original report (only individual values) but calculated afterwards for compliance with CTD format

a: 4- and 6-week dietary administration in mice and rats, respectively
b: 13-week dietary administration
c: 13-week gavag
d: 4-week gavage
e: 12-week gavage
f: 26-week gavage
g: 4-week iv infusion
h: 104-week dietary administration
i: 52/53-week gavage
j: 10-week gavage in juvenile
k: 4-week gavage in juvenile

2.6.7.4 毒性試験：被験物質（バッチ毎）一覧 被験物質：イバブラジン塩酸塩

Batch No.	Purity(%)[a]	Specified impurities (%)[b]							Report number	Type of study
		不純物C*	A[c]	不純物D*	不純物E*	Others[d]	Sum	不純物A*		
原薬申請規格 製剤申請規格 EF 558	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	NP03164	Single-dose oral mouse
									NP03137	Single-dose intravenous mouse
									NP03163	Single-dose oral rat
									NP03138	Single-dose intravenous rat
									NP03165	Single-dose / dose escalation oral dog
									NP03143	Single-dose intravenous dog
									NP08000	Four-week oral rat (non-pivotal)
									NP03166	Two-week intravenous rat (non-pivotal)
									NP15093	Two-week intravenous (bolus) dog (non-pivotal)
									NP03169	Four-week oral Sprague-Dawley rat (non-pivotal)
									NP03144	Four-week oral Sprague-Dawley rat (non-pivotal)
									NP05320	Four-week oral rat (pivotal)
									NP05181	Four-week intravenous rat (non-pivotal)
									NP03162	Four-week oral dog (pivotal)
									NP05108	Four-week intravenous (bolus) dog (non-pivotal)
									NP03142	Ames test
									NP03141	Micronucleus assay mouse
									NP08074	Fertility, pre- and postnatal development rat (non-pivotal)
									NP08075	Embryofœtal development rat (non-pivotal)
									NP08076	Embryofœtal development rabbit (non-pivotal)
									NP05135	Embryofœtal development rat (pivotal)

a: Drug substance content determined by potentiometry
b: Determined by HPLC-UV. Routine analysis included quantitation of 12 impurities or degradation products
c: 不純物F, 不純物G* and 不純物H**
d: Individual content of any other impurity, including 不純物I, 不純物J*, 不純物K*, 不純物L*, 不純物M* and 不純物N**

＊新薬承認情報提供時に置換

2.6.7.4 毒性試験：被験物質（バッチ毎）一覧（続き）

Batch No.	Purity(%)[a]	Specified impurities (%)[b]							Report number	Type of study
		不純物C*	A[c]	不純物D*	不純物E*	Others[d]	Sum	不純物A*		
原薬申請規格	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]		
製剤申請規格	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]		
EG 418						Except 不純物O*: [redacted]			NP08002	Four-week oral rat (non-pivotal)
									NP15094	Twelve-week oral dog (non-pivotal)
									NP05319	Thirteen-week oral rat (pivotal)
									NP05574	Thirteen-week oral dog (pivotal)
									NP05514	Four-week intravenous (infusion) dog (non-pivotal)
									NP05912	Unscheduled DNA synthesis rat hepatocytes
									NP05576	Chromosome aberrations human lymphocytes
									NP05454	Four-week dietary administration mouse
									NP05455	Six-week dietary administration rat
									NP05134	Embryofœtal development rabbit (pivotal)
46 462	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	NP05349	Two-week intravenous (infusion) dog (non-pivotal)
46 762	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	NP06240	Twenty-six-week oral rat (pivotal)
									NP05144	Mouse lymphoma assay
									NP05489	Mouse lymphoma assay
									NP06673	Fertility rat (pivotal)
									NP08073	Embryofœtal development rabbit (pivotal)
									NP07356	Pre- and postnatal development rat (pivotal)
									NP08001	Hemolytic potential human blood

a: Drug substance content determined by potentiometry
b: Determined by HPLC-UV. Routine analysis included quantitation of 12 impurities or degradation products
c: 不純物F, 不純物G* and 不純物H**
d: Individual content of any other impurity, including 不純物I, 不純物J*, 不純物K*, 不純物L*, 不純物M* and 不純物N**

＊新薬承認情報提供時に置換

2.6.7.4 毒性試験：被験物質（バッチ毎）一覧（続き）

Batch No.	Purity(%)[a]	Specified impurities (%)[b]						Report number	Type of study
		不純物C*	A[c]	不純物D*	不純物E*	Others[d]	Sum	不純物A*	
原薬申請規格	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	
製剤申請規格	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	
47 734									NP07026 One-year oral rat (pivotal)
									NP06245 Twenty-six-week oral dog (pivotal)
									NP05409 Unscheduled DNA synthesis rat
									NP05504 Chromosome aberrations rat
49 652	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	NP15280 One-year oral dog (pivotal)
						Except 不純物O*: [redacted]			NP07944 Tumorigenic potential mouse
									NP07943 Tumorigenic potential rat
									NP06393 Thirteen-week dietary administration mouse
									NP06450 Thirteen-week dietary administration rat
54 327	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	NP15279 Four-week oral rat (immunotoxicity)
									NP08592 Phototoxicity *in vitro*
FE 349	[redacted][e]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[f]	[redacted]	[redacted]	NP07357 Ames test (qualification of impurities)
									NP07671 Micronucleus assay rat (qualification of impurities)
									NP07572 Four-week oral rat (qualification of impurities)
55 294	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	NP15300 Four-week oral rat (mechanistic study)
									NP26980 Embryofœtal development rat (pivotal)
L0001357	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	NP28601 Postnatal development juvenile rat (non-pivotal)
									NP28971 Pharmacodynamics juvenile rat (non-pivotal)
									NP30966 Postnatal development juvenile rat (pivotal)
L0042800	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	NP32767 Local lymph node assay
									NP32769 Primary skin irritation/corrosion
									NP32768 Acute eye irritation/corrosion
L03563[g]	[redacted] mg/mL	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	NP22686 Local tolerance

a: Drug substance content determined by potentiometry
b: Determined by HPLC-UV. Routine analysis included quantitation of 12 impurities or degradation products
c: 不純物F, 不純物G* and 不純物H**
d: Individual content of any other impurity, including 不純物I, 不純物J*, 不純物K*, 不純物L*, 不純物M* and 不純物N**
e: Determined by HPLC-UV
f: 18 impurities including 不純物I: [redacted] %, 不純物K*: [redacted] %, 不純物M*: [redacted] % and 不純物N*: [redacted] %*
g: Solution for injection containing 2 mg of Ivabradine per mL

＊新薬承認情報提供時に置換

2.6.7.5 単回投与毒性試験 被験物質：イバブラジン塩酸塩

Species/ strain	Method of administration (vehicle/ formulation)	Doses (mg/kg)	Gender and No. per group	Observed maximum nonlethal dose (mg/kg)	Observed minimum lethal dose (mg/kg) / incidence of death	Noteworthy findings	Report number
Mice/OF1	Gavage (water)	0, 371, 557, 742, 928, 1114	6M 6F	557 742	742 (3/6) 928 (3/6)	- Death (by the next day of dosing; dose-related) at ≥742 (M) or ≥928 (F), preceded by clonic convulsions; LD50 (M+F): 941[833-1062]; LD10 (M+F): 670[597-752] - From 15 min to 5 h after dosing (at ≥371; dose-related): subdued behavior, closed eye, tremor - Reduced global bodyweight gain in F (-30 and -70%, at 928 and 1114, respectively) - No target organ pathology identified	NP03164
Mice/OF1	Intravenous slow bolus (tail vein, 20 mL/kg, 0.5 mL/min) (saline)	0, 19, 37, 56, 74, 93	6M 6F	37 56	56 (1/6) 74 (4/6)	- Death (within 15 min after dosing) at ≥56 (M) or ≥74 (F), preceded by prostration and clonic convulsions; LD50 (M+F): 68[62-75]; LD10 (M+F): 55[50-60] - Immediately to 3 h after dosing: subdued behavior at ≥19 (M) and ≥37 (F), closed eye and tremor (at ≥37) - No target organ pathology identified	NP03137

Additional information: LD50 or LD10 calculated using Bliss' method.

2.6.7.5 単回投与毒性試験（続き）

Species/ strain	Method of administration (vehicle/ formulation)	Doses (mg/kg)	Gender and No. per group	Observed maximum nonlethal dose (mg/kg)	Observed minimum lethal dose (mg/kg) / incidence of death	Noteworthy findings	Report number
Rats/Sprague -Dawley	Gavage (water)	0, 371, 557, 742, 928, 1114	6M 6F	557 371	742 (3/6) 557 (2/6)	- Death (by the next day of dosing) at ≥742 (M) or ≥557 (F), preceded by clonic convulsions (in 2M at 1114); LD50 (M+F): 780[692-879]; LD10 (M+F): 544[489-605] - From 15 min to 5 h after dosing (at 371 and 557; dose- related) and up to D2 inclusive (at ≥742): subdued behavior, closed eye and tremor - Reduced global bodyweight gain at ≥371 on the next day of dosing, M more affected than F - No target organ pathology identified	NP03163
Rats/Sprague -Dawley	Intravenous slow bolus (tail vein, 10 mL/kg, 1 mL/min) (saline)	0, 37, 56, 74, 84, 93	6M 6F	56 56	74 (2/6) 74 (2/6)	- Death (within 15 min after dosing) at ≥74, preceded by prostration and clonic convulsions; LD50 (M+F): 81[76- 86]; LD10 (M+F): 69[65-72] - Immediately after dosing up to 4 h after dosing (at ≥37, dose-related): subdued behavior, closed eye and tremor - No target organ pathology identified	NP03138

Additional information: LD50 or LD10 calculated using Bliss' method.

2.6.7.5 単回投与毒性試験（続き）

Species/ strain	Method of administration (vehicle/ formulation)	Doses (mg/kg)	Gender and No. per group	Observed maximum nonlethal dose (mg/kg)	Observed minimum lethal dose (mg/kg) / incidence of death	Noteworthy findings	Report number
Dogs/beagle	Gavage (powder in capsule)	Single-dose: 37, 70	1M 1F	<37 <37	37 37	- Killed (about 1 h after dosing since MTD had been exceeded) for excessive toxicity - 1M and 1F at 37: emesis, tremor, ataxia, panting, stiffness, hunched posture, convulsions (M); gastro-intestinal tract discoloration - 1M at 70: emesis, tremor, ataxia, tonico-clonic convulsions, stiffness (fore and hind limbs), increased rectal temperature; gastro-intestinal tract discoloration - Surviving F (at 70, 2-week observation period): emesis, stiffness (hind limbs), hunched posture, ataxia, tremor; fecal occult blood (Days 3 and 15); cardiac arrhythmia (3 h after dosing), heart-rate reduction (5 h after dosing); gastro-intestinal tract discoloration - Toxicokinetics of Ivabradine:	NP03165

Dose	Cmax (ng/mL)[a]		AUC24 (ng.h/mL)[a]	
(mg/kg)	M	F	M	F
37	9490	4010	nd	nd
70	4560	2790	nd	13380

a: Emesis precluded accurate determination

2.6.7.5 単回投与毒性試験（続き）

Species/ strain	Method of administration (vehicle/ formulation)	Doses (mg/kg)	Gender and No. per group	Observed maximum nonlethal dose (mg/kg)	Observed minimum lethal dose (mg/kg) / incidence of death	Noteworthy findings	Report number
Dogs/beagle	Gavage (powder in capsule)	Escalating dose: 2.8 (2 days) 5.6 (3 days) 11 (2 days) 22 (2 days)	1M 1F	11 11	22 22	- Changes in appearance and behavior (onset about 0.5 h after dosing, full recovery at the end of dosing day at ≤11): at ≥2.8: emesis; at ≥11: subdued behavior, blood in the feces (only at 11), tremor; at 22: ataxia, stiffness (body/legs), hunched posture, head nodding, panting, loss of balance, leading to unscheduled kill of both dogs (MTD exceeded) - Marginal bodyweight loss associated with reduced feed intake (≥11) - Sinus arrhythmia at ≥11 (max 3 to 5 h after dosing) together with sinus arrest (at 22) - Discoloration of the gastrointestinal tract, consistent with fecal occult blood (D8) - Toxicokinetics of Ivabradine:	NP03165

Dose	Cmax (ng/mL)[a]		AUC24 (ng.h/mL)[a]	
(mg/kg)	M	F	M	F
2.8	212	206	nd	nd
5.6	1250	988	2340	1482
11	1310	2210	3740	5300
22	6980	6270	nd	nd

a: Emesis precluded accurate determination

2.6.7.5 単回投与毒性試験（続き）

Species/ strain	Method of administration (vehicle/ formulation)	Doses (mg/kg)	Gender and No. per group	Observed maximum nonlethal dose (mg/kg)	Observed minimum lethal dose (mg/kg) / incidence of death	Noteworthy findings	Report number
Dogs/beagle	Intravenous slow bolus; ~30 s (cephalic vein, 1mL/kg) (saline)	4.6, 9.3	1M 1F	9.3 9.3	>9.3 >9.3	- Changes in appearance and behavior: at ≥4.6 (dose-related): ataxia, stiffness, tremor; for F (9.3): howling, lateral decubitus, tonico-clonic convulsions, paresis - Marginal bodyweight loss (vs. pretest): -4 to -5% at 9.3 - Increased rectal temperature: at 9.3 (30 min and 1 h after dosing, max: 40.4°C, M) - Heart-rate reduction (at ≥4.6, dose-related, max 3 to 7 h after dosing); prolonged PR-interval (at ≥4.6, max 1 h after dosing) - No target organ pathology identified - Toxicokinetics of Ivabradine:	NP03143

Dose	C5min (ng/mL)[a]		AUC24 (ng.h/mL)	
(mg/kg)	M	F	M	F
4.6	4780	2770	7034	4124
9.3	5170	4710	11389	6306

a: Plasma concentrations measured 5 min after the end of injection

2.6.7.6 反復投与毒性試験：重要な試験以外の試験 被験物質：イバブラジン塩酸塩

Species/ strain	Method of administration (vehicle/ formulation)	Duration of dosing	Doses (mg/kg/d)	Gender and No. per group	NOAEL (mg/kg/d)	Noteworthy findings	Report number
Rats/ Sprague-Dawley	Gavage (water)	4 weeks	0, 14, 56, 223	10M/10F [+8M/8F for toxicokinetics]	Not defined	- Transient subdued behavior, closed eyes (223) - Decreased body weight gain, food consumption (223) - Increased water consumption (≥56) - Increase in calcium [≥14 (F), ≥56 (M)], triglycerides, glucose, BUN and ALP (223) - Heart-rate reduction (≥14) - Heart: focal myocardial lesions with interstitial fibrosis developing spontaneously in control animals and exacerbated by Ivabradine (≥14), increased heart weight [≥56 (F)] - Toxicokinetics of Ivabradine (Day 28, n=8/gender/dose):	NP03169

Dose (mg/kg/d)	Cmax (ng/mL)		AUC24 (ng.h/mL)	
	M	F	M	F
14	385	840	1362	4680
56	2325	2945	10594	20841
223	6080	23370	56408	116293

2.6.7.6 反復投与毒性試験：重要な試験以外の試験（続き）

Species/ strain	Method of administration (vehicle/ formulation)	Duration of dosing	Doses (mg/kg/d)	Gender and No. per group	NOAEL (mg/kg/d)	Noteworthy findings	Report number
Rats/ Sprague-Dawley	Gavage (water)	4 weeks	0, 2.8, 7	10M/10F [+4M/4F for toxicokinetics]	7	- No clinical signs - No treatment-related changes in body weight and food consumption - Decreased heart rate (≥2.8) - No treatment-related changes at macroscopic and histopathological examination - Toxicokinetics of Ivabradine (Day 28, n=4/gender/dose):	NP03144

Dose (mg/kg/d)	Cmax (ng/mL)		AUC24 (ng.h/mL)	
	M	F	M	F
2.8	42	171	226	741
7	179	346	515	2321

2.6.7.6 反復投与毒性試験：重要な試験以外の試験（続き）

Species/ strain	Method of administration (vehicle/ formulation)	Duration of dosing	Doses (mg/kg/d)	Gender and No. per group	NOAEL (mg/kg/d)	Noteworthy findings	Report number
Rats/ Sprague-Dawley	Intravenous slow bolus (tail vein, 6 mL/kg, 1 mL/min) (saline)	2 weeks	0, 9.3, 22, 37	5M/5F [+8M/8F for toxicokinetics]	Not defined	- Subdued behavior, closed eyes (≥9.3); mydriasis, difficult breathing, lacrimation (≥22); unsteady gait (37) - Increased water consumption [≥22 (M), ≥9.3 (F)] - Slight increase in serum calcium [≥22 (M), ≥9.3 (F)], glucose [37 (M), ≥9.3 (F)], cholesterol and triglycerides (37) - Slight increase in liver (37) and heart [37 (F)] weights - Toxicokinetics of Ivabradine (Day 14, n=4/gender/dose):	NP03166

Dose	C5min (ng/mL)[a]		AUC24 (ng.h/mL)	
(mg/kg)	M	F	M	F
9.3	3355	3710	2758	5073
22	9760	10130	10465	15096
37	15650	9795	15202	18545

a: Plasma concentrations measured 5 min after the end of injection

2.6.7.6 反復投与毒性試験：重要な試験以外の試験（続き）

Species/ strain	Method of administration (vehicle/ formulation)	Duration of dosing	Doses (mg/kg/d)	Gender and No. per group	NOAEL (mg/kg/d)	Noteworthy findings	Report number
Rats/Wistar	Gavage (water)	4 weeks	0, 30, 60, 90, 125 b.i.d.	5M/5F [+4M/4F for toxicokinetics]	Not defined	- Decreased spontaneous activity [≥90 b.i.d. (F), 125 b.i.d (M)], increased salivation [≥60 b.i.d. (F), ≥90 b.i.d (M)] - Increased water consumption [≥30 b.i.d. (F), ≥60 b.i.d. (M)] - Increased ALT [125 b.i.d. (F)] and liver weight [≥30 b.i.d. (F)] - Increasing trend of urinary sodium excretion [≥30 b.i.d. (F), ≥60 b.i.d. (M)] - Increasing trend of urinary potassium and increased urea excretion [125 b.i.d. (F)] - Increased number of lymphocyte [≥30 b.i.d (F)] and monocyte [125 b.i.d (F)] - Heart: increased heart weight (≥30 b.i.d.); cardiomegaly [≥90 b.i.d. (M), 90 b.i.d. (F)]; myocardial lesions [mononuclear cell aggregates, ≥60 b.i.d. (M)] - Adrenal: increased adrenal weight [≥90 b.i.d (F)] - Liver: increased liver weight [125 b.i.d (F)] - Toxicokinetics (Day 28, n=4/gender/dose):	NP08002

Dose (mg/kg/d)	Cmax,1 (ng/mL)		Cmax,2 (ng/mL)		AUC24 (ng.h/mL)	
	M	F	M	F	M	F
	Ivabradine					
2 x 30	995	1546	1467	1525	8076	13955
2 x 60	1853	3114	2269	4614	14621	33234
2 x 90	3600	3679	3267	7226	19829	62904
2 x 125	2873	8791	5213	9823	37839	83692
	ONO-IN-306					
2 x 30	57	38	109	20	567	250
2 x 60	204	68	182	87	1205	753
2 x 90	399	129	212	227	1633	2106
2 x 125	272	262	639	446	4450	3870

2.6.7.6 反復投与毒性試験：重要な試験以外の試験（続き）

Species/ strain	Method of administration (vehicle/ formulation)	Duration of dosing	Doses (mg/kg/d)	Gender and No. per group	NOAEL (mg/kg/d)	Noteworthy findings	Report number
Rats/ Wistar	Intravenous slow bolus (tail vein, 6 mL/kg, 1 mL/min) (saline)	4 weeks	2.3, 9.3, 37	10M/10F [+2M/4F for toxicokinetics]	2.3	- Transient subdued behavior (≥2.3), mydriasis, closed eyes, tremor and ventral decubitus position (37) - Decreased body weight gain (≥9.3), food consumption [≥9.3 (F), 37 (M)] - Increased water consumption (37) - Increased serum glucose (37) - Heart: microgranuloma and granuloma [37 (M)] - Immaturity of seminal vesicles [≥9.3 (M)] - Toxicokinetics of Ivabradine (Day 28, n=2 or 4/gender/dose, individual values for males):	NP05181

Dose (mg/kg/d)	C5min (ng/mL)[a]		AUCinf (ng.h/mL)[b]	
	M	F	M	F
2.3	826, 898	851	587, 599	848
9.3	4017, 3330	3522	2894, 2670	3815
37	19068[c]	13669	15717, 25288	17042

a: Plasma concentrations measured 5 min after the end of injection
b: AUC from 0 to infinity
c: Only one individual value because of analytical problem

2.6.7.6 反復投与毒性試験：重要な試験以外の試験（続き）

Species/ strain	Method of administration (vehicle/ formulation)	Duration of dosing	Doses (mg/kg/d)	Gender and No. per group	NOAEL (mg/kg/d)	Noteworthy findings	Report number
Rats/Wistar, Fischer, Sprague-Dawley[a]	Gavage (water)	4 weeks	0, 223	10M [+2 or 4M for toxicokinetics]	Not defined	- Reduced bodyweight gain (Wistar and Fischer) - Heart: increased heart weight (all strains); myocardial lesions (mononuclear cell aggregates) developing spontaneously in control and exacerbated by ivabradine, ranked by strains as follows (in the order of increasing incidence and severity): Wistar, Sprague-Dawley (Charles River), Fischer, Sprague-Dawley (Iffa Credo) - Total number of myocardial lesions by group	NP08000

	Control	Treated
Wistar	9	52
Sprague-Dawley (Charles River)	24	≥ 97
Sprague-Dawley (Iffa Credo)	25	≥ 239
Fischer	41	≥ 209

- Toxicokinetics of Ivabradine (Day 28, n=2/strain):

	AUC24 (ng.h/mL)
Wistar	27543
Sprague-Dawley (Charles River)	22483
Sprague-Dawley (Iffa Credo)	22020
Fischer	22812

a: 4 groups of rats and their respective controls were obtained from two different suppliers as follows: Wistar (Iffa Credo), Sprague-Dawley (Iffa Credo), Sprague-Dawley (Charles River) and Fischer (Charles River)

2.6.7.6 反復投与毒性試験：重要な試験以外の試験（続き）

Species/ strain	Method of administration (vehicle/ formulation)	Duration of dosing	Doses (mg/kg/d)	Gender and No. per group	NOAEL (mg/kg/d)	Noteworthy findings	Report number
Dogs/ beagle	Gavage (water)	12 weeks	5, 10, 20 b.i.d.	2M/2F [+2M/2F for 20 b.i.d]	Not defined	- Hind limb stiffness (10 b.i.d.); tremor and emesis (≥10 b.i.d.); hypertonia, abnormal posture and ataxia (20 b.i.d.) - Amelioration of overt signs at 20 b.i.d. from Day 9 - Heart-rate reduction and sinus arrest (≥5 b.i.d.); isolated AVBI (1M at 10 b.i.d., 1M at 20 b.i.d.) and AVBII (1F at 5 b.i.d., 1M at 20 b.i.d.); atrial extrasystoles (1M at 10 b.i.d., 1M+1F at 20 b.i.d.) - Toxicokinetics (Day79, n=2/gender/dose, individual values):	NP15094

Dose (mg/kg/d)	Cmax,1 (ng/mL)		Cmax,2 (ng/mL)		AUC24 (ng.h/mL)	
	M	F	M	F	M	F
	Ivabradine					
2 x 5	1028,1472	729,749	511,863	105,37	6815	1636
2 x 10	1724,1875	3686,1714	588,1524	930,706	7457	9054
2 x 20	4061,3006	2162,4220	3091,592	369,1451	19688	12602
	ONO-IN-306					
2 x 5	162,177	66,93	36,72	blq,blq	860	149
2 x 10	333,374	554,216	81,180	80,61	759	821
2 x 20	457,343	403,439	290,81	blq,189	3049	1596

2.6.7.6 反復投与毒性試験：重要な試験以外の試験（続き）

<table>
<tr><th>Species/ strain</th><th>Method of administration (vehicle/ formulation)</th><th>Duration of dosing</th><th>Doses (mg/kg/d)</th><th>Gender and No. per group</th><th>NOAEL (mg/kg/d)</th><th>Noteworthy findings</th><th>Report number</th></tr>
<tr><td>Dogs/beagle</td><td>Intravenous slow bolus (cephalic vein, 1 mL/kg) (saline)</td><td>2 weeks</td><td>4.6, 7</td><td>1M/1F</td><td>Not defined</td><td>- Transient and moderate tremor (≥4.6), hypertonia and gait abnormalities (7)
- Heart-rate reduction (≥4.6)
- No target organ pathology identified
- Toxicokinetics of Ivabradine (Day 14):
<table><tr><th rowspan="2">Dose (mg/kg)</th><th colspan="2">C5min (ng/mL)[a]</th><th colspan="2">AUC24 (ng.h/mL)</th></tr><tr><th>M</th><th>F</th><th>M</th><th>F</th></tr><tr><td>4.6</td><td>4000</td><td>3330</td><td>5002</td><td>3144</td></tr><tr><td>7</td><td>3230</td><td>3210</td><td>5252</td><td>3536</td></tr></table></td><td>NP15093</td></tr>
<tr><td>Dogs/beagle</td><td>Intravenous slow bolus (saphenous vein, 1 mL/kg) (saline)</td><td>4 weeks</td><td>1.9, 3.7, 7.4</td><td>3M/3F</td><td>1.9</td><td>- Tremor, generalized stiffness, arched back and/or increased polygon of equilibrium [occasional; 1.9 (M), frequent; ≥3.7]
- Barking, growling or biting of the cage [1.9 (M), 7.4]
- Head nodding or pedaling movements [occasional; 3.7 (M)]
- Heart-rate reduction (≥1.9)
- Sinoatrial block [≥3.7 (F),7.4 (M)], atrial premature complexes (7.4), sinus bradycardia [7.4 (F)]
- No target organ pathology identified
- Toxicokinetics of Ivabradine (Day 28, n=3/gender/dose):
<table><tr><th rowspan="2">Dose (mg/kg/d)</th><th colspan="2">C5min (ng/mL)[a]</th><th colspan="2">AUC24 (ng.h/mL)</th></tr><tr><th>M</th><th>F</th><th>M</th><th>F</th></tr><tr><td>1.9</td><td>1773</td><td>1930</td><td>2108</td><td>1856</td></tr><tr><td>3.7</td><td>3550</td><td>4060</td><td>4777</td><td>5191</td></tr><tr><td>7.4</td><td>5217</td><td>4853</td><td>8635</td><td>8083</td></tr></table></td><td>NP05108</td></tr>
</table>

a: Plasma concentrations measured 5 min after the end of injection

2.6.7.6 反復投与毒性試験：重要な試験以外の試験（続き）

<table>
<tr><th>Species/ strain</th><th>Method of administration (vehicle/ formulation)</th><th>Duration of dosing</th><th>Doses (mg/kg/d)</th><th>Gender and No. per group</th><th>NOAEL (mg/kg/d)</th><th>Noteworthy findings</th><th>Report number</th></tr>
<tr><td>Dogs/beagle</td><td>Intravenous continuous infusion; 24h/24 (external jugular vein, 1 mL/kg/h) (glucose)</td><td>Dose escalation (16 days in total)</td><td>6, 12, 24, 48, 70, 100[a]</td><td>1M/1F</td><td>Not defined[b]</td><td>- Decreased activity, loss of balance, tremor, tonic convulsions, and lateral decubitus (100) resulting in unscheduled kill of both dogs after 24 h of infusion
- Decreased food consumption and bodyweight loss (≥70)
- Heart-rate reduction [≤70 (M), ≤48 (F)], isolated AVBII (F at 12) and occasional sinus arrests (M at 70 and F at 12, 24 or 48)
- Slight increase in serum cholesterol (end of dosing period)
- No target organ pathology identified
- Toxicokinetics of Ivabradine:
-
<table>
<tr><th>Dose</th><th colspan="2">Css (ng/mL)[c]</th><th colspan="2">AUC24 (ng.h/mL)</th></tr>
<tr><th>(mg/kg)</th><th>M</th><th>F</th><th>M</th><th>F</th></tr>
<tr><td>6</td><td>207</td><td>186</td><td>5000</td><td>4500</td></tr>
<tr><td>12</td><td>593</td><td>591</td><td>14000</td><td>14000</td></tr>
<tr><td>24</td><td>1197</td><td>1186</td><td>29000</td><td>28000</td></tr>
<tr><td>48</td><td>2216</td><td>2284</td><td>53000</td><td>55000</td></tr>
<tr><td>70</td><td>2994</td><td>3345</td><td>72000</td><td>80000</td></tr>
<tr><td>100</td><td>3397</td><td>8553</td><td>82000</td><td>205000</td></tr>
</table>
</td><td>NP05349</td></tr>
<tr><td></td><td></td><td>2 weeks</td><td>50</td><td>1M/1F</td><td></td><td>- Isolated sinus arrest (F)
- -Slight increase in serum cholesterol (end of dosing period)</td><td></td></tr>
</table>

a: Each dose was administered for 1 to 3 days (in increasing order)
b: Maximal Tolerated Dose set between 50 and 70 mg/kg/d
c: Observed maximum plasma concentration at steady state

2.6.7.6 反復投与毒性試験：重要な試験以外の試験（続き）

Species/ strain	Method of administration (vehicle/ formulation)	Duration of dosing	Doses (mg/kg/d)	Gender and No. per group	NOAEL (mg/kg/d)	Noteworthy findings	Report number
Dogs/ Beagle	Intravenous continuous infusion; 24h/24 (external jugular vein, 1 mL/kg/h) (glucose)	4 weeks	3, 15, 70	3M/3F	3	- Slight decrease in body weight gain (70) - Bradycardia (≥3), sinoatrial block (70) and sinus arrest [70 (F)] - Toxicokinetics (Day 28, n=3/gender/dose):	NP05514

Dose (mg/kg/d)	Css (ng/mL)[a]		AUC24 (ng.h/mL)	
	M	F	M	F
	Ivabradine			
3	85	72	2100	1700
15	1108	857	27000	21000
70	4575	2692	110000	65000
	OMO-IN-306			
3	2.6	1.7	61	41
15	76	43	1800	1000
70	633	374	15000	8900

a: Plasma concentration at steady state

2.6.7.7 反復投与毒性試験：重要な試験

2.6.7.7A ラットにおける経口投与による4週間反復投与毒性試験

被験物質：イバブラジン塩酸塩

Report Title: S 16257-2: subacute toxicity study four-week oral (gavage) administration in the Wistar rat
Test Article: Ivabradine hydrochloride
Species/Strain: Rats / Wistar
Duration of treatment: 4 weeks
Report No.: NP05320
Initial Age: 8 weeks
Duration of Post-Dose: None
Location in CTD: 4.2.3.2-12
Date of first dose: [redacted]-19[redacted]
Method of Administration: Gavage (10 mL/kg)
GLP compliance: Yes
Vehicle/formulation: Demineralised water / solution

Special features: - Toxicokinetics on Day 1 and Day 28 (sampling 10 min, 1, 6 and 24 h after dosing).
- Doses expressed as salt in the study report (correction factor: 0.928).

NOAEL: 6.5 mg/kg/d (M) / 19 mg/kg/d (F)

Daily dose (mg/kg)	**0 (vehicle)**		**6.5**		**19**		**58**		**175**	
Number of animals (main groups)	M:10	F:10	M:10	F:10	M:10	F:10	M:10	F:10	M:10	F:10
Number of animals (satellite TK groups)	M:0	F:0	M:2	F:2	M:2	F:2	M:2	F:2	M:2	F:2
Toxicokinetics (Ivabradine – on Day 1)[a]										
Cmax (ng/mL) [tmax: 10 min or 1 h]			83	546	636	1234	1231	2027	4435	3928
AUC24 (ng.h/mL)			229	1402	1004	4661	3501	10019	11027	33059
Toxicokinetics (Ivabradine – on Day 28)[a]										
Cmax (ng/mL) [tmax: 10 min]			148	414	559	1009	1816	2979	4501	6440
AUC24 (ng.h/mL)			396	2579	1370	5263	4391	17093	18016	50215
Noteworthy findings										
Died or sacrificed moribund	0	1[b]	0	0	0	0	0	0	1[c]	0
Bodyweight	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Food consumption (%)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Water consumption (%)[b] – Increase from 2nd week	30.6 g/d	29.7 g/d	+7*	-7.2	+12	+32*	+14*	+10	+29**	+28**
Clinical observations:										
Reduced spontaneous activity (immediately after dosing, first two weeks of dosing)	-	-	-	-	-	-	+	+	+	++
Increased salivation (immediately after dosing, whole dosing period)	-	-	-	-	+	+	++	++	+++	+++

a: Mean values not specified in study report and calculated from individual data
b: Accidental deaths, during or following blood sampling (therefore unrelated to Ivabradine Hydrochloride administration)
c: At the end of dosing period
+: Mild, ++: Moderate, +++: Marked (incidence)
*For controls, group means (water consumption) are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown. Statistical significance is based on individual variations from pretest: *: $p<0.05$, **: $p<0.01$ (Dunnett's test vs. controls).*

2.6.7.7A　　ラットにおける経口投与による4週間反復投与毒性試験　　試験番号：NP05320（続き）

Daily dose (mg/kg)	0 (vehicle)		6.5		19		58		175	
Number of animals (main groups)	M:10	F:10	M:10	F:10	M:10	F:10	M:10	F:10	M:10	F:10
Noteworthy findings (Cont'd)										
Ophthalmoscopy	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hematology[a]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Blood biochemistry[a]										
Total cholesterol (mmol/l)	-	0.828	-	1.103*	-	0.958	-	1.063**	-	1.034
Urinalysis[a]										
Volume (mL/24 h) [not statistically significant]	18.97	15.50	31.97	21.98	29.34	29.11	25.42	22.96	27.49	25.25
Sodium excretion (mmol/24 h)	0.394	0.276	0.635*	0.314	0.629*	0.291	0.760**	0.335	0.812**	0.507**
Organ weights (%)[b]										
Number examined	10	9	10	10	10	10	10	10	9	10
Heart Absolute	0.940 g	0.663 g	+4	+4	+13**	+16**	+13**	+21**	+19**	+30**
Relative to bodyweight	0.271%	0.302%	-0.4	+7*	+1.5	+10**	+7*	+18**	+21**	+29**
Gross pathology										
Number examined	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Cardiomegaly	0	0	0	0	2	0	2	0	7	2
Histopathology										
Number examined	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Heart lesions:										
Animals without heart lesions	2	8	4	8	1	6	3	5	0	2
Animals with one microgranuloma (<0.05 mm^2)	5	2	4	2	4	3	2	4	2	3
Animals with >1 microgranuloma (<0.05 mm^2)	1	0	2	0	0	1	4	1	4	4
Animals with granulomas (≥0.05 mm^2)	2	0	0	0	5	0	2	0	4	1

a: At the end of dosing period
b: For controls, group means are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown.
Statistical significance is based on actual data, not on percent differences (organ weights) or on individual variations from pretest (blood biochemistry, urinalysis).
**: p<0.05, **: p<0.01 (Dunnett's test vs. controls).*

2.6.7.7B　　ラットにおける経口投与による 13 週間反復投与毒性試験　　被験物質：イバブラジン塩酸塩

Report Title: S 16257-2: subacute toxicity study thirteen-week oral (gavage) administration in the Wistar rat
Test Article: Ivabradine hydrochloride
Species/Strain: Rats / Wistar
Duration of treatment: 13 weeks
Report No.: NP05319
Initial Age: 6 weeks
Duration of Post-Dose: 6 weeks
Location in CTD: 4.2.3.2-13
Date of first dose: [redacted]-19[redacted]
Method of Administration: Gavage (10 mL/kg)
GLP compliance: Yes
Vehicle/formulation: Demineralized water / solution

Special features: - Toxicokinetics on Day 28 and Day 88 (sampling 10 min, 1, 6 and 24 h after dosing).

NOAEL: 7 mg/kg/d

Daily dose (mg/kg)	**0 (vehicle)**		**7**		**35**		**175**	
Number of animals (main groups)[a]	M: 15	F: 15	M: 15	F: 15	M: 15	F: 15	M: 15	F: 15
Number of animals (satellite TK groups)	M: 0	F: 0	M: 2	F: 2	M: 2	F: 2	M: 2	F: 2
Toxicokinetics (on Day 88 – no time-effect)[b]								
Ivabradine								
Cmax (ng/mL) [tmax: 10 min]			376	464	1111	1458	4479	8087
AUC24h (ng·h/mL)			640	1750	2650	9850	16000	46000
ONO-IN-306								
Cmax (ng/mL) [tmax: 10 min or 1 h]			21	12	86	36	462	166
AUC24h (ng·h/mL)			20	17	149	143	1588	977

a: Including 5 rats/gender/dose killed at the end of a 6-week recovery period
b: Mean values not specified in study report and calculated from individual data

2.6.7.7B ラットにおける経口投与による 13 週間反復投与毒性試験 試験番号：NP05319（続き）

Daily dose (mg/kg)	**0 (vehicle)**		**7**		**35**		**175**	
Number of animals (main groups)	M: 15	F: 15	M: 15	F: 15	M: 15	F: 15	M: 15	F: 15
Noteworthy findings								
Died or sacrificed moribund[a]	2	1	1	0	0	0	3	0
Bodyweight (%)[b]	468.9 g	-	-3.1	-	+1.1	-	-10	-
Bodyweight gain (%)[b]	213.5 g	-	-5.9	-	+7.0	-	-20**	-
Food consumption (%)[b]	25.8 g/d	19.0 g/d	-2.6	-1.7	+1.3	-1.8	-9.3	-11
Water consumption (%)[b]	29.9 g/d	27.4 g/d	+21	+16	+27*	+19	+36**	+54**
Clinical observations								
Increased salivation (after dosing up to the day after, dose-related frequency, females more affected than males)	-	-	-	+	+	++	++	+++
Reduced spontaneous locomotor activity (after dosing, first week of dosing)	-	-	-	-	-	-	++	++
Ophthalmoscopy[b]	-	-	np	np	np	np	-	-
Hematology[b, c]								
White blood cell count (G/l)	-	4.66	-	4.47	-	5.15	-	5.91**
Neutrophils (G/l)	-	0.73	-	0.73	-	0.92	-	1.08*
Blood biochemistry[b]								
ALT (U/l)[c]	-	18.6	-	24.4	-	24.3**	-	26.1**
Glucose (mmol/l)	-	6.13	-	5.95	-	5.82	-	5.71
Total cholesterol (mmol/l)	-	1.07	-	1.14**	-	1.26**	-	1.28**
Triglycerides (mmol/l)	-	0.42	-	0.47	-	0.53	-	0.63**
Urea (mmol/l)	-	6.28	-	7.57	-	7.81	-	8.51
Urinalysis[b]								
Urinary volume (mL/24 h)	-	-	-	-	-	-	-	-
Sodium excretion (mmol/24 h)	0.28	0.14	0.32	0.23	0.38	0.25	0.51	0.50**

a: Accidental deaths, during or following blood sampling (therefore unrelated to Ivabradine Hydrochloride administration)
b: At the end of dosing period
c: Dunnett's test on marginal means
+: Mild ++: Moderate +++: Marked
For bodyweight, bodyweight gain, food and water consumption: group means are shown for controls. For treated groups, percent differences from controls are shown.
*Statistical significance is based on actual data (not on percent differences), i.e. individual variations from pretest: *: $p<0.05$, **: $p<0.01$ (Dunnett's test vs. controls).*

2.6.7.7B　　ラットにおける経口投与による 13 週間反復投与毒性試験　　試験番号：NP05319（続き）

Daily dose (mg/kg)		**0 (vehicle)**		**7**		**35**		**175**	
Number of animals (main groups)		M: 15	F: 15	M: 15	F: 15	M: 15	F: 15	M: 15	F: 15
Noteworthy findings (Cont'd)									
Organ weights (%)[a]									
Number examined		8	9	9	10	10	10	9	10
Heart	Absolute	1.05 g	0.72 g	+2.6	+5.8	+10	+20**	+23**	+33**
	Relative to bodyweight	0.23%	0.29%	+7.0	+5.2	+11**	+13**	+40**	+34**
Adrenal glands	Absolute	-	0.0847 g	-	+0.5		-8.7	-	+12
	Relative to bodyweight	-	0.0338%	-	-0.3		-14	-	+14
Gross pathology[a]									
Number examined[b]		10	10	10	10	10	10	10	10
Cardiomegaly		0	0	2	0	6	4	9	8
Histopathology[a]									
Number examined[b]		10	10	10	10	10	10	10	10
Heart lesions:									
Animals without heart lesions		1	8	4	6	1	2	0	1
Animals with one microgranuloma (<0.05 mm^2)		8	1	3	3	5	3	0	2
Animals with ≥2 microgranulomas (<0.05 mm^2)		1	1	3	0	4	4	10	7
Animals with one granuloma (>0.05 and <0.20 mm^2)		0	0	1	1	4	1	4	2
Animals with ≥2 granulomas (>0.05 and <0.20 mm^2)		0	0	0	0	1	1	2	2
Animals with granulomas (>0.20 and <0.50 mm^2)		0	0	0	0	0	2	0	1
Animals with fibrosis (focal, mild to moderate)		0	0	1	0	2	0	7	4
Glandular stomach, erosions and / or ulcerations		0	0	1	0	0	0	3	2

a: At the end of the dosing period
b: Including animals found dead or killed during the study
For organ weights: group means (for controls) and percent difference from controls (for treated groups) are shown.
*Statistical significance is based on actual data (not on percent differences). **: p<0.01 (Dunnett's test vs. controls).*

2.6.7.7B　　ラットにおける経口投与による 13 週間反復投与毒性試験　　試験番号：NP05319（続き）

Daily dose (mg/kg)	**0 (vehicle)**		**7**		**35**		**175**	
Number of animals (main groups)	M: 15	F: 15	M: 15	F: 15	M: 15	F: 15	M: 15	F: 15
Postdose evaluation (Noteworthy findings)								
Number evaluated	5	5	5	5	5	5	4	5
Bodyweight (%)[a]	499 g	-	-4.4	-	+2.3	-	-7.9	-
Water consumption (%)[a]	27.9 g/d	-	+1.9	-	+41	-	+30	-
Blood biochemistry[a]								
Glucose (mmol/l)	-	7.23	-	6.42**	-	6.19*	-	5.83**
Urea (mmol/l)	-	7.09	-	8.25	-	8.32	-	8.57
Urinalysis[a]								
Sodium excretion (mmol/24 h)	0.10	0.20	0.08	0.21	0.19	0.08	0.31	0.29
Organ weights (%)[a]								
Number examined	5	5	5	5	5	5	3	5
Heart　Absolute	1.11 g	0.75 g	-0.3	+0.3	+2.5	-0.6	+1.8	+7.0
Relative to bodyweight	0.23%	0.28%	+5.2	+2.9	+1.7	-1.4	+11	+16*
Gross pathology								
Number examined	5	5	5	5	5	5	4	5
Cardiomegaly	0	0	2	0	2	0	3	0
Histopathology								
Number examined	5	5	5	5	5	5	4	5
Heart lesions:								
Animals without heart lesions	1	4	3	2	2	2	0	2
Animals with one microgranuloma (<0.05 mm^2)	1	1	1	2	1	0	3	3
Animals with ≥2 microgranulomas (<0.05 mm^2)	3	0	1	1	2	1	1	0
Animals with one granuloma (>0.05 and <0.20 mm^2)	1	0	0	0	0	2	0	0
Animals with ≥2 granulomas (>0.05 and <0.20 mm^2)	0	0	0	0	0	0	0	0
Animals with fibrosis (focal, mild to moderate)	2	0	0	0	0	1	3	2
Animals with fibrous scars	1	0	nd	nd	nd	nd	1	0
Glandular stomach, erosions and / or ulcerations	0	0	0	1	0	1	0	0

a: At the end of recovery period

*For bodyweight, water consumption and organ weights: group means are shown for controls, percent differences from controls are shown for treated groups. Statistical significance is based on individual variations from pretest. *: p<0.05, **: p<0.01 (Dunnett's test vs. controls).*

2.6.7.7C　　ラットにおける経口投与による 26 週間反復投与毒性試験　　被験物質：イバブラジン塩酸塩

Report Title: S 16257-2: chronic toxicity study twenty-six week oral (gavage) administration in the Wistar rat
Test Article: Ivabradine hydrochloride
Species/Strain: Rats / Wistar
Duration of treatment: 26 weeks
Report No.: NP06240
Initial Age: 8 weeks
Duration of Post-Dose: 6 weeks
Location in CTD: 4.2.3.2-14
Date of first dose: [redacted]-19[redacted]
Method of Administration: Gavage (10 mL/kg)
GLP compliance: Yes
Vehicle/formulation: Demineralized water / solution

Special features:
- Toxicokinetics on Days 27, 90 and 183 (sampling 10 min, 2 and 7 h after the 1st daily dosing, then 10 min, 1 and 17 h after the 2nd daily dosing).
- 7-hour daily dosing interval
- Liver samples at necropsy for determination of hepatic S 16257 concentration. Transmission electronic microscopy (TEM) of liver (selected control and high dose group animals)

NOAEL: 2 x 3 mg/kg/d

Daily dose (mg/kg)	**2 x 0 (vehicle)**		**2 x 3**		**2 x 16**		**2 x 90**	
Number of animals (main groups)[a]	M: 20	F: 20	M: 20	F: 20	M: 20	F: 20	M: 20	F: 20
Number of animals (satellite TK groups)	M: 0	F: 0	M: 4	F: 4	M: 4	F: 4	M: 4	F: 4
Toxicokinetics (on Day 183 – no time-effect)								
Ivabradine								
Cmax,1 (ng/mL) (tmax,1: 10 min)			152	373	1188	1363	5361	8179
Cmax,2 (ng/mL) (tmax,2: 10 min)			96	231	1237	1491	10198	5919
AUC24 (ng.h/mL)			nd	1648	4621	10817	32867	62216
ONO-IN-306								
Cmax,1 (ng/mL) (tmax,1: 10 min)			14[b]	6.3[b]	86	28	492	317
Cmax,2 (ng/mL) (tmax,2: 10 min)			5.7	3.5[b]	94	31	703	196
AUC24 (ng.h/mL)			nd	nd	nd	nd	2356	2392
Mean liver concentrations (ng/g) 15 h after the last dosing with Ivabradine Hydrochloride (*liver to plasma ratio*)								
Ivabradine			np	np	np	np	4217 (*20*)	10926 (*24*)
ONO-IN-306			np	np	np	np	602 (*34*)	897 (*55*)

a: Including 5 rats/gender/dose killed at the end of a 6-week recovery period
b: Measured in one sample

2.6.7.7C　　ラットにおける経口投与による 26 週間反復投与毒性試験　　試験番号：NP06240（続き）

Daily dose (mg/kg)	**2 x 0 (vehicle)**		**2 x 3**		**2 x 16**		**2 x 90**	
Number of animals (main groups)	M: 20	F: 20	M: 20	F: 20	M: 20	F: 20	M: 20	F: 20
Noteworthy findings								
Died or sacrificed moribund	0	0	0	1[b]	0	0	0	0
Bodyweight[a]	-	-	-	-	-	-	-	-
Food consumption[a]	-	-	-	-	-	-	-	-
Water consumption (%)[a]	24.2 g/d	22.3 g/d	-6.6	+30*	+6.5	+31*	+25*	+51**
Clinical observations:								
Increased salivation (broadly after dosing, and from Week 2 on)	-	-	-	+	++	++	+++	+++
Partial blepharoptosis (broadly after dosing, Week 1 at ≥2 x 16 mg/kg and from Week 6/7 at 2 x 90 mg/kg)	-	-	-	-	+	+	++	+++
Piloerection (Week 1: after dosing, and Week 6 through Week 26: before and after dosing)	-	-	-	-	-	-	+	+++
Ophthalmoscopy[a]	-	-	-	-	-	-	-	-
Hematology[a]	-	-	-	-	-	-	-	-
Blood biochemistry[a]	-	-	-	-	-	-	-	-
ANP (ng/L)[c]	485	425	513	527	341	634	789**	1493**
Urinalysis[a]								
Urinary volume (mL/24 h)	-	12.0	-	14.9	-	13.8	-	17.5
Sodium excretion (mmol/24 h)	-	0.171	-	0.255	-	0.230	-	0.427**

a: At the end of dosing period
b: Death following blood sampling (therefore unrelated to Ivabradine Hydrochloride administration)
For water consumption: group means are shown for controls, and percent differences from controls are shown for treated groups. c: Dunnett's test on marginal means
+: Mild, ++: Moderate, +++: Marked
*Statistical significance is based on individual variations from pretest: *: p<0.05, **: p<0.01 (Dunnett's test vs. controls).*
.

2.6.7.7C　　ラットにおける経口投与による 26 週間反復投与毒性試験　　試験番号：NP06240（続き）

Daily dose (mg/kg)		**2 x 0 (vehicle)**		**2 x 3**		**2 x 16**		**2 x 90**	
Number of animals (main groups)		M: 20	F: 20	M: 20	F: 20	M: 20	F: 20	M: 20	F: 20
Noteworthy findings (Cont'd)									
Organ weights (%)[a]									
Number examined		15	15	15	15	15	15	15	15
Heart	Absolute	1.126 g	0.752 g	-2.4	+5.0	+5.9	+19**	+28**	+41**
	Relative to bodyweight	0.223%	0.284%	+2.2	+5.3	+13**	+14**	+33**	+42**
Liver	Absolute	-	6.571 g	-	+2.5	-	+10*	-	+15**
	Relative to bodyweight	2.34%	2.49%	+1.3	+2.0	+6.4*	+5.6*	+8.1**	+15**
Adrenal glands	Absolute	-	0.075 g	-	+2.3	-	+7.9	-	+20**
	Relative to bodyweight	-	0.028%	-	+2.1	-	+3.2	-	+20**
Gross pathology									
Number examined		15	15	15	15	15	15	15	15
Heart, enlarged or dilated appearance		0	0	0	0	0	0	1	2
Glandular stomach, erosions		0	1	2	0	4	3	8	6
Histopathology									
Number examined		15	15	15	15	15	15	15	15
Heart lesions:									
Animals without heart lesions		11	14	10	13	3	6	0	2
Animals with one microgranuloma (<0.05 mm^2)		1	0	2	2	7	7	2	3
Animals with ≥2 microgranulomas (<0.05 mm^2)		3	1	3	0	5	2	13	9
Animals with granulomas (>0.05 and <0.20 mm^2)		0	0	1	0	1	0	9	1
Animals with granulomas (>0.20 and <0.50 mm^2)		0	0	0	0	0	0	0	0
Animals with granulomas (>0.50 mm^2)		0	0	0	0	1	0	0	0
Animals with interstitial fibrosis		0	0	1	0	0	1	5	1
Animals with chondroid metaplasia (left ventricle, endocardial pillars)		0	0	0	0	0	0	5	2
Glandular stomach, erosions		0	1	1	0	2	2	8	5
Liver (TEM on selected animals)		nd	-	nd	nd	nd	nd	nd	-

a: At the end of recovery period
For bodyweight, water consumption and organ weights: group means are shown for controls, percent differences from controls are shown for treated groups.
*Statistical significance is based on individual variations from pretest. *: p<0.05, **: p<0.01 (Dunnett's test vs. controls).*

2.6.7.7C　　ラットにおける経口投与による 26 週間反復投与毒性試験　　試験番号：NP06240（続き）

Daily dose (mg/kg)	**2 x 0 (vehicle)**		**2 x 3**		**2 x 16**		**2 x 90**	
Number of animals (main groups)	M: 20	F: 20	M: 20	F: 20	M: 20	F: 20	M: 20	F: 20
Postdose evaluation (Noteworthy findings)								
Number examined	5	5	5	4	5	5	5	5
Blood biochemistry[a]								
ANP (ng/L)[b]	472	318	366	245	468	214	590	810**
Urinalysis[a]								
Urinary volume (mL/24 h)	-	15.0	-	24.2	-	12.2	-	21.4
Sodium excretion (mmol/24 h)	-	0.232	-	0.540	-	0.408	-	0.404
Organ weights (%)[a]								
Heart Absolute	-	-	-	-	-	-	-	-
Relative to bodyweight	-	0.276%	-	-5.8	-	+13**	-	+15**
Liver	-	-	-	-	-	-	-	-
Adrenal glands	-	-	-	-	-	-	-	-
Gross pathology								
Number examined	5	5	5	5	5	5	5	5
Glandular stomach, erosion	0	0	0	0	1	0	0	0
Histopathology								
Number examined	5	5	5	5	5	5	5	5
Heart lesions:								
Animals without heart lesions	2	3	1	5	1	2	5	2
Animals with one microgranuloma (<0.05 mm^2)	1	1	2	0	3	3	0	2
Animals with ≥2 microgranulomas (<0.05 mm^2)	1	1	2	0	1	0	0	0
Animals with granulomas (>0.05 and <0.20 mm^2)	1	0	0	0	0	0	0	1
Animals with granulomas (>0.20 and <0.50 mm^2)	0	0	0	0	0	0	0	0
Animals with granulomas (>0.50 mm^2)	0	0	0	0	0	0	0	0
Animals with interstitial fibrosis	0	0	0	0	1	0	1	0
Animals with chondroid metaplasia (left ventricle, endocardial pillars)	0	0	0	0	0	0	0	0

a: At the end of recovery period
b: Dunnett's test on marginal means
For controls, group means (organ weights) are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown.
*Statistical significance is based on actual data (not on percent differences): **: p<0.01 (Dunnett's test vs. controls).*

2.6.7.7D　　ラットにおける経口投与による 52 週間反復投与毒性試験　　被験物質：イバブラジン塩酸塩

Report Title: S 16257-02: Fifty-two week oral (gavage) toxicity study in the rat
Test Article: Ivabradine hydrochloride
Species/Strain: Rats / Wistar
Duration of treatment: 52 weeks
Report No.: NP07026
Initial Age: 6 weeks
Duration of Post-Dose: None
Location in CTD: 4.2.3.2-15
Date of first dose: [redacted]
Method of Administration: Gavage (5 mL/kg)
GLP compliance: Yes
Vehicle/formulation: Water for injection / solution

Special features: - Toxicokinetics in Weeks 4, 26 and 52 (sampling 10 min, 2 and 7 h after first daily dosing and between 9 and 13 min and 17 h after second daily dosing)
- 7-hour daily dosing interval

NOAEL: 2 x 3 mg/kg/d (M) / <2 x 3 mg/kg/d (F)

Daily dose (mg/kg)	**2 x 0 (vehicle)**		**2 x 3**		**2 x 16**		**2 x 90**	
Number of animals (main groups)	M: 40	F: 40	M: 40	F: 40	M: 40	F: 40	M: 40	F: 40
Number of animals (TK evaluation) [a]	M: 6	F: 6	M: 6	F: 6	M: 6	F: 6	M: 6	F: 6
Toxicokinetics (in Week 52)								
Ivabradine								
Cmax,1 (ng/mL) (tmax,1: 12 min)			78	199	390	808	4793	6024
Cmax,2 (ng/mL) (tmax,2: 12 min)			94	226	452	904	5456	6699
AUC24 (ng.h/mL)			935	2386	4384	12426	64479	88276
ONO-IN-306								
Cmax,1 (ng/mL) (tmax,1: 10 min or 2 h)			nd	nd	nd	nd	786	158
Cmax,2 (ng/mL) (tmax,2: 10 min)			nd	nd	nd	nd	868	280
AUC24 (ng.h/mL)			nd	nd	nd	nd	8608	2632

nd: Not determined due to plasma levels below the limit of quantitation
a: TK evaluation was performed in the animals in the main groups

2.6.7.7D　　ラットにおける経口投与による 52 週間反復投与毒性試験　　試験番号：NP07026（続き）

Daily dose (mg/kg)		**2 x 0 (vehicle)**		**2 x 3**		**2 x 16**		**2 x 90**	
Number of animals (main groups)		M: 40	F: 40	M: 40	F: 40	M: 40	F: 40	M: 40	F: 40
Noteworthy findings									
Died or sacrificed moribund		1	1[b]	2[c]	1[d], 2[e]	1[f]	1[e]	8[f]	16[f]
Bodyweight (%)[a]		631.9 g	384.6 g	+0.6	-0.6	+3.4	+1.6	-11***	-13***
Bodyweight gain (%)[a]		439.0 g	233.9 g	+1.1	-1.6	+4.8	+2.4	-16***	-21***
Food consumption (%) - (Week 1 only)		-	20 g/d	-	0	-	0	-	-15***
Clinical observations:									
Increased salivation (from Week 2)		-	-	+	+	++	++	+++	+++
Hematology[a]		-	-	-	-	-	-	-	-
Blood biochemistry									
Alkaline phosphatase (IU/l)	Week 26	134	57	164	68	147	80*	186***	123***
	Week 52	137	57	148	57	152	63	169	97**
Calcium (mg/l)	Week 52	-	102	-	105	-	104	-	107*

a: At the end of dosing period
b: Killed moribund (ulcerated mass on glandular stomach at necropsy)
c: Death related to lymphoma or pancreatic adenocarcinoma
d: Killed moribund (pituitary adenoma at necropsy)
e: Death related to ether anesthesia/blood sampling
f: Death related to cardiac lesions
+: Mild, ++: Moderate, +++: Marked
For controls, group means (bodyweight, food consumption) are shown, and percent differences from controls are shown for treated groups.
*Statistical significance is based on actual data (not on percent differences): *: p<0.05, **: p<0.01, ***: p<0.001 (Dunnett's test vs. controls).*

2.6.7.7D ラットにおける経口投与による 52 週間反復投与毒性試験 試験番号：NP07026（続き）

Daily dose (mg/kg)		**2 x 0 (vehicle)**		**2 x 3**		**2 x 16**		**2 x 90**	
Number of animals (main groups)		M: 40	F: 40	M: 40	F: 40	M: 40	F: 40	M: 40	F: 40
Noteworthy findings (Cont'd)									
Organ weights (%)[a]									
Number examined		39	39	38	37	39	39	32	24
Heart	Absolute	1.35 g	1.00 g	+5.2*	+9.0**	+19**	+29**	+47**	+86**
	Relative to bodyweight	0.225%	0.273%	+3.6	+9.9**	+13**	+27**	+64**	+116**
Liver	Absolute	14.6 g	9.4 g	+3.4	+4.3	+15**	+8.5*	+2.7	+5.3
	Relative to bodyweight	2.42%	2.55%	+2.5	+5.5	+9.9**	+7.8**	+15**	+24**
Adrenal glands	Absolute	0.073 g	0.081 g	-4.1	+7.4	+12**	+7.4	+16**	+27**
	Relative to bodyweight	0.012%	0.022%	-3.3	+6.3	+8.3**	+5.4	+31**	+46**
Gross pathology									
Unscheduled deaths									
Number examined		1	1	2	3	1	1	8	16
Heart:									
Enlarged		0	0	0	0	0	0	5	12
Pale areas		0	0	0	0	0	0	5	6
Raised areas		0	0	0	0	0	0	0	3
Soft		0	0	0	0	0	0	0	1
Scheduled deaths									
Number examined		39	39	38	37	39	39	32	24
Heart:									
Enlarged		1	0	3	0	4	0	23	15
Pallor or pale areas		0	0	0	0	1	0	0	3
Dark discoloration or dark areas		1	1	0	0	0	3	3	11
Mass		0	0	0	0	0	0	1	0

a: At the end of dosing period
For controls, group means (organ weights) are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown.
*Statistical significance is based on actual data (not on percent differences): *: p<0.05, **: p<0.01 (Dunnett's test vs. controls).*

2.6.7.7D　　ラットにおける経口投与による 52 週間反復投与毒性試験　　試験番号：NP07026（続き）

Daily dose (mg/kg)	**2 x 0 (vehicle)**		**2 x 3**		**2 x 16**		**2 x 90**	
Number of animals (main groups)	M: 40	F: 40	M: 40	F: 40	M: 40	F: 40	M: 40	F: 40
Noteworthy findings (Cont'd)								
Histopathology								
Number Examined (unscheduled and scheduled deaths considered together since changes were similar)	40	40	40	40	40	40	40	40
Heart lesions:								
Changes in chordae tendineae (mucification, cartilaginous and / or osseous metaplasia)	0	0	0	0	9	6	30	37
Left ventricular degeneration and/or necrosis	3	2	3	0	1	0	38	38
Minimal-slight	3	2	3	0	1	0	10	16
Moderate-marked	0	0	0	0	0	0	28	22
Left ventricular fibrosis	21	3	29	17	38	37	37	30
Minimal-slight	20	3	25	16	17	24	12	15
Moderate-marked	1	0	4	1	21	13	25	15
Right ventricular fibrosis, degeneration and/or necrosis	7	1	7	1	16	2	18	12
Atrial or ventricular thrombosis	0	0	0	0	0	0	8	16
Ventricular hypertrophy/dilation	0	0	2	0	11	1	33	38
Atrial hypertrophy/dilation	0	0	0	0	0	0	21	26

2.6.7.7E　　イヌにおける経口投与による４週間反復投与毒性試験　　被験物質：イバブラジン塩酸塩

Report Title: Toxicology study of S 16257-2 following repeated administration for 4 weeks by oral route in the beagle dog　**Test Article:** Ivabradine hydrochloride

Species/Strain: Dogs / beagle　**Duration of treatment:** 4 weeks　**Report No.:** NP03162

Initial Age: 8 to 8.5 months　**Duration of Post-Dose:** None　**Location in CTD:** 4.2.3.2-16

Date of first dose: [redacted]　**Method of Administration:** Gavage (1 mL/kg)　**GLP compliance:** Yes

Vehicle/formulation: Demineralised water / solution

Special features:
- Toxicokinetics on Day 1 (sampling before and 1, 3, 5, 7 and 24 h after dosing - Ivabradine Hydrochloride-treated animals only) and Day 28 (sampling before and 1, 3, 5 and 7 h after dosing - 2 control dogs and all Ivabradine Hydrochloride-treated dogs)
- No statistical analysis performed
- Doses expressed as salt in the study report (conversion factor: 0.928)
- ECG recordings submitted to a qualitative expert-review [Report NP15161, Section 4.2.3.2-20]

NOAEL: 4.6 mg/kg/d

Daily dose (mg/kg)	**0 (vehicle)**		**4.6**		**14**		**42**	
Number of animals	M: 3	F:3	M: 3	F:3	M: 3	F:3	M: 3	F:3
Toxicokinetics (Ivabradine - on Day 28 - no time-effect)								
Cmax (ng/mL) [tmax: 1 h]			1500	1083	3997	2767	8385[a]	7277
AUC24 (ng.h/mL)			3492	1750	9912	6361	33889[a]	28437
Noteworthy findings								
Died or sacrificed moribund	0	0	0	0	0	0	0	0
Bodyweight	-	-	-	-	-	-	-	-
Food consumption (estimate)	-	-	-	-	-	-	-	-
Clinical observations: (incidence)								
Emesis (within 1 h of dosing)	-	-	O (1/3)	O (1/3)	O to F (3/3)	O to F(3/3)	F (3/3)	F (3/3)
Ataxic gate, tremor, hypertonia, hindlimb weakness or postural disturbance (within 1 h of dosing, mainly from Days 1 to 4)[b]	-	-	-	-	O (3/3)	O (3/3)	O to F (3/3)	O to F (3/3)
Convulsions (within 30 min after dosing, on Days 1, 4 and 8)	-	-	-	-	-	-	O (1/3)	O (2/3)
Fecal occult blood	-	-	-	-	-	-	-	-
Ophthalmoscopy	-	-	-	-	-	-	-	-
Rectal temperature	-	-	-	-	-	-	-	-

O: Occasional, F: Frequent

a: Mean value from 2 out of 3 dogs (one dog excluded from analysis because of very low values)

b: Prone/lateral position and/or opisthotonos were also observed at 42 mg/kg in both sexes

2.6.7.7E　　イヌにおける経口投与による 4 週間反復投与毒性試験　　試験番号：NP03162（続き）

Daily dose (mg/kg)		**0 (vehicle)**		**4.6**		**14**		**42**	
Number of animals		M: 3	F:3	M: 3	F:3	M: 3	F:3	M: 3	F:3
Noteworthy findings (Cont'd)									
Electrocardiography									
Heart rate (beats/min)[a]									
Pretest		126	85	97	128	94	85	90	71
Week 1	Before dosing	103	91	93	108	87	87	90	68
	3 h after dosing	119	101	82	89	80	78	88	82
	5 h after dosing	112	106	85	96	79	77	76	74
Week 4	Before dosing	127	106	91	114	87	86	81	54
	3 h after dosing	132	107	94	81	81	78	102	87
	5 h after dosing	124	119	83	93	76	80	86	68
Sinus bradycardia (Week 4 before dosing)		-	-	1/3	-	-	-	-	1/3
Sinoatrial block (Weeks 1 or 4; 3 or 5 h after dosing)		-	-	1/3	-	1/3[b]	1/3	2/3	1/3[b]
Sinoatrial arrest (Week 4; 3 and 5 h after dosing)		-	-	-	-	-	-	-	1/3
First-degree atrioventricular block (Weeks 1 or 4; 3 or 5 h after dosing)		-	-	2/3	-	1/3[b]	-	-	-
Second-degree atrioventricular block (Weeks 1 or 4; 3 or 5 h after dosing)		-	-	1/3	-	-	-	1/3	1/3
Blood pressure		-	-	-	-	-	-	-	-

a: Mean values not specified in study report and calculated from individual data
b: Also observed during the pretest period in the same group

2.6.7.7E イヌにおける経口投与による 4 週間反復投与毒性試験 試験番号：NP03162（続き）

Daily dose (mg/kg)	**0 (vehicle)**		**4.6**		**14**		**42**	
Number of animals (main groups)	M: 3	F:3	M: 3	F:3	M: 3	F:3	M: 3	F:3
Noteworthy findings (Cont'd)								
Hematology[a]	-	-	-	-	-	-	-	-
Blood biochemistry[a]	-	-	-	-	-	-	-	-
Urinalysis[a]	-	-	-	-	-	-	-	-
Sodium excretion (mmol/24h)	0.597	0.570	0.867	0.813	0.610	0.620	1.187	0.087
Organ weights (%)								
Thymus Absolute	2.79 g	4.01 g	-4.8	+5.0	-26	-60	-75	-38
Relative to brain weight	3.65%	5.29%	-6.1	+5.6	-28	-61	-74	-37
Gross pathology								
Number examined	3	3	3	3	3	3	3	3
Findings	-	-	-	-	-	-	-	-
Histopathology								
Number examined	3	3	3	3	3	3	3	3
Thymus, atrophy								
Mild	1	1	1	0	1	1	0	1
Moderate to marked	1	1	1	0	2	2	3	1

a: At the end of dosing period
For controls, group means (organ weights) are shown, and percent differences from controls are shown for treated groups.

2.6.7.7F　　イヌにおける経口投与による 13 週間反復投与毒性試験　　被験物質：イバブラジン塩酸塩

Report Title: Toxicity study of S-16257-2 by repeated oral administration for thirteen weeks in the beagle dog
Test Article: Ivabradine hydrochloride
Species/Strain: Dogs / beagle
Duration of treatment: 13 weeks
Report No.: NP05574
Initial Age: 6.5 to 7.5 months
Duration of Post-Dose: 6 weeks
Location in CTD: 4.2.3.2-17
Date of first dose: [redacted]-19[redacted]
Method of Administration: Gavage (1 mL/kg)
GLP compliance: Yes
Vehicle/formulation: Demineralised water / solution

Special features:
- Toxicokinetics on Day 28 and Day 91 (sampling before and 1, 3, 5 and 7 h after dosing)
- No statistical analysis during off-dose period
- ECG recordings submitted to a qualitative expert-review [Report NP15161, Section 4.2.3.2-20]

NOAEL: 3 mg/kg/d

Daily dose (mg/kg)	**0 (vehicle)**		**3**		**10**		**30**	
Number of animals[a]	M: 5	F:5	M: 5	F:5	M: 5	F:5	M: 5	F:5
Toxicokinetics (on Day 91 - no time-effect)								
Ivabradine								
Cmax (ng/mL) [tmax: 1 h]			784	608	2069	2511	7015	6659
AUC24 (ng.h/mL)			1600	990	6800	6000	29000	21000
ONO-IN-306								
Cmax (ng/mL) [tmax: 1 or 3 h]			73	62	248	381	1141	1009
AUC24 (ng.h/mL)			210	140	1000	900	6500	2900
Noteworthy findings								
Died or sacrificed moribund	0	0	0	0	0	0	0	0
Bodyweight[b] Week 13	8.1 kg	8.0 kg	-4.2	-5.8	-0.5	-14**	-4.7	-18**
Food consumption (estimate)								
Delayed consumption	-		-		T (1/10)		T (6/10)	
Increase of the amount of food provided (+50%) for dogs which had lost more than 20% of bodyweight	-	-	1/5 (Week 13)	-	-	2/5 (Weeks 7 to 13)	-	1/5 (Weeks 9 to 11, Week 13)

T: Transitory
a: Including 2 dogs/gender/dose killed at the end of a 6-week recovery period
b: At the end of dosing period
For controls, group means (body weight) are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown.
*Statistical significance is based on individual variations from pretest: **: $p<0.01$ (Dunnett's test vs. controls).*

2.6.7.7F　　イヌにおける経口投与による 13 週間反復投与毒性試験　　試験番号：NP05574（続き）

Daily dose (mg/kg)	**0 (vehicle)**		**3**		**10**		**30**	
Number of animals	M: 5	F:5	M: 5	F:5	M: 5	F:5	M: 5	F:5
Noteworthy findings (Cont'd)								
Clinical observations:								
Tremor, rigid posterior legs (within 1 h after dosing, daily, transient, recovery from 2 to 4 h after dosing, decreased severity from Week 3)	-		-		O (8/10)		F (10/10)	
Convulsion (transient, first 4 days of dosing, within 10 min after dosing)	-		-		-		O (5/10)	
Emesis (within 1 h after dosing)	-		-		O (2/10)		O (9/10)	
Ophthalmoscopy	-	-	-	-	-	-	-	-
Rectal temperature	-	-	-	-	-	-	-	-
Blood pressure	-	-	-	-	-	-	-	-
Electrocardiography								
Sinus bradycardia (Weeks 4, 8 and/or 13; before dosing, 3 and/or 5 h after dosing)	-	-	1/5	1/5	2/5	1/5	1/5	3/5
Sinoatrial block (Weeks 4, 8 and/or 13; 3 and/or 5 h after dosing)	-	-	-	-	2/5	2/5	4/5	5/5
Sinoatrial arrest (Weeks 4, 8 and/or 13; 3 and/or 5 h after dosing)	-	-	-	-	1/5	-	1/5	3/5
First-degree atrioventricular block (Weeks 4, 8 and/or 13, 3 and/or 5 h after dosing)	-	-	-	-	1/5	1/5	1/5	-
Second-degree atrioventricular block (Weeks 4, 8 and/or 13, 3 and/or 5 h after dosing)	-	-	-	-	1/5	1/5	1/5	1/5
Ventricular escape complexes (Weeks 4 or 13, 3 and/or 5 h after dosing)	-	-	-	-	-	1/5	1/5	1/5
Ventricular fusion complexes (Week 8, 3 h after dosing)	-	-	-	-	-	-	-	1/5

2.6.7.7F　　イヌにおける経口投与による 13 週間反復投与毒性試験　　試験番号：NP05574（続き）

Daily dose (mg/kg)		**0 (vehicle)**		**3**		**10**		**30**	
Number of animals		M: 5	F:5	M: 5	F:5	M: 5	F:5	M: 5	F:5
Noteworthy findings (Cont'd)									
Hematology		-	-	-	-	-	-	-	-
Blood biochemistry		-	-	-	-	-	-	-	-
Urinalysis		-	-	-	-	-	-	-	-
Organ weights (%)									
Number examined		3	3	3	3	3	3	3	3
Thymus	Absolute	-	4.99 g	-	-34	-	-79	-	-82
	Relative to brain weight	-	6.0%	-	-29	-	-76	-	-78
Gross pathology									
Number examined		3	3	3	3	3	3	3	3
Thymus, atrophy		0	0	0	0	0	2	2	2
Histopathology									
Number examined		3	3	3	3	3	3	3	3
Thymus, atrophy									
Mild		1	1	1	2	1	1	0	1
Moderate		0	0	2	0	0	0	0	1
Marked		1	0	0	0	0	2	2	1
Postdose evaluation									
Number examined		2	2	2	2	2	2	2	2
Findings		-	-	-	-	-	-	-	-

For controls, group means (organ weights) are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown (no statistical analysis performed).

2.6.7.7G　　イヌにおける経口投与による 26 週間反復投与毒性試験　　被験物質：イバブラジン塩酸塩

Report Title: Toxicity study of S-16257-2 by repeated oral administration for twenty-six weeks to the beagle dog
Test Article: Ivabradine hydrochloride

Species/Strain: Dogs / beagle
Duration of treatment: 26 weeks
Report No.: NP06245

Initial Age: 5- to 8-month-old
Duration of Post-Dose: 8 weeks
Location in CTD: 4.2.3.2-18

Date of first dose: [redacted]
Method of Administration: Gavage (1 mL/kg)
GLP compliance: Yes

Vehicle/formulation: Demineralised water / solution

Special features:
- Toxicokinetics on Days 22, 85 and 176 [sampling 0.5, 1, 4, 7 h and 24 h after 1st daily dosing and 0.5, 1 and 2 h after 2nd daily dosing on Day 22 (Week 4); 15 min, 1, 4, 7 and 24 h after 1st daily dosing, and 1, 2, 3 and 4 h after 2nd daily dosing on Day 85 (Week 13); 10 min, 1, 4, 7 and 24 h after 1st daily dosing, and 1, 2, 3 and 4 h after 2nd daily dosing on Day 176 (Week 26)]
- Dosing interval: approximately 7 h
- Blood biochemistry included ANP and cortisol levels - Urinalysis included cortisol level
- Histopathology included thyroid immunocytochemistry (calcitonin and thyroglobulin staining)
- 2 dogs/sex/group for off-dose period (no statistical analysis)
- ECG recordings submitted to a qualitative expert-review [Report NP15161, Section 4.2.3.2-20]

NOAEL: 2 x 2 mg/kg/d

Daily dose (mg/kg)	**2 x 0 (Vehicle)**		**2 x 2**		**2 x 6.25**		**2 x 20**	
Number of animals[a]	M: 6	F:6	M: 6	F:6	M: 6	F:6	M: 6	F:6
Toxicokinetics (on Day 176)[b]								
Ivabradine								
Cmax,1 (ng/mL) (tmax,1: 1 h)			693	479	1886	1740	3870	3253
Cmax,2 (ng/mL) (tmax,2: 1.5 or 2 h)			513	324	1194	992	2827	2737
AUC24 (ng.h/mL)			3993	2086	9056	7976	28175	20302
ONO-IN-306								
Cmax,1 (ng/mL) (tmax,1: 35 min or 1 h)			69	55	243	224	584	500
Cmax,2 (ng/mL) (tmax,2: 2 to 3 h)			38	25	163	94	508	450
AUC24 (ng.h/mL)			451	241	1445	1022	5908	3917
Died or sacrificed moribund	0	0	0	0	0	0	0	0
Bodyweight	-	-	-	-	-	-	-	-
Food consumption (estimate)	-	-	-	-	-	-	-	-

a: Including 2 dogs/gender/dose killed at the end of 8-week recovery period
b: Mean Cmax not specified in study report and calculated

2.6.7.7G　　イヌにおける経口投与による 26 週間反復投与毒性試験　　試験番号：NP06245（続き）

Daily dose (mg/kg)		**2 x 0 (Vehicle)**		**2 x 2**		**2 x 6.25**		**2 x 20**	
Number of animals		M: 6	F:6	M: 6	F:6	M: 6	F:6	M: 6	F:6
Noteworthy findings									
Clinical observations: (incidence)									
Episodes of emesis (within 1 h of 1st daily dosing, just before or within 10 min of 2nd daily dosing)		-	-	-	-	-	-	O (4/6)	O (3/6)
Tremor (within 1 h after dosing, Week 1 at 2 x 6.25 and Weeks 1 to 17 at 2 x 20)		-	-	-	-	O (6/6)	O (6/6)	O (6/6)	O (6/6)
Hindlimb hypertonia (within 1 h after dosing, Weeks 1 to 17)		-	-	-	-	-	-	O (6/6)	O (6/6)
Convulsions (1 h after dosing, Day 2)		-	-	-	-	-	-	S (1/6)	-
Ophthalmoscopy		-	-	-	-	-	-	-	-
Rectal temperature		-	-	-	-	-	-	-	-
Blood pressure		-	-	-	-	-	-	-	-
Electrocardiography									
Heart rate (beats/min)									
Pretest		165	155	142	158	173	162	135	158
Week 12	Before dosing	129	148	108	132	122	130	99	105
	1 h after dosing	129	152	98	105	107	105	124	126
	4 h after dosing	150	140	93**	107	97**	103*	98**	94*
	6 h after dosing	143	144	96**	109*	93**	103**	76**	92**
Week 25	Before dosing	140	135	99*	119	105*	122	90**	107
	1 h after dosing	140	134	97*	96*	101*	95*	117	112
	4 h after dosing	142	138	85**	97**	81**	88**	92**	85**
	6 h after dosing	159	140	91**	110**	93**	97**	85**	94**

S: Sporadical, O: Occasional

*Statistical significance is based on individual variations from pretest: *: p<0.05, **: p<0.01 (Dunnett's test vs. controls).*

2.6.7.7G　　イヌにおける経口投与による 26 週間反復投与毒性試験　　試験番号：NP06245（続き）

Daily dose (mg/kg)	**2 x 0 (Vehicle)**		**2 x 2**		**2 x 6.25**		**2 x 20**	
Number of animals	M: 6	F:6	M: 6	F:6	M: 6	F:6	M: 6	F:6
Noteworthy findings (Cont'd)								
Electrocardiography (Cont'd)								
Sinus bradycardia (Weeks 12 or 25; 1 h after dosing)	-	-	1/6	-	1/6	-	-	1/6
Sinoatrial block (Weeks 12 or 25; 1, 4 or 6 h after dosing)	-	-	1/6	-	1/6	-	5/6	2/6
Sinoatrial arrest (Weeks 12 or 25; 4 h after dosing)	-	-	-	-	-	-	1/6	1/6
First-degree atrioventricular block (Weeks 12 or 25; 1, 4 or 6 h after dosing)	-	-	2/6	2/6	1/6	1/6	2/6	2/6
Second-degree atrioventricular block (Week 25; 1 h after dosing)	-	-	1/6	1/6	-	-	-	-
Atrial premature complexes (Week 12; 4 h after dosing)	-	-	-	-	-	-	1/6	-
Ventricular premature complexes (Week 12; 4 h after dosing)	-	-	-	-	-	-	1/6	-
Hematology	-	-	-	-	-	-	-	-
Blood biochemistry	-	-	-	-	-	-	-	-
Urinalysis	-	-	-	-	-	-	-	-
Organ weights								
Number examined	4	4	4	4	4	4	4	4
Findings	-	-	-	-	-	-	-	-
Gross pathology								
Number examined	4	4	4	4	4	4	4	4
Findings	-	-	-	-	-	-	-	-
Histopathology								
Number examined	4	4	4	4	4	4	4	4
Findings	-	-	-	-	-	-	-	-
Postdose evaluation								
Number examined	2	2	2	2	2	2	2	2
Findings	-	-	-	-	-	-	-	-

S: Sporadical, O: Occasional

2.6.7.7H　　イヌにおける経口投与による 53 週間反復投与毒性試験　　被験物質：イバブラジン塩酸塩

Report Title: S 16257-2 – One-year oral (gavage) toxicity study in the beagle dog followed by a 12 week treatment-free period

Test Article: Ivabradine hydrochloride

Species/Strain: Dogs / beagle

Duration of treatment: 1 year

Report No.: NP15280

Initial Age: 6 to 7 months

Duration of Post-Dose: 12 weeks

Location in CTD: 4.2.3.2-19

Date of first dose: [redacted]-19[redacted]

Method of Administration: Gavage (2 mL/kg/administration)

GLP compliance: Yes

Vehicle/formulation: Water for injection / solution

Special features:
- Toxicokinetics on Days 23 (Week 4), 178 (Week 26) and 366 (Week 53) (sampling before, 15 min, 1, 4 h after the 1st daily dosing, then before, 1, 2, 3 h after the 2nd daily dosing) [all animals sampled].
- 8-hour daily dosing interval.
- Electroretinographic examinations (under photopic and scotopic conditions) in pretest, Weeks 26/27 and 50/51 of the treatment period, and after Weeks 1, 7 and 11 of the off-dose period (no statistical analysis).
- Transmission electron microscopy (TEM) conducted on ocular sections in control- and high-dose groups at the end of treatment and off-dose periods.
- Eye and heart levels of Ivabradine and ONO-IN-306 determined at the end of treatment and off-dose periods.

NOAEL: <2 x 1 mg/kg/d (NOAEL excluding the effect on ERG related to pharmacological action of Ivabradine: 2 x 3.5 mg/kg/d)

Daily dose (mg/kg)	**2 x 0 (Vehicle)**		**2 x 1**		**2 x 3.5**		**2 x 12**	
Number of animals[a]	M: 6	F:6	M: 6	F:6	M: 6	F:6	M: 6	F:6[b]
Toxicokinetics (on Day 366; no time-effect)								
Ivabradine								
Cmax,1 (ng/mL) (tmax,1: 15 min to 1 h)			95	88	1252	1174	3678	3241
Cmax,2 (ng/mL) (tmax,2: 1 or 1.5 h)			55	32	615	583	1845	1751
AUC24 (ng.h/mL)			361	205	4650	3890	17300	14300
ONO-IN-306								
Cmax,1 (ng/mL) (tmax,1: 15 min to 1 h)			8.9	11	146	166	565	617
Cmax,2 (ng/mL) (tmax,2: 15 min to 1 h)			blq	blq	40	47	308	334
AUC24 (ng.h/mL)			nd	nd	481	536	3240	2580

a: Including up to 2 dogs/gender/dose killed at the end of a 12-week recovery period
b: Five females from Day 341 due to mortality

2.6.7.7H　　イヌにおける経口投与による 53 週間反復投与毒性試験　　試験番号：NP15280（続き）

Daily dose (mg/kg)		**2 x 0 (Vehicle)**		**2 x 1**		**2 x 3.5**		**2 x 12**	
Number of animals		M: 6	F:6	M: 6	F:6	M: 6	F:6	M: 6	F:6
Noteworthy findings									
Died or sacrificed moribund		0	0	0	0	0	0	0	1[a]
Bodyweight		-	-	-	-	-	-	-	-
Food consumption		-	-	-	-	-	-	-	-
Clinical observations: (mainly first 3 months of dosing)									
Hypersalivation (transitory)		-	-	-	-	-	-	+	+
Vomiting (transitory)		-	-	-	-	-	-	+	+
Liquid feces (transitory, sometimes with blood)		-	-	-	-	-	-	+	+
Ophthalmoscopy		-	-	-	-	-	-	-	-
Electroretinography									
Number examined		6	6	6	6	6	5[b]	6	6
Cone system responses (photopic conditions):									
a-wave slope (µV/ms)	Week 26/27	4.8±0.9	5.3±1.5	-8.3%	+7.5%	+17%	+1.9%	+42%	+32%
	Week 50/51	5.4±1.8	6.1±1.2	-3.7%	-16%	+61%	+16%	+30%	+48%
b-wave amplitude (µV)	Week 26/27	146±33	169±38	-37%	-25%	-60%	-73%	-84%	-67%
	Week 50/51	156±26	176±35	-60%	-44%	-70%	-66%	-80%	-74%
b-wave implicit time (ms)		-	-	-	-	-	-	-	-
Number examined		6	6	6	6	6	6	6	6
Rod system responses (scotopic conditions):									
b-wave amplitude (µV)									
- Week 26	Dark onset (B0)	79±19	87±28	-39%	-41%	-80%	-89%	-82%	-85%
	2-min dark adaptation (B2)	106±18	106±28	-20%	-23%	-49%	-67%	-60%	-50%
	4-min dark adaptation (B4)	123±22	116±34	-16%	-12%	-34%	-50%	-48%	-34%
	From 6- to 12-min dark adaptation (B6 to B12)	-	-	-	-	-	-	-	-
- Week 50/51	Dark onset (B0)	69±9	79±12	-46%	-58%	-100%	-100%	-100%	-100%
	2-min dark adaptation (B2)	86±17	95±14	-2.3%	-31%	-43%	-68%	-42%	-51%
	4-min dark adaptation (B4)	97±16	92±15	+4.1%	-13%	-27%	-53%	-27%	-30%
	From 6- to 12-min dark adaptation (B6 to B12)	-	-	-	-	-	-	-	-
b-wave implicit time (ms)		-	-	-	-	-	-	-	-

+: Mild

a: Found dead on Day 341 approximately 6 h after first daily administration. The cause of death could not be determined from gross or histomorphological examination

b: One female excluded from analysis due to abnormal ERG before treatment

For vehicle-control groups: mean ± SD. For treated groups: percent differences from controls.

2.6.7.7H　　イヌにおける経口投与による 53 週間反復投与毒性試験　　試験番号：NP15280（続き）

Daily dose (mg/kg)		**2 x 0 (Vehicle)**		**2 x 1**		**2 x 3.5**		**2 x 12**	
Number of animals		M: 6	F:6	M: 6	F:6	M: 6	F:6	M: 6	F:6[a]
Noteworthy findings (Cont'd)									
Blood pressure		-	-	-	-	-	-	-	-
Electrocardiography									
Heart rate (beats/min):									
Pretest (2 measures)		123/123	125/115	145/138	143/153**	125/118	120/123	107/120	132/137
Week 1		120	113	137	132	102	110	93	103
Week 13		108	118	122	133	107	93	80	82
Week 26/27		95	120	110	133	98	110	83	82
Week 39		95	118	110	137	102	103	85	80
Week 41/42	Before dosing	110	100	122	130	107	108	83	87
	2 h after dosing	105	112	102	110	87	78*	78*	68**
Week 53	Before dosing	100	123	117	115	108	93	75*	90*
	2 h after dosing	100	105	103	107	85	73*	92	72
	4 h after dosing	113	115	125	122	90	88	78*	64**
Heart-rate change [mean decrease (%) vs. vehicle]									
Week 53	4 h after dosing			+10	+6	-21	-23	-32	-44
PR-interval (ms):		-	-	-	-	-	-	-	-
QRS-complex duration (ms):		-	-	-	-	-	-	-	-
QT-interval duration (ms):									
Pretest (2 measures)		205/197	205/205	173**/192	197/195	185*/202	202/198	203/195	200/193
Week 1		203	200	190	198	207	202	202	220
Week 13		205	198	198	197	223	217**	238*	233*
Week 26/27		222	208	213	210	227	230	248*	250**
Week 39		212	205	198	198	213	213	232	248***
Week 41/42	Before dosing	200	210	198	212	222	213	245***	247*
	2 h after dosing	217	203	215	218	242	237*	240	262***
Week 53	Before dosing	205	197	207	215	232	213	250**	234*
	2 h after dosing	220	210	223	212	243	233*	247	256***
	4 h after dosing	197	205	207	218	233	233*	252**	252**
QTc (Fridericia's correction)		-	-	-	-	-	-	-	-

a: Five females from Day 341 due to mortality
*Dunnett's test vs. controls: *: p<0.05, **: p<0.01, ***: p<0.001*

2.6.7.7H　　イヌにおける経口投与による 53 週間反復投与毒性試験　　試験番号：NP15280（続き）

Daily dose (mg/kg)		**2 x 0 (Vehicle)**		**2 x 1**		**2 x 3.5**		**2 x 12**	
Number of animals		M: 6	F:6	M: 6	F:6	M: 6	F:6	M: 6	F:6[a]
Noteworthy findings (Cont'd)									
Electrocardiography (Cont'd)									
Sinus bradycardia		-	-	-	-	1/6	-	2/6	3/6
Sinoatrial block or arrest (generally 2 or 4 h after first daily dosing, in Weeks 13, 42 or 53)		-	-	-	-	1/6	-	3/6	3/6
Second-degree atrioventricular block (2 h after first daily dosing, in Weeks 41/42 or 53)		-	1/6	-	-	2/6	2/6	2/6	1/6
Hematology		-	-	-	-	-	-	-	-
Blood biochemistry		-	-	-	-	-	-	-	-
Urinalysis		-	-	-	-	-	-	-	-
Organ weights		-	-	-	-	-	-	-	-
Gross pathology		-	-	-	-	-	-	-	-
Histopathology		-	-	-	-	-	-	-	-
Ocular TEM		-	-	nd	nd	nd	nd	-	-
Tissue concentrations (mean values in ng/g)									
Heart									
Ivabradine				blq	blq	blq	blq	blq	blq
ONO-IN-306				blq	blq	blq	blq	blq	blq
Eye									
Ivabradine	Anterior part			12688	8874	59616	47491	128819	151487
	Posterior part			27472	10619	95561	81680	228757	292910
	Vitreous body			blq	blq	163	blq	122	36
ONO-IN-306	Anterior part			891	872	10218	8152	40680	30922
	Posterior part			2629	1269	22612	19595	63125	64755
	Vitreous body			blq	blq	blq	blq	blq	blq

a: Five females from Day 341 due to mortality

2.6.7.7H　　イヌにおける経口投与による 53 週間反復投与毒性試験　　試験番号：NP15280（続き）

Daily dose (mg/kg)		**2 x 0 (Vehicle)**		**2 x 1**		**2 x 3.5**		**2 x 12**	
Number of animals		M: 2	F:2	M: 2	F:2	M: 2	F:2	M: 2	F:1
Postdose evaluation (Noteworthy findings)									
Electroretinography									
Cone response (photopic conditions):									
a-wave slope		-	-	-	-	-	-	-	-
b-wave amplitude	After 1st week	-	-	-	-	±	-	±	±
	After 7th week	-	-	-	-	-	-	±	-
	After 11th week	-	-	-	-	-	-	-	-
Rod response (scotopic conditions):									
b-wave amplitude	After 1st week	-	-	-	-	-	-	-	±
	After 7th week	-	-	-	-	-	-	-	-
	After 11th week	-	-	-	-	-	-	-	-
Tissue concentrations (mean values in ng/g)[a]									
Heart									
Ivabradine				blq	blq	blq	blq	blq	blq[b]
ONO-IN-306				blq	blq	blq	blq	blq	blq[b]
Eye									
Ivabradine	Anterior part			5459	7654	21125	17240	55863	5386[b]
	Posterior part			3982	6315	58850	11067	41154	8089[b]
	Vitreous body			blq	blq	blq	30	27	blq[b]
ONO-IN-306	Anterior part			886	1086	5636	5755	25022	16613[b]
	Posterior part			1394	1611	19138	8326	23837	24064[b]
	Vitreous body			blq	blq	blq	blq	17	blq[b]

±: Partial recovery
a: Mean values not specified in study report and calculated from individual data
b: Only one value (one sample missing)

2.6.7.8 In vitro 遺伝毒性試験

2.6.7.8A 細菌を用いた復帰突然変異試験

被験物質：イバブラジン塩酸塩

Report Title: Genotoxicity study of S 16257-02: In vitro test for gene mutation on Salmonella typhimurium in the histidine reversion system and on Escherichia coli in the tryptophan reversion system (Ames test)

Test Article: Ivabradine hydrochloride
Report No.: NP03142

Test for Induction of: Reverse mutation in bacterial cells
No of independent assays: 2
Location in CTD: 4.2.3.3.1-1

Strains: S. typhimurium TA98, TA100, TA1535 and TA1537; E. coli WP2 uvrA and WP2 uvrA (pKM101)
No of replicate cultures: 3
GLP compliance: Yes
Date of treatment: [redacted]-19[redacted]

Metabolising system: Aroclor-1254-induced rat liver S9, 10% (v/v)
No of cells analyzed/culture: 10^8

Vehicles for: **Test article:** Water for injection
Positive controls: 0.9% (w/v) sodium chloride solution for sodium azide; DMSO for 9-aminoacridine, 4-NQO and 2-anthramine

Treatment: Plate incorporation for 72 h

Special features:
- Concentrations of Ivabradine Hydrochloride are expressed as salt in the study report (correction factor: 0.928).
- Preliminary cytotoxicity assay: 4.6 to 4640 µg/plate.
- Expert-review [Report NP08409, Section 4.2.3.3-1]

Cytotoxic effects: None

Genotoxic effects: None

DMSO: dimethyl sulphoxide
4-NQO: 4-nitroquinoline N-oxide

2.6.7.8A 細菌を用いた復帰突然変異試験 試験番号：NP03142（続き）

Assay 1: Revertant Colony Counts [mean ± SD (IF)]

Metabolic activation	Test article	Dose level (µg/plate)	TA98	TA100	TA1535	TA1537	WP2 uvrA	WP2 uvrA (pKM101)
Without	Negative control	0	32±2 (1.0)	151±49 (1.0)	22±5 (1.0)	9±2 (1.0)	37±5 (1.0)	99±2 (1.0)
	Ivabradine Hydrochloride	46	26±7 (0.8)	153±12 (1.0)	21±2 (0.9)	11±2 (1.2)	41±9 (1.1)	100±7 (1.0)
		139	32±6 (1.0)	215±22 (1.4)	19±4 (0.9)	6±4 (0.7)	40±6 (1.1)	94±10 (0.9)
		464	32±5 (1.0)	202±14 (1.3)	23±5 (1.0)	9±3 (1.1)	44±6 (1.2)	82±5 (0.8)
		1392	28±4 (0.9)	163±14 (1.1)	29±4 (1.3)	8±4 (0.9)	44±1 (1.2)	103±13 (1.0)
		4640	24±2 (0.8)	177±32 (1.2)	21±4 (1.0)	10±5 (1.2)	46±8 (1.2)	83±6 (0.8)
	4-NQO	0.5	281±7** (8.8)	np	np	np	np	878±28** (8.8)
		2	np	np	np	np	858±49** (23.2)	np
	Sodium azide	8	np	719±91** (4.8)	941±50** (42.8)	np	np	np
	9-aminoacridine	100	np	np	np	666±78** (76.6)	np	np
With	Negative control	0	50±4 (1.0)	253±6 (1.0)	22±4 (1.0)	18±4 (1.0)	47±5 (1.0)	56±10 (1.0)
	Ivabradine Hydrochloride	46	43±1 (0.8)	239±18 (0.9)	23±5 (1.0)	17±2 (1.0)	50±6 (1.1)	58±18 (1.0)
		139	57±6 (1.1)	256±19 (1.0)	24±3 (1.1)	15±2 (0.8)	53±10 (1.1)	69±8 (1.2)
		464	60±2 (1.2)	243±10 (1.0)	21±4 (1.0)	17±3 (1.0)	50±8 (1.1)	95±8** (1.7)
		1392	57±3 (1.1)	255±11 (1.0)	20±3 (0.9)	18±2 (1.0)	41±10 (0.9)	78±14 (1.4)
		4640	57±9 (1.1)	269±8 (1.1)	19±6 (0.9)	21±7 (1.2)	40±9 (0.9)	56±6 (1.0)
	2-anthramine	2.5	1183±79**(23.5)	1521±28** (6.0)	127±20** (5.8)	287±4** (16.0)	np	801±93** (14.4)
		10	np	np	np	np	643±47** (13.8)	np

4-NQO: 4-nitroquinoline N-oxide

IF: Induction factor calculated using non-rounded values

***: p<0.01 (one-way analysis of variance followed by Dunnett's test vs. negative controls)*

2.6.7.8A 細菌を用いた復帰突然変異試験 試験番号：NP03142（続き）

Assay 2: Revertant colony counts [mean ± SD (IF)]

Metabolic activation	Test article	Dose level (µg/plate)	TA98	TA100	TA1535	TA1537	WP2 uvrA	WP2 uvrA (pKM101)
Without	Negative control	0	49±2 (1.0)	179±12 (1.0)	17±4 (1.0)	9±3 (1.0)	33±2 (1.0)	43±4 (1.0)
	Ivabradine Hydrochloride	464	47±9 (1.0)	189±19 (1.1)	15±4 (0.9)	8±2 (1.0)	40±5 (1.2)	35±10 (0.8)
		928	46±11 (1.0)	209±8 (1.2)	18±1 (1.1)	8±2 (0.9)	40±8 (1.2)	37±2 (0.9)
		1392	45±6 (0.9)	217±6 (1.2)	16±2 (1.0)	6±2 (0.7)	34±10 (1.0)	50±10 (1.2)
		2320	50±7 (1.0)	202±15 (1.1)	18±4 (1.1)	11±4 (1.2)	38±11 (1.2)	52±5 (1.2)
		4640	58±8 (1.2)	189±29 (1.1)	22±7 (1.3)	6±2 (0.7)	38±3 (1.2)	43±6 (1.0)
	4-NQO	0.5	397±29** (8.2)	np	np	np	Np	585±95** (13.5)
		2	np	np	np	np	864±35** (26.4)	np
	Sodium azide	8	np	613±38** (3.4)	1017±25** (59.8)	np	np	np
	9-aminoacridine	100	np	np	np	725±55** (83.3)	np	np
With	Negative control	0	58±7 (1.0)	232±12 (1.0)	20±2 (1.0)	14±2 (1.0)	52±6 (1.0)	115±8 (1.0)
	Ivabradine Hydrochloride	464	63±2 (1.1)	234±2 (1.0)	24±5 (1.2)	17±1 (1.2)	48±2 (0.9)	96±32 (0.8)
		928	66±4 (1.1)	243±16 (1.0)	28±7 (1.4)	16±1 (1.2)	52±7 (1.0)	99±13 (0.9)
		1392	69±1 (1.2)	247±15 (1.1)	33±8 (1.6)	19±3 (1.4)	53±5 (1.0)	88±19 (0.8)
		2320	60±6 (1.0)	229±22 (1.0)	28±9 (1.4)	18±4 (1.3)	52±3 (1.0)	108±10 (0.9)
		4640	71±6* (1.2)	258±26 (1.1)	27±7 (1.3)	15±5 (1.1)	55±4 (1.1)	82±12 (0.7)
	2-anthramine	2.5	1284±83**(22.1)	2265±43** (9.8)	158±6** (7.8)	212±7** (15.2)	np	854±58** (7.4)
		10	np	np	np	np	716±43** (13.7)	np

4-NQO: 4-nitroquinoline N-oxide

IF: Induction factor calculated using non-rounded values

**: p<0.05, **: p<0.01 (one-way analysis of variance followed by Dunnett's test vs. negative controls).*

2.6.7.8B　　マウスリンフォーマ試験　　被験物質：イバブラジン塩酸塩

Report Title: Mutation assay at the tk locus in L5178Y mouse lymphoma cells using a microtiter cloning technique (trifluorothymidine resistance) with S 16257-2

Test Article: Ivabradine hydrochloride

Report No.: NP05144

Test for Induction of: Gene mutations in mammalian cells

No of independent assays: 2

Location in CTD: 4.2.3.3.1-2

Strains: L5178Y mouse lymphoma cells

No of replicate cultures: 2

GLP compliance: Yes

Metabolising system: Aroclor-1254-induced rat liver S9, 2.5% (v/v)

No of cells analyzed/culture: 3×10^5

Date of treatment: [redacted]-19[redacted]

Vehicles for: **Test article:** Fischer medium without serum

Positive controls: Fischer medium without serum

Treatment (recovery): 3 h, without and with S9 (48 h)

Special features:
- Concentration of Ivabradine Hydrochloride expressed as salt in the study report (conversion factor: 0.928).
- Preliminary cytotoxicity assay: 92.8 to 4640 µg/mL.
- Microtiter cloning technique.
- Counting of small and large colonies.
- No statistical analysis.
- Expert-review [Report NP08409, Section 4.2.3.3-1]

Cytotoxic effects:
- Concentration-related cytotoxicity at ≥928 µg/mL, without and with metabolic activation.

Genotoxic effects:
- Increases in mean mutation frequencies:
  . **Without metabolic activation:** minimal at 696 (1.6-fold in assay 1) or 928 µg/mL (2.2- or 2.1-fold in assays 2 and 3, respectively) and slight at 1160 µg/mL (3.8-fold in assay 3) though with severe cytotoxicity (5% relative survival);
  . **With metabolic activation:** slight and not reproducible at 1392 µg/mL (2.6-fold in assay 2).
- No clear difference in small/large colony ratio, without and with metabolic activation.

2.6.7.8B　　マウスリンフォーマ試験　　試験番号：NP05144（続き）

Assay 1

Metabolic activation	Treatment duration (recovery)	Test article	Concentration (µg/mL)	Mean % RS	Mean mutation frequency $\times 10^{-6}$ cells (IF)
Without	3h	FM0	0	100.0	91.8 (1.0)
	(48h)	Ivabradine Hydrochloride	87	91.5	64.2 (0.7)
			174	84.4	86.9 (0.9)
			348	82.5	106.2 (1.2)
			696	61.2	144.0 (1.6)
		Methyl Methanesulfonate	10	102.8	718.2 (7.8)
With	3h	FM0	0	100.0	104.5 (1.0)
	(48h)	Ivabradine Hydrochloride	87	126.7	138.3 (1.3)
			174	104.5	135.5 (1.3)
			348	108.3	117.2 (1.1)
			696	96.1	109.1 (1.0)
			1392	53.7	128.4 (1.2)
		Cyclophosphamide	2	81.3	733.2 (7.0)

% RS: Relative Survival in Percent (% of controls)

IF: Induction Factor calculated using non-rounded values

FM0: Fischer culture medium without serum

2.6.7.8B マウスリンフォーマ試験 試験番号：NP05144（続き）

Assay 2

Metabolic activation	Treatment duration (recovery)	Test article	Concentration (µg/mL)	Mean % RS	Mean mutation frequency $\times 10^{-6}$ cells (IF)
Without	3h	FM0	0	100.0	68.7 (1.0)
	(48h)	Ivabradine Hydrochloride	87	108.8	86.6 (1.1)
			174	98.7	81.7 (1.2)
			348	86.7	96.0 (1.4)
			696	73.0	75.1 (1.1)
			928	75.2	152.4 (2.2)
		Methyl Methanesulfonate	10	96.7	678.4 (9.9)
With	3h	FM0	0	100.0	97.1 (1.0)
	(48h)	Ivabradine Hydrochloride	174	120.9	113.3 (1.2)
			348	90.3	118.2 (1.2)
			696	77.0	138.5 (1.4)
			1392	35.4	254.0 (2.6)
		Cyclophosphamide	2	74.5	743.1 (7.7)

% RS: Relative Survival in Percent (% of controls)
IF: Induction Factor calculated using non-rounded values
FM0: Fischer culture medium without serum

2.6.7.8B　　マウスリンフォーマ試験　　試験番号：NP05144（続き）

Assay 3

Metabolic activation	Treatment duration (recovery)	Test article	Concentration (µg/mL)	Mean % RS	Mean mutation frequency ×10^{-6} cells (IF)
Without	3h	FM0	0	100.0	73.5 (1.0)
	(48h)	Ivabradine Hydrochloride	475	101.0	64.9 (0.9)
			594	66.3	90.5 (1.2)
			742	66.7	78.7 (1.1)
			928	56.0	151.5 (2.1)
			1160	5.0	277.5 (3.8)
		Methyl Methanesulfonate	10	98.7	695.0 (9.5)
With	3h	FM0	0	100.0	100.2 (1.0)
	(48h)	Ivabradine Hydrochloride	696	96.2	90.9 (0.9)
			928	91.4	106.3 (1.1)
			1160	79.6	102.0 (1.0)
			1392	64.9	112.5 (1.1)
			1624	40.1	120.3 (1.2)
		Cyclophosphamide	2	79.0	922.7 (9.2)

% RS: Relative Survival in Percent (% of controls)
IF: Induction Factor calculated using non-rounded values
FM0: Fischer culture medium without serum

2.6.7.8C　　マウスリンフォーマ試験　　被験物質：イバブラジン塩酸塩

Report Title: S 16257-2: Mutation at the thymidine kinase (tk) locus of mouse lymphoma L5178Y cells using the Microtitre® fluctuation technique

Test Article: Ivabradine hydrochloride

Report No.: NP05489

Test for Induction of: Gene mutations in mammalian cells	**No of independent assays:** 3	**Location in CTD:** 4.2.3.3.1-3	
Strains: L5178Y mouse lymphoma cells	**No of replicate cultures:** 2 (only 1 for positive controls)	**GLP compliance:** Yes	
Metabolising system: Aroclor-1254-induced rat liver S9, 2% (v/v)	**No of cells analyzed/culture:** 10^7	**Date of treatment:** [redacted]-19[redacted]	
Vehicles for: **Test article:** Purified water	**Positive controls:** DMSO		

Treatment (recovery): 3 h, without and with S9 [48 h (1st and 2nd assays) to 72 h (3rd assay)]

Special features:
- Concentration of Ivabradine Hydrochloride expressed as salt in the study report (conversion factor: 0.928).
- Preliminary cytotoxicity assay: 145 to 4640 µg/mL.
- Microtiter cloning technique.
- Counting of small and large colonies.
- In vitro metabolism of the unlabelled compound after 3 h-incubation with mouse lymphoma L5178Y cells.
- Expert-review [Report NP08409, Section 4.2.3.3-1]

Cytotoxic effects: Highest doses at which cells survived were 580 µg/mL without metabolic activation and 1160 µg/mL with metabolic activation (no surviving cells at ≥1160 µg/mL without metabolic activation and at 2320 µg/mL with metabolic activation).

Genotoxic effects:
- Statistically significant increases in mutation frequencies:
  . **Without metabolic activation**: weak, at 928 µg/mL (1.5-fold in assay 2) with severe cytotoxicity (6.7% relative survival);
  . **With metabolic activation**: slight, at 464, 696 and 928 µg/mL (1.8-, 2.2- and 2.2-fold, respectively in assay 2) and at 1160 µg/mL (1.4-fold in assay 3) with high cytotoxicity (32.8, 21.8, 11.8 and 50.3% relative survival, respectively).
- No clear difference in small/large colony ratio, without and with metabolic activation.

***In vitro* metabolism:**
- **Without metabolic activation:** few metabolites.
- **With metabolic activation:** approximately fifteen metabolites in the culture supernatants including hydroxylated, O-desmethylated or N-desmethylated (ONO-IN-306 = M29) metabolites, N-dealkylated cleavage product (Y 596 = M9), and dehydro-benzazepinone Ivabradine (Y 517 = M31) [the correspondence between metabolite coding system (Mx), laboratory code and chemical name is given in 2.6.5.5.10].

DMSO: dimethylsulphoxide

2.6.7.8C　　マウスリンフォーマ試験　　試験番号：NP05489（続き）

Assay 1

Metabolic activation	Treatment duration (recovery)	Test article	Concentration (µg/mL)	Mean[a] % RS	Mean[a] mutation frequency ×10^{-6} cells (IF)
Without	3 h	Negative control	0	100.0	138
	(48 h)	Ivabradine Hydrochloride	116	79.2	nd
			232	89.5	131
			464	86.8	91
			696	59.1	85
			928	50.8	126
			1160	50.8	108
		4-nitroquinoline 1-oxide	0.05	86.8	684
			0.1	74.3	817
With	3 h	Negative control	0	100.0	131
	(48 h)	Ivabradine Hydrochloride	232	58.0	nd
			464	46.7	184
			696	38.8	171
			928	33.8	164
			1160	22.4	166
			1392	15.7	152
		Benzo(a)pyrene	2	59.3	865
			3	55.0	1380

% RS: Relative Survival in Percent (% of controls)
IF: Induction Factor calculated using non-rounded values
a: Except for positive control: only one culture

2.6.7.8C マウスリンフォーマ試験 試験番号：NP05489（続き）

Assay 2

Metabolic activation	Treatment duration (recovery)	Test article	Concentration (µg/mL)	Mean[a] % RS	Mean[a] mutation frequency ×10^{-6} cells (IF)
Without	3 h	Negative control	0	100.0	185 (1.0)
	(48 h)	Ivabradine Hydrochloride	464	74.4	160 (0.9)
			696	60.9	178 (1.0)
			928	6.7	277* (1.5)
			1160	3.0	nd
			1392	0.3	nd
			1856	0.0	nd
		4-nitroquinoline 1-oxide	0.05	78.4	1536 (8.3)
			0.1	38.0	1505 (8.1)
With	3 h	Negative control	0	100.0	167 (1.0)
	(48 h)	Ivabradine Hydrochloride	464	32.8	294 # (1.8)
			696	21.8	367 # (2.2)
			928	11.8	375 # (2.2)
			1160	2.8	nd
			1392	2.5	nd
		Benzo(a)pyrene	2	70.5	1586 (9.5)
			3	32.4	2347 (14.0)

% RS: Relative Survival in Percent (% of controls)
IF: Induction Factor calculated using non-rounded values
a: Except for positive control: only one culture
**: $p<0.05$ (Dunnett's test), # : $p<0.05$ (Dunnett's test) together with a linear trend ($p<0.001$) ($\chi 2$ one-sided).*

2.6.7.8C マウスリンフォーマ試験 試験番号：NP05489（続き）

Assay 3

Metabolic activation	Treatment duration (recovery)	Test article	Concentration (µg/mL)	Mean[a] % RS	Mean[a] mutation frequency ×10^{-6} cells (IF)
Without	3 h	Negative control	0	100.0	142 (1.0)
	(72 h)	Ivabradine Hydrochloride	116	84.8	nd
			232	96.4	nd
			464	84.2	nd
			696	81.2	117 (0.8)
			928	77.6	129 (0.9)
			1160	73.0	97 (0.7)
			1392	63.3	120 (0.8)
			1856	31.8	99 (0.7)
		4-nitroquinoline 1-oxide	0.05	86.8	388 (2.7)
			0.1	87.7	518 (3.6)
With	3 h	Negative control	0	100.0	104 (1.0)
	(72 h)	Ivabradine Hydrochloride	58	101.5	nd
			116	91.0	nd
			232	93.7	nd
			464	78.4	122 (1.2)
			696	77.9	137 (1.3)
			928	61.5	123 (1.2)
			1160	50.3	151* (1.4)
			1392	37.8	110 (1.1)
		Benzo(a)pyrene	2	96.4	745 (7.2)
			3	56.7	1391 (13.4)

% RS: Relative Survival in Percent (% of controls)
IF: Induction Factor calculated using non-rounded values
a: Except for positive control: only one culture
**: p<0.05 (Dunnett's test)*

2.6.7.8D　　ラット初代培養肝細胞を用いた不定期 DNA 合成試験　　被験物質：イバブラジン塩酸塩

Report Title: Genotoxicity study with S 16257-2: measurement of unscheduled DNA synthesis in isolated rat hepatocytes

Test Article: Ivabradine hydrochloride

Report No.: NP05912

Test for Induction of: Primary DNA damage in mammalian cells

No of independent assays: 2

Location in CTD: 4.2.3.3.1-4

Strains: Primary rat hepatocytes

No of replicate cultures: 2

GLP compliance: Yes

Metabolising system: None (fresh hepatocytes metabolically competent)

No of cells analyzed/culture: 100

Date of treatment: [redacted]-19[redacted]

Vehicles for: **Test article:** Water for injection

Positive controls: DMSO

Treatment: 20 to 22 h

Special features:
- Preliminary cytotoxicity assay (3 to 2000 µg/mL).
- No statistical analysis.
- In vitro metabolism determined after incubation with 0, 55, 100, 180, 300 or 550 µg/mL of unlabelled Ivabradine Hydrochloride for 19.5 h.
- Expert-review [Report NP08409, Section 4.2.3.3-1]

Toxic/cytotoxic effects: Dose-related reduction of relative survival (with morphological signs of cytotoxicity): down to 82% at 300 µg/mL, 11% at 1000 µg/mL and 1% at 2000 µg/mL.

Genotoxic effects:
- No reproducible or concentration-related increase in mean net nuclear grain counts up to 400 µg/mL.
- Slight increase in DNA repair at 550 µg/mL (assays 1 and 2), associated with approximately 50% cytotoxicity.

***In vitro* metabolism:** Ivabradine Hydrochloride metabolised into ten metabolites present in the supernatants of cultures including hydroxylated, O-desmethylated or N-desmethylated (ONO-IN-306 = M29) metabolites, and N-dealkylated cleavage product (Y 596 = M9) [the correspondence between metabolite coding system (Mx), laboratory code and chemical name is given in 2.6.5.5.10].

DMSO: dimethylsulphoxide

2.6.7.8D ラット初代培養肝細胞を用いた不定期 DNA 合成試験 試験番号：NP05912（続き）

Test article	Concentration (µg/mL)	Relative survival (%)	NGC (mean ± SD)	CGC (mean ± SD)	NNGC (mean ± SD)	% IR (mean ± SD)
Assay 1						
Negative control	0	100.0	26.2±6.4	25.6±6.0	0.6±3.2	12.0±2.8
Ivabradine	55	98.9	27.5±7.9	27.0±7.8	0.6±3.0	5.0±1.4
Hydrochloride	100	85.4	30.1±7.0	29.2±7.0	1.0±2.9	10.0±5.7
	180	89.3	35.0±9.6	34.3±9.0	0.8±3.2	13.0±7.1
	300	85.7	34.7±10.4	33.5±10.1	1.2±3.1	12.0±5.7
	550	41.0	35.6±9.0	30.7±8.3	4.9±5.7	40.0±33.9
N-Acetylaminofluorene	0.2	nd	36.1[a]±11.3	25.0[a]±8.9	11.2[a]±8.9	94.0±5.7
Assay 2						
Negative control	0	100.0	37.7±8.6	35.4±6.4	2.3±4.8	30.0±5.7
Ivabradine	100	109.6	29.8±6.9	28.1±6.3	1.7±3.4	18.0±8.5
Hydrochloride	180	90.4	35.4±8.6	33.5±7.3	2.0±4.4	19.0±4.2
	300	76.2	40.5±11.0	36.7±8.2	3.9±7.0	32.0±0.0
	400	82.6	34.0±8.2	30.8±6.7	3.3±5.7	36.0±17.0
	550	54.2	37.2±11.3	28.8±8.7	8.3±8.1	60.0±2.8
N-Acetylaminofluorene	0.2	nd	40.3[a]±13.1	11.6[a]±5.6	28.8[a]±19.9	100.0[b]±0.0

NGC: Nuclear grain count (number of grains over the nucleus)
CGC: Cytoplasmic grain count from 3 nuclear-sized areas adjacent to the nucleus
NNGC: Net nuclear grain count (nuclear grain count minus number of grains in 3 equivalent areas of cytoplasm)
% IR: Percentage of cells in repair (with NNGC ≥5)
a: Number of counted nuclei: assay 1: 3 (1st culture) and 27 (2nd culture), assay 2: none (1st culture) and 3 (2nd culture) (cells with nuclear grain counts >50 excluded)
b: All cell nuclei in repair

2.6.7.8E　　培養ヒトリンパ球を用いた染色体異常試験　　被験物質：イバブラジン塩酸塩

Report Title: Toxicity study on S 16257-2: *In vitro* genetic toxicology study for the detection of chromosome aberrations on cultured human lymphocytes

Test Article: Ivabradine hydrochloride

Report No.: NP05576

Test for Induction of: Chromosome aberrations in mammalian cells

No of independent assays: 2 (without S9) or 3 (with S9)

Location in CTD: 4.2.3.3.1-5

GLP compliance: Yes

Strains: Human peripheral blood lymphocytes (one healthy volunteer per sex)

No of replicate cultures: 2

Date of treatment: [redacted]-19[redacted]

Metabolising system: Aroclor-1254-induced rat liver S9, 1% (v/v)

No of cells analyzed/culture: 1000 (cytotoxicity assay) or 100 (metaphase analysis)

Vehicles for: **Test article:** RPMI 1640

Positive controls: 0.9% (m/v) sodium chloride solution

Treatment (recovery): Without S9: 24 h (1st assay) [4 h]; with S9: 2 h [24 h (1st and 3rd assays) or 18 h (2nd assay)]

Special features:
- Concentrations of Ivabradine Hydrochloride expressed as salt in the study report (conversion factor: 0.928).
- *In vitro* metabolism determined in additional cultures with 487 or 1670 µg/mL of [14C] labeled Ivabradine without (24 h treatment) or with (2 h treatment) metabolic activation.
- Expert-review [Report NP08409, Section 4.2.3.3-1]

Cytotoxic effects: Reduction of mitotic index: approximately -50% at 116 µg/mL without metabolic activation and at 1670 µg/mL with metabolic activation

Genotoxic effects: Statistically significant non-concentration-related and non-reproducible increase in the number of cells with structural aberrations [only observed at the lowest concentrations, i.e. 46 µg/mL without metabolic activation (characterised by exchange figures) and 487 and 882 µg/mL with metabolic activation (characterised by deletions and pulverised chromosomes likely related to cytotoxicity)].

***In vitro* metabolism:** Similar qualitative metabolite profile without or with metabolic activation (ONO-IN-306 = M29 and four other metabolites) [the correspondence between metabolite coding system (Mx), laboratory code and chemical name is given in 2.6.5.5.10].

RPMI 1640 is the reference of the treatment medium

2.6.7.8E 培養ヒトリンパ球を用いた染色体異常試験 試験番号：NP05576（続き）

Metabolic activation	Treatment duration (recovery)	Test article	Concentration (µg/mL)	Cytotoxicity[a] (mean reduction %, vs. vehicle control)	Cells with structural aberrations[b] (mean%, sex pooled)	Structural aberrations[b] (mean%, sex pooled)
Assay 1						
Without	24 h	Negative control	0	0	2	2.5
	(4 h)	Ivabradine	46	-14	3 (M: 5)	3
		Hydrochloride	79	-41	1	1
			116	-52	1.5	2
			139	-70	nd	nd
		Bleomycin	250	-26	32 (M:37**; F:27**)	76.5
With	2 h	Negative control	0	0	1	1
	(24 h)	Ivabradine	260	-17	nd	nd
		Hydrochloride	487	-26	3 (M:3*)	4.5
			882	-12	3.5 (M:5**)	3.5
			1670	-37	2	2.5
		Cyclophosphamide	17.5	-51	10.5 (M:14**)	10.5

M: Male donor, F: Female donor
a: Based on mitotic index
b: Excluding gaps
**: p<0.05, **: p<0.01 (likelihood ratio test/vs. negative control)*

2.6.7.8E 培養ヒトリンパ球を用いた染色体異常試験 試験番号：NP05576（続き）

Metabolic activation	Treatment duration (recovery)	Test article	Concentration (µg/mL)	Cytotoxicity[a] (mean reduction %, vs. vehicle control)	Cells with structural aberrations[b] (mean%, sex pooled)	Structural aberrations[b] (mean%, sex pooled)
Assay 2						
Without	24 h	Negative control	0	0	1	1
	(4 h)	Ivabradine	46	-10	3.5 (F:6**)	3.5
		Hydrochloride	79	-25	3.5 (F:4*)	3.5
			116	-58	2	2
		Bleomycin	250	-41	23 (M:25**; F:21**)	35.5
With	2 h	Negative control	0	0	1	1
	(18 h)	Ivabradine	487	-33	0	0
		Hydrochloride	882	-46	2.5	2.5
			1670	-52	1.5	1.5
			2088	-66	nd	nd
		Cyclophosphamide	12.5	-62	11.5 (M:11**, F:12**)	12
Assay 3						
With	2 h	Negative control	0	0	0.5	0.5
	(24 h)	Ivabradine	487	-5	2.5	2.5
		Hydrochloride	882	-3	4	4
			1670	-27	0.5	0.5
		Cyclophosphamide	17.5	-21	13 (M:11**, F:15**)	16

M: Male donor, F: Female donor
a: Based on mitotic index
b: Excluding gaps
**: p<0.05, **: p<0.01 (likelihood ratio test vs. negative control)*

2.6.7.9 *In vivo* 遺伝毒性試験

2.6.7.9A ラットを用いた不定期 DNA 合成試験

被験物質：イバブラジン塩酸塩

Report Title: S 16257-2: Measurement of unscheduled DNA synthesis in rat liver using an in vivo/in vitro procedure

Test Article: Ivabradine hydrochloride

Test for Induction of: Primary DNA damage in mammalian cells

Treatment schedule: Single dose

Sampling times: 2-4 h and 12-14 h after dosing

Report No.: NP05409

Location in CTD: 4.2.3.3.2-1

Species/strain: Rat/Wistar

Cells evaluated: Primary hepatocytes

GLP compliance: Yes

Age: 6-7 weeks (M); 7-8 weeks (F)

No. of cells analyzed/animal: 100

Date of start of experimentation: [redacted]-19[redacted]

Method of administration:
- Ivabradine Hydrochloride: Oral (gavage, 20 mL/kg) at 278 or 928 mg/kg (M) and 181 or 603 mg/kg (F)
- N-acetylaminofluorene: Oral (gavage, 10 mL/kg) at 75 mg/kg
- Dimethylnitrosamine: Oral (gavage, 10 mL/kg) at 10 mg/kg

Vehicle/formulation:
- Ivabradine Hydrochloride: Purified water/solution
- N-acetylaminofluorene: Corn oil/suspension
- Dimethylnitrosamine: Purified water/solution

Special features:
- Preliminary dose-range finding assay conducted at 166, 255, 392, 603 or 928 mg/kg.
- Plasma and liver drug determinations [Ivabradine and ONO-IN-306 (N-desmethylated metabolite)] on satellite groups of 3 rats/sex/group/time, approximately 2 and 12 h after dosing.
- No statistical analysis.
- Doses of Ivabradine Hydrochloride expressed as salt in the study report (conversion factor: 0.928).
- Expert-review [Report NP08409, Section 4.2.3.3-1]

Toxic/cytotoxic effects:
- Deaths at 928 (M) and 603 (F) mg/kg
- Closed eyes, lethargy, unsteady gait, tremor, irregular breathing, ataxia and/or vocalisation at 928 (M) and 603 (F) mg/kg

Genotoxic effects: None

Evidence of exposure: Mean plasma (ng/mL) and liver (ng/g) Ivabradine and ONO-IN-306 concentrations approximately 2 and 12 h after dosing (n=3/gender/dose):

		Ivabradine				ONO-IN-306			
		M		F		M		F	
Dose (mg/kg)		**278**	**928**	**181**	**603**	**278**	**928**	**181**	**603**
Plasma	C2h	810	3400	2100	6300	42	190	34	70
	C12h	600	1300	1200	29000	44	130	22	420
Liver	C2h	10000	48000	28000	59000	640	2900	750	1500
	C12h	9400	17000	11000	421000	760	1800	360	13000

2.6.7.9A ラットを用いた不定期 DNA 合成試験 試験番号：NP05409（続き）

Test article	Dose (mg/kg)	No. of animals	Sampling time (h)	NGC mean ± SD	CGC mean ± SD	NNGC mean ± SD	% IR mean ± SD	NGIR mean ± SD
Males								
Vehicle	0	3	12-14	2.20±0.19	3.55±0.37	-1.3±0.2	1.0±1.0	6.8±0.8
		3	2-4	2.86±0.37	4.03±0.37	-1.2±0.1	0.3±0.6	5.7±0.0
Ivabradine Hydrochloride	278	3	12-14	2.49±0.53	4.08±0.49	-1.6±0.4	1.3±1.5	5.7±0.9
		3	2-4	3.06±0.10	4.77±0.10	-1.7±0.0	0.3±0.6	6.7±0.0
	928	3	12-14	2.61±0.97	4.19±0.96	-1.6±0.4	0.3±0.6	5.0±0.0
		3	2-4	3.18±0.64	5.13±1.05	-2.0±0.5	0.3±0.6	5.0±0.0
N-Acetylaminofluorene	75	3	12-14	19.51±2.62	6.55±1.33	13.0±1.6	89.0±3.5	14.1±1.5
Dimethylnitrosamine	10	3	2-4	14.03±0.68	2.86±0.30	11.2±0.6	87.0±1.7	12.4±0.7
Females								
Vehicle	0	3	12-14	2.28±0.72	3.53±0.48	-1.3±0.2	1.7±1.5	5.4±0.1
		3	2-4	2.85±1.07	4.11±0.37	-1.3±0.7	1.3±2.3	7.4±0.0
Ivabradine Hydrochloride	181	3	12-14	2.24±0.66	3.78±0.07	-1.5±0.7	1.0±1.7	7.2±0.0
		3	2-4	2.05±0.05	3.45±0.81	-1.4±0.8	1.7±2.1	8.1±3.0
	603	3	12-14	3.22±0.90	4.78±0.61	-1.6±0.3	0.7±0.6	5.5±0.7
		3	2-4	2.04±0.59	3.82±0.51	-1.8±0.3	0.3±0.6	5.7±0.0
N-Acetylaminofluorene	75	3	12-14	14.21±1.51	5.05±1.54	9.2±0.1	81.3±4.0	10.5±0.3
Dimethylnitrosamine	10	3	2-4	12.79±0.89	2.73±0.40	10.1±0.9	84.0±1.0	11.4±1.0

NGC: Nuclear grain count (number of grains over the nucleus)
CGC: Cytoplasmic grain count from 3 nuclear-sized areas
NNGC: Net nuclear grain count (nuclear grain count minus number of grains in 3 equivalent areas of cytoplasm)
% IR: Percentage of cells in repair (with ≥ 5 NNG)
NGIR: Net grain count of cells in repair

2.6.7.9B　　ラットを用いた染色体異常試験　　被験物質：イバブラジン塩酸塩

Report Title: S 16257-2: induction of chromosome aberrations in the bone marrow of treated rats

Test for Induction of: Chromosome aberrations in rat bone marrow

Treatment schedule: Single dose

Test Article: Ivabradine hydrochloride

Report No.: NP05504

Location in CTD: 4.2.3.3.2-2

GLP compliance: Yes

Species/strain: Rat/Wistar

Age: 6-7 weeks (M); 8-9 weeks (F)

Cells evaluated: Femoral bone marrow cells

No. of cells analyzed/animal:

- 1000 cells for mitotic index
- 100 cells for metaphase analysis

Sampling times: 18 h (all groups) and 42 h (vehicle and high dose of Ivabradine Hydrochloride) after dosing

Date of start of experimentation: [redacted]-19[redacted]

Method of administration:

- Ivabradine Hydrochloride: Oral (gavage, 20 mL/kg) at 232, 464 or 928 mg/kg (M) and 151, 302 or 603 mg/kg (F)
- Cyclophosphamide: Oral (gavage, 10 mL/kg) at 40 mg/kg

Vehicle/formulation:

- Ivabradine Hydrochloride: Purified water/solution
- Cyclophosphamide: 0.9% (w/v) sodium chloride solution/solution

Special features:

- Five males and/or five females analyzed per group and/or per sampling time.
- Toxicokinetics [Ivabradine and ONO-IN-306 (N-desmethylated metabolite)] on satellite groups of 2 animals/sex/group/time, approximately 10 min and 2 h after dosing.
- Doses of Ivabradine Hydrochloride expressed as salt in the study report (conversion factor: 0.928).
- Expert-review [Report NP08409, Section 4.2.3.3-1]

Toxic/cytotoxic effects:

- Deaths at 928 (M) and 603 mg/kg (F).
- Closed eyes, lethargy, unsteady gait, tremor and/or ataxia at 928 (M) and 603 (F) mg/kg.
- Mitotic index: No relevant changes (vs. controls).

Genotoxic effects: None

Evidence of exposure: Plasma Ivabradine and ONO-IN-306 concentrations (ng/mL) 10 min and 2 h after dosing (n=2/gender/dose, individual values):

	Ivabradine						ONO-IN-306					
	M			F			M			F		
Dose (mg/kg)	**232**	**464**	**928**	**151**	**302**	**603**	**232**	**464**	**928**	**151**	**302**	**603**
C10min[a]	1360	4000	9100	4200	3450	18000	58	135	390	64	60	270
C2h[a]	755	1200	6350	3000	10000[b]	4850	9	56	225	19	100[b]	nd

a: Mean values not specified in study report and calculated from individual data
b: One sample missing

2.6.7.9B　　ラットを用いた染色体異常試験　　試験番号：NP05504（続き）

Treatment duration (recovery)	Test article	Dose (mg/kg)	Cytotoxicity[a] (mean % vs vehicle control)		Cells with structural aberrations[b] (mean%)		Structural Aberrations[b] (mean%)		Numerical aberrations[c] (mean%)	
			Sampling Time		Sampling Time		Sampling Time		Sampling Time	
			18h	42h	18h	42h	18h	42h	18h	42h
Males										
Single dose (18 h or 42 h after dosing)	Vehicle	0	0	0	0	1	0	1	0.6	0.4
	Ivabradine Hydrochloride	232	+68	np	0.4	np	0.4	np	0.4	np
		464	+107	np	0.2	np	0.4	np	0.6	np
		928	+54	+60	0.4	0*, #	0.4	0	0.6	0.4
	Cyclophosphamide	40	-81	np	41.1***	np	84.3	np	2.0	np
Females										
Single dose (18 h or 42 h after dosing)	Vehicle	0	0	0	0 ┐	0.6	0	0.6	1.0	1.2
	Ivabradine Hydrochloride	151	-7	np	0 ├ ##	np	0	np	0.6	np
		302	+4	np	0.2 ┘	np	0.2	np	0.6	np
		603	-34	-7	0.6	0.4	0.6	0.4	0.6	0.8
	Cyclophosphamide	40	-83	np	55.8***	np	106	np	2.3	np

a: Based on mitotic index
b: Excluding gaps
c: Including endoreduplicated, hyperdiploid and polyploid
**: p<0.05 and ***: p<0.001 (heterogeneity χ2 test)*
#: p<0.05 and ##: p<0.01 (linear trend test)

2.6.7.9C　　マウスを用いた小核試験　　被験物質：イバブラジン塩酸塩

Report Title: Mutagenicity study using the Micronucleus Test in mice with S 16257-02

Test Article: Ivabradine hydrochloride
Report No.: NP03141
Location in CTD: 4.2.3.3.2-3
GLP compliance: Yes
Date of treatment: [redacted]-19[redacted]

Test for Induction of: Bone marrow micronuclei
Species/strain: Mice/OF1
Age: 5 to 6 weeks

Treatment schedule: Single dose
Sampling times: 24 h (all groups) and 48 h (Ivabradine Hydrochloride groups) after dosing

Cells evaluated: PCE and NCE in femoral bone marrow
No. of cells analyzed/animal:
- 1000 cells for PCE/NCE ratio
- 2000 cells for presence of micronuclei in PCE

Method of administration:
- Ivabradine Hydrochloride: Oral (gavage, 25 mL/kg) at 116, 232 or 464 mg/kg
- Cyclophosphamide: Intraperitoneal (25 mL/kg) at 50 mg/kg

Vehicle/formulation: Distilled water/solution

Special features:
- Preliminary assay for determination of maximum non-lethal dose conducted at 7.4 to 1856 mg/kg
- Ten (10) animals (5 males and 5 females) per group analyzed
- No toxicokinetics
- Doses of Ivabradine Hydrochloride expressed as salt in the study report (conversion factor: 0.928)
- Expert-review [Report NP08409, Section 4.2.3.3-1]

Toxic/cytotoxic effects:
- No death (minimal lethal dose was 742 mg/kg in the preliminary assay, in both sexes)
- Statistically significant decrease of the relative proportion of PCE/NCE at ≥116 mg/kg (48 h)

Genotoxic effects: None

Evidence of exposure: Significant and dose-related decrease in PCE/NCE ratio in Ivabradine Hydrochloride groups compared to controls 48 h after dosing

PCE: Polychromatic Erythrocytes
NCE: Normochromatic Erythrocytes

2.6.7.9C　　マウスを用いた小核試験　　試験番号：NP03141（続き）

Test article	Dose (mg/kg)	No. of animals	Mean PCE/NCE ratio (± SD)		Mean MN-PCE[a] (± SD)	
			24h	48h	24h	48h
Vehicle	0	5M	1.93 (±0.52)	2.93 (±0.53)	1.80 (±0.45)	2.20 (±1.30)
		5F	2.78 (±0.45)	3.08 (±0.96)	1.80 (±1.79)	1.80 (±1.10)
Ivabradine Hydrochloride	116	5M	3.38 (±0.63)	2.61 (±0.41) *	2.00 (±0.71)	0.80 (±0.84) *
		5F	2.50 (±0.38)	2.55 (±0.20)	2.20 (±1.79)	1.00 (±1.00)
	232	5M	2.31 (±0.15)	2.71 (±0.78) *	1.00 (±0.71)	1.00 (±1.00) *
		5F	2.72 (±0.53)	2.09 (±0.27)	3.60 (±1.14)	0.80 (±0.45)
	464	5M	1.98 (±0.38)	2.01 (±0.33) ***	1.80 (±1.92)	1.60 (±1.14)
		5F	1.84 (±0.59)	2.10 (±0.24)	0.80 (±0.84)	1.00 (±0.00)
Cyclophosphamide	50	5M	1.96 (±0.42) **	np	56.60 (±16.23) **	np
		5F	1.05 (±0.18)	np	41.00 (±15.13)	np

PCE: Polychromatic Erythrocytes
NCE: Normochromatic Erythrocytes
MN-PCE: Micronucleated PCE
a: For 2000 PCEs
*For PCE/NCE ratios (statistical analysis performed on sex pooled): *: p≤0.05, **: p<0.01, ***: p<0.001 (Student t test).*
*For MN-PCE (statistical analysis performed on sex pooled): *: p≤0.05, **: p<0.01 (Mann Whitney U test).*

2.6.7.10 がん原性試験

2.6.7.10A マウスにおける 4 週間混餌投与による用量設定試験 被験物質：イバブラジン塩酸塩

Species/ strain	Method of administration (vehicle/ formulation)	Duration of treatment	Doses (mg/kg/d)	Gender and No. per group	NOAEL (mg/kg/d)	Noteworthy findings	Report number
Mice/ Crl:CD-1 (ICR)BR	Diet	4 weeks	0, 30, 300	10M/10F [+9M/9F for toxicokinetics]	Not specified	- No treatment-related deaths or changes in appearance and behavior. - Bodyweight gain: occasional decrease [≥30 (M)] but similar bodyweights at termination. - Food consumption: slightly lower during first week of dosing (≥30). - Increased heart [≥30] and liver weights [M: 300, F: ≥30]. - No treatment-related macroscopic or histopathological findings. - Toxicokinetics (Day 29, n=3/gender/dose/sampling time):	NP05454

Dose (mg/kg/d)	Cmax (ng/mL)		AUC24 (ng.h/mL)	
	M	F	M	F
	Ivabradine			
30	102	40	1400	430
300	587	858	6700	7700
	ONO-IN-306			
30	20	7.1	290	nd
300	165	186	nd	nd

Conclusion: no evidence of palatability problems. Only minimal toxicity and AUC's were 19 (males) and 22 (females) times higher than AUC in patients at HTD. Therefore appropriate to investigate the effects of a higher dose in the subsequent 13-week study.

2.6.7.10B　　マウスにおける 13 週間混餌投与による用量設定試験　　被験物質：イバブラジン塩酸塩

Species/ strain	Method of administration (vehicle/ formulation)	Duration of treatment	Doses (mg/kg/d)	Gender and No. per group	NOAEL (mg/kg/d)	Noteworthy findings	Report number
Mice/ Crl:CD-1 (ICR)BR	Diet	13 weeks	0, 30, 100, 300, 600	10M/10F [+16M/16F for toxicokinetics]	30 (M) 100 (F)	- No treatment-related deaths or changes in appearance and behavior. - Decreased bodyweight gain over the dosing period [≥100 (M): -24% to -45% vs. controls, 600 (F): -16% vs. controls]. - Decreased bodyweight at the end of dosing period [≥100 (M) without dose-relationship: -9% to -14% vs. controls, 600 (F): -3% vs. controls]. - No effect on food consumption. - Increased alkaline phosphatase [≥300 (M)], increased bilirubin [≥300 (F), ≥100 (M)]. - Heart: increased heart weight (≥30); hypertrophy of muscle fibers in ventricular walls [30, 300 or 600 (M), 600 (F)]. - Toxicokinetics (Week 13, n=4/gender/dose/sampling time):	NP06393

Dose	Cmax (ng/mL)		AUC24 (ng.h/mL)	
(mg/kg/d)	M	F	M	F
	Ivabradine			
30	144	115	2277	1477
100	490	394	5910	5296
300	959	1201	12643	16681
600	1998	1834	26786	28862
	ONO-IN-306			
30	31	16	599	nd
100	123	64	1670	1080
300	302	242	4421	3352
600	651	427	9992	6244

Conclusion: In view of the toxicological and exposure findings, it was considered that the highest dose for the carcinogenicity study should be set at ≥300 mg/kg/d.

2.6.7.10C　　マウスにおける 104 週間混餌投与によるがん原性試験　　被験物質：イバブラジン塩酸塩

Report Title: S 16257-2: Potential tumorigenic effects in prolonged dietary administration to mice
Species/Strain: Mice / Crl:CD-1(ICR)BR
Duration of treatment: 104 Weeks (male mice from high dose group: killed in Week 94)
Initial Age: 5 weeks
Method of Administration: Diet
Date of first dose: [redacted]
Vehicle/formulation: Diet
Treatment of controls: Rodent drug-free diet
Test Article: Ivabradine hydrochloride
Report No.: NP07944
Location in CTD: 4.2.3.4.1-3
TK report No.: NP07946
Location in CTD: 4.2.3.4.1-4
GLP compliance: Yes

Basis for high-dose selection: Toxicity-based endpoint.

Special features:
- The 405 mg/kg/d dose level was reduced to 180 mg/kg/d in Week 81 due to a higher than expected mortality rate.
- Satellite TK groups (26/gender/dose) bled in Weeks 13, 26, 52, 80 and 104 [or 93 for high-dose males] (n=6/gender/dose/sampling time).

Conclusion:
- No evidence of tumorigenic potential up to 405/180 mg/kg/d (high dose appropriate by virtue of toxicity and exposure levels equivalent to high multiples of AUC in patients at HTD)
- NOAEL (general toxicity) set at 20 mg/kg/d in males and not determined in females.

Dose (mg/kg/d)		**0 (control)**		**0 (control)**		**20**		**90**		**405/180[a]**	
Number of animals (main groups)		M: 50	F: 50	M: 50	F: 50	M: 50	F: 50	M: 50	F: 50	M: 50[b]	F: 50
Number of animals (satellite groups)		M: 0	F: 0	M: 0	F: 0	M:26	F: 26	M:26	F: 26	M:26[b]	F: 26
Toxicokinetics – Ivabradine:											
Week 13	Cmax (ng/mL)					120	99	606	380	1534	1544
	AUC24 (ng.h/mL)					2112	1789	9588	7277	29195	27410
Week 26	Cmax (ng/mL)					113	92	486	375	2884	2444
	AUC24 (ng.h/mL)					1940	1641	9208	6669	38898	40762
Week 52	Cmax (ng/mL)					118	103	478	493	1482	2062
	AUC24 (ng.h/mL)					1782	2037	7827	8109	25469	36980
Week 80	Cmax (ng/mL)					72	83	359	421	1290	2232
	AUC24 (ng.h/mL)					1182	1845	6802	7348	25022	43160
Week 104	Cmax (ng/mL)					47	78	380	526	425[c]	1085[c]
	AUC24 (ng.h/mL)					730	1189	6010	8670	7920[c]	14331[c]

a: Dosage level lowered to 180 mg/kg/d from Week 81
b: Due to high mortality rate, the male high dosage group was terminated in Week 94
c: Only 2 or 3 males and 3 females per group were sampled

2.6.7.10C　　マウスにおける 104 週間混餌投与によるがん原性試験　　試験番号：NP07944（続き）

Dose (mg/kg/d)		**0 (control)**		**0 (control)**		**20**		**90**		**405/180[a]**	
Number of animals (main groups)		M: 50	F: 50	M: 50	F: 50	M: 50	F: 50	M: 50	F: 50	M: 50	F: 50
Number of animals (satellite groups)		M: 0	F: 0	M: 0	F: 0	M:26	F: 26	M:26	F: 26	M:26	F: 26
Toxicokinetics – ONO-IN-306:											
Week 13	Cmax (ng/mL)					21	14	138	69	593	364
	AUC24 (ng.h/mL)					387	244	2318	1314	10832	6710
Week 26	Cmax (ng/mL)					25	14	127	62	1143	724
	AUC24 (ng.h/mL)					417	222	2329	1109	13819	8469
Week 52	Cmax (ng/mL)					33	15	112	76	516	329
	AUC24 (ng.h/mL)					373	225	1787	1208	8372	5407
Week 80	Cmax (ng/mL)					17	11	103	73	413	433
	AUC24 (ng.h/mL)					258	181	1813	1210	9164	7033
Week 104	Cmax (ng/mL)					11	7.5	95	66	blq	181
	AUC24 (ng.h/mL)					172	140	1406	1179	nd	nd
Number of animals:											
At start		50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
Found dead / Killed in extremis		27[b]	30	28	21	29	28[b]	30	27	40	38
Terminal kill		22	20	22	29	21	21	20	23	10	12
Survival (%)		46	40	44	58	42	44	40	46	20	24
Bodyweight gain[c]											
(% of combined controls)											
Day 1-Week 68		24.1 g/mouse	21.5 g/mouse	24.7 g/mouse	21.7 g/mouse	-4.5	-16*	+8.2	-23**	-32**	-31**
Day 1-Week 80		22.7 g/mouse	21.1 g/mouse	24.0 g/mouse	20.7 g/mouse	-6.0	-7.7	+4.3	-21*	-36**	-33**
Day 1-Week 104		20.3 g/mouse	20.8 g/mouse	17.9 g/mouse	18.6 g/mouse	+5.2	-14	+0.5	-24	nd	-13
Bodyweight[c]											
(% of combined controls)	Week 104	52 g	44 g	48 g	44 g	+0.0	-6.8	+0.0	-11	-14[d]	-6.8
Food consumption[c]											
(% of combined controls)											
Weeks 1-80		3821 g/mouse	3608 g/mouse	3949 g/mouse	3527 g/mouse	+1.9	+1.3	-3.8	-4.7	-9.4	+0.6
Weeks 1-104		4975 g/mouse	4672 g/mouse	5043 g/mouse	4637 g/mouse	+0.2	+1.0	-5.1	-8.4	nd	+3.6

a: Dosage level lowered to 180 mg/kg/d from Week 81

b: One control male and one female given 20 mg/kg/d were found dead in Week 105 (period of the terminal kill)

c: For controls, group means are shown. For treated groups, percent differences from combined controls (i.e. mean of both control values in each gender group) are shown

d: Week 93

**: p<0.05, **: p<0.01 (vs. combined controls)*

2.6.7.10C　　マウスにおける 104 週間混餌投与によるがん原性試験　　試験番号：NP07944（続き）

Dose (mg/kg/d)		0 (control)		0 (control)		20		90		405/180[a]	
Number evaluated (decedent and terminal)		M: 50	F: 50	M: 50	F: 50	M: 50	F: 50	M: 50	F: 50	M: 50	F: 50
Number of animals with neoplastic lesions:		39	33	39	37	32	36	31	31	20	24
Adrenal glands	Examined	46	50	50	50	31	30	49	50	48	50
Cortical adenoma (B)		0	0	2	0	2	0	2	0	1	0
Cortical adenoma – fusiform type (B)		0	0	0	0	1	1	0	0	0	0
Pheochromocytoma (B)		0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Malignant pheochromocytoma (M)		0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
Bone	Examined	1	0	0	1	1	2	0	0	0	0
Osteoma (B)		1	0	0	0	0	2	0	0	0	0
Brain	Examined	50	50	50	50	29	29	50	50	50	50
Malignant schwannoma (M)		0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
Mixed glioma (M)		0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
Cervix	Examined		50		50		31		49		50
Fibroma (B)			0		1		0		0		0
Granular cell tumor (B)			1		0		0		0		0
Malignant granular cell tumor (M)			0		0		1		0		0
Cervical polyp (B)			1		1		0		2		0
Schwannoma (M)			1		0		0		0		0
Colon	Examined	50	0	50	0	29	0	49	0	50	0
Adenocarcinoma (M)		0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
Duodenum	Examined	50	0	50	0	29	0	48	0	49	0
Osteosarcoma (M)		1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Femur/Joint	Examined	0	50	0	50	0	29	0	50	0	50
Osteosarcoma (M)		0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Bone marrow – hemangiosarcoma (M)		0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Bone marrow – hemangioma (B)		0	0	0	0	0	0	0	1	0	0

(M): Malignant, (B): Benign
a: Dosage level lowered to 180 mg/kg/d from Week 81

2.6.7.10C　　マウスにおける 104 週間混餌投与によるがん原性試験　　試験番号：NP07944（続き）

Dose (mg/kg/d)		0 (control)		0 (control)		20		90		405/180[a]	
Number evaluated (decedent and terminal)		M: 50	F: 50	M: 50	F: 50	M: 50	F: 50	M: 50	F: 50	M: 50	F: 50
Number of animals with neoplastic lesions: (Cont'd)		39	33	39	37	32	36	31	31	20	24
Harderian gland	Examined	50	50	50	50	30	29	50	50	50	50
Adenoma (B)		8	0	3	4	2	2	6	3	3	5
Adenocarcinoma (M)		0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
Head	Examined	0	3	1	2	2	2	4	2	1	1
Osteosarcoma (M)		0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
Zymbal's gland – sebaceous squamous cell carcinoma (M)		0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Fibrosarcoma (M)		0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Hibernating Gland	Examined	4	0	4	0	6	0	7	0	1	0
Hibernoma (B)		2	0	3	0	4	0	4	0	1	0
Kidneys	Examined	50	0	50	0	38	0	50	0	50	0
Tubular cell adenoma (B)		0	0	0	0	1	0	1	0	0	0
Tubular cell carcinoma (M)		0	0	2	0	1	0	0	0	0	0
Mesenchymal tumor (M)		0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Liver	Examined	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
Hepatocellular adenoma (B)		16	3	13	3	15	1	10	1	1	1
Hepatocellular carcinoma (M)		4	0	11	0	2	0	1	0	1	0
Cholangiocarcinoma (M)		0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
Hemangioma (B)		1	0	1	0	2	2	1	1	1	0
Lungs	Examined	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
Bronchiolar-alveolar adenoma (B)		12	8	11	5	7	7	10	9	10	6
Bronchiolar-alveolar carcinoma (M)		7	2	3	2	6	1	4	5	0	1

(M): Malignan, (B): Benign
a: Dosage level lowered to 180 mg/kg/d from Week 81

2.6.7.10C　　マウスにおける 104 週間混餌投与によるがん原性試験　　試験番号：NP07944（続き）

Dose (mg/kg/d)		0 (control)		0 (control)		20		90		405/180[a]	
Number evaluated (decedent and terminal)		M: 50	F: 50	M: 50	F: 50	M: 50	F: 50	M: 50	F: 50	M: 50	F: 50
Number of animals with neoplastic lesions: (Cont'd)		39	33	39	37	32	36	31	31	20	24
Lymphoid multicentric tumours	Examined	10	10	10	18	4	19	4	12	7	14
Pleomorphic lymphoma (M)		2	4	2	5	2	2	2	2	1	5
Lymphoblastic/lymphocytic lymphoma (M)		2	5	5	11	2	9	2	8	3	6
Immunoblastic lymphoma (M)		1	0	1	0	0	0	0	0	0	0
Myeloid leukemia (M)		0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
Mast cell tumor (M)		0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Histiocytic sarcoma (M)		5	1	1	2	0	8	0	2	2	3
Mammary glands	Examined	0	50	0	50	0	32	0	50	0	50
Adenoma (B)		0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
Adenocarcinoma (M)		0	2	0	2	0	4	0	1	0	0
Ovaries	Examined		50		50		48		49		50
Cystadenoma (B)			1		1		2		1		1
Granulosa cell tumor (B)			0		1		0		0		1
Malignant granulosa cell tumor (M)			0		1		0		0		0
Luteoma (B)			0		2		2		1		0
Leiomyosarcoma – fallopian tube (M)			0		0		0		0		1
Leiomyoma – fallopian tube (B)			0		1		1		0		0
Pancreas	Examined	50	50	50	50	29	29	50	50	50	50
Islet cell adenoma (B)		0	0	2	0	0	0	0	0	0	0
Leiomyoma (B)		0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
Pituitary gland	Examined	47	50	50	50	28	30	46	47	47	47
Adenoma – pars distalis (B)		0	0	1	2	0	0	1	4	0	0
Adenoma – pars intermedia (B)		1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Preputial glands	Examined	50		49		43		47		49	
Hemangioma (B)		0		0		2		0		0	
Skeletal muscle	Examined	0	3	0	2	0	1	2	0	2	1
Hemangiosarcoma (M)		0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
Osteosarcoma (M)		0	0	0	1	0	0	0	0	0	0

(M): Malignant, (B): Benign
a: Dosage level lowered to 180 mg/kg/d from Week 81

2.6.7.10C　　マウスにおける 104 週間混餌投与によるがん原性試験　　試験番号：NP07944（続き）

Dose (mg/kg/d)		0 (control)		0 (control)		20		90		405/180[a]	
Number evaluated (decedent and terminal)		M: 50	F: 50	M: 50	F: 50	M: 50	F: 50	M: 50	F: 50	M: 50	F: 50
Number of animals with neoplastic lesions: (Cont'd)		39	33	39	37	32	36	31	31	20	24
Skin	Examined	6	0	12	0	7	0	6	0	5	0
Squamous cell carcinoma (M)		0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Fibroma (B)		1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Fibrosarcoma (M)		0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
Spleen	Examined	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
Hemangioma (B)		0	1	0	0	0	0	0	1	0	0
Hemangiosarcoma (M)		0	1	0	1	0	0	2	0	0	0
Sternum/bone marrow	Examined	0	50	0	50	0	29	0	50	0	50
Osteoma (B)		0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Stomach	Examined	50	50	50	50	33	32	49	50	50	50
Squamous cell papilloma (B)		1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Squamous cell carcinoma (M)		1	0	0	0	0	0	0	1	0	0
Osteosarcoma (M)		0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Subcutis	Examined	4	6	4	4	4	8	5	3	5	2
Fibrosarcoma (M)		0	2	0	2	2	0	2	1	1	0
Rhabdomyosarcoma (M)		0	0	0	0	1	1	0	0	0	0
Osteosarcoma (M)		1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tail	Examined	3	2	4	1	1	1	4	2	2	0
Fibrosarcoma (M)		0	0	0	0	0	0	1	1	0	0
Fibroma (B)		0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
Testes	Examined	50		50		37		50		50	
Interstitial cell adenoma (B)		2		1		1		1		0	
Schwannoma (M)		0		0		0		0		1	
Hemangioma (B)		0		1		0		1		0	
Thyroid gland	Examined	0	49	0	50	0	30	0	50	0	49
Follicular cell carcinoma (M)		0	0	0	0	0	1	0	0	0	0

(M): Malignant, (B): Benign

a: Dosage level lowered to 180 mg/kg/d from Week 81

2.6.7.10C　　マウスにおける 104 週間混餌投与によるがん原性試験　　試験番号：NP07944（続き）

Dose (mg/kg/d)	0 (control)		0 (control)		20		90		405/180[a]	
Number evaluated (decedent and terminal)	M: 50	F: 50	M: 50	F: 50	M: 50	F: 50	M: 50	F: 50	M: 50	F: 50
Number of animals with neoplastic lesions: (Cont'd)	39	33	39	37	32	36	31	31	20	24
Tibia Examined	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Hemangiosarcoma (M)	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Uterus Examined		50		50		49		50		50
Endometrial polyp (B)		2		6		4		5		2
Endometrial stromal cell sarcoma (M)		0		1		0		0		0
Leiomyoma (B)		2		3		4		1		0
Leiomyosarcoma (M)		2		2		0		1		0
Hemangioma (B)		3		2		2		0		0
Vagina Examined		50		49		29		49		50
Fibrosarcoma (M)		0		0		0		0		1
Noteworthy findings										
Gross pathology (all animals):										
Heart										
Enlargement	2	0	4	0	2	0	7	1	22	18
Left atrium: thrombus	2	0	6	0	1	1	3	0	23	10
Ventricle(s): pale areas	0	0	3	0	0	0	2	0	1	5
Mediastinal lymph nodes										
Enlargement	3	3	0	1	1	3	1	2	5	7
Gross pathology (decedent animals):										
Examined	28	30	28	21	29	29	30	27	40	38
Heart										
Atrium: pale areas	1	0	0	0	0	0	2	0	5	0
Lungs										
Congested	7	5	4	1	6	9	5	7	17	18
Edematous	0	0	1	1	2	0	0	0	4	6
Adipose tissue										
Minimal	7	8	7	6	8	11	16	9	17	17
Thoracic cavity										
Contained fluid	2	2	2	0	2	6	2	2	10	15

(M): Malignant, (B): Benign

a: Dosage level lowered to 180 mg/kg/d from Week 81

2.6.7.10C　　マウスにおける 104 週間混餌投与によるがん原性試験　　試験番号：NP07944（続き）

Dose (mg/kg/d)		0 (control)[1]		0 (control)[2]		20		90		405/180[a]	
Number evaluated (decedent and terminal)		M: 50	F: 50	M: 50	F: 50	M: 50	F: 50	M: 50	F: 50	M: 50	F: 50
Noteworthy findings (Cont'd)											
Histopathology											
(Non-neoplastic lesions in decedent animals):											
Heart	Examined	28	30	28	21	29	29	30	27	40	38
Atrial thrombus		1	0	3	0	2	1	7*	0	31**++	28**++
Dilated chambers		1	0	4	1	5	3	5	0	24**++	24**++
Myocardial degeneration		5	7	13*	2	11	12+	13*	11+	37**++	36**++
Myocardial vacuolation		18	13	18	6	18	11	21	10	37**++	36**++
Myocardial fibrosis		23	13	22	7	19	16	26	8	33	35**++
Myocardial cell hypertrophy		0	0	2	0	3	0	5*	0	24**++	19**++
Epicardial inflammation and fibroblast proliferation		2	1	4	0	2	2	1	1	11*	23**++
Liver	Examined	28	30	28	21	29	29	30	27	40	38
Centrilobular hepatocyte vacuolation		12	11	9	6	12	12	7	8	18	31**++
Sinusoidal dilatation/congestion		2	1	4	0	3	2	2	0	13*	12**++
Lungs	Examined	28	30	28	21	29	29	30	27	40	38
Alveolar septal fibrosis		0	3	3	0	4	1	7**	0	17**++	17**++
Alveolar septal thickening and/or degeneration		0	2	3	1	2	3	5*	1	24**++	25**++
Alveolar eosinophilic material		1	1	2	0	3	2	4	1	20**++	16**++
Foamy alveolar macrophages		5	6	5	3	5	8	8	5	28**++	26**++
Thymus	Examined	20	28	20	16	21	25	22	25	28	29
Involution/atrophy		10	11	11	4	12	9	16	7	24**+	19*+
Spleen	Examined	28	30	28	21	29	29	30	27	40	38
Hemosiderosis		8	9+	3	1	6	6	4	2	15+	21*++

a: Dosage level lowered to 180 mg/kg/d from Week 81
**: p<0.05, **: p<0.01 (Fisher's Exact test vs. controls[1])*
+: p<0.05, ++: p<0.01 (Fisher's Exact test vs. controls[2])

2.6.7.10D　　ラットにおける 6 週間混餌投与による用量設定試験　　被験物質：イバブラジン塩酸塩

Species/ strain	Method of administration (vehicle/ formulation)	Duration of treatment	Doses (mg/kg/d)	Gender and No. per group	NOAEL (mg/kg/d)	Noteworthy findings	Report number
Rats/ Wistar	Diet	6 weeks	0, 20, 200	10M/10F [+9M/9F for toxicokinetics]	20	- No deaths or changes in appearance or behavior. - Decreased bodyweight gain over the dosing period [200: -27% (M) / -39% (F) vs. controls]. - Decreased bodyweight at the end of dosing period [200: -13% (M and F) vs. controls]. - Decreased food intake and a slight impairment of food efficiency [200: -15% (M) / -21% (F) vs. controls]. - Heart: dose-related (≥20), heart-rate reduction at Days 2, 28 and 41, increased heart weight (200). Increased incidence and severity of foci of myocardial mononuclear cell aggregates (200). - Toxicokinetics of Ivabradine (Week 6, n=3/gender/dose/sampling time):	NP05455

Dose	Cmax (ng/mL)		AUC24 (ng.h/mL)	
(mg/kg/d)	M	F	M	F
20	29	154	590	2600
200	377	1209	7200	20000

Conclusion: no evidence of palatability problems. Evidence of toxicity at the high dose, and exposure levels at the high dose were 20 (males) and 57 (females) times higher than AUC in patients at HTD. Therefore appropriate to select more doses in the same range for the 13-week study.

2.6.7.10E　　ラットにおける 13 週間混餌投与による用量設定試験　　被験物質：イバブラジン塩酸塩

Species/ strain	Method of administration (vehicle/ formulation)	Duration of treatment	Doses (mg/kg/d)	Gender and No. per group	NOAEL (mg/kg/d)	Noteworthy findings	Report number
Rats/ Wistar	Diet	13 weeks	0, 20, 50, 100, 150, 200	10M/10F [+8M/8F for toxicokinetics]	<20	- No treatment-related deaths - Hair loss on head, neck and shoulders [≥20 (M), ≥50 (F)] - Dose-related decreased bodyweight gain over the dosing period [≥20 (M): -10% to -36% vs. controls, ≥100 (F): -11% to -28% vs. controls] - Dose-related decreased bodyweight at the end of dosing period [≥20 (M): -7% to -23% vs. controls, ≥100 (F): -5% to -12% vs. controls] - Dose-related decreased food intake [≥100 (F), ≥150 (M)] and slight impairment of food efficiency [≥100 (M), ≥150 (F)] - Increased RBC count, hematocrit and hemoglobin [≥20 (M), 200 (F)] - Increased alkaline phosphatase [≥50 (F)], increased cholesterol [200 (F)] - Heart: dose-related heart-rate reduction at Day 8 [≥20 (F), ≥50 (M)], Day 29 and Day 85 (≥20); increased relative heart weight [≥20], myocarditis [≥20] and hypertrophy of myocardial fibers in ventricle walls [≥150 (M), 200 (F)] - Liver: increased relative weight [≥20 (M)] - Adrenal: decreased absolute weight [200 (M)] - Seminal vesicle: decreased absolute weight [200 (M)] - Uterus (at 200): decreased absolute weight and generalized narrowing / atrophy of the myometrium and endometrium	NP06450

2.6.7.10E　　ラットにおける 13 週間混餌投与による用量設定試験（続き）

Species/ strain	Method of administration (vehicle/ formulation)	Duration of treatment	Doses (mg/kg/d)	Gender and No. per group	NOAEL (mg/kg/d)	Noteworthy findings (Cont'd)	Report number
						- Toxicokinetics (Week 13, n=4/gender/dose/sampling time):	NP06450

Dose (mg/kg/d)	Cmax (ng/mL)		AUC24 (ng.h/mL)	
	M	F	M	F
	Ivabradine			
20	53	133	1188	3109
50	153	371	2653	7797
100	257	808	4953	15438
150	421	1035	8522	18832
200	504	1066	7726	23337
	ONO-IN-306			
20	blq	blq	nd	nd
50	nd	nd	nd	nd
100	18	16	425	369
150	33	31	729	585
200	38	34	663	684

Conclusion: Toxicological profile similar to that observed after gavage administration over a comparable range of doses. In view of the toxicological findings, it was considered that the highest dose for the carcinogenicity study should be set at <150 mg/kg/d.

2.6.7.10F　　ラットにおける 104 週間混餌投与によるがん原性試験　　被験物質：イバブラジン塩酸塩

Report Title: S 16257-2: Potential tumorigenic effects in prolonged dietary administration to rats
Species/Strain: Rats / Wistar
Duration of treatment: 104 weeks
Initial Age: 6 weeks
Method of Administration: Diet
Date of first dose: [redacted]
Vehicle/formulation: Diet
Treatment of controls: Rodent drug-free diet

Test Article: Ivabradine hydrochloride
Report No.: NP07943
Location in CTD: 4.2.3.4.1-7
TK report No.: NP07945
Location in CTD: 4.2.3.4.1-8
GLP compliance: Yes

Basis for high-dose selection: Toxicity-based endpoint.

Special features:
- The 120 mg/kg/d dose level was reduced to 60 mg/kg/d in Week 53 due to excessive toxicity.
- Satellite TK groups (6/gender/dose) bled in Weeks 13, 26, 39, 52, 78 and 104 (n=5/gender/dose/sampling time).

Conclusion:
- No evidence of tumorigenic potential up to 120/60 mg/kg/d (high dose appropriate by virtue of toxicity and exposure levels equivalent to high multiples of AUC in patients at HTD).
- NOAEL (general toxicity) not determined in both males and females.

Dose (mg/kg/d)		**0 (control)**		**0 (control)**		**7.5**		**30**		**120/60[a]**	
Number of animals (main groups)		M: 50	F: 50	M: 50	F: 50	M: 50	F: 50	M: 50	F: 50	M: 50	F: 50
Number of animals (satellite groups)		M: 0	F: 0	M: 0	F: 0	M: 6	F: 6	M: 6	F: 6	M: 6	F: 6
Toxicokinetics – Ivabradine[b]:											
Week 13	Cmax (ng/mL)					34	88	99	345	470	854
	AUC24 (ng.h/mL)					628	1470	1733	5537	8680	14870
Week 26	Cmax (ng/mL)					30	86	116	251	515	1153
	AUC24 (ng.h/mL)					581	1595	1761	4776	8860	22181
Week 39	Cmax (ng/mL)					23	74	114	371	432	1279
	AUC24 (ng.h/mL)					452	1282	1711	5321	6466	16616
Week 52	Cmax (ng/mL)					20	59	102	226	424	744
	AUC24 (ng.h/mL)					380	1249	1505	4545	6329	12823
Week 78	Cmax (ng/mL)					30	48	212	259	338	426
	AUC24 (ng.h/mL)					544	816	2766	4026	5151	5987
Week 104	Cmax (ng/mL)					48	48	342	246	480	594
	AUC24 (ng.h/mL)					888	859	6376	3984	7950	8436

a: Dosage level lowered to 60 mg /kg/d from Week 53

2.6.7.10F　　ラットにおける 104 週間混餌投与によるがん原性試験　　試験番号：NP07943（続き）

Dose (mg/kg/d)		0 (control)		0 (control)		7.5		30		120/60[a]	
Number evaluated (decedent and terminal)		M: 50	F: 50	M: 50	F: 50	M: 50	F: 50	M: 50	F: 50	M: 50	F: 50
Number of animals:											
At start		50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
Found dead/killed in extremis		12[b]	20	10	10	9	16	10	9	9	16
Terminal kill		38	30	40	40	41	34	40	41	41	34
Survival (%)		76	60	80	80	82	68	80	82	82	68
Bodyweight gain[c]	Weeks 0-52	368 g/rat	166 g/rat	385 g/rat	168 g/rat	-4	-13**	-10**	-23**	-26**	-36**
(% of combined controls)	Weeks 0-104	424 g/rat	228 g/rat	448 g/rat	235 g/rat	-8**	-16**	-18**	-24**	-28**	-40**
Bodyweight[c]	Week 104	581 g	350 g	605 g	356 g	-6.1	-12	-14	-18	-21	-28
(% of combined controls)											
Food consumption[c]	Weeks 1-52	8020 g/rat	6040 g/rat	8276 g/rat	6240 g/rat	-4*	-4**	-5**	-10**	-16**	-22**
(% of combined controls)	Weeks 0-104	15724 g/rat	12649 g/rat	16357 g/rat	12960 g/rat	-5*	-6**	-7**	-12**	-15**	-21**
Water consumption[c]	Week 103	189 g/rat	257 g/rat	237 g/rat	265 g/rat	-11*	-4	-13*	-19*	-24**	-34**
(% of combined controls)											
Hematology											
White blood cell count (10^9/L)	Week 104	6.30	4.03	5.60	4.97	6.15	5.41	5.33*	4.41	4.77**	3.97
Number of animals with neoplastic lesions:		36	43	33	43	22	36	28	39	35	33
Adipose tissue	Examined	1	0	0	0	5	0	7	0	1	0
Hemangioma (B)		0	0	0	0	2	0	0	0	0	0
Malignant schwannoma (M)		0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
Adrenal glands	Examined	50	50	50	50	17	42	22	30	50	50
Cortical adenoma (B)		0	2	0	0	0	1	0	0	1	1
Cortical carcinoma (M)		0	1	0	0	0	0	1	0	0	1
Phaechromocytoma (B)		2	1	0	1	2	0	1	0	2	2
Bone	Examined	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Fibrosarcoma (M)		0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Brain	Examined	50	50	50	50	9	20	11	17	50	50
Astrocytoma (M)		1	0	2	1	0	0	0	0	0	1
Mixed glioma (M)		0	0	0	0	0	0	0	0	0	1

(M): Malignant, (B): Benign
a: Dosage level lowered to 60 mg/kg/d from Week 53
b: One control male was found dead in Week 105
c: For controls, group means are shown. For treated groups, percent differences from combined controls (i.e. mean of both control values in each gender group) are shown
**: p<0.05; **: p<0.01 (vs. combined controls)*

2.6.7.10F　　ラットにおける 104 週間混餌投与によるがん原性試験　　試験番号：NP07943（続き）

Dose (mg/kg/d)		0 (control)		0 (control)		7.5		30		120/60[a]	
Number evaluated (decedent and terminal)		M: 50	F: 50	M: 50	F: 50	M: 50	F: 50	M: 50	F: 50	M: 50	F: 50
Number of animals with neoplastic lesions Cont'd)		36	43	33	43	22	36	28	39	35	33
Caecum	Examined	50	50	50	50	9	15	10	8	50	50
Fibroma (B)		1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Fibrosarcoma (M)		0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
Cervix	Examined		50		50		31		19		50
Fibroma (B)			0		0		0		1		0
Prolapsed endometrial polyp (B)			0		1		0		0		0
Malignant schwannoma (M)			0		0		0		0		1
Duodenum	Examined	0	50	0	50	0	16	0	9	0	50
Leiomyoma (B)		0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
Eyes	Examined	0	50	0	50	0	20	0	13	0	50
Malignant schwannoma (M)		0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
Head	Examined	0	1	1	0	0	0	1	3	1	0
Malignant schwannoma (M)		0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
Subcutaneous fibrosarcoma (M)		0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
Jejunum	Examined	50	0	50	0	9	0	11	0	50	0
Leiomyoma (B)		0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
Kidneys	Examined	50	50	50	50	9	20	12	11	50	50
Lipoma (B)		0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Pelvic transitional cell carcinoma (M)		0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Limbs	Examined	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0
Fibroma (B)		1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Hemangiosarcoma (M)		0	0	0	0	1	0	0	0	1	0
Liver	Examined	50	50	50	50	18	19	17	19	50	50
Hepatocellular carcinoma (M)		0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
Hepatocellular adenoma (B)		0	0	0	0	0	0	0	2	0	0
Cholangioma (B)		0	0	0	0	0	0	0	1	0	0

(M): Malignant, (B): Benign
a: Dosage level lowered to 60 mg/kg/d from Week 53

2.6.7.10F　　ラットにおける 104 週間混餌投与によるがん原性試験　　試験番号：NP07943（続き）

Dose (mg/kg/d)		0 (control)		0 (control)		7.5		30		120/60[a]	
Number evaluated (decedent and terminal)		M: 50	F: 50	M: 50	F: 50	M: 50	F: 50	M: 50	F: 50	M: 50	F: 50
Number of animals with neoplastic lesions Cont'd)		36	43	33	43	22	36	28	39	35	33
Lungs	Examined	50	0	50	0	50	0	50	0	50	0
Bronchiolar - alveolar adenoma (B)		0	0	1	0	1	0	1	0	0	0
Lymphoid/multicentric tumours	Examined	2	0	1	0	1	0	2	1	1	0
Pleomorphic lymphoma (M)		0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
Lymphoblastic/lymphocytic lymphoma (M)		1	0	1	0	1	0	1	1	1	0
Myeloid leukemia (M)		1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Lymph nodes (mesenteric)	Examined	50	50	50	50	14	19	15	8	50	50
Hemangioma (B)		8	2	5	2	4	1	3	0	6	0
Hemangiosarcoma (M)		1	0	1	0	0	0	0	0	0	0
Mammary glands	Examined	50	50	50	50	9	32	11	23	50	50
Fibroadenoma (B)		0	19	0	13	0	13	0	4	1	2
Fibroadenoma with atypia (B)		0	3	0	3	0	1	0	0	0	0
Fibroma (B)		0	2	0	0	0	0	0	0	0	0
Adenoma (B)		0	0	0	0	0	2	0	1	0	0
Adenocarcinoma (M)		0	1	0	3	0	4	0	3	0	0
Oral cavity	Examined	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
Squamous cell carcinoma (M)		0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
Ovaries	Examined		50		49		27		25		50
Tubulostromal adenoma (B)			0		0		1		3		0
Granulosa cell tumor (B)			1		0		1		0		0
Pancreas	Examined	50	50	50	50	9	17	11	10	50	49
Islet cell adenoma (B)		2	0	0	2	2	0	1	1	1	0
Islet cell carcinoma (M)		0	0	1	0	0	0	0	0	2	0
Mixed acinar-islet cell adenoma (B)		1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Pituitary Gland	Examined	49	50	48	50	12	30	15	27	50	49
Adenoma – pars distalis (B)		12	23	13	28	7	19	8	20	11	16
Adenocarcinoma – pars distalis (M)		0	1	0	2	1	0	0	1	0	0

(M): Malignant, (B): Benign

a: Dosage level lowered to 60 mg/kg/d from Week 53

2.6.7.10F　　ラットにおける 104 週間混餌投与によるがん原性試験　　試験番号：NP07943（続き）

Dose (mg/kg/d)		0 (control)		0 (control)		7.5		30		120/60[a]	
Number evaluated (decedent and terminal)		M: 50	F: 50	M: 50	F: 50	M: 50	F: 50	M: 50	F: 50	M: 50	F: 50
Number of animals with neoplastic lesions Cont'd)		36	43	33	43	22	36	28	39	35	33
Salivary glands (submandibular)	Examined	50	0	50	0	9	0	10	0	50	0
Fibrosarcoma (M)		0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
Seminal vesicles	Examined	50		50		10		14		50	
Adenocarcinoma (M)		1		0		0		0		0	
Skeletal muscle	Examined	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0
Squamous cell carcinoma (M)		0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
Skin	Examined	11	2	5	4	6	4	17	4	8	3
Squamous cell papilloma (B)		0	0	0	1	0	0	1	0	1	0
Keratoacanthoma (B)		3	0	2	0	1	0	4	0	4	0
Fibroma (B)		0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
Basal cell carcinoma (M)		1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Sebaceous cell adenoma (B)		0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
Stomach	Examined	50	50	50	50	12	21	13	13	50	50
Squamous cell papilloma (B)		0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
Leiomyosarcoma (M)		0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Fibrosarcoma (M)		0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Subcutis	Examined	5	2	5	3	2	2	5	3	2	2
Fibroma (B)		2	0	4	0	0	0	4	1	1	1
Fibrosarcoma (M)		0	0	0	0	1	1	0	0	0	0
Lipoma (B)		1	0	0	1	0	0	0	0	0	0
Liposarcoma (M)		1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Malignant schwannoma (microcystic type) (M)		0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Hemangioma (B)		0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Testes	Examined	50		50		15		16		50	
Interstitial cell adenoma (B)		2		3		0		0		1	

(M): Malignant, (B): Benign
a: Dosage level lowered to 60 mg/kg/d from Week 53

2.6.7.10F　　ラットにおける 104 週間混餌投与によるがん原性試験　　試験番号：NP07943（続き）

Dose (mg/kg/d)		0 (control)		0 (control)		7.5		30		120/60[a]	
Number evaluated (decedent and terminal)		M: 50	F: 50	M: 50	F: 50	M: 50	F: 50	M: 50	F: 50	M: 50	F: 50
Number of animals with neoplastic lesions Cont'd)		36	43	33	43	22	36	28	39	35	33
Thoracic cavity	Examined	1	2	1	2	3	1	4	0	0	1
Hemangiosarcoma (M)		0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
Thymic adenocarcinoma (M)		0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
Thymus	Examined	47	50	45	46	8	16	12	12	49	50
Lymphocytic thymoma (B)		1	5	1	5	2	1	4	3	0	2
Thymic adenoma (B)		1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Thyroid gland	Examined	50	50	50	50	11	18	12	10	50	50
Follicular cell adenoma (B)		5	2	3	2	2	2	1	1	5	1
Follicular cell carcinoma (M)		1	0	1	0	0	0	1	0	1	0
C-cell adenoma (B)		1	4	3	2	0	2	1	1	4	5
C-cell carcinoma (M)		3	2	2	5	1	1	0	1	2	4
Uterus	Examined		50		50		50		49		50
Endometrial polyp (B)			7		2		3		2		5
Endometrial adenoma (B)			0		0		1		0		1
Endometrial adenocarcinoma (M)			3		5		6		4		8
Endometrial stromal cell sarcoma (M)			0		1		0		0		0
Leiomyosarcoma (M)			1		0		0		0		0
Fibrosarcoma (M)			1		0		0		0		0
Malignant Schwannoma (microcystic type) (M)			1		0		1		0		1
Uterine carcinoma (anaplastic) (M)			1		0		0		0		0
Noteworthy findings											
Gross pathology (all animals):											
Heart											
Enlargement		0	3	1	2	0	2	6	7	19	14
Thrombus in left atrium		0	0	0	0	0	0	0	0	2	0
Lungs											
Pale areas or foci		10	18	8	15	12	21	17	26	25	25
Uterus											
Masses			8		8		10		7		12

(M): Malignant, (B): Benign
a: Dosage level lowered to 60 mg/kg/d from Week 53

2.6.7.10F　　ラットにおける 104 週間混餌投与によるがん原性試験　　試験番号：NP07943（続き）

Dose (mg/kg/d)		**0 (control)[1]**		**0 (control)[2]**		**7.5**		**30**		**120/60[a]**	
Number evaluated (decedent and terminal)		M: 50	F: 50	M: 50	F: 50	M: 50	F: 50	M: 50	F: 50	M: 50	F: 50
Heart	Examined	38	30	40	40	41	34	40	41	41	34
Ventricle(s): fenestrated		0	0	1	0	2	0	3	0	12	3
Histopathology (non-neoplastic lesions):											
Heart	Examined	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
Myocardial fibrosis		35	20	39	10	31	19	37	32*	45*	35**
Dystrophic mineralization/chondroid metaplasia in chordae tendineae		1	0	0	0	2	0	4	6*	16**	15**
Lungs	Examined	50	50	50	50	50	42	50	45	50	50
Aggregations of alveolar macrophages with focal septal thickening		14	20	13	13	11	11	17	23	25*	18

a: Dosage level lowered to 60 mg/kg/d from Week 53
**: p<0.05, **: p<0.01 (Fisher's Exact test vs. controls[1])*

Species/ strain	Method of administration (vehicle/ formulation)	Treatment period	Doses (mg/kg/d)	No. per group	Noteworthy findings	Report number
Rats/ Wistar	Gavage (water)	I: from 14 days before pairing until euthanasia (M) or G6 (F) / III: from G6 to L21	I: 0, 58, 117, 175 III: 0, 9.3, 19, 37	8M/8F (including 3F per Ivabradine-group for toxicokinetics)	*Fertility investigation:* - Hypoactivity, ventral decubitus (≥58), closed eyes (≥116), mastication, piloerection or irregular breathing (≥175) - Reduced bodyweight gain and food consumption (≥58) - Increased water consumption (≥58) - Cardiomegaly at 175 (M) or ≥58 (F) - Fertility unaffected *Pre- and postnatal development investigation*: - Hypoactivity and ventral decubitus (F0 females at 37) - Transient bodyweight gain reduction (F0 females at ≥9.3) - Increased water consumption during gestation (F0 females at ≥9.3); decreased during lactation (F0 females at 37) - Cardiomegaly (F0 females at ≥9.3) - Reduced litter size (post-implantation losses) with high mortality rate at birth and during lactation (F1 pups at 37) - Reduced bodyweight at birth (F1 pups at 37) - Abnormal shape of heart, with interventricular septal defect (F1 dead newborn pups at 37) - No gross abnormality in F1 pups examined at scheduled kill *Toxicokinetics of Ivabradine (L5, n=3/dose)*: **Dose (mg/kg/d) / Cmax (ng/mL) / AUC24 (ng.h/mL)** 9.3 / 647 / 4869 19 / 1358 / 6528 37 / 1262 / 13719	NP08074

G: gestation day; L: lactation day

2.6.7.11 生殖発生毒性試験：重要な試験以外の試験（続き）

Species/ strain	Method of administration (vehicle/ formulation)	Treatment period	Doses (mg/kg/d)	No. per group	Noteworthy findings	Report number
Rats/ Wistar	Gavage (water)	G6 to G15	0, 14, 56, 111, 223	10 pregnant F (+5F per Ivabradine-group for toxicokinetics)	*F0 females*: - Hypoactivity (≥14), tachypnea, ventral decubitus (≥111), mastication, ptosis and piloerection (223) - Reduced bodyweight gain and food consumption (≥14) - Increased water consumption (14, 56 and 111) *F1 fetuses*: - Increased number of early (≥111) and late (≥56) resorptions resulting in reduced litter size (≥56) and no live fetuses at 223 - Reduced fetal and placental weights (≥56) - Delayed ossification (≥14) - Minor cardiovascular abnormalities, i.e. cardiovascular abnormalities including abnormal shape of heart and/or variations of the major proximal arteries (14) - Teratogenic effects on the cardiovascular system, including interventricular septal defect, right-sided aortic arch, persistent truncus arteriosus (≥56) *Toxicokinetics of Ivabradine (n=3/dose)*:	NP08075

Dose	Cmax (ng/mL)		AUC24 (ng.h/mL)	
(mg/kg/d)	G6	G15	G6	G15
14	928	888	4842	5286
56	3190	2470	22755	20790
111	4560	4340	32233	40402
223	8830	10640	55304	98326

G: gestation day

2.6.7.11 生殖発生毒性試験：重要な試験以外の試験（続き）

<table>
<tr><th>Species/ strain</th><th>Method of administration (vehicle/ formulation)</th><th>Treatment period</th><th>Doses (mg/kg/d)</th><th>No. per group</th><th>Noteworthy findings</th><th>Report number</th></tr>
<tr><td>Rabbits/ New-Zealand White</td><td>Gavage (1% hydroxyethylcellulose)</td><td>G6 to G18</td><td>0, 28, 56, 111, 167, 223</td><td>4 to 9 pregnant F (including 3 per Ivabradine-group for toxicokinetics)</td><td>F0 females:
- Treatment-related deaths at ≥56 (no survival at 223)
- Ptosis (≥28), tachypnea, generalized tremor and ventral decubitus (≥56), convulsion (one animal at 56)
- Reduced bodyweight gain (≥28), food and water consumption (28 - 167)
F1 fetuses:
- Increased number of early resorptions at ≥28 resulting in reduced litter size
- Reduced fetal and placental weights (≥28)

Toxicokinetics of Ivabradine (n=3/dose):
<table>
<tr><th rowspan="2">Dose (mg/kg/d)</th><th colspan="2">Cmax (ng/mL)</th><th colspan="2">AUC24 (ng.h/mL)</th></tr>
<tr><th>G6</th><th>G18</th><th>G6</th><th>G18</th></tr>
<tr><td>28</td><td>2000</td><td>2403</td><td>6860</td><td>11744</td></tr>
<tr><td>56</td><td>3027</td><td>6280</td><td>16942</td><td>27707</td></tr>
<tr><td>111</td><td>7683</td><td>7560</td><td>44168</td><td>60670</td></tr>
<tr><td>167</td><td>6837</td><td>13550</td><td>57648</td><td>89345</td></tr>
<tr><td>223</td><td>5970</td><td>nd</td><td>63211</td><td>nd</td></tr>
</table></td><td>NP08076</td></tr>
</table>

G: gestation day

2.6.7.12 生殖発生毒性試験

2.6.7.12A ラットにおける受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験

被験物質：イバブラジン塩酸塩

Report Title: Oral reproduction toxicity study in the Wistar rat (fertility and early embryonic development)

Test Article: Ivabradine hydrochloride

Report No.: NP06673

Location in CTD: 4.2.3.5.1-2

GLP compliance: Yes

Design similar to ICH 4.1.1? Yes

Duration of treatment: M: 63 days before pairing, throughout pairing period to terminal kill
F: 14 days before pairing, throughout pairing period to G6

Species/strain: Rats/Wistar

Day of mating: G0

Initial Age: 7 weeks (M); 11 weeks (F)

Day of C-section: G14

Date of first dose: [redacted] (M); [redacted] (F)

Method of administration: Gavage (10 mL/kg)

Vehicle/formulation: Demineralised water/solution

Special features:
- Reproductive male organ weights (testes and epididymides weights).
- Sperm count and viability (% of motile spermatozoa).
- Number of oestrous cycle/14 days: not evaluated.
- Toxicokinetics: not evaluated.

NOAEL:

F0 males: 35 mg/kg/d

F0 females: Fertility: 175 mg/kg/d. Maternal toxicity: 7 mg/kg/d

F1 litters: 175 mg/kg/d

Daily dose (mg/kg)	0 (control)	7	35	175
Males:				
No. evaluated	20	20	20	20
No. found dead or killed *in extremis*	0	0	0	0
Clinical observations (just after dosing):				
Increased salivation	-	+	+	+
Hypoactivity and blepharoptosis	-	-	-	+
Necropsy observations	-	-	-	-
Bodyweight	-	-	-	-
Mean No. days prior to mating	2.8	3.2	3.1a	4.0
No. of males that mated	20	20	20	20
No. of fertile males	19	17	17	18

Incidence of clinical signs (number of animals affected and/or frequency): +: Low to average
G: Gestation day
a: One male excluded because of unknown mating date

2.6.7.12A　　ラットにおける受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験　　試験番号：NP06673（続き）

Daily dose (mg/kg) (Cont'd)	**0 (control)**	**7**	**35**	**175**
Females:				
No. evaluated	20	20	20	20
No. found dead or killed *in extremis*	0	0	0	0
Clinical observations (during pre-gestation period and to a lesser extend during gestation period):				
Increased salivation	-	+	+	+
Hypoactivity, blepharoptosis, piloerection and/or mastication	-	+	+	++
Ventral decubitus	-	-	-	+
Necropsy observations	-	-	-	-
Prepairing bodyweight gain (%[a]):				
1st week of dosing	6.83 g	+23	-1	-89**
Gestation bodyweight gain (%[a]):				
G0 to G3	4.96 g	-24	-35**	-59**
G6 to G9	3.72 g	-10	-22	-46**
Prepairing food consumption (%[a])				
1st week of dosing	20.50 g/d	-2	-6	-30**
2nd week of dosing	20.89 g/d	+1	+2	-6*
Gestation food consumption (%[a])				
1st week of dosing	23.99 g/d	-1	-4	-12**
2nd week of dosing	-	-	-	-
Prepairing water consumption (%[a])				
1st week of dosing	25.63 g/d	+13	+17	+20
2nd week of dosing	26.61 g/d	+16	+27*	+32**
Gestation water consumption (%[a])				
1st week of dosing	32.58 g/d	+18	+22	+25
2nd week of dosing	36.33 g/d	+8	+10	+11

Incidence of clinical signs (number of animals affected and/or frequency): +: Low to average, ++: High
G: Gestation day
a: For controls, group means are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown. Statistical significance is based on actual data (not on percent differences)
**: p<0.05, **: p<0.01 (Two-way analysis of variance, Dunnett's Test)*

2.6.7.12A　　ラットにおける受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験　　試験番号：NP06673（続き）

Daily dose (mg/kg) (Cont'd)	0 (control)	7	35	175
Females (Cont'd):				
Mean No. of days prior to mating	2.0	2.8	3.5[a]	3.2
No. of females sperm positive	20	20	20	19
No. of pregnant females	17	18	18	19
Mean No. of Corpora Lutea	14.2	14.6	13.8	13.4
Mean No. of implantations	12.8	13.6	12.5	12.2
Mean % of preimplantation loss	12.3	6.9	9.7	9.5
Mean No. of live conceptuses	11.7	12.1	11.6	11.1
Mean No. of resorptions	1.1	1.5	0.9	1.1
No. of dead conceptuses	0	0	0	0
Mean % of postimplantation loss	13.2	11.1	6.8	11.1

a: One female excluded because of unknown date of mating

2.6.7.12B　　ラットにおける胚・胎児発生に関する試験 1

被験物質：イバブラジン塩酸塩

Report Title: Oral reproduction toxicity study in the Wistar rat (embryo-fetal development)

Test Article: Ivabradine hydrochloride

Design similar to ICH 4.1.3? Yes

Duration of treatment: G6 to G15 inclusive

Report No.: NP05135

Species/strain: Rats/Wistar

Day of mating: G0 (first day of sperm in vaginal smear)

Location in CTD: 4.2.3.5.2-3

Initial Age: 10-11 weeks

Day of C-section: G20

GLP compliance: Yes

Date of first dose: [redacted]

Method of administration: Gavage (10 mL/kg)

Vehicle/formulation: Demineralised water/solution

Special features:
- Toxicokinetics on 3 satellite females per Ivabradine-group for plasma Ivabradine determination 10 min, 1 and 6 h after dosing on G6 and G15.
- Determination of Ivabradine concentrations in amniotic fluid on G15 from embryos of dams used for toxicokinetics (between 6.5 and 7.5 h after dosing).
- Doses expressed as salt in the study report (correction factor: 0.928).

NOAEL:

F0 females: 9.3 mg/kg/d

F1 litters: Embryofetal toxicity: <2.3 mg/kg/d

Teratogenicity: 2.3 mg/kg/d

Daily dose (mg/kg)		0 (control)	2.3	4.6	9.3	19
Dams:						
Toxicokinetics of Ivabradine:						
Cmax (ng/mL)[a]	G6		80	222	517	1337
	G15		117	154	364	1039
AUC24 (ng.h/mL)	G6		469	1060	1874	5592
	G15		565	980	1857	4759
Amniotic liquid/plasma concentration ratio (mean on G15)[a]			2.17	1.80	1.77	1.30
No. pregnant		20	22	21	23	21
No. found dead or killed in extremis		0	0	0	0	0
Clinical observations		-	-	-	-	-
Necropsy observations (C-section)		-	-	-	-	-
Bodyweight		-	-	-	-	-[b]
Food consumption (%)[c]	G6 to G10	27.2 g/d	+1.9	-1.7	-1.7	-4.8

G: Gestation day

a: Mean values not specified in study report and calculated from individual data (ratio = concentration in amniotic fluid at necropsy / plasma concentration 6 h after dosing)

b: Decreased trend of bodyweight gain at G6 to G7

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

2.6.7.12B　　ラットにおける胚・胎児発生に関する試験 1　　試験番号：NP05135（続き）

Daily dose (mg/kg) (Cont'd)	0 (control)	2.3	4.6	9.3	19
Dams (Cont'd):					
Water consumption (%[a])					
G0 to G5	31 g/d	+6.3	+10.4	+18.1	+14.2
G6 to G10	29 g/d	+18.4	+26.3**	+31.6**	+32.5**
G11 to G15	36 g/d	+14.0	+25.6**	+36.8**	+33.1**
G16 to G19	40 g/d	+11.4	+20.0**	+29.0**	+25.0**
Mean No. Corpora Lutea	15.2	14.1	14.3	15.1	15.6
Mean No. implantations	13.1	12.4	12.1	12.1	13.1
Mean % preimplantation loss	13	11	15	19	16
Litters:					
No. litters evaluated	20	22	21	23	21
Mean No. live fetuses	11.6	11.1	10.7	10.9	12.0
Mean No. resorptions (early and late)	1.6	1.3	1.5	1.2	1.1
No. dead fetuses	0	0	0	0	1[b]
Mean % postimplantation loss	11	10	12	12	9
Mean fetal bodyweight (g)	3.41	3.32	3.33	3.31	3.16
Mean placental weight (g)	0.45	0.47	0.48	0.44	0.44
Fetal sex ratios (% males)	49	49	54	50	54
Fetal anomalies:					
Visceral anomalies					
Heart: external abnormal shape[c]					
No. fetuses (%)	1 (0.8)	13 (10.3)	16 (13.6)	75 (56.4)	79 (60.3)
No. litters (%)	1 (5)	8 (36.4)	8 (38.1)	22 (95.7)	21 (100)

G: gestation day

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

b: One dead fetus with cervical spina bifida occulta and generalized delayed ossification

c: Described as dysplasia in the study report

***: p<0.01 (Dunnett's test)*

2.6.7.12B　　ラットにおける胚・胎児発生に関する試験 1　　試験番号：NP05135（続き）

Daily dose (mg/kg) (Cont'd)	0 (control)	2.3	4.6	9.3	19
Litters:					
Fetal anomalies (Cont'd):					
Visceral anomalies (Cont'd)					
Heart: external abnormal shape[a] with anomalies of the major proximal arteries:					
Innominate artery lengthened or absent and/or juxtaposition of the two common carotid arteries or of the left common carotid artery and the left subclavian artery					
No. fetuses (%)	0 (0)	4 (3.2)	2 (1.7)	29 (21.8)	39 (29.8)
No. litters (%)	0 (0)	4 (18.2)	2 (9.5)	15 (65.2)	15 (71.4)
Ascending aorta and pulmonary trunk lengthened					
No. fetuses (%)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (0.8)	0 (0)
No. litters (%)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (4.3)	0 (0)
Complex anomaly[b]					
No. fetuses (%)	0 (0)	0 (0)	1 (0.8)	1 (0.8)	2 (1.5)
No. litters (%)	0 (0)	0 (0)	1 (4.8)	1 (4.3)	2 (9.5)
Heart: external abnormal shape[a] with interventricular septum defect					
No. fetuses (%)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (0.8)	3 (2.3)
No. litters (%)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (4.3)	2 (9.5)
Heart: external abnormal shape[a] with interventricular septum defect and anomalies of the major proximal arteries					
No. fetuses (%)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (0.8)	4 (3.1)
No. litters (%)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (4.3)	3 (14.3)
Skeletal anomalies	-	np	np	-	-

a: Described as dysplasia in the study report

b: Complex anomalies of the major proximal arteries including retro-esophageal arch of the aorta, left common carotid arteries arising from ascending part of aorta, left subclavian artery arising from ducters arteriosus, persistent truncus arteriosus

2.6.7.12C　　ラットにおける胚・胎児発生に関する試験 2　　被験物質：イバブラジン塩酸塩

Report Title: Oral reproduction toxicity study in the Wistar rat (embryo-fetal development)
Test Article: Ivabradine hydrochloride

Design similar to ICH 4.1.3? Yes
Duration of treatment: G6 to G17 inclusive
Report No.: NP26980

Species/strain: Rats/Wistar
Day of mating: G0 (first day of sperm in vaginal smear)
Location in CTD: 4.2.3.5.2-4

Initial Age: 13 weeks
Day of C-section: G20
GLP compliance: Yes

Date of first dose: [redacted]
Method of administration: Gavage (10 mL/kg)
Vehicle/formulation: Purified water/solution

Special features:
- The objective of this study was to determine a NOAEL for the fetal cardiovascular changes since a NOAEL could not be determined for this parameter in a previous pivotal reproduction toxicity study (embryo-fetal development) in Wistar rats (NP05135).
- Toxicokinetics on 5 satellite females/group including the control for plasma determination of Ivabradine and its main active metabolite ONO-IN-306, 10 min, 1, 4, 8, and 24 hours after dosing on G15.
- Only examination of fetal cardiovascular system after Caesarean section on G20.

NOAEL:

F0 females: 9.3 mg/kg/d

F1 litters (for fetal cardiovascular morphological changes): 1.5 mg/kg/d

Daily dose (mg/kg)	0 (control)	0.5	1.5	9.3
Dams:				
Toxicokinetics of Ivabradine:				
Cmax (ng/mL)	blq	38	115	573
AUC24 (ng.h/mL)	blq	198	482	2551
ONO-IN-306:				
Cmax (ng/mL)	blq	1.2	4.1	20
AUC24 (ng.h/mL)	blq	6.7	18	80
No. pregnant	23[a]	20	22	22
No. found dead or killed in extremis	0	0	0	0
Clinical observations	-	-	-	-

G: Gestation day; blq: below limit of quantification (0.25 ng/mL)
a: including three females with total resorptions

2.6.7.12C　　ラットにおける胚・胎児発生に関する試験 2　　試験番号：NP26980（続き）

Daily dose (mg/kg) (Cont'd)		0 (control)	0.5	1.5	9.3
Dams (Cont'd):					
Bodyweight gain		-	-	-	-
Food consumption		-	-	-	-
Water consumption (%)[a]	G6 to G12	29.6 g/day	-4	-1	+6
	G12 to G18	34.5 g/day	+4	+10	+19**
	G18 to G20	38.0 g/day	+2	+11	+19*
Mean No. Corpora Lutea		13.2	13.7	13.9	13.5
Mean No. implantations		11.5	12.4	11.5	11.7
Mean % preimplantation loss		11.7	9.3	18.0	13.7
Litters:					
No. litters evaluated		23b	20	22	22
Mean No. live fetuses		10.2	11.1	10.2	10.8
Mean No. early resorptions		0.1	0.3	0.4	0.1
Mean No. late resorptions		1.2	1.0	0.9	0.8
No. dead fetuses		0	0	0	0
Mean % postimplantation loss		0.18	0.11	0.13	0.08
Mean fetal bodyweight (g)		3.4	3.2	3.4	3.2
Mean placental weight (g)		0.43	0.45	0.46	0.42
Fetal sex ratios (% males)		52	43	46	45

G: Gestation day

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

b: including three females with total resorptions

**: p<0.05; **: p<0.01 (Two-way analysis of variance, Dunnett's Test)*

2.6.7.12C　　ラットにおける胚・胎児発生に関する試験 2　　試験番号：NP26980（続き）

Daily dose (mg/kg) (Cont'd)	0 (control)	0.5	1.5	9.3
Litters (Cont'd):				
Fetal anomalies				
Visceral anomalies				
Fetal anomalies of the cardiovascular system (No. fetuses examined / No. litters examined)	235/20	222/20	225/22	237/22
Cardiovascular variations [No. fetuses (%)/No. litters (%)				
Two carotid arteries juxtaposed[a]	14 (6) / 9 (45)	7 (3.2) / 4 (20)	16 (7.1) / 6 (27)	32 (13.5) / 11 (50)
Presence of an artery parallel to the left subclavian artery on the aortic arch[b]	0	0	0	1 (0.4) / 1 (5)
Abnormal external shape of the heart[c]	0	2 (0.9) / 2 (10)	5 (2.2) / 4 (18)	56 (23.6) / 18 (82)
Cardiovascular malformations [No. fetuses (%)/No. litters (%)				
Single malformation:				
Situs inversus	1 (0.4) / 1 (5)	0	0	0
Ventricular septum defect	0	1 (0.5) / 1 (5)	0	2 (0.8) / 1 (4.5)
Complex malformations				
Aortic arch positioned in the sagittal plane, two carotid arteries juxtaposed, left subclavian artery juxtaposed to the left carotid artery, descending aorta overriding the vertebral column and abnormal external shape of the heart with small cardiac right ventricle	1 (0.4) / 1 (5)	0	0	0

a:1.8% and 6.9%
b: 0%
c: 0.5% and 5.9 %
internal historical mean and maximum values, respectively, for Wistar rats of the strain used

2.6.7.12C　　ラットにおける胚・胎児発生に関する試験 2　　試験番号：NP26980（続き）

Daily dose (mg/kg) (Cont'd)	**0 (control)**	**0.5**	**1.5**	**9.3**
Litters (Cont'd):				
Dilated aortic arch right-sided and positioned in the sagittal plane, descending aorta right-sided, right subclavian artery arising from the aortic arch, dilated innominate artery left-sided, overriding aorta, two pulmonary arteries arising from the ascending aorta, abnormal external shape of the heart and ventricular septum defect	1 (0.4) / 1 (5)	0	0	0
Situs inversus of the cardiovascular system, overriding aorta, pulmonary trunk narrowed, enlarged cardiac left ventricle and ventricular septum defect	0	1 (0.5) / 1 (5)	0	0
Situs inversus of the cardiovascular system, ascending aorta and aortic arch narrowed, pulmonary trunk and ductus arteriosus dilated, pulmonary trunk crossing below the ascending aorta, descending aorta overriding the vertebral column, abnormal external shape of the heart with small cardiac right ventricle and enlarged cardiac left ventricle	0	0	0	1 (0.4) / 1 (5)
Skeletal examinations	np	np	np	np

2.6.7.12D　　ウサギにおける胚・胎児発生に関する試験 1

被験物質：イバブラジン塩酸塩

Report Title: Oral reproduction toxicity study in the New Zealand White rabbit (embryo-fetal development)

Test Article: Ivabradine hydrochloride

Design similar to ICH 4.1.3? Yes

Duration of treatment: G6 to G18 inclusive

Report No.: NP05134

Species/strain: Rabbits/New-Zealand White

Day of mating: G0 (mating checked visually)

Location in CTD: 4.2.3.5.2-5

Initial Age: 15-19 weeks

Day of C-section: G30

GLP compliance: Yes

Date of first dose: [redacted]

Method of administration: Gavage (1 mL/kg)

Vehicle/formulation: Demineralised water/solution

Special features: - Toxicokinetics on 3 satellite females/Ivabradine-treated groups for plasma Ivabradine determination 0.5, 4 and 7 h after dosing on G6 and 18

NOAEL:

F0 females: 7 mg/kg/d

F1 litters: Embryofetal toxicity: <7 mg/kg/d

Teratogenicity: 14 mg/kg/d

Daily dose (mg/kg)		0 (control)	7	14	28
Dams/does:					
Toxicokinetics of Ivabradine[a]:					
Cmax (ng/mL)	G6		192	679	2021
	G18		859	1766	3479
AUC24 (ng.h/mL)	G6		455	1920	5049
	G18		1664	6979	11603
No. pregnant		17	18[b]	19	18
No. found dead or killed in extremis		0	0	0	0
Clinical observations[c]:		-	-	-	-
Necropsy observations (C-section)		-	-	-	-
Bodyweight gain (g)	G6 to G7	+33	+18	+18	-7
Food consumption (g/d)	G6 to G12	186.5	186.9	195.3	179.9
Water consumption		-	-	-	-
Mean No. Corpora Lutea		11.4	11.9	11.1	11.5
Mean No. implantations		8.9	10.1	8.2	9.5
Mean % preimplantation loss		22	17	25	18

G: Gestation day

a: Mean values not specified in study report and calculated from individual data

b: One female given 7 mg/kg/d aborted (dead fetuses and late resorptions) on the day of sacrifice

c: Ptosis was sometimes noted at 14 and 28 mg/kg/d

2.6.7.12D　　ウサギにおける胚・胎児発生に関する試験 1　　試験番号：NP05134（続き）

Daily dose (mg/kg) (Cont'd)	0 (control)	7	14	28
Dams (Cont'd):				
Litters:				
No. litters evaluated	17	17	19	18
Mean No. live fetuses	8.2	8.2	7.0	8.2
Mean No. resorptions	0.8	1.2	1.1	1.2
Mean No. dead fetuses	0.0	0.6	0.1	0.0
Mean % postimplantation loss	7	18	13	15
Mean fetal bodyweight (g)	42.4	41.8	43.0	39.7
Mean placental weight (g)	5.1	5.2	5.2	4.9
Fetal sex ratio (% males)	47	48	51	51
Fetal anomalies:				
External and visceral anomalies	-	-	-	-
Skeletal anomalies				
Ectrodactylia involving absence of two thumbs, two right and three left toes and two left metatarsal bones				
No. fetuses (%)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (0.7)
No. litters (%)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (5.6)
Ectrodactylia involving absence of five fingers on the left forepaw and fusion of four sternebrae				
No. fetuses (%)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (0.7)
No. litters (%)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (5.6)
Total number of ectrodactylia				
No. fetuses (%)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (1.4)
No. litters (%)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (11.1)

2.6.7.12E　　ウサギにおける胚・胎児発生に関する試験２　　被験物質：イバブラジン塩酸塩

Report Title: Oral reproduction toxicity study in the rabbit (complementary investigation on embryo-fetal development)
Test Article: Ivabradine hydrochloride

Design similar to ICH 4.1.3? Yes
Duration of treatment: G6 to G18 inclusive
Report No.: NP08073

Species/strain: Rabbits/New-Zealand White
Day of mating: G0 (mating checked visually)
Location in CTD: 4.2.3.5.2-6

Initial Age: 16 weeks or more
Day of C-section: G30
GLP compliance: No

Date of first dose: [redacted]
Method of administration: Gavage (1 mL/kg)
Vehicle/formulation: Purified water/solution

Special features:
- No toxicokinetics performed.
- Study designed to further assess the teratogenic events noted at 28 mg/kg/d in the previous embryofetal development study in the rabbit (Report No.: NP05134).

NOAEL: Not specified in the study report (no conclusive compound-related teratogenic effects)

Daily dose (mg/kg)		0 (control)	42
Dams/does:			
No. pregnant		24	47[a]
No. found dead or killed in extremis		0	1[b]
Clinical observations:			
Half-closed eyes		-	+
Tachypnea (first week of dosing)		-	+
Hypoactivity (second week of dosing)		-	+
Necropsy observations (C-section):		-	-
Bodyweight gain (%)[c]	G6 to G19	316 g	-35
Food consumption (%)[c]	G6 to G12	158 g/d	-14
Water consumption (%)[c]	G6 to G12	270g/d	-9
	G13 to G18	281g/d	-8
Mean No. Corpora Lutea		11.7	11.2
Mean No. implantations		8.2	8.2
Mean % preimplantation loss		30	26

+: High incidence
G: Gestation day
a: One female given 42 mg/kg/d aborted on G21
b: Death considered not to be treatment-related
c: For controls, group means are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown. No statistical analysis was performed

2.6.7.12E　　ウサギにおける胚・胎児発生に関する試験 2　　試験番号：NP08073（続き）

Daily dose (mg/kg) (Cont'd)	0 (control)	42
Dams (Cont'd):		
Litters:		
No. litters evaluated	24	45
Mean No. live fetuses	7.4	6.8
Mean No. early resorptions	0.5	1.0
Mean No. late resorptions	0.3	0.4
Mean No. dead fetuses	0.04	0.04
Mean % postimplantation loss	8	17
Mean fetal bodyweight (g)	40.4	40.6
Mean placental weight (g)	4.4	4.4
Fetal sex ratio (% males)	43[a]	50
Fetal anomalies:		
External and visceral anomalies	-	-
Skeletal anomalies		
Ectrodactylia involving absence of medial and distal phalanges on the fourth left toe and hypoplastic distal phalange on a right toe		
No. fetuses (%)	0 (0.0)	1 (0.3)
No. litters (%)	0 (0.0)	1 (2.2)
Ectrodactylia involving absence of medial and distal phalanges on the fifth left finger and absence of several medial and distal phalanges of the toes of both feet		
No. fetuses (%)	1 (0.6)	0 (0.0)
No. litters (%)	1 (4.2)	0 (0.0)
Total number of ectrodactylia		
No. fetuses (%)	1 (0.6)	1 (0.3)
No. litters (%)	1[b] (4.2)	1 (2.2)

a: One dam was excluded from calculation because the gender of one of its fetuses could not be determined
b: One fetus with ectrodactylia and multiple additional defects (amniotic bands)

2.6.7.12F　　ラットにおける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　　被験物質：イバブラジン塩酸塩

Report Title: S 16257-2: oral reproduction toxicity study in the Wistar rat (pre- and postnatal development)　　**Test Article:** Ivabradine hydrochloride

Design similar to ICH 4.1.2? Yes　　**Duration of treatment:** G6 to L20　　**Report No.:** NP07356

Species/strain: Rats/Wistar　　**Day of mating:** G0 (first day of sperm in vaginal smear)　　**Location in CTD:** 4.2.3.5.3-1

Initial Age: 14 weeks　　**Method of administration:** Gavage (10 mL/kg)　　**GLP compliance:** Yes

Date of first dose: [redacted]　　**Vehicle/formulation:** Demineralised water/solution

Special features:
- Day of spontaneous delivery = L0; Weaning day = L21
- Five (5) additional females/ Ivabradine-treated groups for plasma determination of Ivabradine and ONO-IN-306 on G17 and L5, 10 min, 1, 6 and 24 h after dosing (samples from 3 pregnant females analyzed)
- Histopathological examination of genital organs of infertile males and females, and mammary glands of dams that lost their litters

NOAEL:

F0 females: <2.5 mg/kg/d

F1 pre- and postnatal development: 2.5 mg/kg/d

F1 male and female fertility: 20 mg/kg/d

F2 pre- and early postnatal development: 20 mg/kg/d

Daily dose (mg/kg)		**0 (control)**	**2.5**	**7**	**20**
F0 females:					
Toxicokinetics of Ivabradine (mean values)[a]:					
Cmax (ng/mL)	G17		100	209	729
	L5		140	222	1096
AUC24 (ng.h/mL)	G17		622	1460	7719
	L5		608	1396	5037

G: Gestation day

L: Lactation day

a: As most of the concentrations of ONO-IN-306 were below the limit of quantitation (2.5 ng/ml), no toxicokinetic interpretation was performed for ONO-IN-306

2.6.7.12F　　ラットにおける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　　試験番号：NP07356（続き）

Daily dose (mg/kg) (Cont'd)		0 (control)	2.5	7	20
F0 females:					
No. pregnant		24	24	22	22
No. found dead or killed in extremis		0	0	0	0
Clinical observations:					
Increased salivation, decreased activity		-	±	+	++
Ventral posture, irregular breathing, partial blepharoptosis, piloerection		-	-	-	++
Necropsy observations:					
Heart: enlargement		0	1	1	2
Gestation bodyweight		-	-	-	-
Lactation bodyweight		-	-	-	-
Gestation food consumption		-	-	-	-
Lactation food consumption		-	-	-	-
Gestation water consumption (%[a]):	G6 to G13	34.8 g/d	+13	+18	+26**
	G14 to G20	37.3 g/d	+18*	+25**	+35**
Lactation water consumption		-	-	-	-
Mean No. implantations		12.4	12.8	11.4	12.4
Mean postimplantation loss (%)		9.3	5.7	10.3	9.9
Mean duration of gestation (days)		22.5	22.7	22.4	22.6
Abnormal parturition		0	0	1[b]	0
Gestation index[c]		1.00	1.00	0.95	1.00
No. female with total litter loss		0	0	0	0

±: Rare, +: Mild, ++: Moderate

a: For controls, group means are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown. Statistical significance is based on actual data (not on percent differences)
*Two-way analysis of variance: *: p<0.05, **: p<0.01*

b: Without delivery

c: Number of females with a live litter / number of pregnant females

2.6.7.12F　　ラットにおける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　　試験番号：NP07356（続き）

Daily dose (mg/kg) (Cont'd)	**0 (control)**	**2.5**	**7**	**20**
F1 litters: (preweaning)				
No. litters evaluated	24	24	21	22
Mean No. pups/litter	11.3	12.2	10.6	11.3
Mean No. live newborn pups/litter	11.2	12.1	10.6	11.2
Mean No. dead newborn pups/litter	0.0	0.0	0.0	0.0
Mean No. stillborn pups/litter	0.1	0.1	0.0	0.0
Pup sex ratios (% males) (at birth)	54	48	52	53
Live birth index	0.90	0.94	0.90	0.90
Postnatal mortality before weaning (birth to L20) (%)	0.8	1.0	1.3	8.1**
Weaning index (L21)	0.99	0.99	0.99	0.92
Mean pup bodyweights (g) (at birth)	6.5	6.5	6.4	6.3
Mean pup bodyweights (g) (at weaning)	42.3	40.7	41.8	41.5
Pup clinical signs	-	-	-	-
Physical landmarks:				
Incisor eruption, eye opening, auditory meatus opening	-	-	-	-
Reflex tests:				
Surface righting, prehensile traction, pupillary reflex, auditory startle	-	-	-	-
Skeletal examination of dead F1 pups[a]	-	-	-	-
Pup necropsy observations[b]				
Heart:				
External abnormal shape	np	np	np	6/6
Interventricular septum defect	np	np	np	4/6

L: Lactation day
a: Four pups dead before L9
b: Of the 20 dead pups during the lactation period, 6 were examined macroscopically
***: $p<0.01$(likelihood ratio χ^2)*

2.6.7.12F　　ラットにおける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　　試験番号：NP07356（続き）

Daily dose (mg/kg) (Cont'd)	**0 (control)**	**2.5**	**7**	**20**
F1 males: (postweaning)				
No. evaluated postweaning	24	24	21	22
No. found dead or killed in extremis	0	0	0	0
Clinical observations	-	-	-	-
Necropsy observations (terminal kill)				
Heart:				
Enlarged	-	-	1	2
Misshapen	-	-	-	1
Depressed whitish area on apex of left ventricle	-	-	-	1
Bodyweight change (from 21pp to 70pp)	-	-	-	-
Balanopreputial gland cleavage	-	-	-	-
Motor activity (open field)	-	-	-	-
Learning and memory (water maze)	-	-	-	-
Mean No. days prior to mating	3.3	3.0	3.0	2.5
No. of males that mated	24	24	21	22
No. of fertile males	23	22	21	22
F1 females: (postweaning)				
No. evaluated postweaning	24	24	21	22
No. found dead or killed in extremis	0	0	0	0
Clinical observations	-	-	-	-
Necropsy observations (terminal kill)				
Heart: misshapen	0	0	0	1
Premating bodyweight change	-	-	-	-
Bodyweight change (from 21pp to 70pp)	-	-	-	-
Vaginal opening	-	-	-	-
Motor activity (open field)	-	-	-	-
Learning and memory (water maze)	-	-	-	-
Mean No. days prior to mating	3.3	3.0	3.0	2.5
No. of females sperm positive	24	24	21	22

pp: Days post-partum

2.6.7.12F　　ラットにおける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　　試験番号：NP07356（続き）

Daily dose (mg/kg) (Cont'd)	**0 (control)**	**2.5**	**7**	**20**
F1 females: (postweaning) (Cont'd)				
No. of pregnant females	23	22	21	22
Fertility index	0.96	0.92	1.00	1.00
Mean No. implantations	12.6	11.4	11.6	13.5
Mean No. postimplantation loss	0.08	0.14	0.10	0.04
Gestation index	1.00	1.00	0.95	1.00
No. female with total litter loss	0	1	0	0
F2 Litters:				
Number of F1 females with litter	23	22	20	22
Mean No. live conceptuses/litter	11.6	10.3	11.0	12.9
No. dead newborn[a] pups	1	2	0	0
No. stillborn pups	0	0	0	3
Mean % Postimplantation loss	0.08	0.14	0.10	0.04
Pup bodyweights (birth) (g)	6.3	6.3	6.3	6.1
Pup bodyweights (L3) (g)	9.2	9.1	9.2	8.7
Pup sex ratios (% males)	53.3	47.8	56.0	52.9
Live birth index	0.91	0.86	0.89	0.96
Viability index (L3)	1.00	0.95	1.00	0.99
External and skeletal examination of dead pups	-	-	-	-

L: Lactation day

a: Dead shortly after delivery (distinguished from stillborn pups thanks to lung flotation test)

<table>
<tr><th>Species/ strain</th><th>Method of administration (vehicle/ formulation)</th><th>Treatment period</th><th>Doses (mg/kg/d)</th><th>No. per group</th><th>Noteworthy findings</th><th>Report number</th></tr>
<tr><td>Rats/ Wistar</td><td>Gavage (water)</td><td>PND7 to PND34</td><td>0, 1, 2, 4, 8</td><td>8M/8F (+16M/16F per Ivabradine-group for toxicokinetics)</td><td>- Death in satellite animals at 2 (1F) and 8 (1M). The cause of death or morbidity of the male could not be established, but the isolated nature and lack of dose-relationship indicate that they were not related to the drug.
- Premature sacrifice (1 control M) due to hypoactivity, loud breathing, dyspnea and half-closed eyes. The cause of moribundity was not established based on macroscopic post-mortem examination.
- Higher glucose concentration and lower creatinine concentration at 8 (F)
- Toxicokinetics of Ivabradine and ONO-IN-306 (Day 28, n=2/ gender/ group/ sampling time):
<table><tr><th>Dose (mg/kg/d)</th><th colspan="2">Cmax (ng/mL)</th><th colspan="2">AUC8 (ng.h/mL)</th></tr><tr><th></th><th>M</th><th>F</th><th>M</th><th>F</th></tr><tr><td></td><td colspan="4">Ivabradine</td></tr><tr><td>1</td><td>10</td><td>21</td><td>22</td><td>87</td></tr><tr><td>2</td><td>9.1</td><td>36</td><td>42</td><td>166</td></tr><tr><td>4</td><td>42</td><td>69</td><td>159</td><td>345</td></tr><tr><td>8</td><td>116</td><td>126</td><td>211</td><td>500</td></tr><tr><td></td><td colspan="4">ONO-IN-306</td></tr><tr><td>1</td><td>0.65</td><td>0.38</td><td>3.5</td><td>2.1</td></tr><tr><td>2</td><td>1.5</td><td>1.0</td><td>7.8</td><td>4.3</td></tr><tr><td>4</td><td>4.5</td><td>2.0</td><td>24</td><td>8.4</td></tr><tr><td>8</td><td>13</td><td>3.3</td><td>52</td><td>15</td></tr></table>
Conclusion: MTD was higher than the highest dose-level of 8 mg/kg/d since no adverse effects were observed after 28 days of treatment.</td><td>NP28601</td></tr>
</table>

PND: postnatal day

2.6.7.12G 新生児を用いた試験：重要な試験以外の試験（続き）

<table>
<tr><th>Species/ strain</th><th>Method of administration (vehicle/ formulation)</th><th>Treatment period</th><th>Doses (mg/kg/d)</th><th>No. per group</th><th>Noteworthy findings</th><th>Report number</th></tr>
<tr><td>Rats/ Wistar</td><td>Gavage (water)</td><td>PND7 to PND21

PND7 to PND34</td><td>2, 8

0, 16</td><td>10M/10F</td><td>- Death in control animals (1M, 1F) and at 2 (1M, 1F) unrelated to Ivabradine Hydrochloride administration due to isolated nature and lack of dose-relationship.
- Heart: increased heart weight [16 (F)]
- Kidneys: increased kidney weight [16 (F)]
- Dose-dependent heart-rate reduction 3 hours after dosing, at ≥2 reaching -44% in M (16) and -31% in F (16) on Day 1, and -15% and -22% respectively on Day 27.
- Toxicokinetics of Ivabradine and ONO-IN-306 (16 mg/kg/d, Day 28, n=2/ gender/ group/ sampling time):
<table>
<tr><th rowspan="2">Dose (mg/kg/d)</th><th colspan="2">Cmax (ng/mL)</th><th colspan="2">AUC24 (ng.h/mL)</th></tr>
<tr><th>M</th><th>F</th><th>M</th><th>F</th></tr>
<tr><td></td><td colspan="4">Ivabradine</td></tr>
<tr><td>16</td><td>165</td><td>447</td><td>441</td><td>1479</td></tr>
<tr><td></td><td colspan="4">ONO-IN-306</td></tr>
<tr><td>16</td><td>11</td><td>18</td><td>30</td><td>44</td></tr>
</table>
Conclusion: In view of the toxicological, exposure and pharmacodynamics findings, it was considered that the highest dose for the pivotal postnatal development study should be set at >16 mg/kg/d.</td><td>NP28971</td></tr>
</table>

PND: postnatal day

2.6.7.12H　　新生児を用いた試験　　被験物質：イバブラジン塩酸塩

Report Title: Oral (gavage) toxicity study in juvenile Wistar rats
Test Article: Ivabradine hydrochloride
Species/Strain: Rats/Wistar
Duration of treatment: 10 weeks (PND7 to PND77/78)
Report No.: NP30966
Initial Age: 7 days
Duration of Post-Dose: 3 weeks (Subset I)
Location in CTD: 4.2.3.5.4-3
Date of first dose: [redacted]-20[redacted]
Method of Administration: Gavage (3 mL/kg)
GLP compliance: Yes
Vehicle/formulation: Purified water/solution

Special features: - The heart rate of all Subset I animals was measured regularly before and throughout the treatment period.
- Toxicokinetics on PND7 (Day 1), PND 34 (Day 28) and PND77 (Day 71) (sampling 10 min, 1, 4, 8 and 24 hours after dosing)

NOAEL:
Toxicity: 7.5 mg/kg/d (M) / 15 mg/kg/d (F)
Postnatal development: 30 mg/kg/d
Male and female fertility: 30 mg/kg/d
F1 pre- and early postnatal development: 30 mg/kg/d

Daily dose (mg/kg)		**0 (vehicle)**		**7.5**		**15**		**30**	
Number of animals (main groups)		M: 30	F: 30	M: 30	F: 30	M: 30	F: 30	M: 30	F: 30
Number of animals (satellite TK groups)		M: 2	F: 2	M: 20[a]	F: 20[a]	M: 20[a]	F: 20[a]	M: 20[a]	F: 20[a]
Died or sacrificed moribund (satellite animals)		0	0	0	0	1[b]	0	0	0
Toxicokinetics – Ivabradine:									
Day 1	Cmax (ng/mL) [tmax: 1 h]			285	216	439	405	1365	650
	AUC24 (ng.h/mL)			1114	650	2126	1568	5617	4107
Day 28	Cmax (ng/mL) [tmax: 10 min to 1 h]			122	108	138	431	379	735
	AUC24 (ng.h/mL)			334	590	512	1888	1309	3143
Day 71	Cmax (ng/mL) [tmax: 10 min to 1 h]			273	350	418	965	897	1144
	AUC24 (ng.h/mL)			696	1883	1324	4181	3222	6417
Toxicokinetics – ONO-IN-306:									
Day 1	Cmax (ng/mL) [tmax: 1 h]			18.8	12.4	36.0	33.0	119	62.3
	AUC24 (ng.h/mL)			78.0	49.6	173	148	549	401
Day 28	Cmax (ng/mL) [tmax: 10 min to 1 h]			8.42	2.63	7.54	14.9	38.4	32.9
	AUC24 (ng.h/mL)			19.3	19.7	31.2	65.0	87.4	112
Day 71	Cmax (ng/mL) [tmax: 10 min to 1 h]			24.4	16.2	26.4	54.1	97.7	61.4
	AUC24 (ng.h/mL)			58.8	78.1	125	215	239	296

PND: Postnatal day
a: 2 rats/ gender/ dose/ sampling time
b: Animal cannibalized on PND7 (events leading to its death unknown)

2.6.7.12H 新生児を用いた試験 試験番号：NP30966（続き）

Daily dose (mg/kg)		0 (vehicle)		7.5		15		30	
Number of animals (main groups)		M: 30	F: 30	M: 30	F: 30	M: 30	F: 30	M: 30	F: 30
Noteworthy findings									
Died or sacrificed moribund		0	1[a]	0	1[b]	1[b]	0	0	2[b]
Bodyweight gain (g)		-	+187	-	+198*	-	-	-	-
Bodyweight (%)[c]		-	203 g	-	+5*	-	-	-	-
Food consumption		-	-	-	-	-	-	-	-
Clinical observations									
Salivation (ptyalism)		0	0	1	3	1	5	5	11
Reflux at dosing		0	0	2	0	2	1	0	1
Preweaning development[c]									
Number examined[d]		16	16	16	16	16	16	16	16
Tibia length (mm)		41.58	38.23	41.27	37.52	40.62	38.23	40.69	37.46
Functional observation battery[c]									
Number examined[d]		16	16	16	16	16	16	16	16
Motor activity		-	-	-	-	-	-	-	-
Water T-maze		-	-	-	-	-	-	-	-
Electrocardiography									
Number examined[d]		14	14	14	14	14	14	14	14
Heart rate (beats/min)	Predose	340	343	331	328	310	338	321	349
	Day 1	384	425	296**	301**	248**	266**	207**	205**
	Day 70	513	547	431*	368**	362**	378**	351**	341**
Heart rate reduction over 24 hours[e]									
[incidence[f], mean decrease (%) vs. predose]	Day 1	0/14, -	0/14, -	5/14, -24	4/14, -26	10/14, -27	13/14, -22	12/14, -39	14/14, -41
	Day 70	0/14, -	0/13, -	0/14, -	2/13, -28	0/13, -	1/14, -17	1/14, -24	2/12, -25
Heart rate reduction over 24 hours[e]									
[mean decrease (%) vs. vehicle]	Day 1	384	425	-23	-29	-35	-37	-46	-52
	Day 70	513	547	-16	-33	-29	-31	-32	-38

a: Found dead (prior to death animal was cold to the touch and thin, no macroscopic changes)

b: Macroscopic and microscopic examination confirmed that none of these deaths or killed moribund were related to Ivabradine administration

c: At the end of dosing period (within week 10)

d: Including rats found dead or killed during the study

e: Heart rate reduction was not provided in the study report. Percentage of decrease in heart rate in rats were calculated by comparison of mean HR calculated from the area under the curve of individual HR as a function of time, over the 0-24 h recording interval, to values reported at pretest or vehicle

f: Incidence refers to the number of animals with mean heart rate reduction greater than 15%

**: p<0.05, **: p<0.01 (Dunnett's or Dunn test vs. controls)*

2.6.7.12H 新生児を用いた試験 試験番号：NP30966（続き）

Daily dose (mg/kg)	**0 (vehicle)**		**7.5**		**15**		**30**	
Number of animals (main groups)	M: 30	F: 30	M: 30	F: 30	M: 30	F: 30	M: 30	F: 30
Noteworthy findings (Cont'd)								
Reproductive development								
Number examined[a]	14	14	14	14	14	14	14	14
Age at balanopreputial separation (days)	51.5		54.5		55.2		54.2	
Age at vaginal opening (days)		33.3		41.2		33.9		36.8
Number examined	9	8	9	8	8	9	9	8
Hematology[b]								
White blood cells (G/L)	-	7.32	-	7.25	-	5.27	-	4.45*
Lymphocytes + LUC (G/L)	-	5.91	-	6.32	-	4.49	-	3.47**
Blood biochemistry[b]								
Sodium (mmol/L)	-	143.6	-	143.4	-	143.6	-	142.4*
Inorganic phosphorus (mmol/L)	-	2.17	-	2.06	-	2.13	-	1.96*
Creatinine (µmol/L)	45	-	46	-	47	-	49*	-
Albumin (g/L)	37	-	39	-	37	-	39*	-
Organ weight (%)[b,c]								
Heart Absolute	0.88 g	0.63 g	+13	+5	+3	+8	+8	+14*
Relative to bodyweight	0.30%	0.36%	+12	+3	+2	+2	+7	+9*
Gross pathology	-	-	-	-	-	-	-	-
Histopathology								
Heart								
Interstitial mononuclear cell aggregates	2	1	3	0	5	0	5	1
Degenerative cardiomyocytes	1	0	3	0	2	1	2	1

LUC: large unstained cells
a: Including rats found dead or killed during the study
b: At the end of dosing period (within week 10)
c: For controls, group means are shown (in g or %). For treated groups, percentage differences from controls are shown. Statistical significance concerns the actual data and not the percentage differences.
**: p<0.05, **: p<0.01 (Dunnett's or Dunn test vs. controls)*

2.6.7.12H 新生児を用いた試験 試験番号：NP30966（続き）

Daily dose (mg/kg)	**0 (vehicle)**		**7.5**		**15**		**30**	
Number of animals (main groups)	M: 30	F: 30	M: 30	F: 30	M: 30	F: 30	M: 30	F: 30
Postdose evaluation – Subset I (Noteworthy findings)								
Number examined	5	5	5	5	5	5	5	5
Died or sacrificed moribund	0	0	0	0	0	0	0	0
Bodyweight[a]	-	-	-	-	-	-	-	-
Food consumption[a]	-	-	-	-	-	-	-	-
Clinical observations	-	-	-	-	-	-	-	-
Hematology[a]								
White blood cells (G/L)		5.18				4.45		4.20
Lymphocytes + LUC (G/L)		4.25				3.49		3.45
Organ weight	-	-	-	-	-	-	-	-
Gross pathology	-	-	-	-	-	-	-	-
Histopathology	-	-	-	-	-	-	-	-
Postweaning development								
Number examined	16	16	16	16	16	16	16	16
Males								
Mean No. of days prior to mating	2.6		2.8		2.6		3.0	
No. of males that mated	16		16		16		16	
Females								
No. of females sperm positive		16		16		16		16
No. of pregnant females		15		16		16		15
Fertility index		0.94		1.0		1.0		0.94
Bodyweight (%)[b]		265		+5		-1		+1
Mean No. of Corpora Lutea		13.3		16.0*		13.7		12.8
Mean No. of implantations		11.1		13.4*		12.3		10.9
Mean % of preimplantation loss		15.3		14.7		9.4		15.8
Mean No. of live conceptuses		10.7		12.8		11.9		10.2
Mean No. of early resorptions		0.3		0.6		0.4		0.7
Mean No. of late resorptions		0.1		0.1		0.0		0.1
No. of dead conceptuses		0		0		0		0
Mean % of postimplantation loss		4.0		5.3		3.5		6.6

LUC: large unstained cell
a: At the end of postdose period
b: At Day 14 post-coitum
**: p<0.05 (Dunnett's or Dunn test vs. controls)*

2.6.7.13　局所刺激性試験　被験物質：イバブラジン塩酸塩

2.6.7.13A　局所刺激性試験（*in vitro*）

Species/ strain or Test system	Method of administration	Duration of treatment	Concentration (mg/mL)	Dose	Gender and No. per group	Noteworthy findings	Report number
Hemolytic potential Human whole blood	*In vitro* incubation	2 min, 37°C	19, 93	-	1 healthy volunteer	- No hemolysis at any dilution level of the 19 mg/mL solution (i.e. 2.1 to 9.5 mg/mL) and up to the 5:1 dilution of the 93 mg/mL solution (i.e. 15 mg/mL) - Hemolysis at 1:1 to 4:1 dilution levels (i.e. 47 to 19 mg/mL) **Conclusion:** Ivabradine in saline solution did not elicit human blood hemolysis at concentration levels up to 15 mg/mL	NP08001

2.6.7.13B 局所刺激性試験（*in vivo*）

Species/ strain or Test system	Method of administration	Duration of treatment	Concentration (mg/mL)[a]	Dose (mg)	Gender and No. per group	Noteworthy findings	Report number
Local tolerance Rabbits/ New-Zealand White	Ear: Intravenous (marginal vein), perivenous (close to the marginal vein), intra-arterial (median artery) slow bolus	Single; ~30 sec	0 [vehicle: 0.9% (w/v) sodium chloride injection] (right ear), 2 (left ear)	0.2, 0.4/ear[b]	6M[c]	No relevant macroscopic or microscopic changes at the injection site whatever the route of administration at concentration level of 2 mg/mL	NP22686
Primary skin irritation/corrosion Rabbits/ New-Zealand White	Skin[d]: Semi occlusive dermal application	3 min 1 hour 4 hours	1.15 in water	0.46 g/site[e]	1M	- Very slight (scattered) erythema (1 hour) and very slight to well defined (scattered or focal) erythema (4 hours). - Mean skin irritation score for erythema for each animal: 1.7, 0.3 and 0.3. Scores for edema: 0.0. - Recovery within 7 days in all animals. - No evidence of skin corrosion.	NP32769
	Skin[d]: Semi occlusive dermal application	4 hours	1.15 in water	0.46 g/site[e]	2M		
Acute eye irritation/corrosion Rabbits/ New-Zealand White	Conjunctival sac: instillation	Single	-	0, 30 [f]	3M	- Slight and transitory signs of irritation of the conjunctivae (redness, chemosis, discharge). Completely resolution of chemosis and discharge within 24 hours after treatment and of redness within 72 hours, in all animals. - Mean eye irritation score of 0.7 for redness conjunctivae. Scores for cornea opacity, iris and conjunctival chemosis: 0.0. - No evidence of ocular corrosion.	NP32768

a: Unless otherwise indicated
b:0.2 mL/ear for the intravenous and the intra-arterial route; 0.1 mL/ear for the perivenous route
c: 3 killed after 3 and 13 days after dosing, respectively
d: 3 separate skin sites
e: 0.4 mL/site
f: 0.1 mL/eye

Species/ strain or test system	Method of administration	Duration of treatment	Doses (mg/kg/d)	Gender and No. per group	Noteworthy findings	Report number
Immunotoxicity						
- Four-week oral immunotoxicology study:						
Rat/Wistar	Gavage	4 weeks	0, 3, 16, 90 b.i.d.	8M, 8F	- Positive control = cyclophosphamide, resulting in marked effects on most parameters measured, and almost complete absence of PFCs, showing the sensitivity of the model to immunomodulation - Reduced bodyweight (at 90 b.i.d.) with decreased feed intake (F) - No relevant changes in lymphocyte subset analysis on peripheral blood cells - No changes in the PFC assay on spleen cells up to 90 b.i.d. - Toxicokinetics (n=8/gender/dose):	NP15279

Dose (mg/kg/d)	Plasma concentrations (ng/mL)					
	Day 22 (first dosing +1 h)		Day 27 (second dosing +1 h)		Day 28 (at necropsy)	
	M	F	M	F	M	F
	Ivabradine					
2 x 3	29	129	41	195	43	200
2 x 16	155	510	270	781	357	904
2 x 90	428	3193	832	3816	1697	5960
	ONO-IN-306					
2 x 3	blq	3.9	blq	4.6	3.9	7.2
2 x 16	16	20	21	32	24	39
2 x 90	157	201	126	190	210	341

Conclusion: Absence of immunotoxicological potential

2.6.7.14 その他の毒性試験（続き）

<table>
<tr><th>Species/ strain or test system</th><th>Method of administration</th><th>Duration of treatment</th><th>Doses (mg/kg/d)</th><th>Gender and No. per group</th><th>Noteworthy findings</th><th>Report number</th></tr>
<tr><td>Mechanistic studies
- Four-week oral telemetry study:
Rat/Wistar</td><td>Gavage</td><td>4 weeks</td><td>0, 7, 35, 175</td><td>6M</td><td>- Dose-dependent heart-rate reduction at ≥7 mg/kg (reaching -41% and -55% vs. controls for groups given 35 and 175 mg/kg, respectively) without effect on aortic blood pressure
- Decreased trend of bodyweight gain at 175 mg/kg
- Increased plasma ANP at 175 mg/kg
- Increased trend of urinary cGMP and troponin I at 175 mg/kg
- Increased left ventricle weight at ≥35 mg/kg, whole heart and right ventricle weight at 175 mg/kg
- Myocardial lesions (inflammatory cell aggregates) developing spontaneously in control animals and exacerbated by ivabradine at 175 mg/kg
- Most advanced lesions (enhanced size and incidence of inflammatory foci) in animals presenting the greatest heart-rate reduction throughout the treatment period.
- Toxicokinetics (mean model-predicted parameters):
<table><tr><th>Dose (mg/kg/d)</th><th>Cmax (ng/mL)</th><th>AUC24 (ng.h/mL)</th></tr><tr><td>7</td><td>97</td><td>319</td></tr><tr><td>35</td><td>462</td><td>1240</td></tr><tr><td>175</td><td>3446</td><td>14397</td></tr></table>Conclusion: The most advanced myocardial inflammatory lesions occurred in those animals presenting the greatest heart-rate reduction throughout the dosing period.</td><td>NP15300</td></tr>
</table>

2.6.7.14 その他の毒性試験（続き）

Species/ strain or test system	Method of administration	Duration of treatment	Doses (mg/kg/d)[a]	Gender and No. per group	Noteworthy findings	Report number
Studies on impurities[b]						
- Ames reverse mutation test in bacterial cells:						
S. typhimurium, E. coli	Preincubation and plate incorporation methods	3 days	50 to 5000 µg/plate with and without S9[c]	n=3/assay	- No genotoxic effects - Clearing of the bacterial lawn and/or reduction in the number of revertant colonies at ≥3000 µg/plate **Conclusion:** The genetic profile of Ivabradine Hydrochloride was unaffected by the impurities present in batch FE 349	NP07357
- Micronucleus test in rat bone marrow:						
Rat/Wistar	Gavage	Single	0, 125, 250, 500, 750	12M, 12F	- No genotoxic effects - Death at 750 mg/kg and overt signs of toxicity at ≥125 mg/kg with dose-related incidence, severity and duration - Similar relative proportions of polychromatic and normochromatic erythrocytes between groups **Conclusion:** The genetic profile of Ivabradine Hydrochloride was unaffected by the impurities present in batch FE 349	NP07671
- Four-week oral toxicity study:						
Rat/Wistar	Gavage	4 weeks	0, 6.5, 20, 59, 175	10M, 10F	- Overt signs of toxicity, including increased salivation [≥6.5 (F), ≥20 (M)], reduced locomotor activity [≥59, and 20 (1M on Day1)] and piloerection (≥59) - Increased water consumption (175), decreased food consumption (175F); increased lymphocyte count (175F); increased ALT activity (175); increased potassium and/or chloride excretion (≥59F); increased heart and liver weights (≥59); enlarged heart (≥59F); inflammatory cell infiltrates with cardiomyofiber loss/necrosis (≥20F, ≥59M) **Conclusion:** The safety profile of Ivabradine Hydrochloride was unaffected by the impurities present in batch FE 349	NP07572

a: Unless otherwise indicated
*b: Batch FE 349 of ivabradine containing [redacted] % impurities by accelerated degradation and spiked with [redacted] % of 不純物A**
c: Metabolizing system: liver S9 mix from Aroclor1254-treated rats

＊新薬承認情報提供時に置換

2.6.7.14 その他の毒性試験（続き）

Species/ strain or test system	Method of administration	Duration of treatment	Doses	Gender and No. per group	Noteworthy findings	Report number
Other studies						
- Phototoxicity:						
Balb/c 3T3 fibroblasts	Neutral red uptake Test	1 h of pre-incubation (dark) + 50 min of irradiation	0.012, 0.06, 0.3, 1.5, 7.5, 37.5, 187, 937 µg/mL	n=6/dose	- No relevant cytotoxic effect after incubation with ivabradine, either with or without irradiation by artificial sunlight **Conclusion:** Absence of phototoxic potential	NP08592
- Local lymph node assay:						
Mouse CBA/J	Ear: Open dermal application	3 days	0 [vehicle: 4:1 (v/v) acetone/olive oil], 10, 25 and 50 w/w% [a]	5F	- No sign of local irritation - Stimulation index of 1.4, 1.0 and 0.8 at 10, 25 and 50% w/w, respectively **Conclusion:** Ivabradine Hydrochloride is not a skin sensitizer.	NP32767
- Ames reverse mutation test in bacterial cells:						
S. typhimurium, E. coli	Preincubation and plate incorporation methods	3 days	52 to 5000 µg/plate with and without S9 [b]	n=3/assay	- 不純物B* induced dose related increases in the number of revertant colonies in tester strain WP2 uvrA (pKM101) - The increases were up to 2.7-fold and more than 2.2-fold compared to the concurrent vehicle control in the absence and presence of S9 mix, respectively **Conclusion:** 不純物B* , potential impurity, was mutagenic in the *E. coli* reverse mutation assay	NP35658

a: 25 µL/ear
b: Metabolizing system: liver S9 mix from Aroclor1254-treated rats

＊新薬承認情報提供時に置換