第 2 部　CTD の概要

一般名：ジルコニウムシクロケイ酸ナトリウム水和物

版番号：[redacted]

2.6.6　毒性試験の概要文
ジルコニウムシクロケイ酸ナトリウム水和物

本資料に記載された情報に係る権利はアストラゼネカ株式会社に帰属します。弊社の事前の承諾なく本資料の内容を他に開示することは禁じられています。

目次

目次 2
略語及び専門用語一覧表 4
2.6.6.1 まとめ 6
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 10
2.6.6.3.1 ラットを用いた反復投与毒性試験 11
2.6.6.3.1.1 ラットを用いた ZS-9 の経口投与時の最大耐量（MTD）の検討及び 7 日間反復経口投与毒性試験 11
2.6.6.3.1.2 ラットを用いた ZS-9 の 7 日間反復経口投与時の忍容性を検討する予備試験 11
2.6.6.3.1.3 ラットを用いた ZS-9 の 1 日 3 回経口投与による 14 日間反復投与毒性試験及び 10 日間回復性試験 12
2.6.6.3.1.4 ラットを用いた ZS の 28 日間反復経口投与毒性試験及び 14 日間回復性試験 13
2.6.6.3.1.5 ラットを用いた ZS の 26 週間反復経口投与毒性試験及び 4 週間回復性試験（雄の受胎能の評価を含む） 14
2.6.6.3.2 イヌを用いた反復投与毒性試験 16
2.6.6.3.2.1 イヌを用いた ZS-9 の経口投与時の最大耐量（MTD）及び 7 日間反復経口投与毒性試験 16
2.6.6.3.2.2 イヌを用いた ZS-9 の 1 日 3 回 7 日間反復経口投与時の忍容性を検討する予備試験 17
2.6.6.3.2.3 イヌを用いた ZS-9 の 1 日 3 回経口投与による 14 日間反復投与毒性試験及び 10 日間回復性試験 17
2.6.6.3.2.4 雌性イヌの尿路に対する尿アルカリ度、ZS-9 の粒子サイズ及びプロトン化の影響を検討する 14 日間反復経口投与毒性試験 19
2.6.6.3.2.5 イヌを用いた ZS の 28 日間反復経口投与毒性試験及び 21 日間回復性試験 20
2.6.6.3.2.6 雌性イヌを用いた ZS の 28 日間反復経口投与毒性試験及び 21 日間回復性試験 21
2.6.6.3.2.7 イヌを用いた ZS の 39 週間反復経口投与毒性試験及び 28 日間回復性試験 22
2.6.6.4 遺伝毒性試験 25
2.6.6.4.1 In vitro 遺伝毒性試験 26
2.6.6.4.1.1 ZS-9：ネズミチフス菌の菌株 TA98、TA100、TA1535 及び TA1537 並びに大腸菌の菌株 WP2*urvA* を用いた復帰突然変異試験 26
2.6.6.4.1.2 ZS-9：チャイニーズハムスター卵巣細胞を用いた *in vitro* 染色体異常試験 27
2.6.6.4.2 in vivo 遺伝毒性試験 27
2.6.6.4.2.1 ラットを用いた ZS の 28 日間反復強制経口投与試験及び 14 日間回復性試験 27
2.6.6.5 がん原性試験 28
2.6.6.6 生殖発生毒性試験 28
2.6.6.6.1 雌の受胎能及び初期胚発生に関する試験 29
2.6.6.6.1.1 ラットの受胎能及び胚・胎児発生に対する ZS の強制経口投与による影響 29
2.6.6.6.2 胚・胎児発生に関する試験 29

2.6.6.6.2.1 ウサギを用いた ZS の強制経口投与による胚・胎児発生に関する試験（予備試験） 29
2.6.6.6.2.2 ウサギを用いた ZS の強制経口投与による胚・胎児発生に関する試験 30
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 31
2.6.6.6.3.1 ラットを用いた ZS の強制経口投与による出生前及び出生後の発生に関する試験 31
2.6.6.6.4 雄の受胎能に関する試験 32
2.6.6.6.4.1 ラット用いた ZS の 26 週間反復経口投与毒性試験と 4 週間回復性試験及び雄受胎能の評価 32
2.6.6.6.5 幼若動物を用いた毒性試験 33
2.6.6.7 局所刺激性試験 33
2.6.6.8 その他の毒性試験 33
2.6.6.8.1 抗原性試験 33
2.6.6.8.2 免疫毒性試験 33
2.6.6.8.3 毒性発現の機序に関する試験 33
2.6.6.8.4 依存性試験 33
2.6.6.8.5 代謝物に関する試験 33
2.6.6.8.6 不純物に関する試験 33
2.6.6.8.7 その他の試験 34
2.6.6.8.7.1 モルモットを用いた ZS の皮膚への適用による皮膚感作性試験（改良 Buehler 法） 34
2.6.6.9 考察及び結論 35
2.6.6.10 参考文献 36

表目次

表 1 ZS 及び ZS-9 の代表的バッチの特性の比較 6
表 2 ZS 及び ZS-9 の毒性試験 7
表 3 ZS 及び ZS-9 の安全性評価に用いたロットの概要 9
表 4 試験群の概要（524020 試験） 13
表 5 試験群の概要（524942 試験） 14
表 6 遺伝毒性試験成績 26

略語及び専門用語一覧表

本概要で使用する略語及び専門用語を以下に示す。

略語及び専門用語	用語の説明
ALT	Alanine aminotransferase：アラニンアミノトランスフェラーゼ
AST	Aspartate aminotransferase：アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ
BUN	Blood urea nitrogen：血中尿素窒素
CPH	Cyclophosphamide：シクロホスファミド
CPK	Creatinine phosphokinase：クレアチニンホスホキナーゼ
DMSO	Dimethyl sulfoxide：ジメチルスルホキシド
FDA	Food and Drug Administration：米国食品医薬品局
GLP	Good Laboratory Practice：医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準
HCA	α-Hexylcinnamaldehyde：α-ヘキシルシンナムアルデヒド
HCO_3	Bicarbonate：重炭酸
HED	Human equivalent dose：ヒト等価用量
ICH	International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use：医薬品規制調和国際会議
KCl	Potassium chloride：塩化カリウム
KEC	Potassium cation exchange capacity：カリウム交換容量
LDH	Lactate dehydrogenase：乳酸脱水素酵素
MC	Methylcellulose：メチルセルロース
MN-NCE	Micronucleated NCE：小核を有する正染性赤血球
MN-PCE	Micronucleated PCE：小核を有する多染性赤血球
MTD	Maximum tolerated dose：最大耐量
NCE	Normochromatic erythrocyte：正染性赤血球
OECD	Organization for Economic Cooperation and Development：経済協力開発機構
PCE	Polychromatic erythrocyte：多染性赤血球
PR	ECG interval measured from the beginning of the P wave to the end of the R wave：心電図の P 波の初めから QRS 波の初めまでの時間
QRS	ECG interval measured from the beginning of the Q wave to the end of the S wave：心電図の Q 波の初めから S 波の終りまでの時間
QTc	Corrected QT interval：補正 QT 間隔
RODI	Reverse osmosis deionized water：逆浸透膜処理した脱イオン水
RR	ECG interval measured from the beginning of one R wave to the beginning of the next R wave：心電図の 1 つの R 波の初めから次の R 波の初めまでの時間
S9	Liver fraction that contains a high concentration of cytochrome P450 metabolic enzyme：シトクロム P450 代謝酵素を高濃度に含有する肝臓画分
UK	Urine potassium：尿中カリウム
UNa	Urine sodium：尿中ナトリウム
UUN	Urine urea nitrogen：尿中尿素窒素
Zr	Zirconium：ジルコニウム

略語及び専門用語	用語の説明
ZS	Sodium zirconium cyclosilicate hydrate：ジルコニウムシクロケイ酸ナトリウム水和物
ZS-9	Nonprotonated sodium zirconium cyclosilicate hydrate：非プロトン化ジルコニウムシクロケイ酸ナトリウム水和物

2.6.6.1 まとめ

微孔質ジルコニウムケイ酸塩の一種であるジルコニウムシクロケイ酸ナトリウム水和物（ZS）は、高カリウム血症の治療薬として開発した陽イオン選択的な無機結晶イオン交換化合物である。ZS は水性媒体及び生体液に溶解せず、体内に吸収されない。ZS の臨床開始用量としては、1 回 10 g を水で懸濁して 1 日 3 回経口投与することが推奨され、通常は、投与後 24～48 時間までに血清カリウムが正常値に到達する。その後は、ZS を 1 回 5 g を水で懸濁して 1 日 1 回経口投与し、必要に応じて 1 日 1 回 10 g まで増量又は 1 日 1 回 5 g の隔日経口投与に減量できる。

非臨床試験は ZS 及び ZS-9 の両製剤について実施した。ZS は ZS-9 を部分プロトン化したものであり、ZS-9 結晶格子内のナトリウムイオンの一部がプロトンに置換されている。ZS の合成過程においては、ZS-9 は ZS の前駆物質であり、プロトン化により ZS-9 は ZS に変換される（Bem et al 1999）。ZS-9 の部分プロトン化により生成される ZS は、アルカリ度及びナトリウム負荷を低減する目的で開発されたものである。ZS 及び ZS-9 の代表的バッチ（両方とも不溶性）について、水性懸濁液中のナトリウムの含有量（%）及び pH を比較した結果を表 1 に示す。

表 1 ZS 及び ZS-9 の代表的バッチの特性の比較

パラメータ	ZS	ZS-9（ロット番号 [redacted]）
ナトリウム含有量（%）	[redacted]	[redacted]
水性懸濁液中の pH	[redacted]	[redacted]
KEC (mEq/g)[a]	[redacted]	[redacted]

a：カリウム交換容量

ラットへの ZS-9 投与により、カリウム及び尿素窒素の尿中排泄量が用量依存的に減少し、カリウム及び尿素窒素の糞中排泄量が用量依存的に増加したことから（2009-003 試験）、ZS-9 が期待される薬理作用を示すことが確認された。ZS を懸濁液として強制経口投与したラット 28 日間及び 26 週間反復投与毒性試験（それぞれ 524020 試験及び 524942 試験）においても、同様のデータが得られた。イヌに ZS を混餌投与した試験（1959-009 試験）においても、尿中カリウム排泄の低下が用量依存的に認められた。したがって、体外へのカリウム排出の促進能は ZS と ZS-9 とで同程度であることから、ZS に関する非臨床安全性評価の一部として、ZS-9 を用いた非臨床試験成績を使用することは妥当と考えられる。なお、臨床試験については、いずれの試験も ZS を用いて実施した。

毒性試験として、ラット及びイヌを用いた単回及び反復経口投与毒性試験、遺伝毒性試験、並びにラット及びウサギを用いた生殖発生毒性試験を実施した。がん原性試験は実施しなかった。開発初期の毒性試験は ZS-9 を用いて実施した。ZS 及び ZS-9 を用いて実施した毒性試験の概要を表 2 に示す。重要な毒性試験は、「医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準」（GLP）を遵守して実施した。毒性試験の一覧を毒性試験概要表（2.6.7.1 項参照）にも示しており、同表には各試験の GLP 適用／非適用の区分及び雌雄における無毒性量も記載している。

表 2　　ZS 及び ZS-9 の毒性試験

試験の種類 及び試験期間	投与経路	1 日あたりの 投与回数	動物種・試験材料	試験番号	GLP
単回投与毒性試験	経口（強制投与）	1	ラット	2009-001*	非適用
	経口（強制投与）	1	イヌ	2009-002*	非適用
反復投与毒性試験					
7 日間	経口（強制投与）	1	ラット	2009-001*	非適用
7 日間	経口（強制投与）	3	ラット	2010-001*	非適用
14 日間	経口（強制投与）	3	ラット	UNTHSC-1000*	適用
28 日間	経口（強制投与）	1 及び 3	ラット	524020	適用
26 週間	経口（強制投与）	3	ラット	524942	適用
7 日間（MTD）	経口（強制投与）	1	イヌ	2009-002*	非適用
7 日間（MTD）	経口（混餌投与）	3	イヌ	14175-10*	非適用
14 日間	経口（混餌投与）	3	イヌ	14250-10*	適用
14 日間	経口（混餌投与）	3	イヌ	1959-001**	非適用
28 日間	経口（混餌投与）	1 及び 3	イヌ	1959-007	適用
28 日間	経口（混餌投与）	3	イヌ	1959-009	適用
39 週間	経口（混餌投与）	1	イヌ	1959-008	適用
遺伝毒性試験					
復帰突然変異試験	*in vitro*	該当せず	ネズミチフス菌及び大腸菌	789296*	適用
染色体異常試験	*in vitro*	該当せず	チャイニーズハムスター卵巣細胞	789301*	適用
骨髄小核試験 [a]	経口（強制投与）	1 及び 3	ラット	524020	適用
生殖発生毒性試験					
雄の受胎能に関する試験 [a]	経口（強制投与）	3	ラット	524942	適用
雌の受胎能及び胚・胎児発生に関する試験	経口（強制投与）	3	ラット	496748	適用
出生前及び出生後の発生に関する試験	経口（強制投与）	3	ラット	496753	適用
母動物への毒性及び MTD に関する試験	経口（強制投与）	1 及び 3	ウサギ	496858	適用
胚・胎児発生に関する試験	経口（強制投与）	3	ウサギ	496863	適用
局所刺激性試験及びその他の毒性試験					
皮膚感作性試験	経皮	該当せず	モルモット	20075345	適用

MTD：最大耐量、GLP：医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準
a：反復投与毒性試験の一部として実施
*：ZS-9 を投与
**：ZS、ZS-9、ZS-9＋カリウム補充、及び [redacted]μm 以下の粒子を除去した ZS-9（= ZS-9S）を投与

投与方法は、げっ歯類ではすべて強制経口投与とし、イヌでは強制経口投与又はウェットフードとの混餌投与とした。被験物質を混餌投与する場合には、ウェットフードによる摂餌量を毎日測定し、投与量を記録した。強制経口投与の場合には、ZS 又は ZS-9 のいずれについても、必要量の被験物質を蒸留水（7 日間までの GLP 非適用経口投与毒性試験の場合）又は高粘度の 0.5% (w/v)メチルセルロース（MC）溶液に懸濁し、毎日調製した。調製の際には、最初にホモジナイザー（14 日間試験の場合）又は試験室用ミキサー[redacted] 型のいずれかを用いて明らかに均一になるまで混和し、次いで、マグネチックスターラーを用いて投与終了時まで攪拌した。14 日間以上の試験においては、バリデートされた分析法（GLP 適用）により調製液中の被験物質濃度を測定した。

毒性試験に用いた被験物質のロットを表 3 に示した。同表には使用した被験物質の KEC も記載した。安全性評価に用いた ZS 及び ZS-9 のロットについて、それらの[redacted]を毒性試験概要表（2.6.7.4-1 項参照）に示した。また、安全性評価に用いた ZS 及び ZS-9 の各種ロットに含まれる元素不純物の詳細については毒性試験概要表（2.6.7.4-2 項参照）に示しており、安全性プログラムによって製剤の申請規格の妥当性が示されている。

ラット及びイヌに極めて高用量の ZS を長期間反復経口投与したときに、いずれの動物種においても忍容性が認められた。淡色の糞便排泄が認められたが、これは ZS の糞中排泄によるものと考えられた。ラットには投与可能な最大用量である 2000 mg/kg 1 日 3 回（6000 mg/kg/日）を最長 26 週間反復投与し（524942 試験）、イヌには 1000 mg/kg 1 日 1 回を最長 39 週間反復投与し（1959-008 試験）、それぞれ忍容性が認められた。FDA ガイダンス（Estimating the maximum safe starting dose in initial clinical trials for therapeutics in adult healthy volunteers, 2005）（FDA Guidance for Industry 2005）で提唱されている投与量換算法を用い、上記の動物における投与量（mg/kg）を体重 60kg のヒトへの用量に換算すると、ラットの投与量（6000 mg/kg/日）については約 58 g/日、イヌの投与量（1000 mg/kg/日）については約 33 g/日に相当する。

イヌに ZS を 2000 mg/kg/日の用量で 39 週間反復投与した結果、ジルコニウム（Zr）又は ZS が体内に吸収されないことが明らかとなった。

いずれの動物種においても、ZS 及び ZS-9 の投与による影響は薬理作用（カリウムの消化管からの吸収を抑制する作用）に関連した所見に限られ、恒常性の維持、特に適切な血清カリウム濃度及び適切な体内の総カリウム量を維持するための適応反応を反映するものであった。主たる適応反応は尿中カリウム排泄量の顕著な減少であったが、この適応反応は、イヌの最高用量群の少数例を除き、概して血清カリウム濃度を低値かつ正常範囲内に維持するための適切な反応であった。ZS 投与に関連した二次的影響として、血清アルドステロン濃度の低下、血清重炭酸（HCO_3）濃度の上昇、尿中ナトリウム排泄量の増加、尿中水素イオン濃度の低下（尿 pH の上昇）が認められた。ラットでは、これらの所見は比較的軽度であり、投与可能な最大用量である 6000 mg/kg/日を最長 26 週間投与した場合にも、これらの影響は有害なものではないと判断された。一方、イヌでは、極めて高用量の ZS を長期投与したときに臨床的に問題となる低カリウム血症が発現し、ZS の薬理作用が用量を制限することとなった。ZS の長期投与により、イヌでは腎臓の変性及び炎症性変化、並びに副腎皮質の脂質空胞形成が認められ（ラットでは認められず）、これらの変化はいずれも低カリウム血症に関連した二次的影響と考えられた。イヌを用いた試験の一部において、追加動物に ZS 又は ZS-9 を塩化カリウムと併用投与し、観察された影響とカリウム低下との関連性を評価した。その結果、カリウムの補充により、低カリウム血症の発現頻度及び／又は程度は低下し、それに伴い腎臓及び副腎への影響も軽減された。また、低カリウム血症は投与中止により回復した。

ZS-9 の細菌を用いた復帰突然変異試験及び *in vitro* 染色体異常試験において、遺伝毒性は認められなかった。また、ラットに ZS を最大 6000 mg/kg/日（2000 mg/kg を 1 日 3 回）まで経口投与

したが、これらのラットから採取した骨髄細胞において小核誘発は認められなかった。ZS のラット及びイヌを用いた長期反復投与毒性試験において過形成や前がん病変が認められなかったこと、ZS 及び ZS-9 は遺伝毒性を示さず、更に ZS は体内に吸収されないことから、ZS がヒトに対して発がん性を示す可能性は低いと考えられる。

雌雄ラットに、ZS を投与可能な最大用量である 6000 mg/kg/日（体重 60kg のヒトにおいて約 58 g/日に相当）まで投与しても、雌雄の生殖機能に対する影響は認められなかった。また、妊娠ラット及び妊娠ウサギに ZS を最大 6000 mg/kg/日まで投与したが、妊娠の維持又は胚・胎児発生への影響は認められなかった。妊娠ラットに妊娠第 1 三半期から授乳終了まで最大 6000 mg/kg/日の ZS を投与したが、妊娠、分娩又は出生児の発達に対する影響は認められなかった。

モルモットを用いた皮膚感作性試験において、適用可能な最大用量（0.3 g）の ZS を皮膚に局所適用した結果、皮膚刺激性は認められず、ZS は皮膚感作性物質ではないと考えられた。

ZS 及び ZS-9 に関連する有害な影響は ZS/ZS-9 の薬理作用に関連するものであり、休薬により回復する可逆性の変化であった。受胎能、生殖能、胚・胎児発生、及び出生児の発生に対する有害な影響は認められず、遺伝毒性も認められなかった。以上のように、これらの毒性試験成績は、適応対象となる患者集団への ZS の使用を支持するものと考えられる。

表 3　　ZS 及び ZS-9 の安全性評価に用いたロットの概要

試験番号	試験名	ロット	KEC (mEq/g)[a]	GLP
単回及び反復投与毒性試験				
2009-001	ラットを用いた単回及び 7 日間反復経口投与毒性試験（1 日 1 回投与）	[redacted]*	[redacted]	非適用
2010-001	ラットを用いた 7 日間反復経口投与毒性試験（1 日 3 回投与）	[redacted]*	[redacted]	非適用
反復投与毒性試験				
UNTHSC-1000	ラットを用いた 14 日間反復経口投与毒性試験（1 日 3 回投与）	[redacted]*	[redacted]	適用
524020	ラットを用いた 28 日間反復経口投与毒性試験（1 日 1 回又は 3 回投与）	[redacted]	[redacted]	適用
524942	ラットを用いた 26 週間反復経口投与毒性試験（1 日 3 回投与）	[redacted]	[redacted]	適用
2009-002	ビーグル犬を用いた単回及び 7 日間反復経口投与毒性試験（1 日 1 回投与）	[redacted]*	[redacted]	非適用
14175-10	ビーグル犬を用いた 7 日間反復経口投与毒性試験（1 日 3 回投与）	[redacted]*	[redacted]	非適用
14250-10	ビーグル犬を用いた 14 日間反復経口投与毒性試験（1 日 3 回投与）	[redacted]*	[redacted]	適用
1959-001	雌性ビーグル犬を用いた 14 日間反復経口投与毒性試験（1 日 3 回投与）	[redacted]* [redacted]* [redacted] [redacted]*	[redacted] [redacted] [redacted] [redacted]	非適用
1959-007	ビーグル犬を用いた 28 日間反復経口投与毒性試験（1 日 3 回投与）	[redacted]	[redacted]	適用

表 3 ZS 及び ZS-9 の安全性評価に用いたロットの概要

試験番号	試験名	ロット	KEC (mEq/g)[a]	GLP
1959-009	ビーグル犬を用いた 28 日間反復経口投与毒性試験（1 日 3 回投与）	[redacted]	[redacted]	適用
1959-008	ビーグル犬を用いた 39 週間反復経口投与毒性試験（1 日 1 回投与）	[redacted]	[redacted]	適用
遺伝毒性試験				
789296	復帰突然変異試験	[redacted]*	[redacted]	適用
789301	染色体異常試験	[redacted]*	[redacted]	適用
524020	小核試験	[redacted]	[redacted]	適用
生殖発生毒性試験				
524942	ラット：雄の受胎能に関する試験（1 日 3 回投与）	[redacted]	[redacted]	適用
496748	ラット：雌の受胎能及び胚・胎児発生に関する試験（1 日 3 回投与）	[redacted]	[redacted]	適用
496858	ウサギ：胚・胎児発生に関する用量設定試験（1 日 1 回又は 3 回投与）	[redacted]	[redacted]	適用
496863	ウサギ：胚・胎児発生に関する試験（1 日 3 回投与）	[redacted]	[redacted]	適用
496753	ラット：出生前及び出生後の発生に関する試験（1 日 3 回投与）	[redacted]	[redacted]	適用
局所刺激性試験及びその他の毒性試験				
20075345	皮膚感作性試験	[redacted]	[redacted]	適用

a：カリウム交換容量
*：ZS-9 のロット

2.6.6.2 単回投与毒性試験

資料番号：4.2.3.2.1（2009-001 試験）、4.2.3.2.6（2009-002 試験）

水で調製した ZS-9 を、投与容量を 10 mL/kg とし 2000 mg/kg の用量でラット（2009-001 試験）又はイヌ（2009-002 試験）に単回強制経口投与した結果、有害な影響は認められなかった。ZS-9 の単回投与による影響については毒性試験概要表（2.6.7.5 項参照）に要約しており、反復投与毒性試験の結果と合わせて評価した。試験の詳細については、次項に記載した。

2.6.6.3 反復投与毒性試験

反復投与毒性試験の概要を表 2 に示した。ZS 及び ZS-9 は不溶性の無機結晶化合物であり、体内に吸収されないと考えられることから、薬物動態の評価は行っていない。なお、イヌ 39 週間反復投与毒性試験（1959-008 試験）では、最終剖検時に尿及び血液試料を採取し、GLP 適用のバリデートされた分析法によりジルコニウム濃度を測定した。

以下の項に示すヒト等価用量（HED）は、FDA ガイダンス（Estimating the maximum safe starting dose in initial clinical trials for therapeutics in adult healthy volunteers, 2005）（FDA Guidance for Industry 2005）に記載されている換算係数を使用し、体表面積を指標として動物における無毒性量から換算したものである。

2.6.6.3.1 ラットを用いた反復投与毒性試験

2.6.6.3.1.1 ラットを用いた ZS-9 の経口投与時の最大耐量（MTD）の検討及び 7 日間反復経口投与毒性試験

資料番号：4.2.3.2.1（2009-001 試験）

雌雄の Sprague Dawley 系ラットに、ZS-9（試験報告書では UZSi-9 と記載）を単回及び反復経口投与したときの最大耐量（MTD）を評価するために、GLP 非適用試験を 2 期に分けて実施した。第 1 期では単回投与の影響を評価し（雌雄各 3 例）、第 2 期では 1 日 1 回 7 日間反復投与したときの影響を評価した（用量あたり雌雄各 5 例）。両試験期に共通の評価パラメータとして、ケージサイドでの観察所見（死亡／瀕死状態）、詳細な一般状態の観察所見、体重、体重増加量及び摂餌量を評価し、第 2 期では、血液生化学的検査、血液学的検査、血液凝固検査及び尿検査、剖検時の肉眼的観察、器官重量及び器官重量比の測定、並びに対照群及び高用量（2000 mg/kg）群のラットから採取した口腔、気管及び消化管全体の組織についての病理組織学的検査も実施した。

ZS-9 の投与液を脱イオン水で調製し、0、500、1000 及び 2000 mg/kg/日の用量及び 10 mL/kg の投与容量で 1 日 1 回、強制経口投与した。第 1 期では投与当日に投与液を調製したが、第 2 期では投与液を一度にまとめて調製し、1 日分の使用量ずつ分注して、投与するまで室温で保管した。投与液は、少なくとも投与前 10 分間以上スターラーで攪拌し、投与液の均一性を確保するために投与の際にも継続して攪拌した。投与液の分析は実施しなかった。

体重、体重増加量、摂餌量、血液生化学的検査、血液学的検査、尿検査、尿中ナトリウム濃度（UNa）、尿中カリウム濃度（UK）、尿中尿素窒素濃度（UUN）、器官重量（絶対重量、相対重量）、剖検及び病理組織学的検査において、被験物質による影響は認められなかった。なお、対照群と比較して、全用量群の雄及び 2000 mg/kg/日群の雌において用量依存的な軽度の平均プロトロンビン時間の延長が認められたが、剖検時に出血を示す所見は認められず、この影響は毒性学的意義のないものと判断した。

本試験において、単回又は 1 日 1 回最長 7 日間反復投与したときの最大耐量は 2000 mg/kg と判断された。この用量は、体重 60 kg として HED に換算すると 19 g に相当する。

2.6.6.3.1.2 ラットを用いた ZS-9 の 7 日間反復経口投与時の忍容性を検討する予備試験

資料番号：4.2.3.2.2（2010-001 試験）

雌雄各 5 例の Sprague Dawley 系ラットに、ZS-9 を 1 回 2000 mg/kg の用量で、12 時間の間に 6 時間間隔で 1 日 3 回、7 日間連日強制経口投与したときの忍容性を評価するために GLP 非適用試験を実施した。被験物質は 0.5% (w/v)メチルセルロース溶液に懸濁して 200 mg/mL の濃度の懸濁液として投与した。投与液は投与当日の初回投与前に調製し（1 日 1 回）、調製時から毎日の投与終了時まで室温で攪拌し続けた。投与容量は 10 mL/kg とした。毎回投与時に一般状態を観察し、投与開始 5 日前と 3 日前並びに投与 1、3、5 及び 8 日目に体重及び摂餌量を記録した。尿及び糞便を 5 日目に採集し、8 日目の剖検に先立ち、安楽死処分直前の血液試料を採取した。試験

計画書に規定された器官の重量を測定し、保存した。なお、投与液中の被験物質濃度の測定は実施しなかった。

ZS-9 投与による死亡例はみられず、有害な一般状態変化も認められなかった。7 日間の投与期間中に平均体重は雄で 7%、雌で 5%減少し（変動範囲：雄 -23%～+7%、雌 -11%～+1%）、試験前と比較して、雄で 35%（範囲：15%～73%）及び雌で 29%（範囲：2%～51%）の平均摂餌量の減少が認められた。雄 1 例（動物番号 6）では 7 日間の投与期間中に摂餌量の着実な減少がみられたが、ZS-9 投与開始後の個々の動物における摂餌量の 1 日減少量は概ね一定であった。

剖検では、雄 1 例（動物番号 6）を除き、すべての組織は正常であった。雄 1 例（動物番号 6）では肺の変色がみられ、表面積の約 40%程度が暗色（褐色）を示し、小腸及び大腸においては黄/黒色の斑状の色調変化を伴う暗色化がみられ、盲腸では暗緑色を帯びていた。これらの所見は強制経口投時に生じた損傷に起因する可能性が高いと考えられた。全体として、器官の絶対重量及び相対重量（体重比）は、すべての動物でほぼ同様であった。

体重増加がみられなかったことに関して、摂餌量の減少を伴っていたが、対照群を設けなかったため、この所見が被験物質投与に関連するものかどうかを判断することはできなかった。最大 2000 mg/kg/日までの ZS-9 の強制経口投与により 14 日間反復投与毒性試験を実施することが適していると判断した。

2.6.6.3.1.3 ラットを用いた ZS-9 の 1 日 3 回経口投与による 14 日間反復投与毒性試験及び 10 日間回復性試験

資料番号：4.2.3.2.3（UNTHSC-1000 試験）

雌雄の Sprague Dawley 系ラットに、ZS-9 を 12 時間の間に 6 時間間隔で 1 日 3 回、少なくとも 14 日間連日強制経口投与したときの毒性を評価するために、GLP 適用の反復投与毒性試験を実施した。主試験では、各群雌雄各 10 例のラットに ZS-9 を 0.5% (w/v) MC 液による懸濁液として、0（媒体）、400、800 及び 1600 mg/kg/回の用量（それぞれ第 1 群～第 4 群とする）及び 10 mL/kg の投与容量で投与した。雌雄各 5 例からなる別の群を設定し、主試験と同様に 0 又は 1600 mg/kg/回を投与し、その後 10 日間の休薬期間を設けて回復性を評価した。また、バリデートされた分析法により懸濁液中の被験物質濃度を測定した。

毎回投与時に死亡及び瀕死状態について観察を行った。また、主試験及び回復性試験の被験動物に対して毎週 1 回、一般状態を観察した。体重及び摂餌量を試験前と試験中は 3 日毎に測定/記録した。被験動物全例に対し、眼科学的検査を試験前と予定剖検前に実施した。9 日目に血液学的検査、血液凝固検査及び血液生化学的検査用の血液試料を生存動物全例から採取し、更に尿検査用試料もすべての被験動物から採取した。試験終了時に剖検を実施し、試験計画書で規定した器官の重量を測定し、更に指定の組織については病理組織学的検査も実施した。

試験中、対照群を含む全群で計 32 例のラット（0 mg/kg 群：雄 4 例及び雌 5 例、400 mg/kg 群：雄 5 例及び雌 2 例、800 mg/kg 群：雄 3 例及び雌 5 例、1600 mg/kg 群：雌雄各 4 例）が、強制経口投与法が原因で死亡した。尿中カリウム（UK）及び尿中尿素窒素（UUN）濃度の低下並びに尿中ナトリウム（UNa）濃度の上昇が認められたが、これらは ZS-9 の薬理作用によるものであり、毒性所見ではないと考えられた。これらの所見以外には、体重、摂餌量、血液生化学的検査、血液学的検査、血液凝固検査、眼科学的検査、器官重量及び剖検において、被験物質に関連する影響は認められなかった。ただし、対照群及び ZS-9 投与群とも、強制経口投与に関連した筋肉損傷に伴うアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（AST）値、クレアチニンホスホキナーゼ（CPK）値及び乳酸脱水素酵素（LDH）値の著明な上昇、食道損傷に起因する肉眼的及び病理組織学的所見、並びに消化管外への媒体又は被験物質の予期せぬ送達が認められた。膀胱における病理組織学的所見の発現頻度及び／又は程度が、ZS-9 を投与した第 2、第 3 及び第 4 群の

雄及び第 4 群の雌でわずかに増加した。膀胱所見として、第 4 群の雌雄で急性炎症、第 2、第 3 及び第 4 群の雄で単核細胞浸潤、並びに第 2、第 3 及び第 4 群の雄で用量依存的な膀胱粘膜過形成の亢進が認められた。炎症細胞の浸潤を伴う粘膜過形成は、膀胱粘膜への刺激により発現した可能性が考えられた。しかし、これらの所見と ZS-9 との関連性は不明であった。10 日間の回復期間終了後には、膀胱の病理組織学的所見は認められず、これらの所見の回復性が示唆された。概して、膀胱の急性炎症、単核細胞浸潤及び粘膜過形成、又はこれらの所見のいずれかが認められた対照群を含むすべてのラットの尿 pH は 8 を超えており、ZS-9 投与群のラットの大部分では尿 pH は 9 以上であった。したがって、尿のアルカリ化により膀胱が刺激されることにより上記の所見が発現した可能性があり、雄ではその感受性が高いと考えられた。なお、ZS-9 を投与したいずれのラットにおいても、膀胱内腔に沈殿物やカルシウム、結晶、又は被験物質の存在を示す病理組織学的所見は認められなかった。

膀胱の所見に基づき、雌における ZS-9 の無毒性量は 800 mg/kg/回（2400 mg/kg/日）と判断され、この用量は体重 60kg として HED に換算すると 8 g/回（約 23 g/日）に相当する。ZS-9 を 400 mg/kg/回の用量で投与した第 2 群では単核細胞浸潤が雄 6 例中 2 例で認められたのに対して、対照群の雄では 7 例中 1 例であり、軽微な出血及び過形成が第 2 群の雄 1 例で認められた。したがって、雄における無毒性量は特定できなかった。

2.6.6.3.1.4 ラットを用いた ZS の 28 日間反復経口投与毒性試験及び 14 日間回復性試験

資料番号：4.2.3.2.4（524020 試験）

ラットに ZS を 1 日 3 回、28 日間反復経口投与したときの毒性を評価し、14 日間の回復期間終了後の所見の回復性を評価するために GLP 適用試験を実施した。試験デザインを表 4 に示す。

表 4 試験群の概要（524020 試験）

群	動物数（回復性試験用）		投与物質（投与方法）	投与量（mg/kg/回）	投与量（mg/kg/日）
	雄	雌			
1	10 (5)	10 (5)	媒体 TID	0	0
2	10	10	ZS TID	300	900
3	10	10	ZS TID	1000	3000
4	10 (5)	10 (5)	ZS TID	2000	6000
5	10	10	ZS QD	2000	2000

QD：1 日 1 回投与
TID：12 時間の間に約 6 時間間隔で 1 日 3 回投与

ZS は 0.5 % (w/v)メチルセルロース溶液（媒体）で調製し、10 mL/kg/回の投与容量で、12 時間の間に 6 時間間隔で投与した。

一般状態観察を試験前の期間から週 1 回実施し、体重を投与前に 1 回と、投与期間中は毎日、及び回復期間中は週 1 回記録し、摂餌量を試験前から回復期間終了時まで週 1 回測定した。眼科学的検査を試験前の期間及び 4 週目にそれぞれ 1 回実施した。また、血液生化学的検査、血液学的検査及び血液凝固検査用の血液試料並びに尿検査及び尿生化学的検査用の尿試料を 4 週目に採取し、回復期間終了時にも尿検査及び尿生化学的検査を実施した。評価パラメータ／評価項目として、一般状態、体重、体重増加量、摂餌量、眼科学的検査所見、並びに血液学的検査、血液凝固検査、血液生化学検査及び尿検査の所見を評価し、小核形成についても評価した。主試験では

29 日目に、回復性試験では 43 日目にそれぞれ動物を安楽死させた。剖検時の肉眼的所見及び器官重量を記録し、試験計画書に規定された組織について病理組織学的検査を実施した。

全身毒性を示す一般症状は認められなかった。投与期間中、3000 又は 6000 mg/kg/日群で淡色の糞便が認められたが、これは被験物質の糞中排泄によるものであった。体重、体重増加量、摂餌量、血液学的検査、血液凝固検査、血液生化学検査、眼科学的検査及び器官重量には、ZS 投与による影響は認められなかった。

ZS 投与群では対照群と比較して、尿中ナトリウム濃度が高値を示し、尿中カリウム及びクロール濃度がクレアチニン濃度による補正の有無に関わらず低値を示した。尿中カリウム濃度の低下は用量依存的であった。14 日間の回復期間終了時までに完全に回復した。

骨髄細胞において小核形成の誘発は認められず、ZS 投与に関連すると考えられる肉眼的所見も病理組織学的所見も認められなかった。

全体として、ZS を最大 6000 mg/kg/日の投与量で 1 日 3 回、28 日間連日強制経口投与したときの忍容性は、雌雄ラットのいずれにおいても良好であり、投与に伴う影響は尿中電解質濃度（ナトリウム、カリウム及びクロール）の可逆性変化に限られた。

これらの結果に基づき、ZS を 1 日 3 回、28 日間反復経口投与した雌雄ラットにおける無毒性量は、検討した最高用量である 2000 mg/kg/回（6000 mg/kg/日）と判断された。また、ZS を 1 日 1 回 28 日間反復経口投与した場合の無毒性量は、検討した最高用量である 2000 mg/kg/日と判断された。ZS を最大 6000 mg/kg/日の用量で 1 日 1 回、28 日間反復経口投与しても、骨髄細胞（赤血球）における小核誘発は認められなかった。6000 mg/kg/日及び 2000 mg/kg/日の投与量は、体重 60kg として HED に換算すると、それぞれ 58 g/日及び 19 g/日に相当する。

2.6.6.3.1.5 ラットを用いた ZS の 26 週間反復経口投与毒性試験及び 4 週間回復性試験（雄の受胎能の評価を含む）

資料番号：4.2.3.2.5（524942 試験）

Sprague Dawley 系ラットを用い、13 週時点の中間剖検を含む GLP 適用 26 週間反復強制経口投与毒性試験及び 4 週間回復性試験を実施し、ZS の毒性、雄の受胎能に及ぼす影響、及び 4 週間の回復期間終了後における所見の回復性を評価した。表 5 に示したように、4 群それぞれに雌雄各 40 例のラットを割り付けた。

表 5 試験群の概要（524942 試験）

群	動物数						投与量（mg/kg/日）	1 回投与量（mg/kg/回）
	13 週目に剖検		26 週目に剖検		回復期間終了時に剖検			
	雄	雌	雄	雌	雄	雌		
1	10	10	20	20	10	10	0	0
2	10	10	20	20	10	10	1000	333
3	10	10	20	20	10	10	3000	1000
4	10	10	20	20	10	10	6000	2000

ZS は 0.5 % (w/v)メチルセルロース溶液（媒体）で調製し、10 mL/kg/回の投与容量で、12 時間の間に 6 時間間隔で 1 日 3 回投与した。バリデートされた分析法により調製液中の被験物質濃度を測定した。

死亡及び瀕死状態について 1 日 2 回の観察を行い、摂餌量を週 1 回測定し、詳細な一般状態観察を週 1 回実施した。また、体重を投与前に 1 回と、試験開始後 4 週間は 1 日 1 回、その後は 1 週間に 2 回測定した。眼科学的検査を投与前及び各計画剖検の直前に実施した。血液生化学的検査用の血液試料並びに尿検査及び尿生化学検査用の尿試料を 4 週目（血液生化学的検査用試料のみ）、12/13 週目、26 週目及び 30 週目（回復期）に採取した。21 週目に、未投与の追加の雌ラット 15 例を各投与群に割り付け、被験物質の投与を受けている雄ラットと同居させて交尾が確認された雌ラットの妊娠率を検討した。13 週目、26 週目及び 4 週間の回復期間終了時に剖検を実施し、器官重量を記録した。26 週間の投与期間終了時には、精子の運動性及び形態の評価を行った。対照群及び 6000 mg/kg/日投与群に対しては病理組織学的検査を実施した。

途中死亡例が 6 例認められたが、いずれの死亡も ZS 投与との関連性はないと考えられた。全身毒性を示す一般症状は認められなかった。投与期間中、6000 mg/kg/日群で淡色の糞便が認められたが、これは被験物質の糞中排泄によるものと考えられた。体重、体重増加量、摂餌量、血液学的検査、血液凝固検査及び眼科学的検査において、ZS 投与による影響は認められなかった。

血液生化学的検査項目において、以下に示すように対照群と比較して ZS 投与群の群平均値に差が認められた。

- 6000 mg/kg/日群の雄では 13 週目及び 26 週目に、3000 mg/kg/日以上の群の雌では 13 週目に平均血漿中カリウム濃度が低値を示した。
- 3000 mg/kg/日以上の群の雌では 13 週目に、6000 mg/kg/日群の雌では 26 週目に平均血漿中尿素濃度が低値を示した。
- ZS 投与群の雌では 26 週目に平均血漿中ナトリウム濃度がわずかに低値を示した。
- 3000 mg/kg/日以上の群の雄及び 1000 mg/kg/日以上の群の雌では、26 週目に平均血漿中クロール濃度がわずかに低値を示した。
- 6000 mg/kg/日群の雄では 13 週目に、1000 mg/kg/日以上の群の雄及び 1000 又は 6000 mg/kg/日群の雌では 26 週目に、平均血漿中マグネシウム濃度がわずかに低値を示した。4 週間の回復期間終了時においても、6000 mg/kg/日群の雄では平均血漿中マグネシウム濃度の低値が認められた。
- 6000 mg/kg/日群の雄及び全用量群の雌では、26 週目に平均 HCO_3 濃度が高値を示した。
- 3000 mg/kg/日以上の群の雄及び 1000 mg/kg/日以上の群の雌では 26 週目に平均グルコース濃度がわずかに低値を示した（約 17%）。

尿検査及び尿生化学的検査項目において、以下に示すように対照群と比較して ZS 投与群の群平均値に差が認められた。

- クレアチニン補正の有無に関わらず、13 週目及び 26 週目に平均尿中ナトリウム濃度の用量依存的な上昇（雄で最高 390%、雌で最高 212%の上昇）が認められた。
- クレアチニン補正の有無に関わらず、13 週目に ZS 投与群の雄で、26 週目には 3000 mg/kg/日以上の群の雄で、平均尿中クロール濃度の用量依存的な上昇が認められた。
- クレアチニン補正の有無に関わらず、13 週目及び 26 週目に平均尿中カリウム濃度の用量依存的な低下（雄で最大 94%、雌で最大 80%の低下）が認められた。
- 3000 mg/kg/日以上の群の雄では、26 週目に平均尿中尿素及びクレアチニン濃度の低下が認められた。
- 3000 mg/kg/日以上の群の雌及び 6000 mg/kg/日群の雄で、13 週目に投与に関連した平均尿中マグネシウム濃度の低下が認められ、26 週目には 3000 mg/kg/日以上の群の雄及び 1000 mg/kg/日以上の群の雌でも低下が認められた。クレアチニン補正を行った後では、6000 mg/kg/日群

の雌では 13 週目に、3000 mg/kg/日以上の群の雌では 26 週目に、尿中マグネシウム濃度の有意な低下が認められた。

- ZS を投与したラットでは、すべての時点を通じ、尿 pH がわずかに高値であった。

上記の所見を除き、4 週間の回復期間終了時には、対照群と回復性評価群のラット間で差は認められなかった。

ZS 投与に関連した器官重量への影響は認められず、肉眼的所見及び病理組織学的所見も認められなかった。

ZS 投与に関連した雄の受胎能対する影響は認められず、ZS を投与した雄との交尾が成立した雌の黄体数、着床数、胚死亡数及び生存胎児数は、未処置対照群の雄との交尾が成立した雌と同様であった。また、ZS を最大 6000 mg/kg/日まで 26 週間投与したときに、精子の運動性及び形態に対する影響は認められなかった。

以上のように、Sprague Dawley 系ラットに ZS を投与可能な最大用量 6000 mg/kg/日まで 26 週間投与（2000 mg/kg を約 6 時間間隔で 1 日 3 回投与）したが、有害な影響は認められなかった。特記すべき所見は、被験物質の薬理作用から予測される所見に限られ、血中及び尿中の電解質濃度の異常、投与に伴う尿 pH の上昇（毒性学的意義のない軽微な血漿中 HCO_3 濃度の上昇に起因）、及び 3000 mg/kg/日以上の群の雄で認められた投与に伴う血漿中グルコース濃度の低下（血漿中 HCO_3 濃度及び血漿中マグネシウム濃度の変化に伴う二次的影響）であった。ZS に関連した影響は休薬により回復した。ZS を最大 6000 mg/kg/日まで 21 週間反復経口投与しても、受胎率及び精子の分析により評価した雄の生殖機能に影響は認められなかった。

以上の結果に基づき、26 週間反復経口投与時の毒性及び雄の生殖機能に対する無毒性量は検討した最高用量である 6000 mg/kg/日と判断された。この用量は、体重 60 kg として HED に換算すると 58 g/日に相当する。

2.6.6.3.2 イヌを用いた反復投与毒性試験

2.6.6.3.2.1 イヌを用いた ZS-9 の経口投与時の最大耐量（MTD）及び 7 日間反復経口投与毒性試験

資料番号：4.2.3.2.6（2009-002 試験）

雌雄ビーグル犬に ZS-9（試験報告書では UZSi-9 と記載）を単回及び反復経口投与したときの最大耐量（MTD）を評価するために、GLP 非適用の試験を 2 期に分けて実施した。第 1 期では単回投与の影響を評価し、第 2 期では 1 日 1 回 7 日間反復投与の影響を評価した。

第 1 期では、1 日目に 2 例のビーグル犬（雌雄各 1 例）に 2000 mg/kg/日の ZS-9 を単回経口投与した。なお、第 1 期の被験動物は、一般状態観察を 4 日間実施した後に、飼育中のビーグル犬集団（stock colony）に戻した。評価パラメータとして、ケージサイドでの観察所見、詳細な一般状態の観察所見、及び体重を評価した。

第 2 期では、ビーグル犬 16 例を 1 群雌雄各 2 例からなる 4 群に割り付けた。0（脱イオン水）、500、1000 及び 2000 mg/kg/日の ZS-9 を経口挿管により 1 日 1 回、7 日間投与した。投与開始前及び 8 日目の安楽死処分前に血液学的検査、血液生化学的検査及び血液凝固検査用の血液試料を採取した。被験動物はすべて、8 日目に安楽死させて、剖検を実施した。評価パラメータとして、ケージサイドでの観察所見、詳細な一般状態の観察所見、体重及び体重増加量、摂餌量、血液学的検査、血液生化学的検査、血液凝固検査及び尿検査の所見、剖検所見、器官重量及び器官重量比、並びに腎臓の病理組織学的検査所見を評価した。

ZS-9 を投与しても、死亡率、体重、体重増加量、摂餌量、血液生化学的検査、血液学的検査、血液凝固検査、尿検査、尿生化学的検査（Na^+、K^+、尿中尿素窒素［UUN］）、器官重量（絶対重量及び相対重量）への影響は認められなかった。また、第 1 群から第 4 群のイヌから採取して作製した腎臓の組織切片について病理組織学的検査を実施した結果、被験物質に関連する影響は認められなかった。第 2 期で観察された一般症状は、糞便中に観察された白色物質に限定され、ZS-9 を投与したすべてのイヌで認められた。本所見は被験物質の糞中排泄によるものと考えられた。

本試験で特定されたビーグル犬への単回及び 1 日 1 回反復経口投与時の MTD は 2000 mg/kg/日であり、この用量は体重 60 kg として HED に換算すると 67 g に相当する。

2.6.6.3.2.2 イヌを用いた ZS-9 の 1 日 3 回 7 日間反復経口投与時の忍容性を検討する予備試験

資料番号：4.2.3.2.7（14175-10 試験）

ビーグル犬（雌雄各 2 例）に ZS-9 を 1 回 1300 mg/kg の用量で、6 時間間隔で 1 日 3 回、7 日間混餌投与したときの毒性を評価するために GLP 非適用の試験を実施した。

7 日間の馴化期間中に、3 つに分けたイヌ用ウェットフードを 12 時間の間に 6 時間間隔で給餌し、イヌがそれらの飼料を摂餌するよう訓練を行った。投与期間中は、被験物質の必要量（最新の体重に基づく）を約 125 g のイヌ用ウェットフードに混ぜ、毎日、12 時間の間に 6 時間間隔で混餌投与した。1 日に必要な総カロリー量に達するようにするため、個々のイヌの体重に応じて、1 日の最後の混餌投与後に追加のドライフードを給餌した。体重を動物搬入時と、投与の 1 日前から 7 日目まで記録した。馴化期間及び投与期間中、一般状態の観察を 1 日 2 回実施した。また、ウェット及びドライフードの摂餌量を投与期間中、毎日記録した。血液生化学的検査、血液学的検査及び血液凝固検査用の血液試料、並びに尿検査用の尿試料を試験前（1 日前）と 7 日目に採取した。

ZS-9 を 1300 mg/kg/回の用量で、12 時間の間に 6 時間間隔で 1 日 3 回、混餌投与したときの忍容性は良好であった。摂餌量に対する影響は認められなかったが、7 日間の投与期間中に体重が約 0.2 kg 減少した。しかし、対照群を設けなかったため、この体重への影響と被験物質との関連性は明らかではなかった。一般状態観察所見として、3 日目の午後から 7 日目まで、被験物質と考えられる白色物質が各イヌの糞便中に認められた。血液学的検査や血液凝固検査において有害な影響は認められなかったが、投与に伴い、血清ナトリウム、血清クロール及び血清カルシウムの濃度が投与前値と比較して上昇し、尿中カリウム濃度が約 90%低下した。尿中ナトリウム濃度も雄 1 例及び雌 2 例で上昇し、尿中窒素濃度の低下が雄 1 例及び雌 2 例で認められた。

本試験の結果に基づき、ビーグル犬を用いた 14 日間反復投与毒性において ZS-9 を 1300 mg/kg の用量で 1 日 3 回投与することは妥当であると判断された。

2.6.6.3.2.3 イヌを用いた ZS-9 の 1 日 3 回経口投与による 14 日間反復投与毒性試験及び 10 日間回復性試験

資料番号：4.2.3.2.8（14250-10 試験）

ビーグル犬を用い、ZS-9 を 12 時間の間に 6 時間間隔で 1 日 3 回、少なくとも 14 日間連日混餌投与したときの毒性を評価するために、GLP 適用の反復経口投与毒性試験を実施した。主試験では、用量あたり雌雄各 3 例のイヌを使用し、ZS-9 を 0（対照）、325、650 及び 1300 mg/kg/回の用量で投与した。これとは別に用量あたり雌雄各 2 例のイヌを回復性試験に割り付け、0 又は 1300 mg/kg/回を主試験と同時に投与し、その後 10 日間の休薬期間を設けて所見の回復性を評価

した。また、投与量の記録を基に投与量の精度を確認した。馴化期間中（投与 7 日前から 1 日前まで）に、3 つに分けたイヌ用ウェットフードを 12 時間の間に 6 時間間隔で給餌し、イヌがそれらの飼料を摂餌するよう訓練を行った。投与期間中は、被験物質の必要量（最新の体重に基づく）を約 100g のイヌ用ウェットフードに混ぜ、12 時間の間に 6 時間間隔で混餌投与した。1 日に必要な総カロリー量に達するようにするため、個々のイヌの体重に応じて、1 日の最後の混餌投与後に追加のドライフードを給餌した。体重を動物搬入時と、投与の 2 日前と 1 日前、及び投与 6、13 及び 20 日目に記録した。馴化期間及び投与期間中、一般状態観察を 1 日 2 回実施した。また、ウェット及びドライフードの摂餌量を投与期間中、毎日記録した。血液生化学的検査、血液学的検査及び血液凝固検査用の血液試料、並びに尿検査用の尿試料を試験前（1 日前）と 13 日目に採取した。眼科学的検査を試験前（6 又は 7 日前）と投与 7 日目（雌）又は 8 日目（雄）に実施し、心電図検査を試験前（1 日前）と 11 日目に実施した。投与終了時（主試験では 14 日目、回復性試験では 24 日目）に剖検を行い、試験計画書に規定された器官の重量を測定し、指定組織について病理組織学的検査を実施した。

ZS-9 を 325、650 及び 1300 mg/kg/回の用量で、12 時間の間に 6 時間間隔で 1 日 3 回、混餌投与したときの忍容性は良好であった。一般状態観察所見は、投与 2 週目の期間中に 325 mg/kg/回群の一部のイヌ及び 650 mg/kg/回以上の群のイヌ全例の糞便中に観察された、被験物質と考えられる白色物質に限定された。体重、体重増加量、器官重量、摂餌量、血液学的検査及び血液凝固検査、並びに眼科学的検査及び心電図検査に有害な影響は認められなかった。血液生化学的検査においては、一部の検査項目で、13 日目に対照群と比較して統計学的に有意な変化が認められた。325 mg/kg/回群の雄で、血中尿素窒素（BUN）濃度の上昇及びクロール濃度の低下が認められた。650 mg/kg/回群では、雌で乳酸脱水素酵素（LDH）値の上昇及びトリグリセリド濃度の低下がみられ、雄ではコレステロール濃度の上昇が認められた。また、650 mg/kg/回以上の群では、雌でクレアチニン及びマグネシウム濃度の上昇並びにクロール濃度の低下がみられ、雄でリン及びアルブミン/グロブリン比の低下が認められた。1300 mg/kg/回群では、雌でマグネシウム及び AST 値の上昇並びにカリウム濃度の低下がみられ、雄ではナトリウム、グロブリン、LDH 及び AST 値の低下が認められた。雄において、有意差はないものの用量依存的な血清カリウム濃度の低下が認められた。いずれの所見も軽微で、個別値は試験前に認められた正常範囲内の変化であり、臨床的に有害ではないと判断された。雌雄両方で認められた血清カリウム濃度の低下を除くその他すべての変化は偶発的なものであり、ZS-9 の投与に関連するものではないと判断された。ZS-9 の投与に伴い、雌雄ともに対照群と比較して尿 pH の上昇がみられ、また最大 80～90%の尿中カリウム濃度の有意で用量依存的な低下及び最大 40～50%の尿中尿素窒素濃度の低下が認められたが、これらの所見は被験物質の薬理作用に起因するものであった。ZS-9 投与に関連する肉眼的所見は認められなかった。病理組織学的所見としては、被験物質投与群において腎臓の軽微～軽度の限局性及び／又は多巣性の炎症が認められたが、対照群では認められなかった。これらの病変の発現頻度及び重症度は、650 及び 1300 mg/kg/回群では同程度であり、325 mg/kg/回群では発現頻度は更に低く、重症度もより軽度であった。一部のイヌにみられた腎臓の炎症は片側性であり、中には膀胱や尿管の炎症を伴う場合もあった。これらの所見を総合すると、直接的な腎障害以外の要因、例えば ZS-9 を投与したイヌの尿成分が変化することなどにより、これらの組織で細菌は認められなかったものの、不顕性尿路感染に対する感受性が亢進した可能性が示唆された。回復性試験では、このような炎症は雌では完全に回復し、雄でも部分的な回復性が認められたことから、炎症の原因は不明であるものの、休薬により回復することが示唆された。以上のような病理組織学的所見が認められたことから、本試験において無毒性量を特定することはできなかった。

2.6.6.3.2.4 雌性イヌの尿路に対する尿アルカリ度、ZS-9 の粒子サイズ及びプロトン化の影響を検討する 14 日間反復経口投与毒性試験

資料番号：4.2.3.2.9 項（1959-001 試験）

14250-10 試験の結果を受け、尿路に及ぼす尿アルカリ度、カリウム補充、ZS-9 の粒子サイズ及びプロトン化の影響を評価するために、ZS、ZS-9、カリウム補充併用での ZS-9（ZS-9+KCl）及び [redacted]μm 以下の粒子を除去した ZS-9（= ZS-9S）を用いた GLP 非適用の反復経口投与毒性試験を実施した。本試験では、毒性学的感受性がより高い雌イヌを用いて実施した。1 群 3 例からなる 9 群の実験未使用雌性ビーグル犬に、ZS-9 600 又は 100 mg/kg 1 日 3 回、ZS-9 600 mg/kg＋KCl 1 日 3 回、ZS-9S 600 又は 100 mg/kg 1 日 3 回、ZS 600 又は 100 mg/kg 1 日 3 回、又は重炭酸ナトリウム（$NaHCO_3$）50 mg/kg 1 日 3 回の投与を行った。対照群（0 mg/kg/回）群には媒体（[redacted]）を投与した。投与製剤は必要量の被験物質を約 100g の媒体と混和して調製した。いずれの群に対しても、被験物質又は媒体を 12 時間中に 6 時間間隔で 1 日 3 回、14 日間連日混餌投与した。投与量の記録及びウェットフードによる摂餌量の 1 日 1 回の測定に基づいて、混餌飼料中の被験物質量を確認した。1 日に必要な総カロリー量に達するようにするため、1 日の最後投与終了後にドライフードを追加給餌した。

すべてのイヌについて、瀕死状態、死亡、損傷、摂餌及び摂水状況、並びに糞便の外観を 1 日 2 回観察した。一般状態観察を週 1 回実施し、体重を投与の 1 日前、投与 7 日目及び 14 日目に測定し記録した。ドライフードによる摂餌量を 1 日 1 回、ウェットフードによる摂餌量を 1 日 3 回、それぞれ測定し記録した。血液ガス、血液生化学的検査、尿検査及び尿生化学的検査用の血液試料及び尿試料をすべての被験動物から投与前に 2 回並びに 7 日目及び 13 日目に採取した。試験終了時に剖検を行い、器官重量を記録し、指定の組織は保存して病理組織学的検査を実施した。

ZS 及び ZS-9 を投与しても、死亡率、体重、体重増加量、器官重量、肉眼的所見、血液生化学的検査項目及び血液ガスパラメータに影響は認められなかった。ZS-9S、ZS-9、又はカリウム補充併用により ZS-9 を 600 mg/kg の用量で 1 日 3 回投与した群では、尿中ナトリウム分画排泄率（FE:Na）の増加及び尿 pH の上昇（最大 2 上昇）が認められ、600 mg/kg の ZS-9、ZS-9S 及び ZS 1 日 3 回投与群では尿中カリウム分画排泄率（FE:K）及び尿中尿素窒素/クレアチニン比の低下が認められた。これらの変化は被験物質に起因するものであるが、毒性学的に有害なものではないと判断された。

被験物質に関連した病理組織学的所見が 600 mg/kg 1 日 3 回投与群で認められた。所見として、腎臓における軽微～軽度の混合性炎症細胞浸潤がみられ、ときに軽微～軽度の尿細管再生を伴うこともあった。ZS-9 及び ZS-9S による 600 mg/kg 1 日 3 回投与群では、軽微な尿細管の変性／壊死、尿管又は尿道への軽微な混合性炎症細胞浸潤、及び軽微な腎盂炎も認められた。腎盂炎が発現したイヌでは、腎実質への混合性炎症細胞浸潤の発現頻度及び／又は重症度が、腎盂炎非発現例と比較して高かった。一部のイヌでみられた腎盂炎及び／又は尿路／尿道における混合性炎症細胞浸潤、並びに炎症性浸潤を伴う腎病変の多巣性のランダムな分布は ZS-9 の間接作用によるものである可能性が高いと考えられた。ZS 600 mg/kg 1 日 3 回投与群では尿 pH の上昇はみられず、更に、これらのイヌ及びカリウム補充併用による ZS-9 600 mg/kg 1 日 3 回投与群のイヌでは、病理組織学的所見の発現頻度が低かったことから、被験物質の薬理作用による尿 pH の上昇及び／又はカリウム除去により尿中の結晶及び細菌による損傷を受けやすくなっていた可能性が示唆された。

以上の結果に基づき、本試験における ZS、ZS-9 及び ZS-9Ş の無影響量は 100 mg/kg 1 日 3 回と判断され、ZS 及びカリウム補充併用による ZS-9 の無毒性量は 600 mg/kg/回と判断された。これらの用量は、体重 60 kg として HED に換算すると、それぞれ 10 g/日及び 60 g/日に相当する。

2.6.6.3.2.5 イヌを用いた ZS の 28 日間反復経口投与毒性試験及び 21 日間回復性試験

資料番号：4.2.3.2.10（1959-007 試験）

ZS の亜慢性毒性を評価し、観察されたすべての変化の回復性、進行性又は遅発性発現を投与後 21 日間の観察期間終了後に評価する GLP 適用の経口投与毒性試験を実施した。5 群の実験未使用ビーグル犬に、ZS を [redacted] を媒体とし、0 mg/kg/回（雌雄各 6 例、対照群）、100 mg/kg/回（雌雄各 3 例）、300 mg/kg/回（雌雄各 3 例）、1000 mg/kg/回（雌雄各 6 例）、又は KCl 併用での 1000 mg/kg/回（雌雄各 3 例）の用量で、12 時間に 6 時間間隔で 1 日 3 回、28 日間連日混餌投与した。更に雌雄各 3 例からなる別の 1 群には、1000 mg/kg/回の ZS を 1 日 1 回、28 日間連日混餌投与した。0 及び 1000 mg/kg 1 日 3 回投与群については、28 日間の投与終了後、雌雄各 3 例に対して 21 日間の休薬期間を設けて回復性を評価した。また、投与量の記録及びウェットフードによる摂餌量の 1 日 1 回の測定に基づいて、混餌飼料中の被験物質量の精度を確認した。個々のイヌについて 1 日に必要なカロリー量に達するようにするため、1 日の最後の混餌投与後に追加のドライフードを給餌した。

すべてのイヌについて、瀕死状態、死亡、損傷、並びに摂餌及び摂水状況を 1 日 2 回観察した。一般状態観察を週 1 回実施し、体重を投与 1 日前と投与 7、14、21 及び 28 日目に測定し記録した。ウェットフード（媒体）による摂餌量を各投与間隔経過後に 1 日 3 回、測定し記録した。ドライフードによる摂餌量も毎日測定し記録した。眼科学的検査を試験前と予定の剖検前に実施した。各被験動物について投与前に身体検査も実施した。心電図検査を投与前及び 2 週目及び 4 週目に 1 回実施した。血液生化学的検査、血液学的検査、血液凝固検査及び血液ガス測定用の血液試料を投与前と、2 週目、4 週目及び回復期の予定剖検前（7 週目）に全例から採取した。更に、アルドステロンの分析に供する血液試料も投与前と 4 週目及び回復期の予定剖検前に採取した。また、潜血検査用の糞便試料も 4 週目終了時と回復期間終了時（7 週目）に全例から採取した。反復投与終了時及び回復期間終了時に剖検を行い、器官重量を測定した。また、0 mg/kg、KCl 併用による 1000 mg/kg 及び 1000 mg/kg 1 日 3 回投与群並びに 1000 mg/kg 1 日 1 回投与群のイヌから採取した組織について病理組織学的検査を実施した。

生存状況、一般状態、体重、体重増加量、摂餌量、眼科学的検査、血液学液検査、便潜血検査、剖検及び器官重量には、ZS に関連する影響は認められなかった。

定性的な心電図パラメータ、心拍数、RR 間隔、PR 間隔及び QRS 時間に、ZS に関連する影響は認められなかった。1000 mg/kg 1 日 3 回投与群の雌において、臨床的に意義がないと考えられる軽度の QTc 延長が認められ、当該所見は、これらの動物で認められた ZS による低カリウム血症に関連した二次的影響と考えられた。

血液生化学的検査値の用量依存的な変化として、血清カリウム濃度、血清リン濃度及び血清アルドステロン濃度の低下、尿の比重及び浸透圧の低下を伴う軽度～中等度の平均尿量の増加、用量依存的な尿中カリウム分画排泄率（FE:K）の低下、並びに平均尿 pH の軽度上昇が認められた。また、1000 mg/kg 1 日 3 回投与群の雌雄において、対照群と比較して平均血清 HCO_3 濃度の軽微な上昇傾向がみられ、これに対応して軽度の平均血清 pH の上昇も認められた。ほとんどの被験物質投与群では、対照群と比較して平均尿中ナトリウム分画排泄率（FE:Na）の軽度～中等度の増加が認められたが、平均血清ナトリウム濃度に意義のある変化は認められなかった。いずれの変化も、21 日間の回復期間終了後には回復性が認められた。カリウム補充併用による ZS 投与群（1000 mg/kg＋KCl 1 日 3 回併用投与群）では雌雄ともに、対照群と比較して軽度の尿中カリウム分画排泄率（FE:K）及び尿中クロール分画排泄率（FE:Cl）の増加が認められ、これらは塩化カリウムの補充によるものと判断された。

血清カリウム濃度の低下に相関する尿中カリウム分画排泄率の低下は、ZS の薬理作用に起因するものであり、アルドステロン産生量の減少、尿量増加並びに尿浸透圧及び尿比重の低下も薬理作用に関連した変化と考えられた。1000 mg/kg 1 日 3 回投与群の雌 3 例を除き、これらの変化は毒性学的に有害な影響ではないと考えられた。雌 3 例については、血清カリウム濃度が投与期間中に最高で 1.8 mmol/L まで低下し、2 週目及び／又は 4 週目にアラニンアミノトランスフェラーゼ（ALT）及びアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（AST）値の上昇も認められた。これら 3 例のうち 1 例において、小さな肝細胞喪失部位が 1 箇所認められ、亜急性の炎症も生じていたが，この炎症が血液生化学的検査値の上昇の原因である可能性は低いと考えられた。別の 1 例では肝細胞障害を示唆する病理組織学的変化は認められなかったが、意義が明らかではない肝類洞の白血球増加が認められた。残りの 1 例は回復群に割り当てた動物であり、回復期間終了後には ALT 及び AST 値は正常範囲となり、病理組織学的検査において異常所見は認められなかった。したがって、上記の軽微な病理組織学的所見と、ALT 及び AST 値の上昇との関連性、並びに ZS との関連性は明らかでない。カリウム値が正常範囲を維持していた高用量群の動物及びカリウムを補充した高用量群の動物では、ALT 及び AST 値の上昇は認められなかったことから、これらの肝酵素値上昇は低カリウム血症に関連した二次的影響である可能性が示唆される。

ZS に関連する副腎の病理組織学的所見として、球状帯細胞の細胞質内脂質空胞形成の増加が 1 日量 900 mg 以上のすべての ZS 投与群（300 mg/kg/回、1000 mg/kg/回+KCl 及び 1000 mg/kg/回の各 1 日 3 回投与群、並びに 1000 mg/kg 1 日 1 回投与群）で認められ、球状帯の嚢胞性変性の発現頻度増加が 1000 mg/kg 1 日 3 回投与群の雌雄で認められた。これらの変化はアルドステロン産生量の減少に起因するものと考えられた。1000 mg/kg 1 日 3 回投与群の動物から採取した腎臓の髄質及び皮質に多巣性病変がみられ、尿細管及び間質の広範な変性及び炎症性変化を伴っていた。これらの変化には尿細管の空胞形成及び変性が含まれ、炎症細胞（主としてリンパ球、マクロファージ及び／又は線維芽細胞）の浸潤による間質拡張を伴う場合と伴わない場合があった。一部の動物では尿細管上皮希薄化を伴う尿細管の拡張がみられ、この群で低カリウム血症が発現した雌 1 例では出血、腎盂内の移行上皮の過形成、及び間質への他の炎症細胞に加えて好塩基球の増加が認められた。これらの腎臓所見は、持続的に体内カリウム濃度が低下した動物の腎臓で認められる変化と整合しており、塩化カリウムの補充により発現が回避された。

以上の結果に基づき、ZS 単独投与時の無毒性量は 300 mg/kg 1 日 3 回又は 1000 mg/kg 1 日 1 回であり、カリウム補充下の ZS の無毒性量は 1000 mg/kg 1 日 3 回と判断された。これらの用量は、体重 60 kg として HED に換算すると、それぞれ 30 g/日、33 g/日及び 100 g/日に相当する。

2.6.6.3.2.6 雌性イヌを用いた ZS の 28 日間反復経口投与毒性試験及び 21 日間回復性試験

資料番号：4.2.3.2.11（1959-009 試験）

ZS（ロット [redacted]）の毒性プロファイルを検討する GLP 適用の経口投与毒性試験を実施した。当該ロットは、ZS、不純物である 不純物A＊ 及び 不純物C＊ をほぼ同等量含有する。本試験の目的は、製造工程で生成される可能性があるこれらの不純物の安全性を評価すること、及び観察された変化の回復性、進行性又は遅発性発現について投与後 21 日間の観察期間終了後に評価することであった。本試験のデザインは、1000 mg/kg 1 日 1 回投与を検討しない点を除き、1959-007 試験の試験デザインと同一であった。

5 群の実験未使用の雌性ビーグル犬に、ZS をイヌ用ウェットフード [redacted]（旧称：[redacted]）を媒体とし、0 mg/kg（6 例、媒体対照群）、100 mg/kg（3 例）、300 mg/kg（3 例）、1000 mg/kg（6 例）、又は塩化カリウム（KCl）224 mg/kg 併用での 1000 mg/kg（3 例）の用量で、12 時間に 6 時間間隔で

＊新薬承認情報提供時に置換えた

1 日 3 回、28 日間連日混餌投与した。0 及び 1000 mg/kg 1 日 3 回投与群については、28 日間の投与終了後、3 例に対して 21 日間の休薬期間を設けて回復性を検討した。また、投与量の記録及びウェットフードによる摂餌量の 1 日 1 回の測定に基づいて、混餌飼料中の被験物質量の精度を確認した。1 日の最後の混餌投与後にドライフードを追加給餌した。

すべてのイヌについて、瀕死状態、死亡、損傷、並びに摂餌及び摂水状況を 1 日 2 回観察した。一般状態観察を週 1 回実施し、体重を投与 1 日前と投与 7、14、21 及び 28 日目と、回復期間中は週 1 回（35、42 及び 49 日目）測定し記録した。ウェットフード（媒体）による摂餌量を各投与間隔経過後に 1 日 3 回、測定し記録した。ドライフードによる摂餌量も毎日測定し記録した。眼科学的検査を投与前と剖検前に実施した。各被験動物について投与前に身体検査も実施した。心電図検査を投与前及び 2 週目及び 4 週目に 1 回実施した。血液生化学的検査、血液学的検査及び血液凝固検査用の血液試料を投与前、2 週目、4 週目及び回復期の剖検前（7 週目）に全例から採取した。血液ガス分析用の血液試料を、投与前と 2 週目及び 4 週目に採取した。更にアルドステロンの分析に供する血液試料も、投与前と 4 週目に採取した。尿検査及び尿生化学的検査用の尿試料を、投与前と 2 週目及び 4 週目、並びに回復期の剖検前に採取した。また、潜血検査用の糞便試料も 26 日目に全例から採取した。反復投与終了時及び回復期間終了時に剖検を行い、器官重量を測定した。また、0 mg/kg、1000 mg/kg 及び KCl 併用による 1000 mg/kg 1 日 3 回投与群の動物から採取した組織について病理組織学的検査を実施した。

イヌに媒体及び媒体と混合した ZS のロット [redacted] を 0、100、300 又は 1000 mg/kg の用量で、12 時間に 6 時間間隔で 1 日 3 回、28 日間連日混餌投与したときの忍容性はいずれも良好であった。媒体のみの投与により、尿中カリウム分画排泄率が増加したが、投与中止により回復した。ZS のロット [redacted] 投与による影響として、100 又は 300 mg/kg 1 日 3 回投与群では媒体に関連する尿中カリウム分画排泄率増加の程度が軽減され、1000 mg/kg 1 日 3 回投与群にでは媒体に関連する尿中カリウム分画排泄率増加が完全に抑制された。

以上の結果に基づき、ZS のロット [redacted] の無毒性量は 1000 mg/kg 1 日 3 回と判断された。 不純物C＊ 及び 不純物I＊ に関して、ZS に含まれるレベルでは安全であると判断された。なお、1000 mg/kg 1 日 3 回の用量は、体重 60kg として HED に換算すると、100 g/日に相当する。

2.6.6.3.2.7 イヌを用いた ZS の 39 週間反復経口投与毒性試験及び 28 日間回復性試験

資料番号：4.2.3.2.12（1959-008 試験）

ZS の慢性毒性を評価するために、GLP 適用の 39 週間反復経口投与毒性試験（13 週時点の中間剖検を含む）を実施した。5 群の実験未使用ビーグル犬に、媒体（イヌ用ウェットフード [redacted]）、媒体と混合した ZS を 0、300、1000 及び 2000 mg/kg/日の用量で 1 日 1 回、又は媒体と混合した ZS 2000 mg/kg/日を塩化カリウム（KCl）253 mg/kg/日と 1 日 1 回混餌投与した。それぞれのイヌについて 1 日に必要なカロリー量を補うため、被験物質投与終了後にドライフードを追加給餌した。投与開始から 13 週間後に 1 群雌雄各 3 例を、また投与期間終了時に 1 群雌雄各 4 例を安楽死させて剖検を実施した。対照群及び ZS 2000 mg/kg/日群には、更に雌雄各 3 例を割り付けて最終投与後 4 週間の休薬期間を設けて回復性を評価し、その後安楽死させて剖検を実施した。

瀕死状態、死亡、損傷、並びに摂餌及び摂水状況の観察を、投与期間中は 1 日 3 回、回復期間中は 1 日 2 回実施した。詳細な一般状態観察を投与期間中に週 1 回、及び回復期間の最終週に 1 回実施した。体重を投与 1 日前及び週 1 回測定し記録した。ウェットフード（媒体）及びドライフードによる摂餌量を毎日測定し記録した。なお、回復期間中はドライフードの摂餌量を毎日測定し記録した。眼科学的検査を投与前と 13 週目及び 39 週目に実施した。また、投与前には全例について身体検査を行った。心電図検査は、投与前に 2 回、13 週目及び 19 週目に 1 回実施し

＊新薬承認情報提供時に置換えた

た。血液学的検査、血液生化学的検査、血液凝固検査用及び血液ガス分析用の血液試料を投与前と 2 週目、4 週目（血清カリウム濃度測定用のみ）、6 週目、13 週目、26 週目、39 週目及び 43 週目（血液生化学的検査及び血液ガス分析用のみ）に全例から採取し、更にアルドステロン分析用の血液試料も投与前と 6、13、39 及び 43 週目に採取した。尿検査及び尿生化学的検査用の尿試料を投与前と 2、6、13、26、39 及び 43 週目に採取し、便潜血検査を 39 週目と 40 週目（それぞれ 273 日目及び 274 日目）に実施した。血圧測定値を 39 週目及び回復期間中に記録した。ジルコニウム（Zr）分析用の全血試料を投与前（投与の 7 日前又は 6 日前）に全例から採取し、6、13、26 及び 39 週目に 0 及び 2000 mg/kg/日群の動物から採取した。投与終了時及び回復期間終了時の剖検の際に、尿試料を 0 及び 2000 mg/kg/日群の動物の膀胱から膀胱穿刺にて採取した。

剖検時に、安楽死処分直前の体重及び肉眼的所見を記録し、指定の器官については重量を測定した。また、0 及び 2000 mg/kg/日群の全例から採取した腎臓、肝臓、肺及び脾臓の試料を Zr の分析のため凍結した。組織試料は採取後、固定処理した。全例の固定処理したすべての組織を鏡検用に処理し、光学顕微鏡で観察して病理組織学的所見を記録した。

生存状況、眼科学的検査、血液学液検査、及び心電図パラメータには、ZS の影響は認められなかった。一般症状が観察されたのは 2000 mg/kg/日（KCl 非併用）群のみであり、それらの発現頻度は低く、17 週目から 31 週目までに限定された。一般症状として、活動性低下、摂餌量低下、四肢機能の障害、運動失調及び体幹の硬直が認められたが、これらは ZS によって誘発された低カリウム血症に起因するものであり、予測された ZS の薬理作用と整合している。これらの一般症状はいずれの場合も、1～2 日間の休薬により回復した。31 週目以降及び回復期間中には、ZS 投与に関連する所見は認められなかった。

雄では ZS に関連する体重への影響は認められなかった。2000 mg/kg/日（KCl 非併用）群を除く ZS 投与群の雌では、13 週目から 39 週目までの平均体重が対照群と比較して同程度又は高値を示したが、2000 mg/kg/日（KCl 非併用）群の雌では平均体重が対照群よりわずかに低値を示した。この体重減少は、低カリウム血症による摂餌量の低下及び各動物のドライフードの摂取量がわずかであったことに起因すると考えられ、有害なものではないと判断された。回復期間中は、対照群及び 2000 mg/kg/日（KCl 非併用）群のいずれにおいても、体重増加量の顕著な変化は認められなかった。

13 週目及び 39 週目に認められた血液学的検査、血液生化学的検査、血液凝固検査、尿検査及び尿生化学的検査で認められた変化を以下に示す。

- 2000 mg/kg/日（KCl 非併用）群において、軽微な可逆性の血清カリウム濃度の低下が認められた。
- 2000 mg/kg/日（KCl 非併用）群において、軽度で可逆性の血清アルドステロン濃度の減少が認められた。
- 2000 mg/kg/日（KCl 非併用）群において、軽微な可逆性の血清 HCO_3 濃度及び総炭酸ガス濃度の上昇が認められた。
- 1000 mg/kg/日以上の投与群（KCl 併用及び非併用）において、軽度で可逆性の尿 pH 上昇が認められた。
- 2000 mg/kg/日（KCL 併用及び非併用）群において、軽微な尿量増加が認められた。
- 1000 mg/kg/日以上の投与群（KCl 併用及び非併用）の雄及び 300 mg/kg/日以上の投与群の雌において、軽度で可逆性の用量依存的な尿中ナトリウム排泄率の上昇が認められた。
- 300 mg/kg/日以上の投与群（KCl 非併用）において、著明で可逆性の用量依存的な尿中カリウム排泄率の低下が認められた。
- 2000 mg/kg/日（KCl 非併用）群において、39 週目に軽微なカルシウム濃度及びリン/クレアチニン比の上昇が認められた。

上記の所見は ZS の投与に関連するものと考えられたが、2000 mg/kg/日（KCl 非併用）群において 17 週目～31 週目に個々の動物で低カリウム血症が複数例認められた点を除き、いずれの所見も有害なものではないと判断された。低カリウム血症は、1 日又は 2 日間の投与中止及び／又は塩化カリウムの経口投与により回復した。いずれの動物に対しても、血清カリウム濃度が正常範囲であることを確認次第、投与を再開した。

剖検所見は、2000 mg/kg/日（KCl 非併用）群の雄 1 例で 39 週目に認められた両腎の表面不整のみであり、中等度の両側尿細管間質の炎症及び軽度両側腎梗塞を伴う所見であった。

KCl 併用の有無に関わらず、2000 mg/kg/日群の雄では 39 週目の腎臓の平均絶対重量が、統計学的有意差は認められなかったものの、対照群と比較して高く、また全用量群の雌及び 1000 mg/kg/日以上の投与群の雄では下垂体の平均絶対重量も対照群と比較して高かった。両所見とも、肉眼的所見及び病理組織学的所見を伴う変化であったことから、ZS 投与と関連する可能性があると判断された。

13 週目に実施した病理組織学的検査において、2000 mg/kg/日群の雄で副腎の球状帯細胞における軽度の細胞質内脂質空胞形成が認められ、また、腎臓の髄質及び皮質に多巣性病変が認められ、尿細管及び間質の変性及び炎症性変化（尿細管間質炎症）を伴っていた。39 週目の ZS に関連する病理組織学的検査所見は 13 週目に認められた所見と同様であり、2000 mg/kg/日群の腎臓でみられた尿細管間質の炎症、1000 mg/kg/日群の雄 1 例及び 2000 mg/kg/日群の雌雄各 1 例でみられた副腎球状帯の軽度の両側性萎縮、並びに ZS を投与した全群の雄 4 例中 1 又は 2 例及び 2000 mg/kg/日群の雌 4 例中 2 例でみられた球状帯細胞における軽微～軽度の細胞質内脂質空胞形成であった。尿細管間質の炎症は皮質及び髄質の多巣性病変を特徴とし、尿細管の空胞化、変性及び再生を伴い、炎症細胞（主としてリンパ球、マクロファージ及び／又は線維芽細胞）の浸潤及び／又は結合組織の増大による間質拡張を伴う場合と伴わない場合があった。2000 mg/kg/日群の雌雄各 1 例では、腎髄質における限局性の軽微～軽度の間質線維化も認められた。KCl を補充した動物では、所見の発現頻度は低く、重症度も軽減された。

4 週間の回復期間終了後には、副腎において ZS に関連する所見は認められず、腎髄質における尿細管間質炎症及び間質マトリックス増大の発現頻度及び重症度が低下したことから、これらの影響は回復性を示すことが示唆された。

中間時点及び投与終了時の剖検で認められた副腎球状帯細胞の萎縮及び細胞質内脂質の増加は、ステロイド産生（アルドステロン生合成）の変化（Henrich et al 1977）及びコレステロール／コレステロールエステルの蓄積（Greaves 2012）に起因すると考えられた。間質の線維化は、ヒトにおいて低カリウム血症が持続すると発現することがあるとされており（Cremer and Bock 1977、Riemenschneider and Bohle 1983）、体内のカリウム濃度が持続的に低下している動物の腎臓で認められる変化と一致している（Conn and Johnson 1956）。

39 週目に認められた間質マトリックス増大は、腎切片のアルシアンブルー染色で陽性であったことから、間質マトリックス内におけるヒアルロン酸（主として髄質内層の間質マトリックスに存在するグリコサミノグリカン）の増加又は拡充が示唆される。間質マトリックス内のヒアルロン酸の分布及び量は、尿細管間質炎症や線維化を含む特定の状態における水の合成及び／又は蓄積の増加により変化する可能性があり（Hällgren et al 1990、Johnsson et al 1996、Göransson et al 2004）、本試験で認められた好塩基性物質の増加は、ZS の投与に関連した尿細管間質炎症に伴う二次的変化である可能性が高いと判断された。

Zr の分析で、26 週目の値が 10.9 ng/mL であった対照群の雌 1 例（動物番号 809F）を除き、いずれの尿試料及び全血試料を分析した場合も、分析値は定量限界の 10 ng/mL を下回っており、Zr 又は ZS は体内に吸収されないことが示唆された。

以上のように、イヌに ZS を最大 2000 mg/kg/日の用量で 1 日 1 回 39 週間連日投与したときの忍容性は良好であった。2000 mg/kg/日群の数例で低カリウム血症がみられ、1 日又は 2 日間の投与中断を余儀なくされたが、この低カリウム血症は期待される ZS の薬理作用に関連した変化であった。ZS に関連する用量依存的な所見は、著明な尿中カリウム排泄の減少、軽微～軽度の血清カリウム濃度及びアルドステロン濃度の低下、軽度の尿量増加、尿 pH 上昇及び尿中ナトリウム排泄量増加、並びに 2000 mg/kg/日群の雄でみられた軽微で一過性の血清 HCO_3 濃度及び総炭酸ガス濃度の上昇、及び同群の雌雄でみられた軽微な尿中リン／クレアチニン比の上昇であった。ZS を 2000 mg/kg/日の用量で 39 週間投与しても、Zr 及び ZS はいずれも体内に吸収されないことが明らかとなった。

ZS に関連する病理組織学的所見が認められたのは 2000 mg/kg/日群のみであり、それらの所見は副腎の球状帯細胞における軽度の細胞質内脂質空胞形成、並びに腎臓の髄質及び皮質における多巣性病変であり、尿細管及び間質の変性及び炎症性変化を伴っていた。これらの所見は長期的に体内カリウムが減少したときに認められる変化と一致し、影響が認められた動物では低カリウム血症と相関していた。腎尿細管間質の炎症の発現頻度及び重症度は、13 週間投与後も 39 週間投与後も同程度であったが、39 週間の投与後にはこれら以外の腎臓の変化（間質マトリックスの増加及び間質の線維化）も認められた。カリウムを補充したイヌの腎臓では、両時点とも腎臓の変化は発現頻度が低く、顕著なものではなかった。

以上より、ZS の 13 週間投与時の無毒性量は ZS 単独投与の場合、雄で 1000 mg/kg/日（体重を 60kg として換算した HED は 33 g/日）、雌で 2000 mg/kg/日（体重を 60kg として換算した HED は 67 g/日）、カリウム補充時では雌雄とも 2000 mg/kg/日と判断された。ZS の 39 週間投与時の無毒性量は、雌雄ともに 1000 mg/kg/日と判断された。これらの無毒性量は、臨床的に問題となる低カリウム血症並びにそれに伴う腎臓の変性及び炎症性変化に基づき判断された。カリウム補充により、低カリウム血症及びそれに伴う腎臓への影響の発現頻度及び／又は程度を低減させることが可能であった。

2.6.6.4 遺伝毒性試験

突然変異誘発性及び染色体異常誘発性を評価するために GLP 適用の *in vitro* 遺伝毒性試験を 2 試験実施し、また、GLP 適用のラット 28 日間反復経口投与毒性試験（524020 試験）の一部として *in vivo* 小核試験も実施した。なお、*in vitro* 遺伝毒性試験では ZS-9 を用い、*in vivo* 小核試験では ZS を用いた。

ZS-9 はアッセイに適合する媒体には溶けないため、懸濁液として直接試験する方法及びジメチルスルホキシド（DMSO）抽出液を用いて試験する方法の 2 通りで検討した。DMSO 抽出液は、DMSO 1 mL あたり 200 mg の ZS-9 を添加し、37°C で振盪させながら 3 日間インキュベーションして調製した。インキュベーション終了後、ZS-9 を遠心分離して沈殿させ、DMSO 上清（抽出液）を試験に供した。遺伝毒性試験結果の概要を表 6 に示す。

表 6　　遺伝毒性試験成績

試験の種類	細胞の種類／動物種	ジルコニウムシクロケイ酸ナトリウム濃度	結果
復帰突然変異試験 [a]	ネズミチフス菌（*Salmonella typhimurium*）TA98、TA100、TA1535、TA1537 大腸菌（*E.coli*）WP2*urvA*	17～5000 μg/プレート±S9 3.13～100%DMSO 抽出液 [b]±S9 3.13～75%DMSO 抽出液 [b]±S9	陰性
染色体異常試験 [a]	チャイニーズハムスター卵巣細胞	78～5000 μg/mL＋S9 39～156 μg/mL－S9 25～100%DMSO 抽出液 [b]＋S9 25～100%DMSO 抽出液 [b]－S9	陰性
小核試験	ラット／Sprague Dawley 系	6000 mg/kg/日 （28 日間経口投与）	陰性

[a]：ZS-9（非プロトン化 ZS）を使用
[b]：100%DMSO 抽出液=100 μL

ネズミチフス菌 TA98、TA100、TA1535 及び TA1537、並びに大腸菌 WP2*urvA* を用いた復帰突然変異試験において、S9 mix の存在下及び非存在下で ZS-9 及び ZS-9 の DMSO 抽出液について変異原性を評価したところ、結果は陰性であり、構造的染色体異常誘発性及び倍数性についても S9 mix の存在下及び非存在下ともに陰性であった。ZS を最大 6000 mg/kg/日の用量で 28 日間反復投与したラットの骨髄細胞において、小核形成の誘発は認められなかった。

2.6.6.4.1 In vitro 遺伝毒性試験

2.6.6.4.1.1 ZS-9：ネズミチフス菌の菌株 TA98、TA100、TA1535 及び TA1537 並びに大腸菌の菌株 WP2*urvA* を用いた復帰突然変異試験

資料番号：4.2.3.3.1.1（789296 試験）

本試験は、経済協力開発機構（OECD）のガイドライン 471（OECD 471）に従った方法で実施した GLP 適用試験であり、ネズミチフス菌の菌株 TA98、TA100、TA1535 及び TA1537 並びに大腸菌の菌株 WP2*urvA* を用いて ZS-9 の変異原性を評価した。

Aroclor 1254 で酵素誘導して調製したラット肝 S9 に混合機能オキシダーゼ活性に必要な補酵素を加えた代謝活性化系（S9 mix）の存在下及び非存在下で、寒天プレート（各用量 3 枚のプレート）を用いて試験を 2 回実施した。

第 1 の試験では、水で調製した ZS-9 の懸濁液を試験菌株に直接適用した。適用濃度は 17～5000 μg/プレートの範囲とした。第 2 の試験では、200 mg/mL の濃度になるように ZS-9 を添加した DMSO を 37°C で振盪させながら 3 日間インキュベーションして DMSO 抽出液を調製し、プレインキュベーション法にて、試験菌株に 100 μL/プレートずつ適用した。適用濃度は未希釈の抽出液を 100%として、S9 mix 非存在下では 2%～75%、S9 mix 存在下では 3%～100%の範囲とした。なお、S9 mix 非存在下では、菌株に対する毒性を考慮し、抽出液の最高適用濃度を制限した。陽性対照を設けることにより、試験系の感度及び S9 mix による代謝活性化を確認した。

いずれの試験においても、S9 mix の存在下及び非存在下ともに、5 菌株のすべてで変異原性は認められなかった。水で調製した ZS-9 懸濁液を適用した場合、菌株に対する毒性は認められなかった。また、適用したいずれの濃度においても、溶解していない物質が存在した。

第 2 の試験で用いた ZS-9 の DMSO 抽出液は S9 mix の非存在下では最高濃度で毒性を示した。S9 mix の存在下では毒性は認められず、抽出液中に ZS-9 の沈殿は生じなかった。

代謝活性化系の存在下及び非存在下で試験を実施した結果、ZS-9 はネズミチフス菌及び大腸菌において変異原性を示さなかった。

2.6.6.4.1.2 ZS-9：チャイニーズハムスター卵巣細胞を用いた *in vitro* 染色体異常試験

資料番号：4.2.3.3.1.2（789301 試験）

チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞を用いた GLP 適用の染色体異常試験を実施し、非プロトン化型である ZS-9 の染色体異常誘発性を評価した。2 試験実施し、試験 1 では、ZS-9 を Ham's F-10 培地による懸濁液として、20、39、78、156、313、625、1250、2500 及び 5000 µg/mL の濃度で適用した。試験 2 では、1 mL あたり 200 mg の ZS-9 を添加したジメチルスルホキシド（DMSO）を 37°C で振盪させながら 3 日間インキュベーションして ZS-9 の抽出液を調製し、次いでこの DMSO 抽出液を最大で培地中濃度 1% (v/v) まで適用した。両試験とも、シクロホスファミド（CPH）及びメチルメタンスルホン酸を陽性対照とし、試験系の感度及び S9 mix による代謝活性化を確認した。

両試験ともに、Aroclor 1254 を投与した成熟雄性ラットの肝臓から調製したポストミトコンドリア分画（S9）と NADPH 生成系からなる外因性代謝活性化系 S9 mix の存在下及び非存在下で実施した。

試験の約 20 時間前から培養した CHO 細胞を S9 mix 存在下で 6 時間、S9 mix 非存在下で 22 時間にわたり被験物質で処理した。次いでこれらの培養細胞を処理開始から 24 時間後（試験 1 及び 2）又は 48 時間後（試験 2）に採取した。

試験 1 では、処理濃度が S9 mix 存在下で 156～5000 µg/mL 及び S9 mix 非存在下で 78～5000 µg/mL の培地において沈殿物／不溶解被験物質が観察された。S9 mix 存在下で処理した培地では毒性は認められなかったが、S9 mix 非存在下で処理濃度が 156 µg/mL 以上では毒性が認められた。試験 2 では、S9 mix の存在下及び非存在下で培地中濃度 0.5 及び 1% (v/v)の ZS-9 抽出液で処理した培地において沈殿物が観察されたが、毒性は認められなかった。

S9 mix の存在下及び非存在下のいずれにおいても、ZS-9 による染色体構造異常及び倍数体の誘発は認められなかった。したがって、CHO 細胞を用いた *in vitro* 試験において ZS-9 は染色体異常誘発性を示さないと結論づけられた。

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 ZS の 28 日間反復強制経口投与試験及び 14 日間回復性試験

資料番号：4.2.3.2.4（524020 試験）

GLP 適用のラット 28 日間反復経口投与毒性試験（524020 試験）の一部として、ZS が小核形成を誘発するかどうかを評価する *in vivo* 小核試験を実施した。表 4 に要約したように、ラットに ZS を 0、300、1000 及び 2000 mg/kg/回の用量で、12 時間の間に 6 時間間隔で 1 日 3 回、28 日間

連日強制経口投与し、別の 1 群には 2000 mg/kg を 1 日 1 回、28 日間連日強制経口投与した。投与期間終了後、各群の最初の動物番号の雌雄各 5 例の左大腿骨から骨髄細胞を採取し、スライド標本を作製した。なお、陽性対照については、過去にシクロホスファミド（CPH）を 50 mg/kg の用量で経口投与したラットから採取して作製した骨髄細胞の保存スライド標本を使用し、ZS 投与ラットのスライドとともに無作為抽出した。毒性作用は多染性赤血球（PCE）の正染性赤血球（NCE）に対する比（PCE/NCE 比）に基づき評価し、遺伝毒性については、ラット 1 例あたり最低 2000 個の PCE について小核の有無を観察し、小核を有する PCE（MN-PCE）及び／又は小核を有する NCE（MN-NCE）の出現頻度に基づき評価した。ZS を最大 6000 mg/kg/日（2000 mg/kg 1 日 3 回）の用量で経口投与した Sprague Dawley 系ラットから採取した骨髄細胞において、ZS は小核形成を誘発しないことが示された。小核の発現率は 3000 mg/kg/日群（第 3 群）の雌で最大であったが、MN-PCE の平均発現率は 0.06%であった。この MN-PCE の発現率は、媒体投与又は未処置の Sprague Dawley 系ラットにおける背景データ（1 群 5～7 例の MN-PCE 発現率は 0.01～0.13%）の範囲内であった。PCE/NCE 比による評価に基づくと、ZS 投与群では骨髄毒性は認められなかった。

2.6.6.5 がん原性試験

がん原性試験は実施しなかった。

ZS 及び ZS-9 は体内に吸収されず、ICH S2 (R1)ガイドラインで推奨されている標準的な *in vitro* 及び *in vivo* 遺伝毒性試験において ZS 及び ZS-9 は遺伝毒性を示さなかったことから、ZS はヒトに対して遺伝毒性を示さないと考えられる。

ラット及びイヌを用いた長期反復投与毒性試験（524942 試験及び 1959-008 試験）において、それぞれヒト等価用量として 58 g/日及び 67 g/日に相当する用量を投与しても、過形成又は前がん病変は認められなかった。したがって、ZS 及び ZS-9 は遺伝毒性を示さず、体内に吸収されないことから、ヒトに対して発がん性を示す可能性は低いと考えられる。

2.6.6.6 生殖発生毒性試験

ラット及びウサギを用いた一連の GLP 適用の生殖発生毒性試験を実施し、生殖発生に対する ZS の影響を評価した。これらの試験として、雄ラットに ZS を 147 日間以上投与して雄ラットの受胎能に及ぼす影響を評価する試験、雌ラットに ZS を交配開始 14 日前から妊娠 16 日目（交尾確認日を妊娠 0 日目とする）まで投与して雌ラットの受胎能及び胚・胎児発生に及ぼす影響を評価する試験、妊娠ウサギに ZS を妊娠 6 日目から妊娠 18 日目まで投与して胎児発生に及ぼす影響を評価する試験、並びに妊娠ラットに ZS を妊娠 6 日目からその出生児が授乳 21 日目に離乳するまで投与して出生前の発生及び出生後の発生に及ぼす影響を評価する試験を実施した。いずれの試験においても、ZS を 12 時間の間に 6 時間間隔で 1 日 3 回投与した。

ZS をラット及びウサギに最大 6000 mg/kg/日まで投与しても、雌雄の受胎能、胚・胎児発生、出生後の発生及び生殖機能への影響は認められなかった。これらの試験結果から、ZS が生殖能や受胎能に影響を及ぼす可能性は低く、妊娠中及び／又は授乳中に服用しても胎児発生及び出生後の発生に影響を及ぼす可能性も低いことが示唆された。

2.6.6.6.1 雌の受胎能及び初期胚発生に関する試験

2.6.6.6.1.1 ラットの受胎能及び胚・胎児発生に対する ZS の強制経口投与による影響

資料番号：4.2.3.5.1.1（496748 試験）

本試験（GLP 適用）では、雌性 Sprague Dawley 系ラットを 1 群 20 例からなる 5 群に無作為に割り付け、ZS を 0 mg/kg/日（媒体対照群）、1000 mg/kg/日（333 mg/kg 1 日 3 回）、3000 mg/kg/日（1000 mg/kg 1 日 3 回）、及び 6000 mg/kg/日（2000 mg/kg 1 日 3 回）の用量で、交配開始 14 日前から妊娠 16 日目（交尾確認日を妊娠 0 日目とする）まで、12 時間の間に 6 時間間隔で強制経口投与した。投与容量は 10 mL/kg/回とした。

投与する懸濁液は、1 日 1 回、適切な量の ZS を 0.5% (w/v)メチルセルロース溶液に添加して調製し、調製時から毎日の投与終了時までスターラーで攪拌し続けた。残った投与液は廃棄した。調製した懸濁液はすべて、調製後 24 時間以内に使用した。投与 1 日目及び 3 週目に調製した懸濁液については、それらの懸濁液中の被験物質濃度及び均一性をバリデートされた分析法により確認した。

生存状況及び毒性による一般症状について、交配の 14 日前から妊娠期間中、ラットを 1 日 1 回観察した。試験期間中、体重増加量及び摂餌量を試験計画書に規定された時点で測定した。妊娠 20 日目にラットを安楽死処分して妊娠の転帰を評価し、胸腔及び腹腔の評価を含む剖検を実施した。各卵巣の黄体数を記録した。着床数及び着床部位について各ラットの子宮内容物を調べ、着床ごとに分類した。生存胎児は外表検査を行い、体重を測定し、内臓及び骨格の異常や変形の有無（骨化の状態を含む）を評価した。血漿中ナトリウム濃度、カリウム濃度及びクロール濃度を測定するための採血を交配前及び安楽死処分前に実施した。

ラットは全例、試験終了時まで生存した。母動物の一般状態、体重、体重増加量、摂餌量、母動物の血漿中ナトリウム濃度／カリウム濃度／クロール濃度、発情周期、交尾能及び妊娠能に対する ZS に関連した影響は認められなかった。また、胎児の体重に ZS 投与による影響はみられず、ZS 投与に起因する胎児の内臓又は骨格の異常も認められなかった。

以上のように、雌ラットに交配 14 日前から妊娠 16 日目まで、ZS を 2000 mg/kg までの用量で 6 時間毎に 1 日 3 回（1 日量として投与可能な最大用量 6000 mg/kg/日まで）投与しても、生存中及び剖検時に毒性所見は認められなかった。また、発情周期、交尾行動、受胎能、及び妊娠に対する ZS 投与による影響はみられず、胎児の成長及び発達にも影響は認められなかった。これらの結果に基づき、生殖発生及び胎児における無毒性量は、投与可能な最大用量である 2000 mg/kg 1 日 3 回（6000 mg/kg/日）と判断された。この用量は、HED に換算すると 58 g/日に相当する。

2.6.6.6.2 胚・胎児発生に関する試験

ウサギの胚・胎児発生に及ぼす ZS の影響について、用量設定のための予備試験（GLP 適用）及び本試験（GLP 適用）において評価した。

2.6.6.6.2.1 ウサギを用いた ZS の強制経口投与による胚・胎児発生に関する試験（予備試験）

資料番号：4.2.3.5.2.1（496858 試験）

非妊娠ウサギ及び妊娠ウサギ（ニュージーランドホワイト種）に ZS を投与したときの毒性を評価する GLP 適用試験を実施した。本試験は 2 期に分けて実施した。第 1 期では、未交配の雌 3 例からなる 1 群（第 1 群）に、ZS を 12 時間の間に 6 時間間隔で 1 日 3 回、13 日間強制経口投与

した。第 2 期では、交尾が確認された雌 4 例からなる群に ZS を 1 日 1 回（2000 mg/kg；第 3 群）又は 1 日 3 回（0［対照群］、1000 又は 2000 mg/kg/回；それぞれ第 2、第 4 及び第 5 群）、妊娠 6 日目から 18 日目まで強制経口投与した。なお、第 2 期における投与量は本試験の未交配試験期に得られたデータに基づき設定した。投与容量は 10 mL/kg とし、バリデートされた分析法により投与液中の被験物質濃度を測定した。

未交配期では、体重及び摂餌量を初回投与日から毎日記録し、一般状態及び投与に対する反応を 1 日 1 回観察した。血漿中の電解質濃度測定のための血液試料を投与開始前及び安楽死処分前日の最終投与日（試験 13 日目）に採取した。未交配の雌は最終投与の翌日に剖検せずに安楽死させた。

交尾が確認された雌については、体重を妊娠 4、6～19 及び 22 日目に記録し、摂餌量を妊娠 4 日目から毎日記録した。一般状態及び投与に対する反応を 1 日 1 回記録し、妊娠 3 日目からは詳細な一般状態観察を実施した。血漿中カリウム、ナトリウム及びクロール値測定用の血液試料を投与前及び最終投与日（妊娠 18 日目）に耳静脈より採取した。これらの雌ウサギは最終投与から 4 日後の妊娠 22 日目に安楽死させ、剖検を実施した。黄体数、生存及び死亡胎児数、並びに早期又は後期死亡胚数について子宮及び卵巣を評価した。

未交配の雌において淡色の糞便が認められ、これは被験物質の糞中排泄によるものと考えられたが、この所見を除き、一般状態、体重増加量、摂餌量、又は血漿中ナトリウム、カリウム及びクロール濃度に ZS 投与による影響は認められなかった。ZS はまた、最大 6000 mg/kg/日の用量で妊娠 6 日目から 18 日目まで投与しても、妊娠に影響を及ぼさなかった。

以上の結果に基づき、ウサギを用いた以後の生殖発生毒性試験で用いる適切な投与量は 0、500、1000 及び 2000 mg/kg 1 日 3 回と判断された。

2.6.6.6.2.2 ウサギを用いた ZS の強制経口投与による胚・胎児発生に関する試験

資料番号：4.2.3.5.2.2（496863 試験）

雌性ニュージーランドホワイト種ウサギを用い、ZS を妊娠 6 日目から 18 日目まで経口投与したときの胚・胎児発生に及ぼす影響を評価する GLP 適用試験を実施した。本試験では、母体毒性も評価した。

雌 20 例からなる群に、ZS を 0（媒体対照）、500、1000 又は 2000 mg/kg 1 日 3 回の用量で強制経口投与した。投与容量は 10 mL/kg とした。投与は 12 時間の間に 6 時間間隔で行い、バリデートされた分析法により投与液中の被験物質濃度を測定した。

体重を投与前に 1 回と、妊娠 6～19 日目及び妊娠 22、26、29 日目に 1 日 1 回測定した。摂餌量を妊娠 4 日目以降の試験期間中、1 日 1 回測定した。血漿中ナトリウム、カリウム及びクロール濃度を投与前及び最終投与日に測定した。詳細な一般状態観察所見を妊娠 3 日目より 1 日 1 回記録し、投与に対する反応の徴候を投与期間中 1 日 1 回観察した。最終投与から 11 日後の妊娠 29 日目に安楽死させた。着床部位、胎盤重量、色調及び形状、並びに生存及び死亡胎児数及び早期又は後期死亡胚数について子宮を評価した。各卵巣について黄体数を記録した。胎児の体重を測定し、性別の判定を行い、外表、内臓又は骨格の異常の有無を評価した。

母動物において、ZS は一般状態、体重、体重増加量、摂餌量、血漿中ナトリウム、カリウム及びクロール濃度、又は妊娠能に影響を及ぼさなかった。胎児においても、ZS の投与に関連する異常は認められなかった。

以上のように、雌のニュージーランドホワイト種ウサギに妊娠 6 日目から妊娠 18 日目まで、ZS を 2000 mg/kg までの用量で 12 時間の間に 6 時間間隔で 1 日 3 回投与しても、生存中及び剖検

時に毒性所見は認められなかった。また、ZS 投与による妊娠能に対する影響はみられず、胎児の成長、雌雄の比率及び発達にも影響は認められなかった。これらの結果に基づき、母体及び胎児における無毒性量は投与可能な最大用量である 2000 mg/kg/回（6000 mg/kg/日）と判断された。この用量は、HED に換算すると 116 g/日に相当する。

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 ラットを用いた ZS の強制経口投与による出生前及び出生後の発生に関する試験

資料番号：4.2.3.5.3.1（496753 試験）

本試験（GLP 適用）では、ラットを用い、妊娠の胎児期及び授乳期間中の ZS 投与による毒性を評価した。交尾が確認された雌性 Sprague Dawley 系ラット（1 群 24 例；F_0 世代）に、ZS を 0、333、1000 又は 2000 mg/kg の用量及び 10 mL/kg の投与容量で 1 日 3 回強制経口投与した。投与は 12 時間の間に 6 時間間隔で、F_1 世代ラットが離乳する授乳 21 日目（同腹児の出生日を授乳 0 日目とする）まで行った。

投与する懸濁液は 1 日 1 回、投与量の規定に適合するように重量を計測した被験物質を適切な量の 0.5% (w/v)メチルセルロース溶液に添加し、高せん断ミキサーで混合した。1 週目及び 5/6 週目に、バリデートされた分析法により懸濁液中の被験物質濃度を測定した。

F_0 世代の雌（母動物､以下「F_0 雌」と記載）の体重を投与前に 1 回記録し､その後も妊娠 6 日目から安楽死まで 1 日 1 回記録した。各成熟 F_0 雌による摂餌量を妊娠 4 日目から分娩時まで記録した。同腹児を出産した F_0 雌については、授乳 0～7 日目及び授乳 7～14 目の期間にも摂餌量を週 1 回記録した。F_0 雌に対しては､一般状態及び投与に対する反応を投与期間中 1 日 1 回観察し、詳細な一般状態観察も試験前から週 1 回実施し、更に授乳期初期に血漿中カリウム、ナトリウム及びクロール濃度も測定した。

F_0 雌は自然分娩させ、分娩困難又は分娩時間の延長が認められた場合にはその旨を記録した。同腹児ごとに F_1 世代の生存児数及び死亡児数を授乳 0 日目から少なくとも授乳 21 日目まで記録した。F_1 生存児数は少なくとも授乳 21 日目まで毎日カウントし、目に見える外表異常の有無を調べ、更に同腹児全体（雌雄別）の重量を授乳 1、4、7 及び 14 目に測定し、個別重量を妊娠 21 日目に測定した。また、母動物による哺育行動の欠如（例えば、寝巣の作り方や清浄が不適切である、子を分散した状態又は冷たい状態に放置している、子に身体的虐待を与えている、授乳や給餌が明らかに不十分であるなど）が認められた場合には、それらも記録した。

F_1 出生児は授乳 21 日目に離乳させ、各同腹児から雌雄各 1 例の F_1 離乳児を選択して飼育を継続し、正常な成長及び機能の発達（身体的成熟、感覚機能、性的成熟など）について検査した。F_0 世代の母動物及び離乳後の評価対象に選択されなかった 1 同腹児あたり雌雄各 2 例の F_1 離乳児を安楽死処分し、剖検を実施した。離乳後の評価対象に選択されなかった残りの F_1 離乳児は安楽死時点に外表異常の有無を確認後、処分した。

F_1 ラットは離乳後、週 1 回体重を測定し、その測定期間は同腹児のほとんどが離乳後 1 週間以内の時点から、雄については安楽死処分まで、雌については交配開始までとした。選択された F_1 動物はほぼ 4 週齢に達した時点より、耳介展開、上顎切歯萌出、開眼、膣開口（雌）、陰茎亀頭包皮分離（雄）、聴覚及び視覚機能、背地走性について評価し、オープンフィールド試験、ロータロッド試験及び多 Y 字型水迷路試験を実施した。F_1 ラットの生殖機能を、F_1 ラットの交配（同腹児内の雌雄では交配せず）と、その後の F_1 雌の妊娠、分娩及び授乳（授乳 14 日目まで）を通じて評価した。授乳 14 日目の時点で、F_1 雌及び F_2 児は安楽死させ、外表を検査した。交尾が確

認された F_1 雌は妊娠 0、7、14 及び 20 日目、分娩後は授乳 1、7 及び 14 日目にそれぞれ体重を測定した。F_2 生存児を計数し、外表の発達、生存状況及び体重を 1 日 1 回検査した。

F_0 雌では、ZS 投与に関連する影響は 2000 mg/kg 1 日 3 回投与群のラット 7 例で認められた淡色の糞便に限られ、これは被験物質の糞中排泄によるものと考えられた。体重、体重増加量、摂餌量、又は血漿中ナトリウム、カリウム及びクロール濃度には、ZS の影響は認められなかった。ZS は生殖機能（妊娠期間、F_1 同腹児数、F_1 児の体重）にも影響を及ぼさず、剖検時に特記すべき所見も認められなかった。

F_1 ラットにおいて、F_0 母動物への ZS 投与に関連する影響は認められなかった。すなわち、生存状況、体重、体重増加量、膣開口、陰茎亀頭包皮分離、機能的試験における成績、又は生殖機能（妊娠期間及び F_2 同腹児数）に影響はみられず、剖検所見も認められなかった。

F_2 児においても、F_0 母動物への ZS 投与に関連する影響は認められなかった。すなわち、生存状況、体重、体重増加量及び外表の発達に影響は認められず、剖検所見も認められなかった。

以上のように、妊娠した F_0 雌ラットに ZS を最大 6000 mg/kg/日（2000 mg/kg/1 日 3 回）までの用量で妊娠 6 日目から離乳時まで経口投与したときに、ZS 投与に関連した影響は最高用量群にみられた淡色の糞便のみであった。F_0 雌に ZS を投与しても、生殖機能（妊娠、分娩、又は授乳）に影響はみられなかった。更に F_0 母動物から出生した F_1 出生児の成長及び発達又は生殖機能に ZS 投与の影響はみられず、F_1 母動物から出生した F_2 出生児の成長及び発達にも影響は認められなかった。これらの結果に基づき、母動物における無毒性量及び生殖機能に対する無毒性量はともに、投与可能な最大用量であり検討した最高用量である 2000 mg/kg/1 日 3 回（6000 mg/kg/日）と判断された。この用量は、体重 60kg として HED に換算すると 58 g/日に相当する。

2.6.6.6.4 雄の受胎能に関する試験

2.6.6.6.4.1 ラット用いた ZS の 26 週間反復経口投与毒性試験と 4 週間回復性試験及び雄受胎能の評価

資料番号：4.2.3.2.5（524942 試験）

Sprague Dawley 系ラットを用いた GLP 適用 26 週間反復投与毒性試験の一部として雄の受胎能に及ぼす ZS の影響を評価した。雌雄各 40 例からなる群に、ZS を 0、333、1000 及び 2000 mg/kg 1 日 3 回の用量で投与した。投与開始から 147 日後に、各用量群の雄 15 例を未処置の雌と 1 対 1 で交配させた。交尾が確認されるまで、毎日早朝に膣内を洗浄して洗浄液を採取し、各膣洗浄液で観察された発情周期の段階を記録した。*in situ* での膣栓及び／又は膣洗浄液中での精液の検出日を妊娠 0 日目とした。雌雄 1 対 1 の交配期間は最長 7 泊とした。

交配期間終了までに交尾の成立を示す所見が認められなかった場合、該当する雌動物は交配最終日の翌朝に雄から分離し、最後の 1 泊の間に交尾したものとして処理した。該当する雌動物に対する手順は、交配の最後の 1 泊に交尾したものとして、仮想妊娠 14 日目～16 日目の剖検時まで継続した。それぞれの雌について、交尾の徴候が陽性となるまでに要した期間及び交尾の機会を逃した回数（交尾の徴候なく経過した発情周期数）を評価した。

雌ラット及びそれらの胎児は妊娠 14、15 又は 16 日目に安楽死させ、すべての着床数及び着床部位を記録し、生存胚、後期胚死亡（胚が目視可能な状態）、又は早期胚死亡（初期の胎盤のみが残っているか、脱落膜痕が見える状態）に分類した。各卵巣内の黄体数も記録した。26 週間の投与後、各用量群の雄 20 例（交配に使用した雄ラットを含む）を安楽死させ、各ラットの精巣上体尾部から精液を採取し、ラット 1 例あたり 200 個の精子について、エオジン染色塗抹標本の観察による形態異常評価、及び運動性評価を実施した。

ZS を投与可能な最大用量 6000 mg/kg/日まで投与しても、雄の交尾能、受胎能、生殖能又は精子の異常に対する ZS 投与に関連する影響は認められなかった。6000 mg/kg/日は、HED に換算すると 58 g/日に相当する。

2.6.6.6.5 幼若動物を用いた毒性試験

幼若動物を用いた毒性試験は実施しなかった。

2.6.6.7 局所刺激性試験

臨床投与経路は経口投与であるため、局所刺激性試験は実施しなかった。

2.6.6.8 その他の毒性試験

ZS の取扱い上の安全性に関する評価の一環として、ZS を用いた皮膚感作性試験を実施した。この試験以外にはその他の毒性試験は実施しなかった。

2.6.6.8.1 抗原性試験

ZS は体内に吸収されないため、抗原性試験は実施しなかった。

2.6.6.8.2 免疫毒性試験

ZS は体内に吸収されず、反復投与毒性試験において ZS 投与に関連した免疫学的な影響が認められなかったことから、免疫毒性試験は実施しなかった。

2.6.6.8.3 毒性発現の機序に関する試験

毒性発現の機序に関する試験は実施しなかった。

イヌ反復投与毒性試験の一部において、追加動物に ZS 又は ZS-9 を塩化カリウムと併用投与し、観察された所見とカリウム低下との関連性について評価した。

2.6.6.8.4 依存性試験

ZS は体内に吸収されず、反復投与毒性試験において中枢神経系及び末梢神経系に対する有害な影響が認められなかったことから、依存性試験は実施しなかった。

2.6.6.8.5 代謝物に関する試験

ZS は体内に吸収されず、酵素代謝を受けない無機物質であるため、代謝物に関する試験は実施しなかった。

2.6.6.8.6 不純物に関する試験

ZS の毒性試験において不純物の安全性評価も行っているため、別途試験は実施しなかった。

2.6.6.8.7 その他の試験

2.6.6.8.7.1 モルモットを用いた ZS の皮膚への適用による皮膚感作性試験（改良 Buehler 法）

資料番号：4.2.3.7.7.1（20075345 試験）

OECD ガイドライン 406（OECD 406）に従い、Hartley 系白色モルモットを用いた皮膚感作性試験（GLP 適用）を実施し、ZS の皮膚感作性を評価した。雌雄各 2 例のモルモットを用いて用量設定予備試験を実施し、主試験で使用する適切な用量を設定した。主試験では、雌雄各 10 例のモルモットに 100%の ZS（0.3 g）を週 1 回、連続 3 週間にわたり局所適用した。2 週間の無処置期間後、被験物質処置モルモット 20 例及び未処置対照モルモット 10 例（惹起処置のみ）に 100%の ZS を皮膚に局所適用して感作反応を惹起した。α-ヘキシルシンナムアルデヒド（HCA）処置モルモット 10 例及び HCA 処置対照モルモット 10 例からなる HCA による陽性対照群も上記と同様に処置を行い、HCA 処置群には 5% w/v HCA エタノール溶液を適用して感作処置を行い、2.5%及び 1.0% w/v HCA アセトン溶液を適用して惹起処置を行った。25 mm の Hill Top Chamber を用いて被験物質又は HCA を各モルモットの刈毛した腹側部皮膚に適用し、弾性包帯を巻いて Chamber を固定した。固形物／粉末と皮膚との接触を強化するために、Chamber 適用直前に、適量の逆浸透膜処理した脱イオン水（RODI）で被験物質を湿らせた。被験物質は感作誘導時には左腹側部に、惹起時には右腹側部にそれぞれ適用した。Chamber 適用から約 6 時間後に、皮膚に適用していた材料を取り除き、試験区画を RODI で湿らせたガーゼで拭き取り、更に乾いたガーゼで拭き取って被験物質の残渣を取り除いた。Buehler 法（Buehler 1965）に従い、肉眼観察による皮膚反応グレード評価により、各惹起処置の 24 及び 48 時間後に試験区画における皮膚刺激反応のグレードを評価した。

100%の ZS による惹起処置後、被験物質処置群及び対照群（惹起処置のみ）のいずれにおいても皮膚反応は認められなかった。

2.5% w/v HCA アセトン溶液で惹起した場合、惹起後 24 時間では HCA 処置群のモルモット 10 例中 8 例、惹起後 48 時間では 10 例中 7 例においてそれぞれスコア 1 又は 2 の皮膚反応が認められた。HCA 処置対照群（惹起処置のみ）にみられた皮膚反応はスコア 0 又は±であった。HCA 処置群における皮膚反応の群平均スコアは 1.6 であり、HCA 処置対照群（0.0～0.1）と比較して 1.6 と高かった。1.0% w/v HCA アセトン溶液で惹起した場合は、惹起後 24 時間では HCA 処置群のモルモット 10 例中 7 例、惹起後 48 時間では 10 例中 5 例においてそれぞれスコア 1 又は 2 の皮膚反応が認められた。HCA 処置対照群（惹起処置のみ）では皮膚反応は認められなかった（皮膚反応スコアは 0）。HCA 処置群における皮膚反応の群平均スコアは 0.9～1.2 であり、HCA 処置対照群（0.0）と比較して高かった。陽性対照の HCA に関する試験結果から、適切に試験が実施されたことが示され、本試験デザインは皮膚感作性物質を検出できるデザインであることが示された。

以上の結果に基づき、皮膚感作性の判定基準（被験動物の 15%以上で皮膚反応スコアが 1 以上）は満たされておらず、ZS はモルモットにおいて接触皮膚感作性物質ではないと判断された。

2.6.6.9 考察及び結論

ラット及びイヌに極めて高用量の ZS を長期間反復経口投与したときに、いずれの動物種においても忍容性が認められた。ラットには投与可能な最大用量である 2000 mg/kg を 1 日 3 回（6000 mg/kg/日）、最長 26 週間反復投与し、イヌには 1000 mg/kg/日を最長 39 週間反復投与したときに、それぞれ忍容性が認められた。これらの投与量は、体重 60 kg のヒトへの用量に換算すると、それぞれ約 58 g/日（ラット）及び約 33 g/日（イヌ）に相当する。

いずれの動物種においても、ZS 及び ZS-9 の投与による影響は薬理作用（カリウムの消化管からの吸収を抑制する作用）に関連した所見に限られ、恒常性の維持、特に適切な血清カリウム濃度及び適切な体内の総カリウム量を維持するための適応反応を反映するものであった。主たる適応反応は尿中カリウム排泄量の顕著な減少であった。ZS 投与に関連した二次的影響として、血清カリウム濃度の低下、血清アルドステロン濃度の低下、血清 HCO_3 濃度の上昇、尿中ナトリウム排泄量の増加、尿中水素イオン濃度の低下（尿 pH の上昇）が認められた。ラットでは、これらの所見は比較的軽度であり、投与可能な最大用量である 6000 mg/kg/日を反復投与した場合においても、これらの影響は有害なものではないと判断された。一方、イヌでは、極めて高用量を長期投与したときに臨床的に問題となる低カリウム血症が発現し、これに関連した二次的影響として腎臓の変性及び炎症性変化並びに副腎皮質の脂質空胞形成が認められ、ZS の薬理作用が用量を制限することとなった。カリウムの補充により、低カリウム血症の発現頻度及び／又は程度は低下し、それに伴い腎臓及び副腎への影響も軽減された。また、低カリウム血症は投与中止により回復した。

ICH で推奨されている標準的な *in vitro* 及び *in vivo* 遺伝毒性試験において、ZS 及び ZS-9 に遺伝毒性は認められなかったことから、ヒトに対して遺伝毒性を示すことはないと考えられる。ラット及びイヌを用いた長期反復投与毒性試験において過形成や前がん病変が認められなかったこと、また、ZS 及び ZS-9 は遺伝毒性を示さず、更に ZS は体内に吸収されないことから、ヒトに対して発がん性を示す可能性は低いと考えられる。

雌雄ラットに、ZS を投与可能な最大用量である 6000 mg/kg/日（体重 60 kg のヒトでは約 58 g/日に相当）まで投与しても、雌雄の生殖機能に対する影響は認められなかった。また、妊娠ラット及び妊娠ウサギに ZS を 6000 mg/kg/日まで投与しても、妊娠の維持又は胚・胎児発生への影響は認められなかった。妊娠ラットに妊娠第 1 三半期から授乳終了まで最大で 6000 mg/kg/日の ZS を投与しても、妊娠、分娩又は出生児の発生に対する影響は認められなかった。

モルモットを用いた皮膚感作性試験において、適用可能な最大用量（0.3 g）の ZS を皮膚に局所適用した結果、皮膚刺激性は認められず、ZS は皮膚感作性物質ではないと考えられた。

以上のように、毒性試験の成績は適応対象となる患者集団に ZS を使用することの妥当性を裏付けるものである。

2.6.6.10 参考文献

Bem et al 1999

Bem D, Bedard R, Broach R, Leon-Escamilla E, Gisselquist J, et al. Synthesis and characterization of a new family of microporous zirconium silicates. Mat. Res. Soc. Symp. Proc. 1999; 549: 73-8.

Buehler 1965

Buehler EV. Delayed Contact Hypersensitivity in the Guinea Pig. Arch Dermat. 1965; 91: 171-7.

Conn and Johnson 1956

Conn JW, Johnson RD. Kaliopenic nephropathy. Am. J. Clin. Nutr. 1956; 4(5): 523-8.

Cremer and Bock 1977

Cremer W, Bock KD. Symptoms and course of chronic hypokalaemic nephropathy in man. Clin. Nephrol. 1977; 7: 112-9.

FDA Guidance for Industry 2005

Guidance for Industry: Estimating the Maximum Safe Starting Dose in Initial Clinical Trials for Therapeutics in Adult Healthy Volunteers. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER), 2005. Available from:

https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/estimating-maximum-safe-starting-dose-initial-clinical-trials-therapeutics-adult-healthy-volunteers

Göransson et al 2004

Göransson V, Johnsson C, Jacobson A, Heldin P, Hällgren R, Hansell P. Renal hyaluronan accumulation and hyaluronan synthase expression after ischaemia-reperfusion injury in the rat. Nephrol. Dial. Transplant 2004; 19: 823-30.

Greaves 2012

Greaves P. Endocrine glands In: Greaves P, editor. Histopathology of preclinical toxicity studies, interpretation and relevance in drug safety studies. Fourth edition. Oxford, UK: Elsevier. 2012. 725-97.

Hällgren et al 1990

Hällgren R, Gerdin B, Tufveson G. Hyaluronic acid accumulation and redistribution in rejecting rat kidney graft: relationship to the transplantationoedma. J. Exp. Med. 1990; 171: 2063-76.

Henrich et al 1977

Henrich WL, Katz FH, Molinoff PB, Schrier RW. Competitive effects of hypokalemia and volume depletion on plasma renin activity, aldosterone and catecholamine concentrations in hemodialysis patients. Kidney Int. 1977; 12: 279-84.

Johnsson et al 1996

Johnsson C, Tufveson G, Wahlberg J, Hällgren R. Experimentally-induced warm renal ischemia induces cortical accumulation of hyaluronan in the kidney. Kidney Int. 1996; 50: 1224-9.

OECD 406

OECD Guideline for testing of chemicals Number 406: Skin Sensitisation. The Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD), France, 1992. Available from:

https://www.oecd-ilibrary.org/docserver/9789264070660-en.pdf?expires=1555915695&id=id&accname=guest&checksum=DCC98591623AE7F9438359A6EABEF384

OECD 471

OECD Guideline for testing of chemicals Number 471: Bacterial Reverse Mutation Test. The Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD), France, 1997. Available from:

https://www.oecd-ilibrary.org/docserver/9789264071247-en.pdf?expires=1555915751&id=id&accname=guest&checksum=06D73CA5BA3AC0DD77541A898ACE6E11

Riemenschneider and Bohle 1983

Riemenschneider T, Bohle A. Morphologic aspects of low-potassium and low-sodium nephropathy. Clin Nephrol. 1983; 19: 271-9.

第 2 部　CTD の概要

一般名：ジルコニウムシクロケイ酸ナトリウム水和物

版番号：[redacted]

2.6.7　毒性試験概要表
ジルコニウムシクロケイ酸ナトリウム水和物

本資料に記載された情報に係る権利はアストラゼネカ株式会社に帰属します。弊社の事前の承諾なく本資料の内容を他に開示することは禁じられています。

目次

目次 2
2.6.7.1 毒性試験：一覧表 3
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 7
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 8
2.6.7.4 毒性試験：被験物質（バッチ毎）一覧 9
2.6.7.5 単回投与毒性試験 11
2.6.7.6 反復投与毒性試験：重要な試験以外の試験 12
2.6.7.7 反復投与毒性試験：重要な試験 15
2.6.7.8 In Vitro 遺伝毒性試験 30
2.6.7.9 In Vivo 遺伝毒性試験 39
2.6.7.10 がん原性試験 41
2.6.7.11 生殖発生毒性試験：重要な試験以外の試験 42
2.6.7.12 生殖発生毒性試験：受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験 43
2.6.7.13 生殖発生毒性試験：胚・胎児発生に関する試験 48
2.6.7.14 生殖発生毒性試験：出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験 51
2.6.7.15 新生児を用いた試験 56
2.6.7.16 局所刺激性試験 56
2.6.7.17 その他の毒性試験 56

2.6.7.1 毒性試験：一覧表

Type of study	Species and strain	Method of administration	Duration of dosing	Doses [a] (mg/kg)	GLP compliance	Testing facility	Study number	Location in CTD
2.6.7.5 Single-dose toxicity	Rat, Sprague-Dawley	Oral (gavage)	Single dose	2000[1]	No	[redacted], China	2009-001	4.2.3.2.1
	Dog, Beagle	Oral (gavage)	Single dose	2000[1]	No	[redacted], China	2009-002	4.2.3.2.6
2.6.7.6/7 Repeat-dose toxicity	Rat, Sprague-Dawley	Oral (gavage)	7 days	500, 1000, 2000[1,b]	No	[redacted], China	2009-001	4.2.3.2.1
	Rat, Sprague-Dawley	Oral (gavage)	7 days	2000[1,c]	No	[redacted], USA	2010-001	4.2.3.2.2
	Rat, Sprague-Dawley	Oral (gavage)	14 days	0, 400[d], 800, 1600[1,c]	Yes	[redacted], USA	[redacted]-1000	4.2.3.2.3
	Rat, Sprague-Dawley	Oral (gavage)	28 days	0, 300, 1000, 2000[c] 2000[b]	Yes	[redacted], UK	524020	4.2.3.2.4
	Rat, Sprague-Dawley	Oral (gavage)	180 days	0, 333, 1000, 2000[c]	Yes	[redacted], UK	524942	4.2.3.2.5
	Dog, Beagle	Oral (gavage)	7 days	500, 1000, 2000[1,b]	No	[redacted], China	2009-002	4.2.3.2.6

Type of study	Species and strain	Method of administration	Duration of dosing	Doses [a] (mg/kg)	GLP compliance	Testing facility	Study number	Location in CTD
	Dog, Beagle	Oral (in diet)	7 days	1300[1,c]	No	[redacted], USA	14175-10	4.2.3.2.7
	Dog, Beagle	Oral (in diet)	14 days	0, 325, 650, 1300[1,c]	Yes	[redacted], USA	14250-10	4.2.3.2.8
	Dog, Beagle (females only)	Oral (in diet)	14 days	0, 100, 600[1,c] 600+KCl[1,c] 100, 600[2,c] 100, 600[b]	No	[redacted], USA	1959-001	4.2.3.2.9
	Dog, Beagle	Oral (in diet)	28 days	0, 100, 300, 1000[c] 1000+KCl[c] 1000[b]	Yes	[redacted], USA	1959-007	4.2.3.2.10
	Dog, Beagle	Oral (in diet)	28 days	0, 100, 300, 1000[c] 1000+KCl[c]	Yes	[redacted], USA	1959-009	4.2.3.2.11
	Dog, Beagle	Oral (in diet)	270 days	0, 300, 1000, 2000[b] 2000+KCl[b]	Yes	[redacted], USA	1959-008	4.2.3.2.12
2.6.7.8/9 Genotoxicity								
Mutagenic Activity (Ames)	*Salmonella typhimurium*: TA 1535 TA 1537 TA 98 TA 100 *Escherichia coli*: WP2*uvrA*	*in vitro*	n/a	17-5000 µg/plate ±S9[1], 2.34-75% -S9, 3.13-100% +S9 of a 3-day DMSO extract of 200 mg/mL ZS-9[1]	Yes	[redacted], UK	789296	4.2.3.3.1.1

Type of study	Species and strain	Method of administration	Duration of dosing	Doses [a] (mg/kg)	GLP compliance	Testing facility	Study number	Location in CTD
Chromosomal Aberrations Assay	Chinese hamster ovary cells	*in vitro*	n/a	39-156 µg/mL -S9[1], 78-5000 µg/mL +S9[1] 0.25-1% ±S9 of a 3-day DMSO extract of 200 mg/mL ZS-9[1]	Yes	[redacted], UK	789301	4.2.3.3.1.2
Micronucleus	Rat, Sprague-Dawley	Oral (gavage)	28 days	0, 300, 1000, 2000[c] 2000[b]	Yes	[redacted], UK	524020	4.2.3.2.4
2.6.7.10 Carcinogenicity	Not applicable: studies not required for the present indication.							
2.6.7.11-14 Reproductive & development toxicity								
Male Fertility	Rat, Sprague-Dawley	Oral (gavage)	147 days	0, 333, 1000, 2000[c]	Yes	[redacted], UK	524942	4.2.3.2.5
Female Fertility & Developmental Toxicity	Rat, Sprague-Dawley	Oral (gavage)	14 days prior to mating through GD 16	0, 300, 1000, 2000[c]	Yes	[redacted], UK	496748	4.2.3.5.1.1
Pre/postnatal development	Rat, Sprague-Dawley	Oral (gavage)	GD 6 to LD 21 inclusive	0, 300, 1000, 2000[c]	Yes	[redacted], UK	496753	4.2.3.5.3.1
Rabbit Maternal Toxicity MTD	Rabbit, New Zealand White	Oral (gavage)	GD 6 to 18 inclusive	0, 1000, 2000[c] 2000[b]	Yes	[redacted], UK	496858	4.2.3.5.2.1

Type of study	Species and strain	Method of administration	Duration of dosing	Doses [a] (mg/kg)	GLP compliance	Testing facility	Study number	Location in CTD
Rabbit Embryo-fetal Development	Rabbit, (New Zealand White	Oral (gavage)	GD 6 to 18 inclusive	0, 500, 1000, <u>2000</u>[c]	Yes	[redacted], UK	496863	4.2.3.5.2.2
2.6.7.15 Studies in juvenile animals	No studies in juvenile animals were conducted on Sodium Zirconium Cyclosilicate (ZS).							
2.6.7.16 Local tolerance	No local tolerance studies were conducted on Sodium Zirconium Cyclosilicate (ZS)							
2.6.7.17 Other toxicity studies	No other toxicity studies were conducted on Sodium Zirconium Cyclosilicate (ZS).							
Dermal Toxicity	Guinea Pig, Hartley-derived albino	Topical	Once weekly for 3 weeks (Days 1, 7, and 14; Induction Phase)	100%; 0.3 g/chamber	Yes	[redacted], USA	20075345	4.2.3.7.7.1

1 unprotonated Sodium Zirconium Cyclosilicate.
2 unprotonated Sodium Zirconium Cyclosilicate, >5µm particle size.
a Unless otherwise specified, for repeat-dose toxicity studies the highest NOAEL (No Observed Adverse-Effect Level) is underlined.
b Dosed once daily.
c Dosed three times daily at 6 hour intervals.
d For females only, no NOAEL determined for males.

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

Type of Study	Test System	Method of Administration	Doses (mg/kg)	GLP Compliance	Study Number	Location in CTD
Absorption Repeat dose toxicity	Dog, Beagle	Oral (in diet)	0, 300, 1000, 2000, 2000+KCl	Yes	BS-01520	4.2.2.2.1
Distribution Repeat dose toxicity	Dog, Beagle	Oral (in diet)	0, 300, 1000, 2000, 2000+KCl	Yes	BS-01520	4.2.2.2.1
Metabolism Not Applicable: sodium zirconium cyclosilicate is an insoluble, inorganic crystalline compound that is not metabolized.						
Excretion Mass-balance	Rat, Sprague Dawley	Oral (in diet)	2000	No	ZSP-1	4.2.2.5.1

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

Species, strain (formulation)	Dose (mg/kg/day)	Weeks of Dosing	Pharmacokinetic Parameter Representing Systemic Exposure				Study Number
			Whole Blood (ng/mL)		Urine (ng/mL)[2]		
			Male	Female	Male	Female	
Dog, Beagle (Oral, in diet)	0	6	<LLOQ[1]	<LLOQ[1]			BR-01520
	2000	6	<LLOQ[1]	<LLOQ[1]			
	0	13	<LLOQ[1]	<LLOQ[1]			
	2000	13	<LLOQ[1]	<LLOQ[1]			
	0	26	<LLOQ[1]	<LLOQ[1]			
	2000	26	<LLOQ[1]	<LLOQ[1]			
	0	39	<LLOQ[1]	<LLOQ[1]	<LLOQ[1]	<LLOQ[1]	
	2000	39	<LLOQ[1]	<LLOQ[1]	<LLOQ[1]	<LLOQ[1]	

1 Lower limit of quantification is 10 ng/mL.
2 Collected directly from the bladder at terminal sacrifice.
Data presented are average values for male and female animals at terminal sacrifice and thus are considered to be at steady state after repeat oral administration.

2.6.7.4　毒性試験：被験物質（バッチ毎）一覧

2.6.7.4-1 Toxicology Batch Details

Batch number	Purity (%)	[redacted]			Study number	Type of study
		不純物B＊	不純物A＊	不純物C＊		
[redacted][1]	[redacted]				2009-001	Acute and 7-day MTD rat oral toxicity
					2009-002	Acute and 7-day MTD dog oral toxicity
[redacted][1]	[redacted]	[redacted]	[redacted]		2010-001	7-day repeat dose rat oral toxicity
					[redacted] 1000	14-day rat oral toxicity with recovery
					14250-10	14-day dog oral toxicity
					789296	Ames mutagenicity assay
					789301	Chromosomal aberration assay with CHO cells
					2009-001	14-day rat oral toxicity with recovery
					1959-001	14-day dog oral toxicity
[redacted][1]	[redacted]	[redacted]			1959-001	14-day dog oral toxicity
[redacted]	[redacted]	[redacted]			1959-001	14-day dog oral toxicity
[redacted][1]	[redacted]	[redacted]			1959-001	14-day dog oral toxicity
					14175-10	7-day dog oral toxicity
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	524020	28-day rat oral toxicity with recovery and micronucleus assessment
					1959-007	28-day dog oral toxicity with recovery
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	1959-009	28-day dog oral toxicity with recovery
[redacted]	[redacted]		[redacted]	[redacted]	524942	6-month rat oral toxicity with recovery and assessment of male fertility
[redacted]	[redacted]		[redacted]	[redacted]	1959-008	9-month dog oral toxicity with recovery
[redacted]	[redacted]		[redacted]	[redacted]	496748	Female fertility and embryo-fetal development
[redacted]	[redacted]		[redacted]	[redacted]	496753	Rat pre- and post-natal development
					496858	Rabbit embryonic fetal development: dose range finding
					496863	Rabbit embryonic fetal development - pivotal
					20075345	Dermal sensitization

1　Nonprotonated sodium zirconium cyclosilicate.

＊新薬承認情報提供時に置換えた

2.6.7.4-2 Drug Substance Heavy Metal Impurities (ppm)

Batch No.	[redacted][2]	[redacted][2]	[redacted][1]	[redacted][1]	[redacted][1]	[redacted][1]	[redacted][1]	Detection Limit[a]
KEC (mEq/g)	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]

1　sodium zirconium cyclosilicate.
2　ZS-9 (unprotonated sodium zirconium cyclosilicate).
a　Detection limit varies by lot.
nd　Not detected.
nm　Not measured.

2.6.7.5　単回投与毒性試験

Species / Strain	Method of administration (Vehicle / Formulation)	Doses (mg/kg)	Gender and number per group	Observed Maximum Non-Lethal Dose (mg/kg)	Approximate Lethal Dose (mg/kg)	Noteworthy findings	Testing Facility	Study number
Rat / Sprague-Dawley	Oral (gavage) (deionised water / suspension)	2000[1]	3M + 3F	2000	Not determined	None	[redacted], China	2009-001
Dog / Beagle	Oral (gavage) (deionised water / suspension)	2000[1]	1M + 1F	2000	Not determined	None	[redacted], China	2009-002

All single dose studies were non-GLP.
M = male, F = female.
1　unprotonated Sodium Zirconium Cyclosilicate.

2.6.7.6 反復投与毒性試験：重要な試験以外の試験

Species / Strain	Method of administration (Vehicle / Formulation)	Duration of dosing	Doses (mg/kg/day)	Gender and number per group	NOAEL[a] (mg/kg/day)	Noteworthy findings	Testing Facility	Study number
Rat / Sprague-Dawley	Oral (gavage) (deionised water / suspension)	7 days	0, 500, 1000, 2000[1]	5M + 5F	2000	None.	[redacted], China	2009-001
Rat / Sprague-Dawley	Oral (gavage) (0.5% methylcellulose / suspension)	7 days	6000[1,b]	5M + 5F	6000	Absence of body weight gain and reduction in food consumption.	[redacted], USA	2010-001
Rat / Sprague-Dawley	Oral (gavage) (0.5% methylcellulose / suspension)	14 days	1200, 2400 0, 4800[1,b]	10M + 10F 15M + 15F[c]	2400 (F) Not determined in males.	Changes in urinary sodium, potassium and ammonium concentrations, attributed to the pharmacological action of the test article. Reversible test article related microscopic findings in urinary bladder (minimal to mild mononuclear cell infiltration, mucosal hyperplasia and acute inflammation sometimes associated with minimal hemorrhage, edema and/or mineralization) in individual animals at terminal necropsy.	[redacted], USA	[redacted]-1000

Species / Strain	Method of administration (Vehicle / Formulation)	Duration of dosing	Doses (mg/kg/day)	Gender and number per group	NOAEL[a] (mg/kg/day)	Noteworthy findings	Testing Facility	Study number
Dog / Beagle	Oral (gavage) (deionised water / suspension)	7 days	0, 500, 1000, 2000[1]	2M + 2F	2000	White faeces, believed to be excreted test article.	[redacted], China	2009-002
Dog / Beagle	Oral (in diet)	7 days	3900[1,b]	2M + 2F	Not determined	Body weight loss. White faeces, believed to be excreted test article. Increases in serum sodium, chloride and calcium and urinary sodium concentrations. Decreases in urinary nitrogen and potassium concentrations.	[redacted], USA	14175-10
Dog / Beagle	Oral (in diet)	14 days	975, 1950 0, 3900[1,b]	3M + 3F 5M + 5F[d]	Not determined	White faeces, believed to be excreted test article. Observed serum chemistry changes were considered incidental and not related to administration of the test article with the possible exception of the decrease in serum potassium observed in both sexes. Increases in urinary pH and sodium, and decreases in urinary potassium and urea nitrogen concentrations, attributed to the pharmacology of the test article. Minimal to mild focal and/or multifocal inflammation observed in the kidneys; in recovery animals the inflammation was completely resolved in females and partly resolved in males.	[redacted], USA	14250-10

Species / Strain	Method of administration (Vehicle / Formulation)	Duration of dosing	Doses (mg/kg/day)	Gender and number per group	NOAEL[a] (mg/kg/day)	Noteworthy findings	Testing Facility	Study number
Dog / Beagle	Oral (in diet)	14 days	0, 300, 1800, 1800[1]+KCl[b] 300, 1800[2,b] 300, 1800[3,b]	3F	300[1,2] 1800[1]+KCl 1800[3]	Microscopic findings observed at the 600 mg/kg/dose[1,2,3] included minimal to mild mixed leukocyte infiltrates in the kidney sometimes associated with minimal to mild renal tubular regeneration. Minimal renal tubular degeneration/necrosis, minimal mixed leukocyte infiltrates in ureter and /or urethra and minimal pyelitis were also present at 600 mg/kg/dose[1,2].	[redacted], USA	1959-001

Studies [redacted]-1000 and 14250-10 contain GLP statements. Studies 2009-001, 2010-001, 2009-002, 14175-10 and 1959-001 do not claim GLP compliance.
M = male, F = female.
1 unprotonated Sodium Zirconium Cyclosilicate.
2 unprotonated Sodium Zirconium Cyclosilicate, [redacted].
3 protonated Sodium Zirconium Cyclosilicate.
a No Observed Adverse Effect Level.
b Administered in three doses at ~6h intervals over 12 hours.
c 5 animals/sex given 10 day recovery period prior to termination.
d 2 animals/sex given 10 day recovery period prior to termination.

2.6.7.7 反復投与毒性試験：重要な試験

2.6.7.7A Repeat-Dose Toxicity	**Report Title:** A 28 Day Oral (Gavage) Toxicity Study with ZS in Rats with a 14 Day Recovery Period	**Test Article: Sodium zirconium cyclosilicate**
Species / Strain: Rat / Sprague-Dawley	**Duration of dosing:** 28 days	**Study number:** 524020
Age at start of dosing: approximately 7-8 weeks	**Duration of post-dose:** 14 days	**GLP compliance:** Yes
Date of first dose: [redacted] 20[redacted]	**Method of administration:** Oral (gavage)	**Testing Facility:** [redacted], UK
Special features: None.		**Vehicle / Formulation:** Suspension in 0.5% (w/v) methylcellulose in water
No observed adverse-effect level: 2000 mg/kg/dose.		
Conclusion: administration of ZS by oral gavage 3 times each day for 28 consecutive days was well tolerated in both male and female rats at dosages of up to 6000 mg/kg/day, and was only associated with a reversible change in the electrolyte levels, sodium, potassium and chloride, in the urine. Based on these results, the no-observed-adverse-effect level (NOAEL) in male and female rats given oral doses of ZS three times a day for 28 consecutive days was considered to be 2000 mg/kg/dose (= 6000 mg/kg/day), the highest dose level tested. For ZS administered once a day for 28 consecutive days, the NOAEL was considered to be 2000 mg/kg/day, the highest dose level tested.		

Daily Dose (mg/kg)	**0 (Vehicle)**		**900 [a]**		**3000 [a]**		**6000 [a]**		**2000**	
Number of Animals **Main** **Recovery**	**M: 10** **M: 5**	**F: 10** **F: 5**	**M: 10** **M: 0**	**F: 10** **F: 0**	**M: 10** **M: 0**	**F: 10** **F: 0**	**M: 10** **M: 5**	**F: 10** **F: 5**	**M: 10** **M: 0**	**F: 10** **F: 0**
Toxicokinetics Not measured										
Noteworthy Findings										
Died or Sacrificed Moribund	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Clinical Observations [b]	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-
Urinalysis (Week 4)										
pH	8.8	7.7	8.8	7.9	8.3	7.8	8.3*	7.5	7.7***	7.0
Chloride (mmol/L)	73.0	35.9	63.4	31.0	29.0***	31.4	41.9**	18.1**	40.1**	30.0
Chloride:creatinine ratio	12.26	9.95	13.02	8.55	7.92	8.3	7.55**	5.62	6.66*	8.38
Potassium (mmol/L)	188.5	92.5	94.4**	67.7	36.9***	57.3**	32.9***	26.3***	53.6***	37.2***
Potassium:creatinine ratio	29.16	23.58	19.44**	19.71*	10.52***	13.07***	5.47***	8.33***	10.10***	10.45***
Sodium (mmol/L)	44.5	34.5	82.6*	45.9	72.4	62.3**	113.1***	61.3**	87.7*	53.5*
Sodium:creatinine ratio	7.9	9.8	17.5**	13.4	19.7***	16.3*	20.6***	18.6**	14.4*	15.4
Post-dose Evaluation: **Number Evaluated**	5	5	0	0	0	0	5	5	0	0
Noteworthy findings	-	-					-	-		

M = male, F = female.
-: No noteworthy findings, +: Mild.
* p<0.05; ** p<0.01; *** p<0.001.　Selected urinalysis data were analysed for homogeneity of variance using the 'F max' test.
a　Administered in three doses at ~6h intervals over 12 hours.
b　Light-coloured faeces, attributed to the presence of test article.

2.6.7.7B Repeat-Dose Toxicity	**Report Title:** A 26 Week Toxicity Study of ZS by Oral Administration in Rats with a 4 Week Recovery Period and Assessment of Male Fertility	**Test Article: Sodium zirconium cyclosilicate**
Species / Strain: Rat / Sprague-Dawley	**Duration of dosing:** 26 weeks	**Study number:** 524942
Age at start of dosing: 6-7 weeks	**Duration of post-dose:** 28 days	**GLP compliance:** Yes
Date of first dose: [redacted] 20[redacted]	**Method of administration:** Oral (gavage)	**Testing Facility:** [redacted], UK
Special features: An assessment of male fertility.		**Vehicle / Formulation:** Suspension in 0.5% (w/v) methylcellulose in water
No observed adverse-effect level: 6000 mg/kg/day.		
Conclusion: Sprague Dawley rats tolerated the daily oral administration of ZS for 26 weeks at up to 6000 mg/kg/day, given as three daily doses of 2000 mg/kg approximately 6 hours apart, without any adverse effects. The only findings noted were expected disturbances in electrolyte concentrations, evident both in the blood and urine, a treatment-related increase in urinary pH attributed to minor, not toxicologically meaningful increases in plasma bicarbonate levels, and a treatment related decrease in plasma glucose in males at ≥3000 mg/kg/day that was considered secondary to the changes in bicarbonate and plasma magnesium concentrations. Based on these results, the 26-week no-observed-adverse-effect level was considered to be 2000 mg/kg/dose (= 6000 mg/kg/day), the highest dosage tested.		

Daily Dose (mg/kg)	**0 (Vehicle)**		**1000 [a]**		**3000 [a]**		**6000 [a]**	
Number of Animals **Main** **Recovery**	**M: 30 [b]** **M: 10**	**F: 30 [b]** **F: 10**	**M: 30 [b]** **M: 10**	**F: 30 [b]** **F: 10**	**M: 30 [b]** **M: 10**	**F: 30 [b]** **F: 10**	**M: 30 [b]** **M: 10**	**F: 30 [b]** **F: 10**
Toxicokinetics Not measured								
Noteworthy Findings								
Unscheduled deaths	0	0	1	0	2	1	2	0
Clinical Observations	-	-	-	-	-	-	-	-
Serum Chemistry								
Week 13								
Magnesium (mmol/L)	0.82	0.86	0.83	0.86	0.81	0.86	0.78***	0.87
Potassium (mmol/L)	5.0	5.0	5.0	5.0	5.1	4.7*	4.6***	4.6
Urea (mmol/L)	5.3	6.8	5.3	6.4	5.3	6.2*	5.2	6.0**
Week 26								
Bicarbonate (mmol/L)	23.4	22.4	23.3	23.6**	24.2	23.3*	25.2***	23.3*
Chloride (mmol/L)	101	102	101	100***	100	100	100***	100
Magnesium (mmol/L)	0.80	0.87	0.73***	0.83**	0.74***	0.86	0.74***	0.83**
Potassium (mmol/L)	4.3	3.8	4.3	3.9	4.2	3.9	3.8***	3.8
Sodium (mmol/L)	144	144	142***	142***	144	143*	144	142***
Urea (mmol/L)	4.5	5.4	4.3	5.5	4.5	5.1	4.3	4.8**
Glucose (mmol/L)	11.17	9.71	10.68	8.14***	9.23***	9.87	9.16***	8.82
Urinalysis								
Week 12/13								
pH	8.0	7.5	8.5	7.5	8.5	8.0	9.0	8.0
Chloride (mmol/L)	52	48	63*	48	68***	54	80***	59
Chloride:creatinine ratio	8.18	10.02	10.51*	12.72	11.97***	14.28**	12.96***	14.12*
Creatinine (mmol/L)	6.49	5.14	6.16	4.20	6.23	4.05	6.51	4.80
Magnesium (mmol/L)	4.36	7.73	4.96	6.56	3.59	5.59*	2.87**	5.46**
Magnesium:creatinine ratio	0.711	1.575	0.854	1.735	0.647	1.602	0.505	1.199*
Phosphate (mmol/L)	13.80	19.02	9.73	13.86	14.76	16.91	19.78	19.96
Phosphate:creatinine ratio	2.355	3.797	1.832	3.603	2.445	4.042	3.177	3.978
Potassium (mmol/L)	103.5	92.0	64.4**	59.2**	40.6***	37.2***	16.2***	20.2***
Potassium:creatinine ratio	15.96	18.65	11.07**	14.87	6.80***	10.04***	2.50***	3.88***

Daily Dose (mg/kg)	**0 (Vehicle)**		**1000 [a]**		**3000 [a]**		**6000 [a]**	
Number of Animals **Main** **Recovery**	**M: 30 [b]** **M: 10**	**F: 30 [b]** **F: 10**	**M: 30 [b]** **M: 10**	**F: 30 [b]** **F: 10**	**M: 30 [b]** **M: 10**	**F: 30 [b]** **F: 10**	**M: 30 [b]** **M: 10**	**F: 30 [b]** **F: 10**
Sodium (mmol/L)	65	65	123***	87	178***	137***	249***	182***
Sodium:creatinine ratio	10.58	13.53	20.45***	22.28**	30.49***	35.07***	39.27***	40.71***
Week 26								
pH	8.0	7.0	8.5	7.5	8.5	7.5	8.5	8.0
Chloride (mmol/L)	35	40	37	35	39	52	49**	36
Chloride:creatinine ratio	5.67	10.61	6.88	11.57	10.09***	15.17	12.08***	11.16
Creatinine (mmol/L)	6.61	4.63	6.34	3.11	4.09***	3.78	4.61***	4.80
Magnesium (mmol/L)	5.71	8.27	5.82	4.60**	2.97**	5.09*	3.18*	4.39***
Magnesium:creatinine ratio	0.873	1.928	1.066	1.777	0.782	1.344*	0.664	1.089***
Potassium (mmol/L)	87.7	73.1	49.2*	39.8**	13.4***	27.8***	3.2***	14.8***
Potassium:creatinine ratio	13.49	17.20	8.54*	13.49	3.44***	7.66	0.75***	3.48***
Sodium (mmol/L)	47	49	97***	66	121***	125***	169***	140***
Sodium:creatinine ratio	7.76	12.25	16.76**	21.46**	30.05***	35.21***	38.00***	38.17***
Post-dose Evaluation: **Number Evaluated**	10	10	10	10	10	10	10	10
<u>Noteworthy findings</u>	-	-	-	-	-	-	-	-

M = male, F = female.
-: No noteworthy findings
* p<0.05; ** p<0.01; *** p<0.001. Serum chemistry and urinalysis data analysed using Dunnett's Test.
a Administered in three doses at ~6h intervals over 12 hours.
b 10 animals/sex/group were terminated on Day 91.

2.6.7.7C Repeat-Dose Toxicity	**Report Title:** A 28-Day Repeat Dose Oral Toxicity Study of ZS in Beagle Dogs with a 21-Day Recovery Period	**Test Article: Sodium zirconium cyclosilicate**
Species / Strain: Dog / Beagle	**Duration of dosing:** 28 days	**Study number:** 1959-007
Age at start of dosing: approximately 6 – 7 months	**Duration of post-dose:** 21 days	**GLP compliance:** Yes
Date of first dose: [redacted] 20[redacted]	**Method of administration:** Oral	**Testing Facility:** [redacted], USA
Special features: None.		**Vehicle / Formulation:** [redacted] dog food / mixed with diet.
No observed adverse-effect level: 900 mg/kg/day in three doses ~6h apart; 1000 mg/kg/day as a single dose; 3000 mg/kg/day in 3 doses when supplemented with potassium.		
Conclusion: Based on the results of this 28-day repeat dose study, the no-observed-adverse-effect-level (NOAEL) for ZS alone was 300 mg/kg TID or 1000 mg/kg SID and 1000 mg/kg TID for ZS supplemented with potassium.		

Daily Dose (mg/kg)	**0 (Vehicle)**		**300 [a]**		**900 [a]**		**3000 [a]**		**3000 [a] + KCl**		**1000**	
Number of Animals												
Main	**M: 3**	**F: 3**	**M: 3**	**F: 3**	**M: 3**	**F: 3**	**M: 3**	**F: 3**	**M: 3**	**F: 3**	**M: 3**	**F: 3**
Recovery	**M: 3**	**F: 3**	**M: 0**	**F: 0**	**M: 0**	**F: 0**	**M: 3**	**F: 3**	**M: 0**	**F: 0**	**M: 0**	**F: 0**
Toxicokinetics												
Not measured												
Noteworthy Findings												
Died or Sacrificed Moribund	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Clinical Observations	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Serum Chemistry												
Week 2												
Bicarbonate (mEq/L)	21.5	22.3	23.3	23.0	22.7	22.3	24.8**	25.8*	23.3	23.0	23.3	24.3
Phosphorous (mg/dL)	6.72	6.27	7.03	6.17	6.90	6.50	6.00	5.08**	6.10	6.23	7.07	6.10
Potassium (mEq/L)	4.98	4.98	5.13	4.97	5.03	5.07	4.38*	3.87**	5.17	5.03	5.23	4.80
Week 4												
Aldosterone (pg/mL)	66.3	78.8	195.7**	72.7	82.3	103.0	22.2	34.5	71.0	59.0	51.0	120.7
Bicarbonate (mEq/L)	24.8	25.5	27.7	26.7	24.0	26.0	28.2*	28.2	26.3	28.3	25.7	29.0
Phosphorous (mg/dL)	6.23	5.93	6.13	5.70	6.53	6.20	5.27*	4.77	5.90	5.40	6.50	5.70
Potassium (mEq/L)	4.78	4.78	4.87	4.67	4.97	4.93	4.37	3.68**	4.90	4.63	5.03	4.47
Urinalysis												
Week 2												
Osmolality (mosm/kg)	1468	1809	1722	1718	1702	1922	700**	648**	1249	1312*	1780	1555
pH	5.67	5.75	5.83	6.00	5.83	5.83	7.00**	7.25	6.33*	7.00**	5.83	5.67
Specific Gravity	1.042	1.053	1.049	1.050	1.049	1.060	1.021**	1.020**	1.030	1.034*	1.052	1.044
Volume (mL)	36.7	37.5	43.3	43.3	40.0	31.7	76.7	100.8**	80.0	80.0	30.0	31.7
Fractional excretion: Cl	0.997	1.193	1.307	1.113	0.970	1.127	0.973	0.815	2.583*	2.437	0.917	1.010
K	17.2	21.1	17.7	14.7*	13.3	14.75**	0.8**	0.8**	31.2*	32.6	12.3	11.9**
Na	0.34	0.45	0.59	0.71	0.52	0.67	1.29**	1.27**	1.40**	1.51**	0.81**	0.48
Week 4												
Osmolality (mosm/kg)	1305	1410	1142	1649	1067	1530	599*	423**	1238	1290	1772	1643
pH	6.17	6.17	6.67	5.83	6.17	5.83	7.25*	7.42**	6.67	7.33*	6.00	6.17
Specific Gravity	1.037	1.041	1.032	1.045	1.031	1.042	1.017*	1.013**	1.028	1.030	1.053	1.042
Volume (mL)	67.5	51.7	36.7	58.3	88.3	73.3	107.5	171.7**	93.3	80.0	35.0	38.3
Fractional excretion: Cl	0.912	1.105	0.733	1.160	1.173	1.237	1.035	0.960	2.880*	2.177	1.060	0.883

Daily Dose (mg/kg)	**0 (Vehicle)**		**300 [a]**		**900 [a]**		**3000 [a]**		**3000 [a] + KCl**		**1000**	
Number of Animals **Main** **Recovery**	**M: 3** **M: 3**	**F: 3** **F: 3**	**M: 3** **M: 0**	**F: 3** **F: 0**	**M: 3** **M: 0**	**F: 3** **F: 0**	**M: 3** **M: 3**	**F: 3** **F: 3**	**M: 3** **M: 0**	**F: 3** **F: 0**	**M: 3** **M: 0**	**F: 3** **F: 0**
Fractional excretion: K Fractional excretion: Na	16.1 0.39	19.0 0.52	12.2 0.46	14.9 0.68	16.0 0.71**	15.18 0.83	0.8** 1.38**	1.0[#] 1.39**	30.2* 1.69**	29.0 1.43**	11.6* 0.87**	12.5** 0.54
Histopathology Number examined	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
Adrenal glands Degeneration, cystic, zona glomerulosa Minimal	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0
Vacuolation, increased lipid, zona glomerulosa Minimal Mild	0 0	0 0	1 0	0 0	2 0	2 0	2 1	0 1	3 0	2 0	2 0	1 0
Kidneys Inflammation, tubulointerstitial Mild	0	0	0	0	0	0	3	3	0	0	0	0
Post-dose Evaluation: **Number Evaluated**	3	3	0	0	0	0	3	3	0	0	0	0
<u>Noteworthy findings</u>	-	-					-	-				

M = male, F = female.
-: No noteworthy findings
* p<0.05; ** p<0.001.　Serum chemistry data analysed using Levene's/ANOVA-Dunnet's/Welch Test, urinalysis data using rank transformation with Dunnett's Test.
#　No statistics performed due to lack of variability or sample size.
a　Administered in three doses at ~6h intervals over 12 hours.

2.6.7.7D Repeat-Dose Toxicity	**Report Title:** A 28-Day Repeat Dose Oral Toxicity Study of ZS in Female Beagle Dogs with a 21-Day Recovery Period	**Test Article: Sodium zirconium cyclosilicate**
Species / Strain: Dog / Beagle	**Duration of dosing:** 28 days	**Study number:** 1959-009
Age at start of dosing: approximately 5 months	**Duration of post-dose:** 21 days	**GLP compliance:** Yes
Date of first dose: [redacted] 20[redacted]	**Method of administration:** Oral	**Testing Facility:** [redacted], USA
Special features: None.		**Vehicle / Formulation:** [redacted] dog food / mixed with diet.
No observed adverse-effect level: 3000 mg/kg/day.		
Conclusion: Dogs tolerated administration of both vehicle ([redacted] dog food) and ZS Lot [redacted] mixed with vehicle at dose levels of 0, 100, 300, or 1000 mg/kg three times daily (TID) at 6-hour intervals over a 12-hour period for 28 consecutive days. Administration of vehicle alone resulted in a progressive increase in the renal fractional excretion of potassium (FE:K), which was reversible when dosing stopped. The only effect of ZS Lot [redacted] was to reduce the magnitude of the vehicle-related increase in FE:K at 100 or 300 mg/kg TID and to completely prevent the vehicle-related increase in FE:K at 1000 mg/kg TID. Based on these results, the no-observed-adverse-effect-level (NOAEL) for ZS Lot [redacted] was 1000 mg/kg TID. [redacted] can be considered qualified as safe at the levels at which they are present.		

Daily Dose (mg/kg)	**0 (Vehicle)**	**300 [a]**	**900 [a]**	**3000 [a]**	**3000 [a] + KCl**
Number of Animals **Main** **Recovery**	 **F: 3** **F: 3**	 **F: 3** **F: 0**	 **F: 3** **F: 0**	 **F: 3** **F: 3**	 **F: 3** **F: 0**
Toxicokinetics Not measured					
Noteworthy Findings					
Died or Sacrificed Moribund	0	0	0	0	0
Clinical Observations	-	-	-	-	-
Urinalysis Fractional excretion: K Pretest Week 2 Week 4	 9.0 12.6 15.9	 9.4 8.2 12.7	 9.6 9.5 11.0*	 9.0 4.9** 8.155**	 9.8 31.0* 37.233
Post-dose Evaluation: **Number Evaluated**	 3	 0	 0	 3	 0
Noteworthy findings	-			-	

F = female.
-: No noteworthy findings
* p<0.05; ** p<0.01.　Serum chemistry data analysed using using Levene's/ANOVA-Dunnet's/Welch Test.
a　Administered in three doses at ~6h intervals over 12 hours.

2.6.7.7E Repeat-Dose Toxicity	**Report Title:** A 39-Week Oral Toxicity Dietary Study with ZS (Sodium zirconium cyclosilicate) in Dogs with a 28-Day Recovery Period	**Test Article: Sodium zirconium cyclosilicate**
Species / Strain: Dog / Beagle	**Duration of dosing:** 39 weeks	**Study number:** 1959-008
Age at start of dosing: approximately 5 – 6 months	**Duration of post-dose:** 28 days	**GLP compliance:** Yes
Date of first dose: [redacted] 20[redacted]	**Method of administration:** Oral	**Testing Facility:** [redacted], USA
Special features: None.		**Vehicle / Formulation:** [redacted] dog food / mixed with diet.

No observed adverse-effect levels:
Week 13: 1000 mg/kg/day in males and 2000 mg/kg/day in females for ZS alone and 2000 mg/kg/day in both sexes when supplemented with potassium.
Week 39: 1000 mg/kg/day.

Conclusion: Dogs tolerated daily administration of ZS for 39 weeks at doses up to 2000 mg/kg/day, although dosing had to be suspended occasionally at the 2000 mg/kg/day dose for a day or two in several dogs due to hypokalemia, which is consistent with the expected pharmacology of the compound. Dose dependent, ZS-related findings included marked decreases in urinary potassium excretion and minimal to mild decreases in serum potassium and aldosterone concentrations; mild increases in urine output, pH, and sodium excretion; and minimal transient increases in serum HCO3 and tCO2 in males and minimal increases in the urinary phosphorous creatinine ratio in both sexes at the 2000 mg/kg/day dose.

ZS-related microscopic findings occurred only at 2000 mg/kg/day and included mild intracytoplasmic lipid vacuolation in cells of the zona glomerulosa of the adrenal glands and multifocal areas in the medulla and cortex of the kidneys with a spectrum of tubular and interstitial degenerative and inflammatory changes. These findings were consistent with prolonged potassium depletion and correlated with the hypokalemia observed in the affected animals. The incidence and grade of renal tubulointerstitial inflammation was similar after 13 or 39 weeks of administration, but there were additional renal changes (increased interstitial matrix and interstitial fibrosis) after 39 weeks of administration. At both time points renal changes were less common and less pronounced in the kidneys of dogs supplemented with potassium.

Based on these results, the 13 week no-observed-adverse-effect-level (NOAEL) was 1000 mg/kg/day in males and 2000 mg/kg/day in females for ZS alone and 2000 mg/kg/day in both sexes when animals were supplemented with potassium. The 39 week NOAEL for ZS in dogs was 1000 mg/kg/day in both sexes. These NOAELs were defined by clinically significant hypokalemia and associated degenerative and inflammatory changes in the kidneys. Potassium supplementation helped reduce the incidence and/or magnitude of hypokalemia and its associated renal effects.

Daily Dose (mg/kg)	**0 (Vehicle)**		**300**		**1000**		**2000**		**2000 + KCl**	
Number of Animals **Main** **Recovery**	**M: 7 [a]** **M: 3**	**F: 7 [a]** **F: 3**	**M: 7 [a]** **M: 0**	**F: 7 [a]** **F: 0**	**M: 7 [a]** **M: 0**	**F: 7 [a]** **F: 0**	**M: 7 [a]** **M: 3**	**F: 7 [a]** **F: 3**	**M: 7 [a]** **M: 0**	**F: 7 [a]** **F: 0**
Toxicokinetics: Not measured										
Noteworthy Findings										
Died or Sacrificed Moribund	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Body Weight (%) [b]	(kg)									
Week 13	8.43	7.25	+7	+2	+4	+15	+0	+3	+9	+22*
Week 39	9.73	7.97	+2	+7	-3	+28*	-5	-5	+11	+21
Clinical Observations [c]	-	-	-	+	-	-	+	++	-	-
Blood Gas Evaluation										
Week 13										
Actual HCO_3 (mmol/L)	22.13	21.15	22.84	22.60	24.06	23.30	22.65	24.28**	22.49	22.34
Total CO_2 (mmol/L)	23.37	22.29	24.07	23.74	25.33	24.53	23.85	25.59**	23.70	23.54
Week 39										
Actual HCO_3 (mmol/L)	21.41	21.71	21.53	21.25	23.63	24.93*	23.94	22.57	21.40	23.83
Total CO_2 (mmol/L)	22.54	22.89	22.63	22.35	24.83	26.18*	25.14	23.76	22.58	25.10
Serum Chemistry										
Week 13										
Aldosterone (pg/mL)	46.877	46.421	47.704	47.720	40.979	57.211	35.272	27.309 [d]	43.046	38.759
Potassium (mEq/L)	4.51	4.42	4.49	4.66	4.66	4.43	4.06*	4.07	4.70	4.61
Week 39										
Aldosterone (pg/mL)	39.461	50.400	60.783	57.360	48.973	70.880	28.794	36.833	55.520	83.580
Potassium (mEq/L)	4.29	4.34	4.33	4.33	4.45	4.73	4.03	4.07	4.63	4.60
Urinalysis										
Week 13										
pH	6.00	6.15	6.00	6.29	6.57*	6.50	7.20**	6.90**	6.57	6.57
Volume (mL)	67.5	70.0	100.7	101.4	52.9	80.0	141.2	136.0*	90.0	115.7
Fractional excretion: K	10.141	11.487	6.134*	6.694**	2.246**	4.780**	1.026**	2.523**	8.039	9.153
Na	0.350	0.268	0.284	0.394	0.436	0.703**	0.781**	0.815**	1.336**	1.503**
Week 39										
pH	7.29	7.29	6.88	7.50	6.88	7.63	7.57	7.36	7.13	7.38
Volume (mL)	99.3	71.4	57.5	77.5	80.5	128.8	136.4	138.6	180.0	133.8
Calcium (mg/8 h)	1.41	1.69	1.43	1.23	3.30	4.87*	4.94	7.90**	7.20	7.83*
Fractional excretion: K	9.193	9.829	6.988	7.738	3.395**	4.183*	1.383**	1.468**	8.908	8.180

Daily Dose (mg/kg)	**0 (Vehicle)**		**300**		**1000**		**2000**		**2000 + KCl**	
Number of Animals **Main** **Recovery**	**M: 7 [a]** **M: 3**	**F: 7 [a]** **F: 3**	**M: 7 [a]** **M: 0**	**F: 7 [a]** **F: 0**	**M: 7 [a]** **M: 0**	**F: 7 [a]** **F: 0**	**M: 7 [a]** **M: 3**	**F: 7 [a]** **F: 3**	**M: 7 [a]** **M: 0**	**F: 7 [a]** **F: 0**
Fractional excretion: Na Phosphorous/Creatinine Ratio	0.483 0.66	0.357 0.96	0.463 0.93	0.488 0.93	0.723 0.95	0.690* 1.05	1.030** 1.24*	0.827** 1.64*	1.438** 1.15	1.390** 1.00
Organ Weights (%) [b,e] (Week 39) Kidneys Pituitary gland	(g) 46.881 0.055	 36.340 0.048	 -5 +7	 +3 +23	 -2 +18	 +8 +52	 +18 +18	 +1 +27	 +5 +25	 +7 +38
Gross Pathology (Week 39) Number examined	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
Kidneys Irregular surface Moderate	 0	 0	 0	 0	 0	 0	 1	 0	 0	 0
Histopathology (Week 13) Number examined	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
Adrenal glands Vacuolation, increased lipid, zona glomerulosa Mild	 0	 0	 0	 0	 0	 0	 3	 0	 0	 0
Kidneys Inflammation, tubulointerstistial, bilateral Minimal Mild	 0 0	 0 0	 0 0	 0 0	 0 0	 0 0	 1 2	 0 0	 0 0	 0 0
Histopathology (Week 39) Number examined	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
Adrenal glands Atrophy, bilateral, zona glomerulosa Mild Vacuolation, cortical, increased, bilateral Minimal	 0 0	 0 0	 0 1	 0 0	 1 2	 0 0	 1 0	 2 2	 0 0	 0 0

Daily Dose (mg/kg)	**0 (Vehicle)**		**300**		**1000**		**2000**		**2000 + KCl**	
Number of Animals **Main** **Recovery**	**M: 7 [a]** **M: 3**	**F: 7 [a]** **F: 3**	**M: 7 [a]** **M: 0**	**F: 7 [a]** **F: 0**	**M: 7 [a]** **M: 0**	**F: 7 [a]** **F: 0**	**M: 7 [a]** **M: 3**	**F: 7 [a]** **F: 3**	**M: 7 [a]** **M: 0**	**F: 7 [a]** **F: 0**
Vacuolation, increased lipid, bilateral										
Minimal	0	0	2	0	0	0	1	2	1	0
Mild	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0
Kidneys										
Fibrosis, interstitial, medulla, bilateral										
Mild	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
Fibrosis, interstitial, medulla, unilateral										
Minimal	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
Inflammation, tubulointerstistial, bilateral										
Minimal	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
Mild	0	0	0	0	0	0	1	2	1	0
Moderate	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
Increased interstitial matrix, medulla, bilateral										
Mild	0	0	0	0	0	0	3	4	0	0
Post-dose Evaluation: **Number Evaluated**	3	3	0	0	0	0	3	3	0	0
<u>Noteworthy findings</u> **Histopathology** **Kidneys**										
Fibrosis, interstitial, medulla, unilateral										
Minimal	0	0					1	0		
Mild	0	0					0	2		
Inflammation, tubulointerstistial, bilateral										
Minimal	0	0					1	0		
Mild	0	0					0	1		

Daily Dose (mg/kg)	**0 (Vehicle)**		**300**		**1000**		**2000**		**2000 + KCl**	
Number of Animals **Main** **Recovery**	**M: 7 [a]** **M: 3**	**F: 7 [a]** **F: 3**	**M: 7 [a]** **M: 0**	**F: 7 [a]** **F: 0**	**M: 7 [a]** **M: 0**	**F: 7 [a]** **F: 0**	**M: 7 [a]** **M: 3**	**F: 7 [a]** **F: 3**	**M: 7 [a]** **M: 0**	**F: 7 [a]** **F: 0**
Increased interstitial matrix, medulla, bilateral Mild	0	0					0	1		

M = male, F = female.
-: No noteworthy findings, +: Mild, ++: Moderate.
* $p<0.05$; ** $p<0.01$. Serum chemistry and organ weight data analysed using Levene's/ANOVA-Dunnet's/Welch Test, urinalysis data using rank transformation with Dunnett's Test.

a 3 animals/sex/group were terminated after 13 weeks.

b For controls, group means are shown, for treated groups, percent differences from controls are shown. Statistical significance is based on actual data (not on the percent differences). All percent difference values are rounded to the nearest whole number.

c Findings, observed infrequently and only between Weeks 17 and 31 in animals receiving 2000 mg/kg/day without KCl, included decreased activity, inappetence, impaired limb function, ataxia and rigid body, which were attributed to the ZS-induced hypokalemia which is consistent with the expected pharmacology of the compound. The clinical findings resolved in each case following a 1-2-day drug holiday.

d Calculation includes one or more individual values out of linear range.

e Both absolute and relative weights differed from controls in the direction indicated. Displayed figures are for the absolute organ weight effects.

2.6.7.8 In Vitro 遺伝毒性試験

<table>
<tr><td colspan="2">2.6.7.8A Genotoxicity: in vitro</td><td>Report Title: ZS-9: Testing for Mutagenic Activity with Salmonella typhimurium TA 1535, TA 100 TA 1537and TA 98 and Escherichia coli WP2uvrA</td><td>Test Article: Sodium zirconium cyclosilicate</td></tr>
<tr><td colspan="2">Test for induction of: Reverse mutation in bacterial cells.</td><td>Number of independent assays: 2</td><td>Study number: 789296</td></tr>
<tr><td colspan="2">Strains:
Salmonella typhimurium TA 1535, TA 1537, TA 98, TA 100 and Escherichia coli WP2uvrA</td><td>Number of replicate cultures: 3</td><td>GLP compliance: Yes</td></tr>
<tr><td colspan="2">Metabolizing system: Aroclor 1254 induced rat liver S9, 10%</td><td>Number of cells analysed/culture: Not applicable</td><td>Testing Facility: [redacted], UK</td></tr>
<tr><td>Vehicles:</td><td>For Test Article:
Assay 1: Aqueous suspension
Assay 2: DMSO extract [1]</td><td colspan="2">For positive controls: e.g.:DMSO (9-aminoacridine, 2-aminoanthracene, N-ethyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine, 2-nitrofluorene) and water (sodium azide)</td></tr>
<tr><td colspan="3">Treatment:
Assay 1 (-/+S9): plate incorporation; 37°C for 3 days.
Assay 2 (-/+S9): 20 minute pre-incubation; 37°C for 3 days.</td><td>Date of treatment:
Assay 1: [redacted] 20[redacted]
Assay 2: [redacted] 20[redacted]</td></tr>
<tr><td colspan="4">Cytotoxic effects: Assay 1: none. Assay 2: toxic in the absence of S9 mix at 37.5% to 75% of 100 µL of the undiluted extract per plate.</td></tr>
<tr><td colspan="4">Genotoxic effects: None.</td></tr>
</table>

1 A suspension of unprotonated sodium zirconium cyclosilicate in dimethylsulphoxide (200 mg/mL) was incubated at 37ºC, with shaking, in an incubator for 3 days before testing. The suspension was then centrifuged at ~ 190 g for 5 min and the supernatant (eluate) removed. The total volume of dimethylsulphoxide eluate in the culture medium was limited to 1% (v/v).

Metabolic activation	Test Article	Concentration (μg/plate)	Assay 1: Mean revertant colony counts (SD)				
			TA1535	TA1537	TA98	TA100	WP2*uvrA*
Without activation	Water	100 μL/plate	13 ± 6	9 ± 6	20 ± 7	82 ± 10	8 ± 3
	ZS-9	17 P	14 ± 5	8 ± 2	24 ± 6	86 ± 4	9 ± 2
		50 P	15 ± 2	7 ± 7	22 ± 10	73 ± 7	11 ± 4
		167 P	10 ± 0	12 ± 1	20 ± 5	90 ± 6	10 ± 2
		500 P	9 ± 4	6 ± 2	22 ± 4	77 ± 15	7 ± 4
		1667 P	9 ± 2	5 ± 0	13 ± 2	68 ± 7	8 ± 1
		5000 P	12 ± 4	5 ± 2	11 ± 2	70 ± 12	4 ± 2
	Sodium azide	1	437 ± 54			1050 ± 46	
	9-Aminoacridine	80		5666 ± 664			
	2-Nitrofluorene	1			807 ± 43		
	N-Ethyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine	2					244 ± 30

No statistical analysis was conducted.
P　Precipitate.

Metabolic activation	Test Article	Concentration (μg/plate)	Assay 1: Mean revertant colony counts (SD)				
			TA1535	TA1537	TA98	TA100	WP2*uvrA*
With activation	Water	100 μL/plate	15 ± 2	9 ± 4	33 ± 5	93 ± 1	5 ± 2
	ZS-9	17 P	12 ± 2	7 ± 4	28 ± 7	96 ± 6	7 ± 3
		50 P	10 ± 4	11 ± 1	36 ± 11	102 ± 18	5 ± 1
		167 P	12 ± 3	10 ± 4	37 ± 7	104 ± 21	3 ± 2
		500 P	11 ± 2	8 ± 5	30 ± 8	110 ± 6	6 ± 1
		1667 P	11 ± 2	7 ± 3	28 ± 8	103 ± 12	8 ± 4
		5000 P	10 ± 2	6 ± 2	21 ± 6	91 ± 5	5 ± 2
	2-Aminoanthracene	0.5			551 ± 53	782 ± 44	
		2	639 ± 36	269 ± 14			
		20					631 ± 38

No statistical analysis was conducted.
P　Precipitate.

Metabolic activation	Test Article	Concentration (%) [1]	Assay 2: Mean revertant colony counts (SD)				
			TA1535	TA1537	TA98	TA100	WP2*uvrA*
Without activation	DMSO	100 µL/plate	15 ± 3	16 ± 2	23 ± 2	87 ± 8	7 ± 6
	ZS-9 DMSO Extract	2.34	16 ± 4	13 ± 5	28 ± 5	78 ± 15	5 ± 4
		4.69	19 ± 2	10 ± 7	22 ± 5	93 ± 5	7 ± 4
		9.38	21 ± 4	8 ± 2	19 ± 6	92 ± 2	6 ± 2
		18.75	13 ± 2	8 ± 2	22 ± 9	70 ± 8	6 ± 1
		37.5	19 ± 3	4 ± 2 ST	22 ± 5	21 ± 3 TL	9 ± 4 ST
		75	19 ± 4 ST	NC VT	13 ± 8 ST	NC VT	5 ± 2 VT
	Sodium azide	1	518 ± 16			1134 ± 20	
	9-Aminoacridine	80		4374 ± 607			
	2-Nitrofluorene	1			867 ± 81		
	N-Ethyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine	2					443 ± 48

No statistical analysis was conducted.
1　Based on a 100% dose being represented by 100 µL of undiluted extract.
NC　Not counted due to resistant colonies (where a small number of bacteria are resistant to the toxic effects of the test item, the microcolonies that develop from the survivors may become much larger than normal, due to the rate-limiting amino acids and other essential nutrients being passively divided among fewer and fewer bacteria as the dose becomes more and more toxic.　When these non-mutant colonies grow to a size that makes them difficult to distinguish from mutant colonies, no attempt is made to assess the number of mutant colonies).
ST　Slightly thin lawn.
TL　Thin lawn.
VT　Very thin lawn.

Metabolic activation	Test Article	Concentration (%) [1]	Assay 2: Mean revertant colony counts (SD)				
			TA1535	TA1537	TA98	TA100	WP2*uvrA*
With activation	DMSO	100 µL/plate	9 ± 3	23 ± 1	37 ± 9	97 ± 23	5 ± 1
	ZS-9 DMSO Extract	3.13	16 ± 1	16 ± 5	41 ± 2	95 ± 2	5 ± 3
		6.25	16 ± 4	18 ± 3	46 ± 14	99 ± 5	9 ± 2
		12.5	16 ± 1	18 ± 2	33 ± 14	97 ± 2	7 ± 5
		25	16 ± 3	18 ± 2	31 ± 6	109 ± 10	6 ± 2
		50	14 ± 2	18 ± 2	38 ± 4	84 ± 6	6 ± 2
		100	16 ± 1	20 ± 7	50 ± 9	86 ± 13	6 ± 4
	2-Aminoanthracene	0.5 µg			489 ± 25	772 ± 68	
		2 µg	479 ± 46	284 ± 41			
		20 g					508 ± 55

No statistical analysis was conducted.
1 Based on the 100% dose being 100 µL of undiluted extract.

<table>
<tr><td colspan="2">2.6.7.8B Genotoxicity: in vitro</td><td>Report Title: ZS-9: Chromosomal Aberrations Assay with Chinese Hamster Ovary Cell Cultures In Vitro</td><td>Test Article: Sodium zirconium cyclosilicate</td></tr>
<tr><td colspan="2">Test for induction of: Chromosome aberrations.</td><td>Number of independent assays: e.g.:2</td><td>Study number: 789301</td></tr>
<tr><td colspan="2">Strains: Chinese Hamster Ovary cells (CHO)</td><td>Number of replicate cultures:
2 for Test Article and vehicle
1 for positive controls</td><td>GLP compliance: Yes</td></tr>
<tr><td colspan="2">Metabolizing system: Aroclor 1254 induced rat liver S9, 10%</td><td>Number of cells analysed/culture:
100 (300 for polyploidy phase of Assay 2)</td><td>Testing Facility: [redacted], UK</td></tr>
<tr><td>Vehicles:</td><td>For Test Article:
Assay 1: Ham's F-10 (suspension)
Assay 2: DMSO extract [1]</td><td colspan="2">For positive controls: Ham's F-10/DMSO</td></tr>
<tr><td colspan="3">Treatment: Continuous treatment for 22 hours in the absence of S9 or 6 hours in the presence of S9. Cultures harvested 24 hours (Assays 1 and 2) or 48 hours (Assay 2) post treatment.</td><td>Date of treatment:
Assay 1: [redacted] 20[redacted]
Assay 2: [redacted] 20[redacted]</td></tr>
<tr><td colspan="4">Cytotoxic effects: Assay 1: None +S9, dose related decreases in cell counts at ZS-9 concentrations ≥ 156 µg/mL -S9. Assay 2: None.</td></tr>
<tr><td colspan="4">Genotoxic effects: None.</td></tr>
</table>

1 A suspension of unprotonated sodium zirconium cyclosilicate in dimethylsulphoxide (200 mg/mL) was incubated at 37ºC, with shaking, in an incubator for 3 days before testing. The suspension was then centrifuged at ~ 190 g for 5 min and the supernatant (eluate) removed. The total volume of dimethylsulphoxide eluate in the culture medium was limited to 1% (v/v).

Metabolic activation	Test Article	Concentration (µg/mL)	Assay 1 (24 hour harvest)			
			Cytotoxicity (% of control)	Aberrant cells Mean % [a]	Aberrations/cell [a]	Total Polyploid cells (% of Cells)
Without activation	Ham's F-10 medium	10 µL/mL	100	0.0	0.00	0.0
	ZS-9	39	100	0.5	0.01	0.0
		78	97	0.0	0.00	0.5
		156	51	0.0	0.01	0.0
	Methyl methanesulphonate	20	ND	5.0	0.10	0.0
		30	ND	17.0	0.28	0.0
With activation	Ham's F-10 medium	10 µL/mL	100	0.0	0.01	0.5
	ZS-9	78	83	0.0	0.01	1.0
		1250	84	0.0	0.00	0.0
		2500	91	0.0	0.00	0.0
		5000	63	0.5	0.01	0.5
	Cyclophosphamide	30	ND	6.0	0.11	0.0
		40	ND	7.0	0.10	0.0

No statistical analysis was conducted.
a　Excluding gaps.
ND　Not determined.

Metabolic activation	Test Article	Concentration (%)	Assay 2 (24 hour harvest)			
			Cytotoxicity (% of control)	Aberrant cells Mean % [a]	Aberrations/cell [a]	Total Polyploid cells (% of Cells)
Without activation	Ham's F-10 medium	10 μL/mL	100	0.0	0.00	0.0
	ZS-9 DMSO extract	0.25	80	0.0	0.01	0.0
		0.5	89	0.0	0.01	0.0
		1	88	0.0	0.00	0.0
	Methyl methanesulphonate	20 μg/mL	ND	2.0	0.06	0.0
		30 μg/mL	ND	14.0	0.24	0.0
With activation	Ham's F-10 medium	10 μL/mL	100	0.5	0.01	2.0
	ZS-9 DMSO extract	0.25	97	0.0	0.00	3.0
		0.5	118	0.0	0.01	4.0
		1.0	119	0.5	0.01	2.5
	Cyclophosphamide	30 μg/mL	ND	4.0	0.08	0.0
		40 μg/mL	ND	9.0	0.12	0.0

No statistical analysis was conducted.
a　Excluding gaps.
ND　Not determined.

Metabolic activation	Test Article	Concentration (%)	Assay 2 (48 hour harvest)			
			Cytotoxicity (% of control)	Aberrant cells Mean % [a]	Aberrations/cell [a]	Total Polyploid cells (% of Cells)
Without activation	DMSO	10 µL/mL	100	0.0	0.00	0.0
	ZS-9 DMSO extract	0.25	86	0.0	0.00	0.0
		0.5	74	0.0	0.00	0.0
		1.0	75	0.0	0.00	0.0
	Methyl methanesulphonate	20 µg/mL	ND	9.0	0.18	0.0
		30 µg/mL	ND	40.0	1.02	0.0

No statistical analysis was conducted.
a　Excluding gaps.
ND　Not determined.

Assay 2 (24 hour harvest) Polyploidy Data						
With activation	DMSO	10 µL/mL				1.15
	ZS-9 DMSO extract	0.25				2.12
		0.5				1.64
		1.0				2.44
Assay 2 (48 hour harvest) Polyploidy Data						
With activation	DMSO	10 µL/mL				0.00
	ZS-9 DMSO extract	0.25				0.17
		0.5				0.66
		1.0				1.66

2.6.7.9　In Vivo 遺伝毒性試験

2.6.7.9 Genotoxicity: *in vivo*	**Report Title:** A 28 Day Oral (Gavage) Toxicity Study with ZS in Rats with a 14 Day Recovery Period	**Test Article: Sodium zirconium cyclosilicate**
Test for induction of: Bone-marrow micronuclei (MN)	**Treatment schedule:** 28 days (as three doses at ~6h intervals over 12 hours)	**Study number:** 524020
Species / Strain: Rat / Sprague Dawley	**Sampling times:** 28 days after the first dose	**GLP compliance:** Yes
Age at sampling: 11 – 12 weeks	**Method of administration:** Oral (gavage)	**Testing Facility:** [redacted], UK
Cells evaluated: Polychromatic erythrocytes (PCEs)	**Vehicle / Formulation:** Suspension in 0.5% (w/v) methylcellulose in water	**Date of dosing:** [redacted] 20[redacted] – [redacted] 20[redacted]
Number of cells analysed/animal: 2000		
Special features: None.		
Toxic/cytotoxic effects: No observed suppression of PCE/NCE ratio in the micronucleus test.		
Genotoxic effects: None.		
Evidence of exposure: None**;** drug is non-absorbed.		

Test Article	Dose (mg/kg/day)	Number of Animals	Number of MNE	Number of PCE Analysed	% (MN-PCE)	PCE/NCE Ratio (Mean ± SD)
Vehicle	10 mL/kg/dose [a]	5M	2	10007	0.00	0.81 ± 0.05
		5F	0	10007	0.04	0.83 ± 0.10
ZS	900 [a]	5M	5	10002	0.03	0.82 ± 0.08
		5F	0	10005	0.03	0.89 ± 0.11
	3000 [a]	5M	2	10003	0.00	0.79 ± 0.14
		5F	2	10002	0.06	0.78 ± 0.14
	6000 [a]	5M	2	10005	0.02	0.79 ± 0.05
		5F	3	10007	0.02	0.89 ± 0.08
	2000	5M	1	10006	0.02	0.87 ± 0.05
		5F	2	10002	0.05	0.82 ± 0.13
Cyclophosphamide	50	3M	12	6004	2.17	0.53 ± 0.09

M = male, F = female.
MNE　Micronucleated Normochromatic Erythrocytes.
PCE　Polychromatic Erythrocytes.
MN-PC　Micronucleated Polychromatic Erythrocytes.
MNE　Micronucleated Normochromatic Erythrocytes.
No statistical analysis was conducted (no increase in MN-PCE > 10% of max. historical negative control range).
a　Administered in three doses at ~6h intervals over 12 hours.

2.6.7.10　　がん原性試験

該当なし

2.6.7.11　生殖発生毒性試験：重要な試験以外の試験

Species / Strain	Method of administration (Vehicle / Formulation)	Dosing period	Doses (mg/kg)	Number per group	Noteworthy findings	Testing Facility	Study number
Rabbit / New Zealand White	Oral (gavage) (0.5% methylcellulose / suspension)	13 days	6000 [a]	3F (non-pregnant)	Light colored faeces. No effect on body weight, food consumption or plasma sodium, potassium or chloride.	[redacted], UK	496858
		GD 6 to GD 18	0, 3000, 6000 [a] 2000	3F (pregnant)	No effect on clinical signs, body weight, food consumption, plasma electrolytes or pregnancy performance (number corpora lutea graviditatis, fetal mortality or fetal weight).		

Study 496858 does not claim GLP compliance.
F = female.
a　Administered in three doses at ~6h intervals over 12 hours.

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

2.6.7.12A Reproductive and Developmental Toxicity – Male Fertility	**Report Title:** A 26 Week Toxicity Study of ZS by Oral Administration in Rats with a 4 Week Recovery Period and Assessment of Male Fertility	**Test Article: Sodium zirconium cyclosilicate**
Design similar to ICH 4.1.1? Yes (for males)	**Duration of dosing:** 26 weeks (males housed with untreated females from Days 147 to 153 inclusive)	**Study number:** 524942
Species / Strain: Rat / Sprague Dawley	**Day of mating:** Day 0 (females)	**GLP compliance:** Yes
Initial age: approximately 6 weeks at start of dosing	**Day of C-section:** Days 14 to 16	**Testing Facility:** [redacted], UK
Date of first dose: [redacted] 20[redacted]	**Method of administration:** e.g.:Oral (gavage)	
Special features: Sperm analysis	**Vehicle / Formulation:** Suspension in water containing 0.5% w/v methylcellulose	
No Observed Adverse-Effect Level: **F_0 Males:** **F_0 Females / F_1 Litters:**	 6000 mg/kg/day Not evaluated	

Conclusion: Sprague Dawley rats tolerated the daily oral administration of ZS for 26 weeks at up to 6000 mg/kg/day, given as three daily doses of 2000 mg/kg approximately 6 hours apart, without any adverse effects. The only findings noted were expected disturbances in electrolyte concentrations, evident both in the blood and urine, a treatment-related increase in urinary pH attributed to minor, not toxicologically meaningful increases in plasma bicarbonate levels, and a treatment related decrease in plasma glucose in males at ≥3000 mg/kg/day that was considered secondary to the changes in bicarbonate and plasma magnesium concentrations. Based on these results, the 26-week no-observed-adverse-effect level was considered to be 2000 mg/kg/dose (= 6000 mg/kg/day), the highest dosage tested.

The pregnancy performance of the untreated females, including total corpora lutea graviditatis, total number of implants, and total live implants, showed no apparent adverse effects caused by the treatment of male rats with sodium zirconium cyclosilicate. The incidence of sperm abnormalities was 0.6% and 0.2% for male rats in the vehicle control and sodium zirconium cyclosilicate high dose groups, respectively, indicating no adverse effect on sperm after 26 weeks of dosing with sodium zirconium cyclosilicate.

Daily dose (mg/kg)	**0 (Vehicle)**	**900** [a]	**3000** [a]	**6000** [a]
Males				
Toxicokinetics: Not measured				
Number evaluated	40	40	40	40
Number died or sacrificed moribund	0	1	2	2
Clinical observations	-	-	-	-
Necropsy observations	-	-	-	-
Body weight (%) [b] Day 148	(g) 642	 -4.2	 +3.7	 +1.4
Food consumption (%) [b] Week 22	(g/animal/day) 27.8	 +1.4	 +6.4	 +9.0
Mean pre-coital interval	2.6	2.1	2.3	2.5
Number of males that mated	15	15	15	15
Number (%) of fertile males	13 (87)	14 (93)	12 (80)	14 (93)
Females Not evaluated				

-: No noteworthy findings.
* $p<0.05$; ** $p<0.01$.　Body weight and food consumption data analysed using Levene's Test.
a　Administered in three doses at ~6h intervals over 12 hours.
b　For controls, group means are shown, for treated groups, percent differences from controls are shown.　Statistical significance is based on actual data (not on the percent differences).

2.6.7.12B Reproductive and Developmental Toxicity - Fertility and early embryonic development to implantation	**Report Title:** The Effect of Oral (Gavage) Sodium Zirconium Cyclosilicate on Fertility and Embryo-fetal Development in Rats	**Test Article: Sodium zirconium cyclosilicate**
Design similar to ICH 4.1.1? Yes/No	**Duration of dosing:** from 2 weeks prior to pairing until Day 16 of gestation.	**Study number:** 496748
Species / Strain: Rat / Sprague Dawley	**Day of mating:** Day 0	**GLP compliance:** Yes
Initial age: 9 to 11 weeks at start of dosing	**Day of C-section:** Day 20 of gestation	**Testing Facility:** [redacted], UK
Date of first dose: [redacted] 20[redacted]	**Method of administration:** Oral (gavage)	
Special features: Fetal evaluations.	**Vehicle / Formulation:** Suspension in water containing 0.5% w/v methylcellulose	
No Observed Adverse-Effect Level: **F_0 Females:** **F_1 Litters:**	 6000 mg/kg/day 6000 mg/kg/day	
Conclusion: Thrice daily oral administration of ZS to female rats from 14 days before mating through gestation day 16 at dose levels up to 2000 mg/kg tid (6000 mg/kg/day), given approximately 6 hours apart over a 12-hour period, did not produce in-life or post-mortem evidence of toxicity; did not affect oestrus cycling, mating performance, fertility, or pregnancy; and did not affect fetal growth or development. Based on these results, the reproductive and fetal no-observed-adverse-effect level was considered to be 2000 mg/kg/dose (6000 mg/kg/day), the highest dosage tested.		

Daily dose (mg/kg)	**0 (Vehicle)**	**1000 [a]**	**3000 [a]**	**6000 [a]**
F_0 Females				
Toxicokinetics: Not measured				
Number evaluated	20	20	20	20
Number died or sacrificed moribund	0	0	0	0
Clinical observations	-	-	-	-
Necropsy observations	-	-	-	-
Pre-mating body weight gain (%) [b] Days 0 to 14	(g) 15	-7	+13	-7
Gestation body weight gain (%) [b] Days 0 to 20	(g) 133	+3	+8	+7
Pre-mating food consumption (%) [b] Day 14	(g/animal/day) 20.5	+0.5	+6	-0.5
Gestation food consumption (%) [b] Day 10	(g/animal/day) 30.3	+1	+7	-1
Mean number of estrous cycles / 14 days	4.0	4.1	4.0	4.1
Median number of nights prior to mating	2	2	2	2
Number of females with positive mating sign	19	20	20	19
Number of pregnant females	20	19	18	18
Number aborted or with total resorption of litter	0	1	0	0
Mean number of corpora lutea	16.1	15.4	15.2	16.6
Mean number of implantations	15.5	14.7	16.3	16.1
Mean % pre-implantation loss	4	4	3	3
Mean number (%) of live implants	15.0 (96)	14.3 (97)	15.6 (96)	15.2 (94)
Mean number (%) of dead implants	0.6 (4)	0.5 (3)	0.7 (4)	0.9 (6)
Mean number (%) of early embryonic deaths	0.6 (4)	0.5 (3)	0.7 (4)	0.9 (6)

Daily dose (mg/kg)	**0 (Vehicle)**	**1000 [a]**	**3000 [a]**	**6000 [a]**
Mean number of late embryonic deaths	0	0	0	0
Mean number of dead fetuses	0	0	0	0
Mean % post-implantation loss	4	3	4	6
Total live male fetuses (%)	145 (48)	142 (52)	145 (52)	137 (50)
Total live female fetuses (%)	154 (52)	129 (48)	136 (48)	137 (50)
Live fetal sex ratio (M:F)	1:1.06	1:0.91	1:0.94	1:1.00
Mean total uterus weight (g)	85	87	90	88
Mean litter mean fetal weight (g)	3.54	3.60	3.58	3.57
F_1 Litters				
Number of litters	20	18	18	18
Number of live fetuses	299	271	281	274
Number of fetuses examined for Visceral Abnormalities	151	133	140	137
Visceral Abnormalities	-	-	-	-
Number of fetuses examined for Skeletal Abnormalities	148	138	141	137
Skeletal Abnormalities, including state of Skeletal Ossification	-	-	-	-

-: No noteworthy findings.
a Administered in three doses at ~6h intervals over 12 hours.
b For controls, group means are shown, for treated groups, percent differences from controls are shown.

2.6.7.13 生殖発生毒性試験：胚・胎児発生に関する試験

2.6.7.13 Reproduction and development toxicity - Effects on embryo-fetal development	**Report Title:** Developmental Toxicity Study of Sodium Zirconium Cyclosilicate by Oral Gavage Administration in the Rabbit	**Test Article: Sodium zirconium cyclosilicate**
Design similar to ICH 4.1.3? Yes	**Duration of dosing:** 13 days (GD 6 to 18)	**Study number:** 496863
Species / Strain: Rabbit / New Zealand White	**Day of mating:** Day 0	**GLP compliance:** Yes
Initial age: approximately 4 to 5 month at start of dosing	**Day of C-section:** Day 29 of gestation	**Testing Facility:** [redacted], UK
Date of first dose: [redacted] 20[redacted]	**Method of administration:** Oral (gavage)	
Special features: Fetal evaluations	**Vehicle / Formulation:** Suspension in water containing 0.5% w/v methylcellulose	
No Observed Adverse-Effect Level: **F_0 Females:** **F_1 Litters:**	 6000 mg/kg/day 6000 mg/kg/day	
Conclusion: Thrice daily oral administration of ZS to female NZW rabbits from GD6 to GD18, inclusive at dose levels up to 2000 mg/kg/tid (6000 mg/kg/day), given approximately 6 hours apart over a 12-hour period, did not produce in-life or post-mortem evidence of toxicity, did not affect pregnancy performance, and did not affect fetal growth, sex distribution or development. Based on these results, the maternal-no-effect-level and fetal no-observed-effect-level was considered to be 2000 mg/kg/dose (6000 mg/kg/day), the highest dosage tested.		

Daily dose (mg/kg)	**0 (Vehicle)**	**1500 [a]**	**3000 [a]**	**6000 [a]**
Dams/does:				
Toxicokinetics: Not measured				
Number died or sacrificed moribund	0/20	0/20	0/20	1/20
Clinical observation	-	-	-	-
Necropsy observations	-	-	-	-
Gestation body weight gain (%) [b] Day 6 to 19	(kg) 0.15	-7	+7	-7
Gestation food consumption (%) [b] Day 25	(g/animal/day) 138.2	-11	-4	-7
Number pregnant	19	20	16	20
Number aborted or with total resorption of litter	0	0	0	0
Mean number of corpora lutea	9.2	8.8	9.2	8.9
Mean number of implantations	8.2	8.1	8.2	8.5
Mean % pre-implantation loss	11	9	11	5
Litters:				
Number of litters evaluated	19	20	16	19
Number of live fetuses	139	153	117	145
Mean number (%) of live implants	7.3 (90)	7.7 (95)	7.3 (89)	7.6 (90)
Mean number (%) of dead implants	0.8 (10)	0.4 (5)	0.9 (11)	0.8 (10)
Mean number (%) of early embryonic deaths	0.4 (5)	0.3 (3)	0.4 (5)	0.5 (6)
Mean number (%) of late embryonic deaths	0.4 (5)	0.2 (2)	0.5 (6)	0.3 (4)
Mean number of dead fetuses	0	0	0	0
Mean % post-implantation loss	10	5	11	10
Total live male fetuses (%)	82 (59)	84 (55)	57 (47)	80 (55)

Daily dose (mg/kg)	**0 (Vehicle)**	**1500 [a]**	**3000 [a]**	**6000 [a]**
Total live female fetuses (%)	57 (41)	69 (45)	60 (51)	65 (45)
Live fetal sex ratios (M:F)	1:0.70	1:0.82	1:1.05	1:0.81
Mean total uterus weight (g)	453	484	476	486
Mean litter mean fetal weight (g)	41.5	42.5	43.3	42.5
Fetal anomalies:				
Number of fetuses examined for Visceral Abnormalities	139	153	117	145
Visceral Abnormalities	-	-	-	-
Number of fetuses examined for Skeletal Abnormalities	139	153	117	145
Skeletal Abnormalities, including state of Skeletal Ossification	-	-	-	-

-: No noteworthy findings.
a Administered in three doses at ~6h intervals over 12 hours.
b For controls, group means are shown, for treated groups, percent differences from controls are shown. Statistical significance is based on actual data (not on the percent differences).

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

2.6.7.14 Reproductive and Developmental toxicity - Effects on pre- and post-natal development including maternal function	**Report Title:** A Pre and Post Natal Study of Orally (gavage) Administered ZS in Rats	**Test Article: Sodium zirconium cyclosilicate**
Design similar to ICH 4.1.2? Yes	**Duration of dosing:** e.g.:From either Gestation Day (GD) 16 or GD6 to Lactation Day (LD) 0	**Study number:** 496753
Species / Strain: Rat / Sprague Dawley	**Day of mating:** {5} e.g.:GD0	**GLP compliance:** Yes
Initial age at start of dosing: approximately 9 to 10 weeks	**Day of C-section:** e.g.:Not applicable	**Testing Facility:** [redacted], UK
Date of first dose: [redacted] 20[redacted]	**Method of administration:** Oral (gavage)	
Special features: None.	**Vehicle / Formulation:** Suspension in water containing 0.5% w/v methylcellulose	**Litters culled/not culled:** Not culled
No Observed Adverse-Effect Level: **F_0 females:** **F_1 males:** **F_1 females:**	 6000 mg/kg/day 6000 mg/kg/day 6000 mg/kg/day	
Conclusion: The only effect of thrice daily oral administration of ZS at doses up to 6000 mg/kg/day (2000 mg/kg/tid) to pregnant F_0 female rats from GD6 through weaning was pale faeces at the highest dosage, which were attributed to excretion of the test article. Administration of ZS to F_0 females did not affect reproductive function (pregnancy, parturition, or lactation). It also did not affect the growth, development, or reproductive function of F_1 offspring born to F_0 dams, nor did it affect growth and development of F_2 offspring born to F_1 dams. Based on these results, both the maternal no-observed-adverse effect level and the reproductive no-observed-effect level were considered to be 2000 mg/kg/tid (6000 mg/kg/day), the highest dosage tested.		

Daily dose (mg/kg)	**0 (Vehicle)**	**1500** [a]	**3000** [a]	**6000** [a]
F_0 females:				
Toxicokinetics Not measured				
Number pregnant	24	24	23	24
Number died or sacrificed moribund	1	0	0	3
Number aborted or with total resorption of litter	0	0	0	0
Clinical observations	-	-	-	+[b]
Necropsy observations	-	-	-	-
Gestation body weight (%) [c] GD 20	(g) 372	 +1.9	 +2.7	 +2.4
Lactation body weight (%) [c] LD 7 LD 14	(g) 320 348	 -1.6 +0.9	 0 -2.3	 +0.9 +1.1
Gestation food consumption (%) [c] GD 20	(g/animal/day) 17.2	 +13.4	 +28.5	 +18.0
Lactation food consumption (%) [c] LD 7 to 14	(g/animal/day) 76.6	 -2.7	 -10.6	 +0.7
Mean duration of gestation (days)	21.5	21.4	21.4	21.4
Abnormal parturition	0	0	0	1
F_1 litters (pre-weaning):				
Number litters evaluated	24	23	23	22
Mean number of implantations	13.4	13.9	12.8	14.1
Mean number pups /litter	12.8	13.0	12.0	13.2
Mean number liveborn pups /litter	12.8	12.9	11.7	13.2

Daily dose (mg/kg)	**0 (Vehicle)**	**1500** [a]	**3000** [a]	**6000** [a]
Number of litters with stillborn pups	1	3	2	1
Post-natal survival to Day 4	12.6	12.2	11.6	12.7
Post-natal survival to weaning	12.6	12.1	11.5	12.6
Number of total litter losses	4	2	0	3
Change in pup body weights Days 1 to 21 (%) [c] Males Females	(g) 43.1 41.4	 -0.9 -0.7	 +2.8 +3.4	 -2.3 -2.2
Pup sex ratios (% M:F)	50:50	46:54	51:49	48:52
Physical maturation: median day to event (M/F) Pinna detachment Incisor eruption Eye opening	 3.5 / 3.4 11.6 / 11.4 14.8 / 14.8	 3.7 / 3.8 11.8 / 11.7 15.1 / 15.1	 3.7 / 3.5 11.5 / 11.4 14.7 / 14.6	 3.5 / 3.6 11.7 / 11.9 14.9 / 14.8
F_1 males (post-weaning):				
Number evaluated post-weaning per litter [d]	1	1	1	1
Number of males evaluated post-weaning	19	22	23	20
Number died or sacrificed moribund	0	0	0	0
Clinical observations	-	-	-	-
Necropsy observations	-	-	-	-
Body weight change (%) [c] Weeks 0 to 17	(g) 503	 +0.2	 -0.8	 -3.0
Preputial separation Mean age (days) Mean weight (g)	 41.3 209	 42.3 215	 42.0 219	 42.1 207
Sensory function	-	-	-	-
Motor activity	-	-	-	-

Daily dose (mg/kg)	**0 (Vehicle)**	**1500** [a]	**3000** [a]	**6000** [a]
Learning and memory	-	-	-	-
Number of males paired	19	22	23	20
Median number of nights to positive mating sign	3	2	2	2
Number of fertile males	19	21	22	20
F_1 female (post-weaning):				
Number evaluated	19	22	23	20
Number died or sacrificed moribund	0	0	0	0
Clinical observations	-	-	-	-
Necropsy observations	-	-	-	-
Body weight (%) [c] Pre-mating (Weeks 4 to 11) Gestation (Days 0 to 20) Lactation (Days 1 to 14)	(g) 187 159 84	 +0.5 -3.1 -10.7	 -2.1 -1.9 +3.6	 +1.6 +0.6 -2.4
Mean age of vaginal patency (days)	33.7	33.5	33.7	34.2
Weight at vaginal opening (g)	120	121	123	123
Sensory function	-	-	-	-
Motor activity	-	-	-	-
Learning and memory	-	-	-	-
Median number of nights to positive mating sign	3	2	2	2
Number of females paired	19	22	23	20
Number of pregnant females	19	21	22	20
Number of females producing live litters	19	21	22	20
Mean number implantations	15.5	16.3	17.2	16.7

Daily dose (mg/kg)	**0 (Vehicle)**	**1500 [a]**	**3000 [a]**	**6000 [a]**
Mean number of live pups/litter				
At Birth (Day 0 Lactation)	15.0	14.8	15.1	15.1
Day of 14 Lactation	13.4	11.6	13.1	14.4
F_2 litters:				
Body weight gain (Lactation Days 1 to 14) (%) [c]	(g)			
Males	23.1	+2.2	+3.9	-6.1
Females	21.7	+5.1	+7.4	-1.8

-: No noteworthy findings.
a Administered in three doses at ~6h intervals over 12 hours.
b Clinical signs limited to pale faeces, attributed to excretion of the test article.
c For controls, group means are shown, for treated groups, percent differences from controls are shown.
d On Day 21 of lactation, 1 male and 1 female, where available, were selected from each litter. For each litter, the selected pups were those with a body weight closest to the median weight of that sex for that litter.
e F1 animals were allowed to litter normally; F_2 pups were examined for external abnormalities on Lactation Day 14 (all appeared normal) and were then euthanised.

2.6.7.15　新生児を用いた試験

該当なし

2.6.7.16　局所刺激性試験

該当なし

2.6.7.17　その他の毒性試験

Species / Strain	Method of administration	Doses	Gender and number per group	Noteworthy findings	Testing Facility	Study number
Guinea Pig / Hartley-derived albino	Topical on a 25 mm Hilltop Chamber backed by adhesive tape	0, 0.3g	10M + 10F	No dermal irritation observed during the induction phase. No dermal reactions in test and challenge control animals following challenge with 100% ZS.	[redacted], USA	20075345

Study 20075345 contains a GLP statement.
M = male, F = female.