

エクリラ 400 μ g ジェヌエア 30 吸入用
エクリラ 400 μ g ジェヌエア 60 吸入用

(アクリジニウム臭化物)

第2部 CTDの概要(サマリー)

2.4 非臨床試験の概括評価

杏林製薬株式会社

目次

略語及び専門用語一覧表	3
2.4.1 非臨床試験計画概略	5
2.4.2 薬理試験	6
2.4.3 薬物動態試験	12
2.4.4 毒性試験	23
2.4.5 総括及び結論	36
2.4.6 参考文献	38

表一覧

表 2.4.2-1 アクリジニウム臭化物及び類薬のヒト M ₁ 、M ₂ 、M ₃ 、M ₄ 及び M ₅ 受容体に対する親和性(K _i 測定値)	7
表 2.4.2-2 気管支収縮試験のアクリジニウム臭化物及び対照物質の結果	8
表 2.4.2-3 ビーグル犬を用いたアクリジニウム臭化物及びチオトロピウム臭化物の AUC _{0-6h} (気管支収縮の抑制)/AUC _{0-6h} (心拍数の増加)の比較	9
表 2.4.2-4 心血管系安全性薬理試験の無影響濃度(又は使用最高濃度)と臨床血漿中濃度との比較の要約	11
表 2.4.3-1 マウス、ラット、イヌ及びヒトのアクリジニウム臭化物、LAS34823 及び LAS34850 の全身曝露量(単回投与試験、LC-MS/MS により測定)	15
表 2.4.3-2 マウス、ラット、妊娠ウサギ、イヌ及びヒトのアクリジニウム臭化物投与後 7 日間の排泄率の比較 (1/2)	21
表 2.4.4-1 単回投与毒性試験の概要表	23
表 2.4.4-2 反復投与毒性試験 NOAEL 及びヒトにアクリジニウム臭化物を臨床用量(400 μg 1 日 2 回)で投与した際の曝露量との比較	24
表 2.4.4-3 <i>In vitro</i> 遺伝毒性試験結果及び使用したアクリジニウム臭化物のバッチの純度との関係	29
表 2.4.4-4 <i>In vivo</i> 遺伝毒性試験のNOAEL 及びヒトにアクリジニウム臭化物を臨床用量(400 μg 1 日 2 回)で投与した際の曝露量との比較	29
表 2.4.4-5 がん原性試験の NOAEL 及び臨床用量(400 μg 1 日 2 回)投与時のアクリジニウム臭化物の曝露量との比較	30
表 2.4.4-6 生殖発生毒性試験 NOAEL 及び臨床用量(400 μg 1 日 2 回)投与時のアクリジニウム臭化物の曝露量との比較	32
表 2.4.4-7 原薬に含まれる不純物	34
表 2.4.4-8 ヒト最大 1 日摂取量と遺伝毒性を示す不純物の TTC の比及び規格値での安全率	35

図一覧

図 2.4.3-1 マウス、ラット、ウサギ、イヌ及びヒトの肝ミクロソームでのアクリジニウム臭化物の代謝経路	18
---	----

略語及び専門用語一覧表

略語及び専門用語	用語の説明
LAS34273	アクリジニウム臭化物のコード番号
LAS34850	アクリジニウム臭化物カルボン酸代謝物のコード番号
LAS34823	アクリジニウム臭化物アルコール代謝物のコード番号
LAS34040	アクリジニウム臭化物(S)-Enantiomer のコード番号
ACh	Acetylcholine : アセチルコリン
AChE	Acetylcholinesterase : アセチルコリンエステラーゼ
ADME	Absorption, Distribution, Metabolism and Excretion : 吸収、分布、代謝、排泄
AUC	Area under the concentration-time curve : 血漿中濃度-時間曲線下面積
AUC _{0-6h}	気道収縮抑制率-時間曲線下面積または心拍数増加率-時間曲線下面積
BALF	Bronchoalveolar lavage fluid : 気管支肺胞洗浄液
BuChE	Butyrylcholinesterase : ブチリルコリンエステラーゼ
CbE	Carboxyesterase : カルボキシエステラーゼ
C _{max}	Maximum plasma drug concentration : 最高血漿中濃度
COPD	Chronic obstructive pulmonary disease : 慢性閉塞性肺疾患
CYP450	Cytochrome P450 : チトクロームP450
DEREK	Deductive Estimation of Risk from Existing Knowledge : 化合物構造のデータベースから毒性を予測するシステム
EC ₅₀	Effective concentration at 50% : 50%有効濃度
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
GSH	Glutathione : グルタチオン
HEK	Human embryonic kidney : ヒト胎児腎臓(細胞)
HERG	Human ether-à-go-go related gene : ヒト急速活性型遅延整流カリウムチャネル遺伝子
ICH	International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use : 日米EU医薬品規制調和国際会議
I _{Kr}	Delayed rectifier potassium current : 遅延整流カリウムイオン電流
K _i	Inhibition constant : 阻害定数
LC-MS/MS	Liquid chromatography-tandem mass spectrometry: 液体クロマトグラフィタンデム質量分析計
M ₁ 受容体	ムスカリノン性アセチルコリン受容体 M ₁ サブタイプ
M ₂ 受容体	ムスカリノン性アセチルコリン受容体 M ₂ サブタイプ
M ₃ 受容体	ムスカリノン性アセチルコリン受容体 M ₃ サブタイプ
M ₄ 受容体	ムスカリノン性アセチルコリン受容体 M ₄ サブタイプ
M ₅ 受容体	ムスカリノン性アセチルコリン受容体 M ₅ サブタイプ
NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate : ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリノン
NMR	Nuclear magnetic resonance : 核磁気共鳴

略語及び専門用語	用語の説明
³ H-NMS	1-[N-Methyl- ³ H]-scopolamine methyl chloride : 1-[N-メチル ³ H]-スコポラミンメチルクロライド
NOAEL	No Observed Adverse Effect Level : 無毒性量
P-gp	P-glycoprotein : P 糖タンパク
PMSF	Phenylmethylsulfonyl fluoride : フェニルメチルスルホニルフルオリド
pIC ₅₀	50%阻害濃度の負の対数
QTc	Corrected QT : 補正 QT
S9	Submitochondrial fraction
TK	Toxicokinetics : トキシコキネティクス
TTC	Threshold of toxicological concern : 毒性学的懸念の閾値

2.4.1 非臨床試験計画概略

本項に記したアクリジニウム臭化物及びアルコール代謝物(LAS34823)は臭化物塩濃度として表示し、カルボン酸代謝物(LAS34850)は LAS34850 フリーアイド濃度として表示した。

2.4.1.1 薬理試験計画の概略

アクリジニウム臭化物のムスカリン M_3 受容体に対する選択性を、ムスカリン受容体に対する拮抗作用及び解離速度の面から検討するため、様々な *in vitro* 及び *in vivo* 薬理試験によって評価した。ヒトムスカリン(M_1 ~ M_5)受容体の結合性及びその他の受容体に対するアクリジニウム臭化物とその主要代謝物(LAS34823 及び LAS34850)の親和性を評価した。摘出したモルモット気管及びウサギ虹彩を用いて、 M_3 受容体に対する拮抗作用を評価した。摘出したモルモット左房を用いて、 M_2 受容体に対する拮抗作用も評価した。麻酔下モルモット及び麻酔下ビーグル犬を用い、ACh の静脈内投与により誘発された気管支収縮に対するアクリジニウム臭化物の気管支拡張作用を評価した。

ICH S7A 及び S7B ガイドラインに従い、安全性薬理試験としてアクリジニウム臭化物及び代謝物の中枢神経系、心血管系、呼吸器系、腎/尿路系及び消化管系への影響を様々なモデルで評価した。

2.4.1.2 薬物動態試験計画の概略

薬物動態及びTK測定のために、[REDACTED]社及びAlmirall社でアクリジニウム臭化物、LAS34823 及び LAS34850 の血漿中濃度測定法を開発し、バリデーション試験を実施した。アクリジニウム臭化物は C-3 位に不斉中心を持ち、医薬品有効成分としては 3-(R)-Enantiomer であるが、光学異性体の(S)-Enantiomer に薬理活性は認められること、*in vivo* でキラル反転が起こる可能性が低いことなどから、全て非光学選択性分析を行なった。

薬物動態試験及び TK 試験では、マウス、ラット、ウサギ及びイヌに吸入、経口、静脈内及び皮下投与を行い、血漿中のアクリジニウム臭化物とその主要代謝物(LAS34823 及び LAS34850)の濃度測定に加え、毒性試験結果を補完するため、肺組織及び気管支肺胞洗浄液(BALF)中の濃度測定も行った。

アクリジニウム臭化物の2種類の放射性標識体(phenyl 基及び glycolyl 基を ^{14}C で標識)を合成し、アクリジニウム臭化物、LAS34823 及び LAS34850、並びに関連する代謝物の放射能分布と代謝経路を評価した。*In vivo* ADME 試験として、放射性標識したアクリジニウム臭化物をラット及びイヌに静脈内、経口(ラットのみ)、又は気管内のいずれかの経路から単回投与し評価した。マウス及び妊娠ウサギには静脈内投与し、代謝及び排泄試験も実施した。

アクリジニウム臭化物の代謝プロファイルを比較するため、またヒトで認められた全代謝物の安全性試験での曝露を示すため、マウス、ラット、ウサギ、イヌ及びヒトの血漿、ヒト及びラットの肝ミクロソーム、ヒト肺ミクロソーム、並びにマウス、ラット、ウサギ、イヌ及びヒトの肝細胞を用いて *in vitro* 代謝試験を実施した。さらに、アクリジニウム臭化物の酵素的加水分解に関するヒトエステラーゼ及び CYP450 アイソフォームを同定する試験も実施した。薬物相互作用の可能性を検討するために、アクリジニウム臭化物とその主要代謝物が CYP450 及びエステラーゼの *in vitro* 活性を阻害するかを評価した。また、各種動物血漿中のアクリジニウム臭化物、イブラトロピウム臭化物、チオトロピウム臭化物及びグリコピロニウム臭化物の安定性も評価した。ラット及びヒトから調製した肝以外の細胞画分を用いたアクリジニウム臭化物の *in vitro* 安定性も評価した。

様々な動物種(マウス、ラット、ウサギ、イヌ及びヒト)で $[^{14}\text{C}]$ -アクリジニウム臭化物の血漿タ

ンパク結合率、さらにヒト血清アルブミン及びヒト α_1 酸性糖タンパクに対する [^{14}C]-アクリジニウム臭化物の結合率を *in vitro* で検討した。また、肝ミクロソームタンパクとの共有結合も検討した。

2.4.1.3 毒性試験計画の概略

アクリジニウム臭化物の吸入投与経路による毒性試験を主体に実施し、その他に経口、皮下及び静脈内投与経路の試験も行った。これらの投与経路を用いた毒性試験結果から、原薬及びその代謝物に対する気道、消化管、体循環などの体組織で生じうる毒性を総合的に評価した。アクリジニウム臭化物に対し、標準的な組み合わせの遺伝毒性試験を実施した。アクリジニウム臭化物を長期使用する可能性があることから、ラット及びマウスを用いて、がん原性試験を実施した。また、構造から遺伝毒性が懸念される原薬中不純物について、遺伝毒性を評価した。

アクリジニウム臭化物をラット及びウサギに吸入投与する生殖発生毒性試験を実施し、催奇形性、胚・胎児毒性、出生前及び出生後の影響、受胎能への影響並びに生殖能力への影響を評価した。ウサギでは、経口投与による胚・胎児発生に関する試験も実施した。

本剤は吸入投与されることから、適切な試験系による局所刺激性試験を実施した。

主要な安全性薬理コアバッテリー試験、薬物動態/TK 試験及び毒性試験は、GLPに準拠して実施した。原薬及び製剤中の不純物について、ICH Q3A、Q3B 及び Q6A に従い評価した。また、遺伝毒性が懸念される不純物についても評価した。

2.4.2 薬理試験

アクリジニウム臭化物並びに対照物質のチオトロピウム臭化物(長時間作用性ムスカリーン受容体拮抗薬)及びイプラトロピウム臭化物(短時間作用性ムスカリーン受容体拮抗薬)の抗コリン作用を *in vitro* 及び *in vivo* 薬理試験で評価した。その結果、アクリジニウム臭化物は長時間作用性で可逆的な M₃受容体拮抗薬であり、作用発現も早いことが確認された。

心血管系、中枢神経系、呼吸器系、腎/尿路系及び消化管系の各安全性薬理試験で、アクリジニウム臭化物及びその代謝物は顕著な作用を示さなかった。非臨床安全性プロファイルの解析から、アクリジニウム臭化物には心血管系パラメータに及ぼす予想外の作用や心電図(QTc 間隔を含む)への影響は認められなかった。チオトロピウム臭化物は口内乾燥、尿閉及び便秘を誘発する傾向¹⁾を示し、イプラトロピウム臭化物でも散瞳、結膜炎、粘膜乾燥及び頻脈などの抗コリン作用が報告されている²⁾。しかし、アクリジニウム臭化物ではこれらの有害事象が発現する可能性の低いことが、チオトロピウム臭化物及びイプラトロピウム臭化物との比較試験より示された。

これらの薬理試験の結果から、アクリジニウム臭化物は安全性の高い有用な長時間作用性ムスカリーン受容体拮抗薬であることが示唆された。

2.4.2.1 効力を裏付ける試験(2.6.2.2)

アクリジニウム臭化物は $^3\text{H-NMS}$ の結合阻害試験でヒトムスカリーン受容体の各サブタイプに対して高い親和性を示し、M₁、M₂、M₃、M₄ 及び M₅受容体サブタイプに対する親和性の値(Ki 値)はそれぞれ 0.09、0.1、0.12、0.25 及び 0.15 nmol/L であった(表 2.4.2-1)。ヒトムスカリーン受容体に対するアクリジニウム臭化物の親和性はチオトロピウム臭化物と同程度で、イプラトロピウム臭化物より 10 倍以上高かった(M₄受容体以外:M₄受容体では 8.4 倍)。アクリジニウム臭化物と M₁、M₂、M₃ 及び M₅受容体サブタイプの解離速度はチオトロピウム臭化物より速かったが、イプラトロピウム臭化物より遅かった。アクリジニウム臭化物、チオトロピウム臭化物及びイプラトロピ

ウム臭化物の M_3 受容体との解離半減期($t_{1/2}$)は、それぞれ 29.2、62.2 及び 0.47 時間であった(表 2.6.2.2-7)。受容体からの $t_{1/2}$ 比を M_3 受容体と M_2 受容体及び M_3 受容体と M_1 受容体(それぞれ M_3/M_2 及び M_3/M_1)について算出すると、アクリジニウム臭化物はそれぞれ 6.3 及び 4.2、チオトロピウム臭化物はそれぞれ 4.1 及び 1.2 であった(表 2.6.2.2-7)。また、³H-NMS の結合阻害実験では、アクリジニウム臭化物は解離速度の面から M_2 受容体と比較して M_3 受容体に対してチオトロピウム臭化物と同程度の選択性($t_{1/2}$ 比で示した M_3/M_2 ではアクリジニウム臭化物及びチオトロピウム臭化物は同程度)を有するとの結果(表 2.6.2.2-1)もあるものの、³H ラベル化した被験物質の結合阻害試験では、受容体からの解離に関する $t_{1/2}$ を比較すると、アクリジニウム臭化物よりチオトロピウム臭化物の方が M_2 受容体で 3.2 倍長く、 M_3 受容体での 2.1 倍より差が大きかった。 M_2 受容体サブタイプは心拍数増加などの有害作用に関係しているとされており、アクリジニウム臭化物は M_2 受容体からの解離が相対的に早いことから、安全性が向上している可能性が示唆された。また、アクリジニウム臭化物、チオトロピウム臭化物及びイプラトロピウム臭化物と M_5 受容体との解離半減期は、それぞれ 11.8、55.3 及び 0.79 時間であった(表 2.6.2.2-9)。気道平滑筋に発現する M_3 受容体は ACh に対する気管支収縮反応を介在しており、COPD 患者の気道の生理及び病理に重要な役割を果たしている。したがって、アクリジニウム臭化物は M_3 受容体での ACh に対する拮抗作用により、ACh による気管支収縮を抑制することが期待される。

表 2.4.2-1 アクリジニウム臭化物及び類薬のヒト M_1 、 M_2 、 M_3 、 M_4 及び M_5 受容体に対する親和性(K_i 測定値)

化合物	M_1 受容体 (nmol/L)	M_2 受容体 (nmol/L)	M_3 受容体 (nmol/L)	M_4 受容体 (nmol/L)	M_5 受容体 (nmol/L)
Aclidinium bromide	0.09	0.1	0.12	0.25	0.15
Tiotropium bromide	0.13	0.09	0.14	0.38	0.18
Ipratropium bromide	1.29	1.01	1.25	2.11	3.22

結果は 2~3 回測定の平均値

表 2.6.2.2-1 及び表 2.6.2.2-3 を改変

アクリジニウム臭化物 の(S)-Enantiomer である LAS35040 の M_1 、 M_2 及び M_3 受容体サブタイプに対する親和性(IC_{50} 値)はそれぞれ 45.5、16.0 及び 154.8 nmol/L であった(表 2.6.2.2-10)。これらの受容体に対する LAS35040 の親和性はアクリジニウム臭化物より低く、 M_1 、 M_2 及び M_3 受容体サブタイプに対する両者の親和性の比(IC_{50} LAS35040/ IC_{50} アクリジニウム臭化物)はそれぞれ 325、94 及び 910 であった(2.6.2.2.1.6)。

モルモット気管及びウサギ虹彩のカルバコール又は ACh 誘発性収縮に対して、アクリジニウム臭化物は対照物質(チオトロピウム臭化物及びイプラトロピウム臭化物)と同程度の抑制作用を示した(表 2.6.2.2-12、表 2.6.2.2-14 及び表 2.6.2.2-23)。アクリジニウム臭化物及びイプラトロピウム臭化物の作用は可逆的競合阻害であるのに対し、チオトロピウム臭化物は高濃度で ACh の最大収縮反応を抑制する性質を有していた(2.6.2.2.2.1)。アクリジニウム臭化物は、モルモット気管及びウサギ虹彩のムスカリン受容体から緩やかに解離することが示された(表 2.6.2.2-13 及び表 2.6.2.2-23)。

モルモット及びヒトの摘出気管標本を用いて電気刺激誘発性収縮に対する M_3 受容体拮抗作用を評価した試験で、アクリジニウム臭化物の効力はチオトロピウム臭化物及びイプラトロピウム臭化物と同程度であった(表 2.6.2.2-16 及び表 2.6.2.2-19)。モルモット摘出気管では、アクリジニウム臭化物、チオトロピウム臭化物及びイプラトロピウム臭化物の効力(EC_{50} 値)はそれぞれ 5.3、3.0 及び 3.0 nmol/L であった。また、アクリジニウム臭化物の作用持続時間($t_{1/2}$)はチオトロピウム

臭化物と同程度であり、両化合物とも 8 時間以上であった(観察時間 8 時間)。したがって、アクリジニウム臭化物はイプラトロピウム臭化物($t_{1/2} = 42$ 分)とは異なり、長時間作用することが示唆された。ヒト摘出気管では、アクリジニウム臭化物、チオトロピウム臭化物及びイプラトロピウム臭化物の効力は同程度であり、 pIC_{50} 値はそれぞれ 9.28、9.59 及び 9.52 であった。アクリジニウム臭化物の抑制作用の発現速度はイプラトロピウム臭化物と同程度であり、チオトロピウム臭化物より速かった(作用発現の $t_{1/2}$ はアクリジニウム臭化物、チオトロピウム臭化物及びイプラトロピウム臭化物でそれぞれ 4.4、7.4 及び 3.3 分)。さらに、アクリジニウム臭化物洗浄後の気管支収縮反応の回復速度(作用消失速度)は、イプラトロピウム臭化物より遅かった(作用消失の $t_{1/2}$ はそれぞれ 334 及び 76 分)。チオトロピウム臭化物では、洗浄後も気管支収縮反応は回復しなかつた。

モルモット左心房標本を用いた電気刺激性収縮のカルバコール誘発性弛緩反応に対するアクリジニウム臭化物、チオトロピウム臭化物及びイプラトロピウム臭化物の M_2 受容体拮抗作用を検討した。アクリジニウム臭化物の効力($EC_{50} = 17.4$ nmol/L)はイプラトロピウム臭化物($EC_{50} = 19.9$ nmol/L)と同程度であったが、チオトロピウム臭化物($EC_{50} = 11.8$ nmol/L)より弱かった(表 2.6.2.2-21)。アクリジニウム臭化物の作用持続時間($t_{1/2}$)の 102 分はイプラトロピウム臭化物の 4 分より長く、チオトロピウム臭化物の 184 分より短かった(表 2.6.2.2-22)。

In vivo 試験では、麻酔下モルモットを用いた ACh 誘発性気管支収縮がアクリジニウム臭化物の吸入によって抑制され、その効果はチオトロピウム臭化物及びイプラトロピウム臭化物と同程度であった(表 2.4.2-2)。ACh 誘発性気管支収縮に対するアクリジニウム臭化物、チオトロピウム臭化物及びイプラトロピウム臭化物の抑制作用の効力(EC_{50})はそれぞれ 140、45 及び 68 μg/mL であった。アクリジニウム臭化物の最大作用の発現時間(30 分)はイプラトロピウム臭化物(30 分)と同程度で、チオトロピウム臭化物(80 分)より速かった。

アクリジニウム臭化物、チオトロピウム臭化物及びイプラトロピウム臭化物の吸入によって ACh 誘発性気管支収縮が濃度依存的に抑制された。作用持続時間($t_{1/2}$)はアクリジニウム臭化物で 29 時間であり、イプラトロピウム臭化物の 8 時間より長く、チオトロピウム臭化物の 64 時間より短かった(表 2.4.2-2)。

表 2.4.2-2 気管支収縮試験のアクリジニウム臭化物及び対照物質の結果

試験名	化合物	用量 (μg/mL)	EC_{50} (μg/mL)	最大作用の 発現時間 (min)	作用持続 時間 $t_{1/2}$ (h)
LAS34273 ムスカリン M_3 受容体拮抗薬：麻酔下 モルモットを用いたアセチルコリン 誘発性気管支収縮 効力及び作用発現(BIOL [] 04)	Aclidinium bromide	100～1000	140	30	-
	Tiotropium bromide	30～300	45	80	-
	Ipratropium bromide		68	30	-
モルモットのアセチルコリン誘発性 気管支収縮に対する吸入 LAS34273、 チオトロピウム臭化物及びイプラト ロピウム臭化物の効力及び作用持続 時間の比較試験(BIOL [] 05)	Aclidinium bromide	0.1～1000	2.5	-	29
	Tiotropium bromide	0.1～300	1.4	-	64
	Ipratropium bromide	1～3000	3.4	-	8

各濃度 4～10 匹

表 2.6.2.2-24、表 2.6.2.2-25、表 2.6.2.2-26 及び表 2.6.2.2-27 を改変

ビーグル犬を用い、アクリジニウム臭化物及びチオトロピウム臭化物が ACh 誘発性気管支収縮

及び心拍数に及ぼす影響を検討した(2.6.2.2.3.3)。気管支収縮に対する評価では、アクリジニウム臭化物 5 μg/kg 及びチオトロピウム臭化物 0.25 μg/kg の吸入により、それぞれ最大 87 及び 99% まで気管支収縮が抑制され、いずれも作用が長時間持続した。心拍数の增加持続時間の評価では、アクリジニウム臭化物 500 μg/kg 及びチオトロピウム臭化物 25 μg/kg(それぞれ気管支収縮試験で使用した用量の 100 倍)を吸入した結果、アクリジニウム臭化物の心拍数への影響は、投与後 2 から 6 時間まで、チオトロピウム臭化物と比べて有意に小さかった。気管支収縮抑制の AUC を心拍数増加の AUC で除して算出した値「AUC_{0-6h}(気管支収縮の抑制)/AUC_{0-6h}(心拍数の増加)」を気管支収縮抑制作用の安全性を示す値として定義した。この比はアクリジニウム臭化物及びチオトロピウム臭化物で、それぞれ 4.2 及び 1.6 であった(表 2.4.2-3)。したがって、アクリジニウム臭化物は臨床で効力が強く安全な治療薬になることが示唆された。

表 2.4.2-3 ビーグル犬を用いたアクリジニウム臭化物及びチオトロピウム臭化物の AUC_{0-6h}(気管支収縮の抑制)/AUC_{0-6h}(心拍数の増加)の比較

薬剤	気管支収縮抑制率の AUC _{0-6 h} (%・h)	心拍数増加率の AUC _{0-6 h} (%・h)	AUC _{0-6h} (気管支収縮の抑制)/AUC _{0-6h} (心拍数の増加)
Aclidinium bromide	462	108	4.2
Tiotropium bromide	540	341	1.6

表 2.6.2.2-30 を引用

麻酔下モルモットにアクリジニウム臭化物の(S)-Enantiomer(LAS35040)を 1000 μg/mL の用量で吸入投与したところ、ACh 誘発性気管支収縮に対する最大抑制値である 37%に達したが EC₅₀ 値は算出できなかった(EC₅₀ > 1000 μg/mL)。一方、アクリジニウム臭化物の EC₅₀ 値は 2.9 μg/mL であった(2.6.2.2.3.4)。

アクリジニウム臭化物の 2 つの主要代謝物(LAS34850 及び LAS34823)はムスカリーン受容体に対し顕著な親和性(*in vitro*)を示さず(表 2.6.2.2-11)、麻酔下モルモットの ACh 誘発性気管支収縮に対しても吸入による抑制作用(*in vivo*)を示さなかった(2.6.2.2.3.5)。

2.4.2.2 副次的薬理試験

アクリジニウム臭化物及びその主要代謝物(LAS34850 及び LAS34823)のムスカリーン受容体以外の種々の受容体に対する親和性を検討した。アクリジニウム臭化物は検討した受容体の一部に対し、中程度の親和性(IC₅₀ ≥ 1 μmol/L)しか示さなかった(表 2.6.2.3-2 及び表 2.6.2.3-3)。また、種々の酵素活性に対しても阻害作用を示さなかった(表 2.6.2.3-1)。アクリジニウム臭化物の 2 つの主要代謝物は、ムスカリーン受容体を含め検討したいずれの受容体に対しても顕著な親和性を示さず、各種酵素活性に対しても阻害作用を示さなかった(表 2.6.2.2-11 及び 2.6.2.3.3)。

2.4.2.3 安全性薬理試験

アクリジニウム臭化物の安全性薬理プロファイルを検討した。また、2 つの主要代謝物(LAS34850 及び LAS34823)も *in vitro* 試験を中心に検討した。必要に応じて対照物質(チオトロピウム臭化物及びイプラトロピウム臭化物)も試験に加えた。

2.4.2.3.1 中枢神経系

覚醒下マウスを用いた Irwin 法及び自発運動量の評価では、最大 300 mg/kg までの用量で経口投与しても、行動プロファイル及び自律神経系に顕著な変化は認められなかった(2.6.2.4.1.1) 及び

2.6.2.4.2.1)。

放射性標識したアクリジニウム臭化物の分布で脳内放射能濃度が低いことが示され(2.6.4.4.1 及び 2.6.4.4.2)、アクリジニウム臭化物及びその主要代謝物は、血液脳関門の通過量が少ないことが示唆された。

2.4.2.3.2 心血管系

In vitro 電気生理学的試験では、仔ブタの単離心臓プルキンエ線維を用いて、アクリジニウム臭化物とその主要代謝物が心臓の再分極に及ぼす影響を検討した(2.6.2.4.1.2.1)。アクリジニウム臭化物は 10 μmol/L で AMP(活動電位振幅)及び APD₆₀(60%再分極時の活動電位)を有意に減少させ、3 μmol/L で MRD(最大立ち上がり速度)を有意に低下させた。LAS34850 は 10 μmol/L で MRD を著しく低下させたが LAS34823 は顕著な作用を示さなかった。アクリジニウム臭化物、LAS34850 及び LAS34823 の無影響濃度は 1、3 μmol/L 及び 10 μmol/L であった。チオトロピウム臭化物はプルキンエ線維の活動電位に顕著な作用を示さなかった。

HERG 遺伝子を導入/発現させたヒト胎児腎臓(HEK-293)細胞株を用いた HERG 電流(I_{Kr})への影響の検討では、アクリジニウム臭化物並びに主要代謝物の LAS34850 及び LAS34823 は HERG 電流の振幅を抑制した(2.6.2.4.1.2.2 及び 2.6.2.4.1.2.3)。

In vivo 電気生理学的(心電図)試験では、麻酔下モルモットにアクリジニウム臭化物 1000 μg/kg を静脈内投与しても、心電図の QT_c 間隔(Bazett 補正)の延長は認められなかった(2.6.2.4.2.2.4)。この試験でのアクリジニウム臭化物、LAS34850 及び LAS34823 の無影響血漿中濃度はそれぞれ 37.7、636 及び 58.8 ng/mL であった。

麻酔下ビーグル犬にアクリジニウム臭化物及びチオトロピウム臭化物(いずれも 3~300 μg/kg)を静脈内投与したところ、最高用量(300 μg/kg)でのみ血圧及び心拍数の軽度の減少がみられた。また、アクリジニウム臭化物投与群で心電図に問題となる変化は観察されなかった(表 2.6.2.4-25)が、チオトロピウム臭化物 100 及び 300 μg/kg 投与群では QT_c 間隔が延長した。覚醒下テレメータ装着ビーグル犬にアクリジニウム臭化物 100 μg/kg を静脈内投与すると、心拍数は増加したが、QT_c 間隔に対する影響は軽度であり、無視できる程度の変化であった(表 2.6.2.4-4)。麻酔下ラットにアクリジニウム臭化物 1000 及び 3000 μg/kg を静脈内投与すると、QT_c 間隔に変化はみられなかった(表 2.6.2.4-11、表 2.6.2.4-12、表 2.6.2.4-13 及び表 2.6.2.4-14)。

覚醒下ビーグル犬にアクリジニウム臭化物を静脈内投与すると 100 μg/kg で心拍数が増加したが、3 時間以内に消失した。一方、チオトロピウム臭化物は 10 μg/kg で心拍数が増加し、6 時間以上持続した(表 2.6.2.4-30)。覚醒下ビーグル犬にアクリジニウム臭化物 50 及び 167 μg/kg を静脈内投与しても、不整脈又は心室性期外収縮は観察されなかった(2.6.2.5.1)。対照的に、ホルモテロールフマル酸塩(アドレナリン受容体β₂サブタイプ刺激薬) 3 及び 10 μg/kg のみをビーグル犬に投与すると、投与 24 時間後には心室性頻拍が用量依存的に誘発された。アクリジニウム臭化物はホルモテロールフマル酸塩と併用投与しても、ホルモテロールフマル酸塩誘発性心室性頻拍の発現及び発現率に影響を与えるなかった。また、アクリジニウム臭化物又はホルモテロールフマル酸塩単独の心拍数増加は併用により変化しないと考えられた(2.4.2.4)。

麻酔下ラット、イヌ及びブタを用いて、アクリジニウム臭化物及びその主要代謝物の肺動脈圧に対する影響を検討した(表 2.6.2.4-9、表 2.6.2.4-15、表 2.6.2.4-26 及び表 2.6.2.4-31)。ラットにアクリジニウム臭化物 2000 μg/kg/day を 4 箇月間吸入投与しても肺動脈圧に変化は認められず(表 2.6.2.4-15)、ビーグル犬(表 2.6.2.4-26)及び Landrace 及び Large White の交雑種ブタ(表 2.6.2.4-31)に最大 1000 μg/kg の用量で静脈内投与しても、同様に肺動脈圧に変化は見られなかった。

心血管系の安全性薬理試験の無影響濃度(又は使用最高濃度)と臨床用量での曝露量を表 2.4.2-4

に示す。アクリジニウム臭化物、LAS34850 及び LAS34823 の無影響濃度(曝露量)はヒトでの曝露量のそれぞれ 5.4、2.7 及び 3.0 倍以上であった。なお、心拍数の変化(FD.34273.08)を除くと、それぞれ 170、44 及び 200 倍以上であった。

表 2.4.2-4 心血管系安全性薬理試験の無影響濃度(又は使用最高濃度)と臨床血漿中濃度との比較の要約

安全性薬理試験 (試験番号)	無影響濃度又は 使用最高濃度*	ヒトでの濃度 ^a との比較		
		Aclidinium bromide	LAS34850	LAS34823
HERG 試験(FD.24EX 及び FD.40EX)	Aclidinium bromide : 0.3 μmol/L LAS34850 : 10 μmol/L LAS34823 : 0.3 μmol/L	760 倍 (50000 倍 : 対 IC ₅₀ ^b)	520 倍 (>1600 倍 : 対 IC ₅₀ ^b)	340 倍 (34000 倍 : 対 IC ₅₀ ^b)
仔ブタブルキンエ線維の活動電位パラメータ(FD.34273.07)	Aclidinium bromide : 1 μmol/L LAS34850 : 3 μmol/L LAS34823 : 10 μmol/L*	2500 倍	160 倍	>11000 倍
麻酔下モルモットの QTc 間隔(FD.25JG)	Aclidinium bromide : 37.7 ng/mL* LAS34850 : 636.3 ng/mL* LAS34823 : 58.8 ng/mL*	>170 倍	>140 倍	>200 倍
覚醒下ビーグル犬の時間依存性頻脈(FD.1JG)	Aclidinium bromide : 1.20 ng/mL LAS34850 : 12.55 ng/mL LAS34823 : 0.91 ng/mL	5.4 倍	2.7 倍	3.0 倍
覚醒下ビーグル犬の心電図に対するアクリジニウム臭化物及びホルモテロールの単独及び併用投与の影響(FD.03MV)	Aclidinium bromide : 307 ng/mL* LAS34850 : 203 ng/mL* LAS34823 : 139 ng/mL* (催不整脈無影響濃度としての使用最高濃度)	>1400 倍	>44 倍	>460 倍
麻酔下ビーグル犬の血行動態パラメータ(FD.34273.08)	Aclidinium bromide : 1.5 ng/mL LAS34850 : 147 ng/mL LAS34823 : 10.5 ng/mL	6.7 倍	32 倍	35 倍

a : アクリジニウム臭化物、LAS34850 及び LAS34823 のヒト(400 μg : 1 日 2 回)C_{max} はそれぞれ 0.224 ng/mL(0.397 nmol/L)、4.61 ng/mL(19.2 nmol/L)及び 0.301 ng/mL(0.879 nmol/L)として計算(2.7.2.2.2.1)

b : HERG 試験でのアクリジニウム臭化物、LAS34850 及び LAS34823 の IC₅₀ はそれぞれ 19.7、>30 及び約 30 μmol/L 表 2.6.2.6-1 を引用

2.4.2.3.3 呼吸器系

仔ブタの気管標本を用いた *in vitro* 試験並びに麻酔下及び覚醒下モルモットを用いた *in vivo* 試験によって、アクリジニウム臭化物が気道に及ぼす作用を検討したが、顕著な作用は認められなかつた(表 2.6.2.4-32、表 2.6.2.4-33、表 2.6.2.4-5、表 2.6.2.4-6 及び表 2.6.2.4-7)。

2.4.2.3.4 腎・泌尿器系

ラットではアクリジニウム臭化物、チオトロピウム臭化物及びイプラトロピウム臭化物のいずれの薬物も尿量及び尿中電解質に影響を及ぼさなかった。モルモットを用いた *in vivo* 試験により、アクリジニウム臭化物が尿閉に及ぼす影響を検討したが、100 μg/kg の用量まで残尿量、尿排泄量及び最大排尿圧に対する影響は観察されなかつた(表 2.6.2.4-34、表 2.6.2.4-35、表 2.6.2.4-36 及び表 2.6.2.4-37)。モルモットのアクリジニウム臭化物の血漿中濃度は、臨床(400 μg : 1 日 2 回)血漿中濃度(0.224 ng/mL : 2.7.2.2.2.1)の 45 倍であった。一方、チオトロピウム臭化物及びイプラトロピウム臭化物の 30 又は 100 μg/kg の用量はモルモットの残尿量、尿排泄量及び最大排尿圧に対し

て抑制又は抑制傾向を示した。また、麻酔下ビーグル犬にアクリジニウム臭化物及びチオトロピウム臭化物を 1000 μg/kg 静脈内投与しても、腎機能に問題となる作用はみられなかった(2.6.2.4.3.1.3)。これらの試験結果から、チオトロピウム臭化物及びイプラトロピウム臭化物と比較して、アクリジニウム臭化物を投与した動物では排尿困難や尿閉などの有害作用が生じる可能性は低いことが示唆された。

2.4.2.3.5 消化管

麻酔下マウス及び覚醒下ラットのピロカルピン誘発性流涎に対し、アクリジニウム臭化物はチオトロピウム臭化物及びイプラトロピウム臭化物と比較して、口内乾燥を誘発する作用が弱いことが示された(2.6.2.4.3.2.1、表 2.6.2.4-43)。これらの結果から、臨床でアクリジニウム臭化物が口内乾燥を誘発する可能性は、チオトロピウム臭化物及びイプラトロピウム臭化物より低いことが示唆された。

麻酔下モルモットにアクリジニウム臭化物を皮下投与すると、検討した最高用量(1000 μg/kg)のみ大腸運動の抑制がみられたが、その作用は有意ではなかった。対照的に、チオトロピウム臭化物では、用量に依存した大腸運動の抑制が認められ、100 μg/kg では有意であった(表 2.6.2.4-45)。覚醒下ラットにアクリジニウム臭化物を皮下投与したところ、最高用量の 1000 μg/kg で 24 時間糞排泄量は減少したが、その減少幅はチオトロピウム臭化物の 1/16 であり、臨床でアクリジニウム臭化物がチオトロピウム臭化物より便秘を誘発する可能性は低いことが示唆された(表 2.6.2.4-44)。

2.4.2.4 薬力学的薬物相互作用試験

アクリジニウム臭化物を最高用量 167 μg/kg として、ホルモテロールフマル酸塩を最高用量 10 μg/kg として、両薬剤を併用してビーグル犬に静脈内投与したところ、ホルモテロール誘発心室性頻拍の発現及び発現率のいずれもアクリジニウム臭化物の影響を受けなかった(表 2.6.2.5-3)。また、アクリジニウム臭化物又はホルモテロールフマル酸塩単独の心拍数増加は併用により変化しないと考えられた(表 2.6.2.5-4)。吸入投与されるアクリジニウム臭化物の臨床用量は低く、ヒト血漿中では顕著な薬理活性を示さない主要代謝物へと速やかに加水分解されて失活することから、アクリジニウム臭化物が体内で他の薬剤と薬力学的薬物相互作用を生じる可能性は極めて低いと考えられる。

2.4.3 薬物動態試験

アクリジニウム臭化物の吸収、分布、代謝、排泄、代謝酵素の活性に及ぼす影響及び血漿タンパクとの結合プロファイルを評価する *in vitro* 及び *in vivo* 試験を実施した。さらに、各種動物(マウス、ラット、ウサギ、イヌ)に種々の投与経路(静脈内、経口、吸入、皮下)及び日数(単回及び反復)により TK 試験を行ない、曝露量を評価した。

アクリジニウム臭化物は速やかにアルコール代謝物(LAS34823)とカルボン酸代謝物(LAS34850)に代謝された。試験に用いた動物種、投与経路、投与量に係わらず、LAS34823 の全身曝露量はアクリジニウム臭化物と同程度であり、LAS34850 は大きかった。動物試験から得られた薬物動態データは、ヒトと同様に優れた吸収、分布、代謝及び排泄を示した。

2.4.3.1 分析法

マウス、ラット、ウサギ及びイヌのアクリジニウム臭化物並びにその 2 つの主要代謝物である

LAS34823(アルコール代謝物)及び LAS34850(カルボン酸代謝物)の血漿中濃度測定のための分析方法が先に [REDACTED] 社(ラット : 2.6.4.2.3 及びイヌ : 2.6.4.2.8)によって、後に Almirall 社(マウス : 2.6.4.2.1、ラット : 2.6.4.2.4、ウサギ : 2.6.4.2.6 及びイヌ : 2.6.4.2.9)によって開発された。分析方法はオフライン自動固相抽出後、LC-MS/MS 法で行った。

薬物動態測定及び TK 測定でのアクリジニウム臭化物の安定性

アクリジニウム臭化物は血漿中で速やかに加水分解されるためエステラーゼ阻害剤の PMSF 添加による安定化処置をした。しかしながら、[REDACTED] 社での血漿サンプルの取扱が不適切であったため、アクリジニウム臭化物の安定性は確認できなかった。このため Almirall 社では厳密に血漿サンプルを管理した新たな分析方法を開発した。

[REDACTED] 社及び Almirall 社がそれぞれ測定した異なる系統のラットに異なる剤形のアクリジニウム臭化物を吸入投与した毒性試験の血漿中濃度に乖離が認められた。この問題に対処するため、2 系統のラットに異なる剤形のアクリジニウム臭化物を吸入投与する試験(2.6.4.3.2)を実施し、その血漿中濃度測定は Almirall 社で行った。その結果、ラットの血漿中濃度は系統間及び薬剤の剤形間では軽微な差異しか認められず、Almirall 社が分析した他の毒性試験と同程度であったが(2.6.6)、[REDACTED] 社の結果より高かった(最大で約 10 倍)。このため、[REDACTED] 社が測定したアクリジニウム臭化物の血漿中濃度は、参考値として扱うこととした。その後の TK 試験では、Almirall 社で濃度測定を実施した。

TK 試験での高投与量時に得られる高い血漿中濃度の検体を測定するために、定量範囲の拡大による分析方法の再バリデーションを行った(マウス : 2.6.4.2.2、ラット : 2.6.4.2.5、ウサギ : 2.6.4.2.7 及びイヌ : 2.6.4.2.10)。マウス、ラット、ウサギ及びイヌの TK 試験では、定量濃度範囲を拡大した本方法を用いて曝露量を評価した(2.4.4)。

血漿中のアクリジニウム臭化物はエステラーゼにより速やかに加水分解されるため、その血漿タンパク結合率を正確に測定することはできなかった(2.6.4.4.4)。したがって、アクリジニウム臭化物及びその代謝物の薬物動態パラメータと TK パラメータは全て血漿中総薬物濃度に基づいて算出した。

2.4.3.2 吸収

マウス、ラット、ウサギ及びイヌにアクリジニウム臭化物を単回又は反復して経口、吸入、皮下及び静脈内投与する試験を行った(表 2.6.4.9-1)。これらの試験でアクリジニウム臭化物とその主要代謝物である LAS34823(アルコール代謝物)及び LAS34850(カルボン酸代謝物)の曝露を確認した(表 2.4.3-1)。

ラットを用いた吸入投与による TK 試験で、肺のアクリジニウム臭化物は代謝物より高濃度で存在した(2.6.6.3.2.1.5 及び 2.6.6.3.2.1.6)。アクリジニウム臭化物の肺からの消失は緩やかで、半減期は 7~14 時間であった。吸入投与後の肺中濃度が血漿中濃度より約 1000 倍高いことから、臨床適応症に対してアクリジニウム臭化物を肺内に局所投与する妥当性が十分に裏付けられた。

アクリジニウム臭化物は分子内のエステル結合が生体内で容易に加水分解する。そのため、アクリジニウム臭化物を経口投与した後のバイオアベイラビリティは低いと考えられた(表 2.6.4.3-1)。アクリジニウム臭化物の血漿中の主な代謝物は LAS34850 であった。

[¹⁴C]-アクリジニウム臭化物をラット及びイヌに単回投与した後の吸収を検討したところ、血漿中のアクリジニウム臭化物は速やかに加水分解した(表 2.6.4.3-5 及び表 2.6.4.3-10)。ラットに [¹⁴C]-アクリジニウム臭化物を 1 mg/kg 静脈内投与後の最高血漿中濃度は、投与後 5 分で 350 ng equiv./g 以上であった。一方、雄白色ラットに経口投与後の血漿中放射能濃度は低く、投与後 24 時間では

検出下限付近又は検出下限未満であった。雄白色ラットに気管内投与後の血漿中放射能濃度は、経口投与後と同様に低かった。イヌに^{[14]C}-アクリジニウム臭化物を静脈内投与後の曝露量は高かったが、気管内投与後は低かった。これらの結果からアクリジニウム臭化物は速やかに代謝されるため血漿中濃度が低いと考えられた。経口及び吸入投与後のアクリジニウム臭化物の血漿中濃度は低く、バイオアベイラビリティを算出できなかった(2.6.4.3.5、2.6.4.3.6、2.6.4.3.9 及び 2.6.4.3.10)。

2つの26週間反復投与試験(2.6.6.3.2.1.5 及び 2.6.6.3.2.1.6)で、ラットにアクリジニウム臭化物(2 mg/kg/day)を吸入投与したところ、肺への分布量は投与量の約14%(投与後15分)及び1~2%(投与後24時間)であった。静脈内投与時の血漿中濃度とは対照的に、2つの主要代謝物の肺中濃度は低かった(アクリジニウム臭化物の約1/30)。BALF中に回収されたアクリジニウム臭化物の量から、投与量の約10%が投与後5時間以上経ても肺内に残ることが示唆された。吸入投与後のBALF中の2つの主要代謝物はアクリジニウム臭化物と比較して少なかった。投与開始から1又は6箇月後でも肺内のアクリジニウム臭化物濃度は変化しなかったため、長期間反復投与しても肺に蓄積しないことが示唆された。また、肺組織及びBALF中のアクリジニウム臭化物濃度は、投与後徐々に低下していることからも蓄積しないと考えられた。これらの結果からアクリジニウム臭化物は吸入投与後に肺胞で速やかに吸収され、肺内に沈着した残りは緩徐に吸収されることが示された。

表 2.4.3-1 マウス、ラット、イヌ及びヒトのアクリジニウム臭化物、LAS34823 及び LAS34850 の全身曝露量(単回投与試験、LC-MS/MS により測定)

Species	Route of administration	Dose (mg/kg)	Aclidinium bromide				LAS34823				LAS34850				Study No.	
			C _{max} (ng/mL)		AUC ₀₋₂₄ (ng·h/mL)		C _{max} (ng/mL)		AUC ₀₋₂₄ (ng·h/mL)		C _{max} (ng/mL)		AUC ₀₋₂₄ (ng·h/mL)			
			Male	Female	Male	Female	Male	Female	Male	Female	Male	Female	Male	Female		
Mouse	Oral : single dose	500	28	52.6	206	624	13.4	20.1	108	252	21792	24280	240991	258810	B.34273.31	
		1000	6.33	10.4	53.3	168	14.2	11.1	103	180	38795	43528	360378	396058		
		2000	229	146	1991	1562	94.7	57.6	869	699	41578	20421	452929	217880		
Rat	Intravenous : radioactive single dose	1	89.2	103.5	61.4	61.9	75.8	89.9	62.0	82.6	222.4	221.3	345.9	291.2	AML/05	
Rat	Inhalation : single dose	0.2	2.38	-	2.90 ^a	-	0.902	-	1.29 ^a	-	17.1	-	35.1 ^a	-	B.34273.13	
		2.0	18.0	-	24.0 ^a	-	5.87	-	9.51 ^a	-	101	-	176 ^a	-		
Dog	Intravenous : radioactive single dose	1	25.4	33.7	4.0	3.95	412.7	397.6	147.7	127.7	2088.5	1797.0	3421.6	3420.3	AML/06	
Human ^b	Inhalation	400 μg	0.224		0.964		0.301		3.96		4.61		79.0		KRPAB1102-D 202	

a : AUC₀₋₂

b : アクリジニウム臭化物の C_{max} : 2.7.2.2.2.1、表 2.7.2.2-3 参照、AUC : 2.7.2.2.2.1、表 2.7.2.2-3 の AUC_{t,ss} を一日投与量(800 μg)に換算、LAS34823 の C_{max} : 2.7.2.2.2.1、表 2.7.2.2-5 参照、LAS34823 の AUC : LAS34823 : 2.7.2.2.2.1、表 2.7.2.2-5 の AUC_{t,ss} を 1 日投与量(800 μg)に換算、LAS34850 の C_{max} : 2.7.2.2.2.1、表 2.7.2.2-7 参照、LAS34850 の AUC : 2.7.2.2.2.1、表 2.7.2.2-7 の AUC_{t,ss} を一日投与量(800 μg)に換算

2.4.3.3 分布

ラットに [¹⁴C]-アクリジニウム臭化物を 1 mg/kg の用量で単回静脈内、経口、又は気管内投与後の組織分布を検討した。静脈内投与後の放射能は多くの組織に広範に分布し、膀胱、肺臓、腎臓及び消化管で高濃度が検出されたが、脳内の放射能濃度は低かった。放射能濃度の最高値は投与後 0.25 時間に観察され、投与後 48 時間には全組織で放射能濃度が大きく低下し、投与後 72 時間までに検出下限付近(0.001 μg equiv./g wet tissue)又は検出下限未満となった(表 2.6.4.4-1 及び表 2.6.4.4-2)。単回経口投与後は放射能の吸収が少なく、消化管の放射能濃度が最も高かった。投与後 24 時間では検出下限付近又は検出下限未満に低下した。単回気管内投与後の放射能の分布は、経口投与時と同様であった。雌雄白色ラット、雄有色ラット、妊娠ラット及び非妊娠ラットの間で放射能の分布に顕著な違いは認められなかった。また全身オートラジオグラフィーで観察された放射能の全身分布と、摘出法で測定された分布試験結果はほぼ一致し、測定したいずれの組織でも特異な分布又は蓄積の徴候は認められなかった(2.6.4.4.1 及び 2.6.4.4.2)。

妊娠ラットを用いて [¹⁴C]-アクリジニウム臭化物の胎盤通過を評価したところ、胎児では検出下限付近又は検出下限未満であり、単回静脈内投与した場合に胎児への曝露はわずかであることが示唆された。授乳期の母動物に静脈内投与したところ、新生児は授乳により薬物由来放射能の曝露を受けるが、投与後 24 時間までに血漿中濃度より低くなった。アクリジニウム臭化物の母乳への移行が認められたため、授乳中のアクリジニウム臭化物の使用は、子供への母乳栄養のベネフィットと母親への長期治療のベネフィットを考慮して判断しなければならない。しかしながらアクリジニウム臭化物は経口投与されても消化管からの吸収率が低いため、全身作用を示す可能性は低いと考えられた(2.6.4.4.1 及び 2.6.4.4.2)。

さらに、雄有色ラットに [¹⁴C]-アクリジニウム臭化物を静脈内投与した後の組織分布を検討した結果(表 2.6.4.4-3)、眼及び有色皮膚の放射能濃度は低く、アクリジニウム臭化物とメラニンとの親和性は低いと考えられた(2.6.4.4.3)。

マウス、ラット、ウサギ、イヌ及びヒト血漿を用いて、 [¹⁴C]-アクリジニウム臭化物の *in vitro* タンパク結合を検討したところ、[glycolyl-U-¹⁴C]-アクリジニウム臭化物のタンパク結合率は 66~87%、[phenyl-U-¹⁴C]-アクリジニウム臭化物は 12~26% であった。アクリジニウム臭化物はインキュベーション中に加水分解されたため、これらの結果は LAS34823 が 12~26%、及び LAS34850 が 66~87% の血漿タンパク結合率であることを示した。これらの化合物は血漿中でアルブミン及び α_1 酸性糖タンパクの両者と結合したと考えられるが、LAS34823 とアルブミンの結合は LAS34850 とアルブミンの結合に比べて非常に弱かった(表 2.6.4.4-6)。代謝物の血漿タンパク結合率は、動物種間(ラット、マウス、ウサギ、イヌ及びヒト)で差異が小さかった(2.6.4.4.3)。

2.4.3.4 代謝

2.4.3.4.1 血漿中の安定性

ラット、モルモット、イヌ及びヒト血漿中のアクリジニウム臭化物、イプラトロピウム臭化物、チオトロピウム臭化物及びグリコピロニウム臭化物の安定性に関して *in vitro* で検討した結果、全動物種でアクリジニウムが最も不安定な化合物であり、ヒト、ラット、モルモット及びイヌ血漿中の消失半減期はそれぞれ 2.4、11.7、38 及び 1.8 分であった(表 2.6.4.5-6 及び表 2.6.4.5-7)。アクリジニウム臭化物は吸入投与されると薬効部位である肺に到達し、薬理作用を発揮する。その後、血漿中へと移行し全身循環するが、上述のように血漿中でアクリジニウム臭化物は不安定であり、速やかに LAS34823 及び LAS34850 へ加水分解する。これらの代謝物の薬理活性は低いことから(2.4.2 及び 2.4.4)、アクリジニウム臭化物投与後の全身作用が少なかつた結果と相關していると考

えられた(2.4.4)。

In vitro でアクリジニウム臭化物の酵素的加水分解に関するヒトエステラーゼを同定する試験を実施した結果、LAS34823 及び LAS34850 への加水分解は非酵素的及び酵素的に進行することが示された。リン酸緩衝液(pH 7.4)中、37°C でアクリジニウム臭化物の半減期は 1.2 時間であった。アクリジニウム臭化物の酵素的加水分解に関する主要な酵素は、ヒト血漿中に主に局在する butyrylcholinesterase(BuChE)であった。CYP450 はアクリジニウム臭化物の加水分解には関与せず、ヒト肝臓及び肺細胞画分による加水分解は、ヒト血漿中より進行が遅かった(表 2.6.4.5-3)。

In vitro 及び *in vivo* 試験によってアクリジニウム臭化物の代謝プロファイルを評価した結果を以下に示す。

2.4.3.4.2 *In vitro* 代謝

マウス、ラット、ウサギ、イヌ及びヒトの肝ミクロソーム並びにヒト肺ミクロソームを用いて、 $[^{14}\text{C}]$ -アクリジニウム臭化物の *in vitro* 代謝を比較した。その結果、アクリジニウム臭化物の主要な代謝経路は LAS34823(アルコール代謝物)及び LAS34850(カルボン酸代謝物)を生ずる加水分解であった。他に微量のアクリジニウム臭化物及び LAS34823 のヒドロキシ体などを生じる酸化的経路も認められた(2.6.4.5.1、2.6.4.5.2 及び 2.6.4.5.3)。ヒト肺ミクロソームを用いた試験では、LAS34823 及び LAS34850 のみが代謝物として検出された(2.6.4.5.1)。

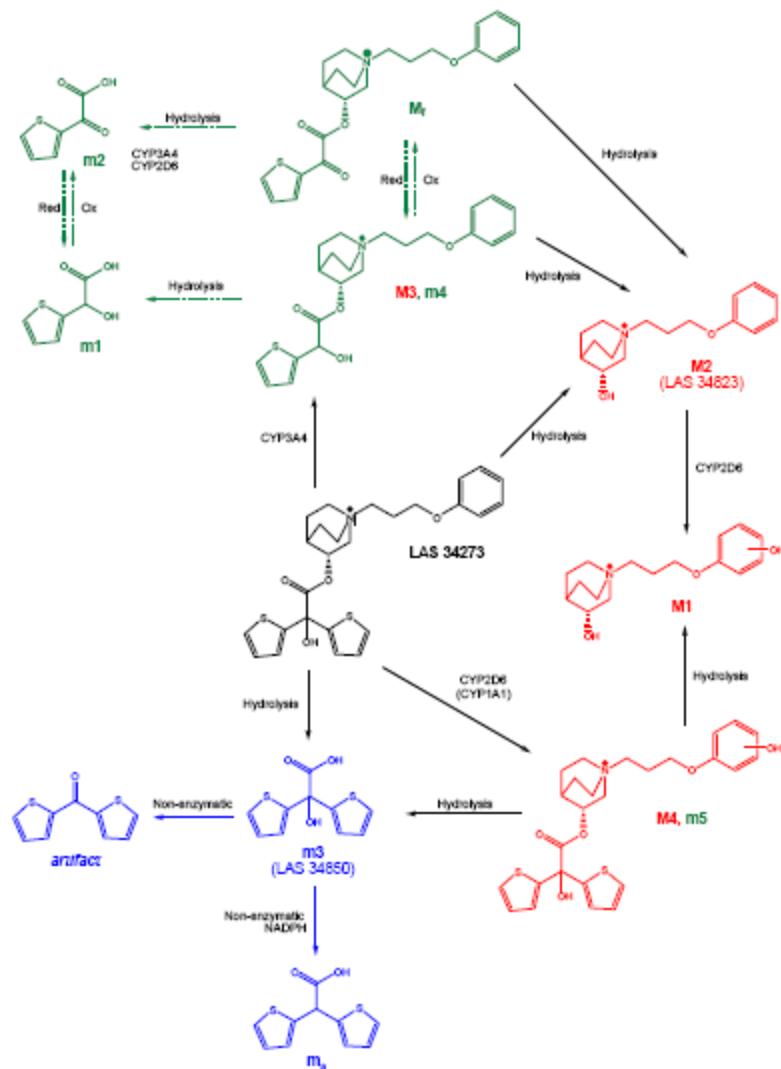
ヒト肝ミクロソームによる [phenyl-U- ^{14}C]-アクリジニウム臭化物の主要代謝物は LAS34823(M2)であったが、主に非酵素的な加水分解により生成した。他に M3(thiophene 環が脱離)及び M4(phenyl 環のヒドロキシ化)の 2 つの代謝物が検出されたが、LAS34823 より少量であった。M3 及び M4 の生成は両者とも NADPH 依存的であり、それぞれ主に CYP3A4 及び CYP2D6 によって生じることが示唆された。ヒト肝ミクロソームでは、 $[^{14}\text{C}]$ -LAS34823 は主に CYP2D6 を介してヒドロキシ体(M1)へと代謝されることが明らかとなった(2.6.4.5.2)。M1 及び M4 の化学構造はマススペクトル及び $^1\text{H-NMR}$ 測定によって明らかにされ、それぞれ LAS34823 及びアクリジニウム臭化物の phenyl 基の *p*-位がヒドロキシ化された代謝物であることが明らかになった(2.6.4.5.4)。

ヒト肝ミクロソームによる [glycolyl-U- ^{14}C]-アクリジニウム臭化物の主要代謝物は LAS34850(m3)であり、エステル結合が加水分解されて生成した。また、m4 及び m5 の 2 つの微量代謝物も認められた。これらは[phenyl-U- ^{14}C]-アクリジニウム臭化物のインキュベーション時にも認められた M4 及び M5 とそれぞれ一致した。さらに、2 つの thiophene 環を含む glycol 部位が関わる代謝、及びその後のエステル結合の加水分解も観察された。極性代謝物の m1 及び m2 は、それぞれ hydroxyl-2-thienylacetic acid 及び 2-thiopheneglyoxylic acid と同定された。 $[^{14}\text{C}]$ -LAS34850 はヒト肝ミクロソームでは代謝されなかった。NADPH に依存してアクリジニウム臭化物から生じる他の微量代謝物が検出され、分子内の glycol 部位と quinuclidinol 部位の両者が関わる代謝経路の存在が示唆された(2.6.4.5.2 及び 2.6.4.5.3)。

ラット、マウス、イヌ、ウサギ及びヒトの肝ミクロソーム存在下でのアクリジニウム臭化物の *in vitro* 代謝試験から、ヒトを含む全動物種で代謝経路は同様であった(2.6.4.5.3)。

各動物種における *in vitro* 肝ミクロソームでの代謝経路を図 2.4.3-1 に示す。

図 2.4.3-1 マウス、ラット、ウサギ、イヌ及びヒトの肝ミクロソームでのアクリジニウム臭化物の代謝経路



ヒト肝及びAroclor-1254誘導ラット肝S9画分による *in vitro* 代謝、及びタンパクとの共有結合の検討では、アクリジニウム臭化物は非酵素的及び酵素的に LAS34823 及び LAS34850 へ加水分解され、いずれの種の代謝経路も同様であった。試験した全条件下でタンパクと共有結合したアクリジニウム臭化物の割合は少なく(0.15%未満)、[phenyl-U-¹⁴C]-アクリジニウム臭化物及び[glycolyl-U-¹⁴C]-アクリジニウム臭化物を NADPH 存在下でインキュベーションした際、両者に顕著な違いはなかった。しかし、Aroclor-1254 誘導ラット肝 S9 画分を用いた方がタンパクと共有結合したアクリジニウム臭化物の割合がわずかに高かった(表 2.6.4.5-1)。

ヒト肝ミクロソームとの共有結合に関する検討では、[glycolyl-U-¹⁴C]-アクリジニウム臭化物及び[phenyl-U-¹⁴C]-アクリジニウム臭化物(20 μmol/L)並びに [¹⁴C]-LAS34850 は肝ミクロソームタンパクと共有結合した(それぞれ 3045、2288 及び 504 pmol equiv./mg protein、総放射能の 9.3、4.6 及び 1.1%、表 2.6.4.5-2)。^{[14]C]-LAS34823 とミクロソームタンパクとの共有結合は認められなかった。タンパクとの共有結合は NADPH に依存し、主に CYP3A4 及び CYP2D6 が関与した。ヒト肝ミクロソームを用いた試験で、トラップ剤としてグルタチオン(GSH、5 mmol/L)を添加した結果、[glycolyl-U-¹⁴C]-アクリジニウム臭化物、[phenyl-U-¹⁴C]-アクリジニウム臭化物及び^{[14]C]-LAS34850}}

がそれぞれ 83%、75%及び 95%減少した。分子内の thiophene 環の 1 つが GSH と結合し、アクリジニウム臭化物及びヒドロキシ体の GSH 抱合体が生成すると考えられた。

マウス、ラット、ウサギ、イヌ及びヒトの肝細胞を用いて、[glycolyl-U-¹⁴C]-アクリジニウム臭化物及び[phenyl-U-¹⁴C]-アクリジニウム臭化物(1 μmol/L)のタンパクとの共有結合及び代謝プロファイルに関する *in vitro* 代謝試験を実施した。その結果、タンパクと共に結合した割合は総放射能の 2%未満であり、動物種間に違いはみられなかった。GSH 抱合体の形成された割合は少なく、全動物種で同様であった。ヒト肝細胞によるアクリジニウム臭化物の代謝プロファイルは、同様の条件下で他の動物種で得られた結果と類似していた。ヒト肝細胞により [¹⁴C]-LAS34850 は代謝されず、[¹⁴C]-LAS34823 は phenyl 基の *p*-ヒドロキシ体へと代謝された(2.6.4.5.7)。

これらの結果は、チオトロピウム臭化物で報告されているように^{3), 4)}、アクリジニウム臭化物は *in vitro* でミクロソームタンパクと共に結合する反応性代謝物を生成することにより説明できる。しかし、主要な血漿中代謝物である LAS34850 が生体内で活性化されにくく、LAS34823 はミクロソームタンパクと共に結合しないため、アクリジニウム臭化物由来物質が生体内で共有結合する可能性は低いと考えられる。

ラット及びヒトの肝以外の組織由来の細胞画分での *in vitro* 安定性を検討したところ、ラット及びヒトの肺、小腸及び腎の細胞画分ではアクリジニウム臭化物の代謝にエステラーゼを介した加水分解の関与は低いことが示された。ヒト小腸ミクロソームでは NADPH 依存性の代謝が認められ、喫煙者及び非喫煙者の肺細胞画分ではアクリジニウム臭化物の代謝は同様であった(2.6.4.5.9)。

2.4.3.4.3 *In vivo* 代謝

ラット及びイヌに [¹⁴C]-アクリジニウム臭化物を静脈内、経口又は気管内投与し、代謝物プロファイルを検討した。血漿及び尿中に検出された主要な放射性成分は LAS34823 及び LAS34850 であり、*in vitro* 試験の結果と同様であった(図 2.6.4.5-8、図 2.6.4.5-9、図 2.6.4.5-11 及び図 2.6.4.5-12)。マウス及び妊娠ウサギにアクリジニウム臭化物を静脈内投与した後の代謝を検討したところ、代謝プロファイルはラット及びイヌと同様の結果が得られた(図 2.6.4.5-7 及び図 2.6.4.5-10)。

ラット及びイヌの尿中に 2 つの微量代謝物が検出され、LC-MS/MS によって LAS34823 のモノヒドロキシ体及び LAS34823 モノヒドロキシ体のグルクロロン酸抱合体と同定された。LC-MS/MS 分析で LAS34823 のモノヒドロキシ体の保持時間及びマススペクトルは、LAS188638(LAS34823 のフェニル基の *p*-位がヒドロキシ化された代謝物)と一致した(2.6.4.5.13 及び 2.6.4.5.16)。

ヒトに吸入又は静脈内投与したとき、アクリジニウム臭化物は非酵素的及び酵素的に速やかに加水分解した(2.5.3.1.3)。アクリジニウム臭化物はリン酸緩衝液(pH 7.4、37°C)中で非酵素的に加水分解する際の半減期は 1.2 時間であるが、*in vivo* の血漿中では butyrylcholinesterase(BuChE)による酵素的加水分解が起こるため、半減期は短くなる。投与されたアクリジニウム臭化物のほぼすべてが加水分解によって主要代謝物である LAS34823 及び LAS34850 に変換した。加水分解によって生じた LAS34823 の約半分が *p*-ヒドロキシ LAS34823 として排泄され、残りは LAS34823 として排泄された。2 つの微量な代謝物(2-thiopheneglyoxylic acid 及び LAS34850 の還元型)も認められた。ヒトの *in vivo* 代謝プロファイルはラット及びイヌに類似していた(図 2.7.2.2-2、図 2.6.4.5-8、図 2.6.4.5-9、図 2.6.4.5-11 及び図 2.6.4.5-12)。

In vivo では、ラット及びイヌに [glycolyl-U-¹⁴C]-アクリジニウム臭化物及び[phenyl-U-¹⁴C]-アクリジニウム臭化物を静脈内、経口、又は吸入投与した後に、グルタチオン(GSH)付加体又はその誘導体である cysteinylglycine、cysteine、N-acetylcysteine 及び mercapturic acid などは検出されなかつた(2.6.4.5.13、2.6.4.5.14、2.6.4.5.16 及び 2.6.4.5.17)。これらの結果から *in vivo* では反応性代謝物の形成はわずかであることが示唆された。CYP450 分子種 3A4 及び 2D6 のヒト肺での含有量は、ヒ

ト肝の 1/10 以下である^{5), 6), 7)}。このため、ヒト肺で形成される反応性代謝物の量は、ヒト肝で形成される量より少ないと考えられる。ヒト肝のグルタチオン転移酵素活性部位の濃度は約 0.2 mmol/L、肝の通常の GSH の含有量は 5 mmol/L である⁸⁾。同様に、ヒト下気道の上皮細胞被覆液(ELF)中には GSH が高濃度に含まれる(0.2~0.4 mmol/L)⁹⁾⁻¹²⁾。したがって、反応性の薬剤及び代謝物は、その反応性成分の総量が GSH 及びグルタチオン転移酵素の総量を上回らない限り、速やかに不活性化されると考えられる。

アクリジニウム臭化物の臨床用量は 400 μg 1 日 2 回であり、アクリジニウム臭化物、LAS34823 及び LAS34850 の C_{max} は低いことから、*in vitro* で認められたタンパクとの共有結合がヒトにおける安全性に影響を及ぼすとは考えにくい。

結論として、*in vitro* 及び *in vivo* でのアクリジニウム臭化物の主要な代謝経路は加水分解であり、試験に用いた全ての動物種で同様の結果であった。

2.4.3.5 排泄

マウス、ラット、妊娠ウサギ及びイヌを用いてマスバランスを検討した。単回静脈内、経口又は気管内投与後に、放射性標識アクリジニウム臭化物は速やかに非酵素的及び酵素的加水分解を受け、放射能の 70%が投与後 48 時間以内に排泄された(表 2.4.3-2)。ラットにアクリジニウム臭化物を静脈内投与したところ、LAS34850 は主に尿中排泄され、LAS34823 は主に糞中排泄された。ラットに経口投与したところ、排泄された総放射能([phenyl-U-¹⁴C]-アクリジニウム臭化物)の 90% 以上がアクリジニウム臭化物及び LAS34823 として糞中に排泄された。この結果より、経口投与後に加水分解されなかったアクリジニウム臭化物は、他の 4 級アンモニウム塩と同様に、消化管から吸収されにくいことが考えられた^{3), 13)}。

[glycolyl-U-¹⁴C]-アクリジニウム臭化物の静脈内投与後は主に尿中に、経口投与後には尿中と糞中に同程度排泄された。[glycolyl-U-¹⁴C]-アクリジニウム臭化物を経口投与した場合、消化管で加水分解されて放射性標識された LAS34850 を生成すると考えられた。LAS34850 は良好に吸収され、血漿中濃度はアクリジニウム臭化物又は LAS34823 より高く、尿中に排泄された。

マウス、ラット、妊娠ウサギ及びイヌに [¹⁴C]-アクリジニウム臭化物を静脈内投与した時の排泄試験の結果から、glycolyl 基標識代謝物(大部分が LAS34850)は全動物種で主に尿中に排泄されたが、phenyl 基標識代謝物(LAS34823、LAS34823 の *p*-ヒドロキシ体及び LAS34823 *p*-ヒドロキシ体のグルクロロン酸抱合体)はマウス及びイヌで主に尿中に、ラットで主に糞中に、ウサギでは尿及び糞中に同程度排泄された。

男性健康被験者に [phenyl-U-¹⁴C]-アクリジニウム臭化物を 400 μg 静脈内投与した場合、投与量(総放射能)の約 65%が尿中に、約 33%が糞中排泄された。一方、[glycolyl-U-¹⁴C]-アクリジニウム臭化物を投与した場合、投与量(総放射能)の約 54%が尿中に、約 20%が糞中排泄された。ヒトではいずれの標識体を用いた場合においても尿中に多く排泄された(表 2.4.3-2)。

表 2.4.3-2 マウス、ラット、妊娠ウサギ、イヌ及びヒトのアクリジニウム臭化物投与後 7 日間の排泄率の比較 (1/2)

試験	サンプル	静脈内投与		経口投与 雄
		雄	雌	
[phenyl-U- ¹⁴ C]-aclidinium bromide を投与したマウスの ME 試験 AML/16	尿	62.0	47.3	
	糞	30.5	33.5	
	ケージ洗浄水及び沈殿物	3.5	2.6	
	呼気	0.2	0.08	
	屍体	0.1	0.3	
	合計	96.4	83.8	
[glycolyl-U- ¹⁴ C]-aclidinium bromide を投与したマウスの ME 試験 AML/16	尿	60.3	36.3	
	糞	23.9	39.2	
	ケージ洗浄水及び沈殿物	7.6	4.7	
	呼気	1.8	2.7	
	屍体	0.5	0.7	
	合計	94.1	83.6	
[phenyl-U- ¹⁴ C]-aclidinium bromide を投与したラットの ADME 試験 AML/05	尿(+ケージ洗浄水)	33.4	24.9	5.0
	糞	68.1	70.2	95.4
	呼気	nd	nd	nd
	屍体	0.7	0.6	nd
	合計	102.2	95.7	100.4
[glycolyl-U- ¹⁴ C]-aclidinium bromide を投与したラットの ADME 試験 AML/07	尿(+ケージ洗浄水)	53.0	57.5	43.4
	糞	34.0	31.8	49.4
	呼気	1.8	1.7	0.6
	屍体	2.5	1.5	0.7
	合計	91.3	92.6	94.1
[phenyl-U- ¹⁴ C]-aclidinium bromide を投与した妊娠ウサギの ME 試験 AML/15	尿		32.9	
	糞		35.5	
	ケージ洗浄水及び沈殿物		13.8	
	合計		82.1	
[glycolyl-U- ¹⁴ C]-aclidinium bromide を投与した妊娠ウサギの ME 試験 AML/15	尿		49.4	
	糞		7.0	
	ケージ洗浄水及び沈殿物		27.9	
	合計		84.2	

Results expressed as % administered dose

表 2.4.3-2 マウス、ラット、妊娠ウサギ、イヌ及びヒトのアクリジニウム臭化物投与後 7 日間の排泄率の比較 (2/2)

試験	サンプル	静脈内投与		気管内投与	
		雄	雌	雄	雌
[phenyl-U- ¹⁴ C]-aclidinium bromide を投与したイヌの ADME 試験 AML/06	尿	77.8	80.7	17.4	11.0
	糞	8.6	11.3	64.6	54.8
	ケージ洗浄水	5.5	3.2	1.4	0.8
	合計	91.8	95.2	83.3	66.5
[glycolyl-U- ¹⁴ C]-aclidinium bromide を投与したイヌの ADME 試験 AML/08	尿	70.0	69.4	72.7	55.5
	糞	3.7	8.0	7.8	13.6
	ケージ洗浄水	6.8	2.6	3.3	1.7
	合計	80.4	79.9	83.78	70.8
[phenyl-U- ¹⁴ C]-aclidinium bromide を投与したヒトの ADME 試験 M/34273/04	尿	64.7			
	糞	32.5			
	合計	97.3			
[glycolyl-U- ¹⁴ C]-aclidinium bromide を投与したヒトの ADME 試験 M/34273/04	尿	54.1			
	糞	19.9			
	合計	74.0			

Results expressed as % administered dose

2.4.3.6 薬物動態学的薬物相互作用

In vitro でアクリジニウム臭化物、LAS34823 及び LAS34850 は、ヒト CYP1A2、2A6、2B6、2C8、2C9、2C19、2E1、3A4/5 及び 4A9/11 に対する阻害をほとんど示さなかった。アクリジニウム臭化物及び LAS34823 は、ヒト CYP2D6 活性を競合的に阻害した(表 2.6.4.5-8)。アクリジニウム臭化物及びその代謝物の LAS34823 と LAS34850 の各種ヒトエステラーゼに対する阻害を評価したところ、アクリジニウム臭化物は acetylcholinesterase (AChE)及び BuChE を競合的に阻害し、carboxylesterase (CbE)をわずかに阻害したが、paraoxonase 及び arylesterase を阻害しなかった。LAS34823 は AChE 及び BuChE をわずかに阻害したが、CbE、paraoxonase 及び arylesterase を阻害せず、一方 LAS34850 はいずれのエステラーゼ活性に対しても影響を与えるなかった(表 2.6.4.5-9)。

臨床用量である 400 μg 投与時のアクリジニウム臭化物、LAS34823 及び LAS34850 の血漿中濃度は低いため、ヒト CYP450 又はエステラーゼ活性に対して影響を与えないと考えられた。

培養ヒト肝細胞を用いて、アクリジニウム臭化物、LAS34823 及び LAS34850 の CYP450 誘導能を検討したところ酵素活性にはほとんど影響を与えるなかった(2.6.4.5.20)。

Caco-2 細胞を用いて、アクリジニウム臭化物、LAS34823 及び LAS34850 が P-gp の基質又は阻害剤として作用する可能性を検討した。P-gp の基質としての活性を検討した結果、アクリジニウム臭化物及び LAS34850 は P-gp の基質にはならず、LAS34823 は P-gp の基質となる可能性が低いことが示された(2.6.4.5.21)。したがって、P-gp はアクリジニウム臭化物又はその代謝物のヒト体内動態に影響を与えないと考えられた。また、アクリジニウム臭化物、LAS34823 及び LAS34850 は P-gp を阻害しないことが明らかになり、P-gp の基質となる薬物が併用されても、アクリジニウム臭化物と 2 つの主要代謝物は併用された薬物の体内動態に影響を与えないと考えられた(2.6.4.5.22)。

2.4.4 毒性試験

マウス、ラット、イヌ、ウサギ及びモルモットを用いて、吸入、経口、皮下及び静脈内投与毒性試験を実施した。吸入毒性試験では、アクリジニウム臭化物の賦形剤として乳糖を使用した。毒性用量では、主に抗コリン性の薬理作用の延長による所見として、心拍数増加、散瞳、摂餌量の減少、気道の組織変化、涙液分泌低下、耳下腺の組織変化、唾液分泌の抑制及び食道食物残留が認められた。これらの変化は他の抗コリン薬であるチオトロピウム臭化物やトルテロジンなどでも認められている^{14), 15)}。唾液分泌に対する作用に関してはM₃ムスカリン受容体のノックアウトマウスモデルで確認されている¹⁶⁾⁻¹⁹⁾。

2.4.4.1 単回投与毒性(2.6.6.2)

げつ歯類を用いた単回経口投与毒性試験では、この投与経路によるアクリジニウム臭化物の毒性が低いことを示したが、高用量投与時に散瞳などの抗コリン作用の一般状態観察所見が認められた(2.6.6.2.1.1.1 及び 2.6.6.2.2.2.1)。ラットを用いた単回吸入及び静脈内投与毒性試験では、有害な一般状態観察所見はほとんどみられなかった(2.6.6.2.2.1.1 及び 2.6.6.2.2.3.1)。

表 2.4.4-1 単回投与毒性試験の概要表

動物種/系統	投与方法	観察された最大非致死量(mg/kg)	概算致死量(mg/kg)	試験番号
マウス/ Swiss CD1	強制経口	雄 2000 雌は確定せず	> 2000	T.34273.03
ラット/ Sprague Dawley	単回 1 時間持続鼻部吸入 (アクリジニウム臭化物のみ；乳糖なし)	雄 3.7 雌 3.8	雄 > 3.7 雌 > 3.8	■762006
ラット/ Sprague Dawley	強制経口	2000	> 2000	T.34273.04
ラット/ Wistar	静脈内	1.2	> 1.2	■A25907

2.4.4.2 反復投与毒性(2.6.6.3)

2.4.4.2.1 反復吸入投与毒性試験の結果

ラットを用いた 14 日間及び 28 日間吸入投与毒性試験では、呼吸器系への作用が認められた(2.6.6.3.2.1.1 及び 2.6.6.3.2.1.2)。14 日間試験では、鼻腔のわずかな杯細胞過形成及び軽度の刺激性を示す炎症が観察された。28 日間試験ではハーダー腺にアクリジニウム臭化物の薬理作用と関連する病理組織学的所見が認められたが、ハーダー腺はヒトにはないため、この所見はヒトのリスク評価に直接関係しないと考えられた。ハーダー腺の所見は、M₃受容体拮抗薬によって唾液腺の分泌作用が低下したことと関連すると考えられた。抗コリン薬はラットで管腔の拡張や色素沈着などの形態変化を誘発し、分泌物の放出を抑制することが知られているため、ハーダー腺の所見は、これに関連した変化であると類推できる¹⁶⁾。鼻腔及び鼻咽頭の杯細胞過形成並びに炎症を伴わない肺胞マクロファージが観察されたが、これらの毒性学的懸念はほとんどないと考えられた。

ウサギを用いた眼刺激性試験及びマウスを用いた局所リンパ節試験では軽度の刺激性が認められたため、吸入試験で観察された軽度の気道刺激症状は投与による影響であると推測できた(2.6.6.7.2 及び 2.6.6.8.1.3)。

3 箇月以上の反復吸入投与毒性試験として、ラットを用いた 4 試験(6 箇月間(26 週間) ; ■810797、■845323、■845322 及び ■848358)、イヌ(39 週間 ; ■810808)及びマウス(3 箇

月間(13週間) ; [REDACTED] 841849)を用いた各1試験を実施した。ラット及びイヌ試験で用いた用量は、短期の反復吸入投与毒性試験の結果に基づいて設定した。イヌでは、高用量群(1及び2 mg/kg/day)で心拍数増加並びにそれに対応する PQ 及び QT 間隔短縮などの可逆的な心血管系への影響が観察された(2.6.6.3.3.1.2 及び 2.6.6.3.3.1.3)。しかし、影響がみられたアクリジニウム臭化物の用量及び全身曝露量は、臨床用量より明らかに高値であった。

イヌに 0、0.03、0.22 及び 1.6/0.8 mg/kg/day を投与した 39 週間吸入投与毒性試験(2.6.6.3.3.1.4)では、高用量群で被験物質との因果関係が疑われた 2 頭の死亡及び過度の薬理作用を示唆する様々な所見が認められたため、試験 7 週目に用量を減量した(1.6 mg/kg/day を 0.8 mg/kg/day)。当該試験の所見の大部分はアクリジニウム臭化物の可逆的な薬理作用によるものと考えられ、心拍数の増加や涙液産生減少などが観察された。NOAEL は 0.225 mg/kg/day(目標投与量 0.22 mg/kg/day)と推定された。有害作用は高用量群(1.6/0.8 mg/kg/day)でのみ観察された。したがって、長期吸入投与毒性試験の結果では臨床に関連した安全性に対する懸念はなく、心血管系の安全性に関する臨床試験では当該試験でみられた変化が発現していないことと一致している(2.5.5.5)。

2.4.4.2.2 重要な反復投与毒性試験の結果に対する定量的リスク評価

げっ歯類及び非げっ歯類を用いた重要な長期吸入毒性試験の NOAEL でのアクリジニウム臭化物の曝露量を臨床用量(400 μg 1 日 2 回)の吸入投与によって得られたヒト曝露量と比較し、安全域を算出した(表 2.4.4-2)。試験で観察された主に薬理学的に関連のある所見を考慮すると、許容できる安全域が得られた。

表 2.4.4-2 反復投与毒性試験 NOAEL 及びヒトにアクリジニウム臭化物を臨床用量(400 μg 1 日 2 回)で投与した際の曝露量との比較

試験種 (試験番号)	NOAEL (mg/kg/day)	Aclidinium bromide ^a C _{max} (ng/mL) AUC(ng·h/mL)	ヒト曝露量 ^b との比較
ラット 6 箇月間反復吸入投与試験(II) [REDACTED] 845323、TK 報告書 : B.34273.15)	0.035	C _{max} : 1.11 AUC : 6.72	5 × 7 ×
イヌ 39 週間反復吸入投与試験 [REDACTED] 810808、TK 報告書 : B.34273.07)	0.225	C _{max} : 3.51 AUC : 7.61	16 × 7.9 ×

a : 雄、雌及び投与日の全体平均値

b : C_{max} : 2.7.2.2.2.1、表 2.7.2.2-3 参照、AUC : 2.7.2.2.2.1、表 2.7.2.2-3 の AUC_{T,ss} を一日投与量(800 μg)に換算

2.4.4.2.3 薬理作用に関連したラットの死亡及び肺病変

最初のラット長期(6 箇月間)吸入毒性試験(I)(2.6.6.3.2.1.3)では、予測しなかった少数の死亡がみられた。TK 群も含めて各群 70 匹のうち、0、0.1、0.45 及び 2.0 mg/kg 群の死亡例はそれぞれ 0、1、7 及び 3 匹であった。死亡は主に 2~4 箇月間の投与後に発現した。当該試験での他の主な所見として、肺血管外膜及び肺胞領域に色素含有したマクロファージ及びヘモジデリン沈着が認められた。しかし、これらの変化は死亡を誘発するほど重度ではなく、病理組織学的変化と死亡の間に明確な関係は認められなかった。喉頭及び食道に餌が残留し、肺に出血がみられたことから、おそらくアクリジニウム臭化物の薬理作用のために唾液分泌量が減少し、同時に摂取した固形飼料が喉に詰まった結果、迷走神経反射を介した痙攣が生じ、死亡に至ったものと考えられた。ラット M₃受容体サブタイプは唾液の産生及び分泌に関与すると考えられており¹⁷⁾、アクリジニウム臭化物も唾液分泌を抑制したものと推測されたが、ラットにおいて死亡及び肺病変がみられた

ことから、追加検討を行った。

追加試験として、さらに低用量(0、0.01、0.04、0.08 及び 0.2 mg/kg/day)でラット 6 箇月間反復吸入投与毒性試験(II)([2.6.6.3.2.1.4](#))を実施した。この試験でも、投与開始から 2 箇月後に 0.08 mg/kg 投与群(70 匹中 7 匹)及び 0.2 mg/kg 群(70 匹中 2 匹)に発現率は低く用量依存的ではないが、薬剤と関連があると推定される死亡がみられた。これらの用量群では、前回と同様、喉頭及び食道での飼料残留並びに肺での出血が認められた。0.04 及び 0.01 mg/kg 投与群では、0.04 mg/kg 投与群の雄の体重増加率の軽度の減少以外、死亡又はアクリジニウム臭化物の有害な変化はみられなかつた。NOAEL は 0.035 mg/kg/day(目標投与量 0.04 mg/kg/day)であった。いずれの 6 箇月間試験でも、死亡の前に状態不良を示す変化はみられず、死因を示す明らかな症状又は剖検所見は認められなかつた。追加試験では色素沈着の程度は大幅に軽減されたことから、毒性学的意義は非常に低いと考えられた。

マウス 13 週間反復吸入投与毒性試験([2.6.6.3.1.1.1](#))では、0.6 mg/kg/day(実投与量 0.61 mg/kg/day)までの用量群に薬剤に関連がある死亡は認められなかつたが、最高用量群(2.0 mg/kg/day、実投与量 2.5 mg/kg/day)では死亡の発現率が対照群より高かつた(2.0 mg/kg 群；13%、対照群；8%)。死亡の一部は、首に付けたタグの突出が飲食行動を妨げたためと考えられた。なお、マウスの死亡についても抗コリン作用と関連性が疑われたが、がん原性試験の結果も含め、明らかな因果関係は確認できなかつた。反復吸入投与毒性試験では、投与した全動物種で死亡例がみられたが、イヌ及びマウスの死亡例はラットより非常に高い用量群で認められ、それらの用量はラットで死亡例がみられた最低用量(0.08 mg/kg/day、実投与量 0.082 mg/kg/day)と比較して、イヌ及びマウスでそれぞれ 20 及び 30 倍高かつた。これらの用量を投与した場合、アクリジニウム臭化物の血漿中濃度は、ラットと比較してイヌ及びマウスで C_{max} はそれぞれ 7 及び 3 倍高く、全身曝露量(AUC)はそれぞれ 3 及び 10 倍高かつた。

ラットでみられた死亡の原因を検討する試験を複数実施した。死因は、アクリジニウム臭化物がラットの上気道及び口咽頭に沈着して、過度の抗コリン作用により顕著に唾液分泌が減少し、摂取飼料の嚥下が困難になるためと考えられた。一部の動物で、食塊が口咽頭に留まり気道閉塞を引き起こした可能性もあり、喉頭痙攣を誘発する可能性に加えて、窒息による死亡につながることが推測された。

こうした説明は以下に示す他の試験の結果等からも裏付けられる：

- 死亡は、ラットが最も活動的で餌を摂取する夜間に発生した(試験での状態観察は昼間に行っており、その観察中に死亡はみられなかつた)。
- 長期投与試験では摂水量の増加が認められており([2.6.6.3.2.1.5](#))、これはげっ歯類用飼料を効率的に咀嚼及び嚥下することができないことと一致する。
- 死亡動物の剖検では、一部の動物の食道及び喉頭に飼料様物質が認められた。最初の 6 箇月間吸入試験([2.6.6.3.2.1.3](#))で、死後発見された動物にこのような所見が見つかる割合が低かつた原因是、死亡から剖検時までに自己溶解が進む上、気道内の飼料残留の検出を通常では実施しておらず、観察が不十分であったためと考えられた。また、死亡原因が予測できなかつたため、対応できなかつた。追加の 6 箇月間試験([2.6.6.3.2.1.4](#))では、剖検時の上気道及び食道の観察に特に注意した。
- 下気道で(ヘモジデリン沈着を示唆する)色素含有マクロファージ巣が発現することは、窒息発現を繰り返し、最終的に死亡に至ることと一致した。食塊の嵌入による気道閉塞は、呼吸時の力みにつながり、最終的には肺実質の限局性出血を引き起こしたと考えられた。

アクリジニウム臭化物の毒性発現機序に関するラット 26 週間反復吸入投与毒性試験では、過去に検出された肺病変を検討するため、ラットにアクリジニウム臭化物 0 及び 2.0 mg/kg/day を吸入投与し、月 1 回経時的にラットを剖検した(2.6.6.3.2.1.5)。アクリジニウム臭化物を投与したラットでは、喉頭の扁平上皮化生及び上皮組織崩壊の発現率が上昇し、この組織での刺激性が示唆された。過去の試験でこの所見は可逆的であることが示されており(2.6.6.3.2.1.4)、チオトロピウム臭化物を吸入投与したラットでも同様の所見が観察されている¹⁴⁾。他のラット反復吸入投与毒性試験と同様に、毒性発現の標的器官は肺、ハーダー腺及び耳下腺であった。後者 2 つの器官での所見は文献で報告されており^{16), 17)}、アクリジニウム臭化物の抗コリン作用によるものと考えられた。100 匹中 7 匹で、被験物質投与と関連し、他の試験と同じ原因による死亡が認められた。気管支肺胞洗浄液中の IL-6、TNF- α 、ヒスタミン及び抗 ED1+ 抗体の濃度は、アクリジニウム臭化物を投与しても変化しなかった。これらの所見に加え、他の免疫系又は免疫系関連のパラメータに対する影響がなかったことから、ラットで観察された作用に免疫学的な機序はないことが推察された。

ラット 6 箇月間反復吸入投与毒性試験(2.6.6.3.2.1.4)では、高用量(0.08 及び 0.2 mg/kg/day)で肺胞マクロファージにヘモジデリン沈着が認められた。この病変の程度は軽く、トルテロジンを投与したラットでも同様の変化が観察されている¹⁵⁾。肺胞マクロファージにヘモジデリンが沈着する所見はアクリジニウム臭化物を休薬した動物では認められず、したがってこの作用は可逆的で毒性学的意義は低いと推察された。

もう 1 つのラット 26 週間反復吸入投与毒性試験(2.6.6.3.2.1.6)では、2 つの異なるバッチ(S001R1M1 及び R001)のアクリジニウム臭化物を比較検討した。両バッチとも毒性プロファイルは同等であったため、不純物プロファイルや粒子径などの規格が影響を生じる可能性は低いと判断された。

アクリジニウム臭化物を吸入投与したラットの肺組織中の薬剤濃度を測定した(2.6.6.3.2.1.5 及び 2.6.6.3.2.1.6)。その結果、アクリジニウム臭化物の肺組織中の濃度は血漿中濃度より顕著に高いことが判明した。また、これらの結果はラットの窒息と上気道及び口咽頭におけるアクリジニウム臭化物の局所曝露との関連を示唆するものと考えられた。

ラットにアクリジニウム臭化物 1 mg/kg/day を 26 週間反復皮下投与した毒性試験(2.6.6.3.2.4.3)では、アクリジニウム臭化物及び主要代謝物の血漿中濃度が吸入投与した場合より明らかに高値を示した。この試験で観察されたアクリジニウム臭化物の作用は典型的な抗コリン性の薬理作用であり、他のラット反復投与試験と同様に、散瞳や耳下腺及びハーダー腺の組織学的变化が認められた。薬剤の最終投与月間に 2 匹が死亡し、喉頭に食物の残留が認められた。過去の長期吸入投与毒性試験と同様に、これらの動物は夜間に死亡し、一般状態観察所見は認められなかった。肺の病理組織学的検査から色素沈着した肺胞マクロファージ(2.6.6.3.2.1.4)で可逆的な作用であることが示された)が認められたが、発現率は低く、病変の程度は長期吸入投与毒性試験(2.6.6.3.2.1.3 及び 2.6.6.3.2.1.4)と同様であった。皮下投与試験で得られた全身曝露量(AUC)は、吸入試験で死亡と関連があった最も低い用量群より 20 倍以上高かった。この全身曝露量の違いから、アクリジニウム臭化物の全身曝露量又は最高血漿中濃度に関連して死亡するのではなく、気道での局所曝露が重大な要素となっていることが示唆された。ただし、長期皮下投与毒性試験で死亡例がみられ(最終投与月間で 2 匹のみ)、さらに肺の形態に特徴的な変化(色素沈着したマクロファージ)が観察されたことから、長期吸入又は皮下投与後の死亡の発症機序は同一であることが示唆された。

ラット 26 週間反復皮下投与毒性試験(2.6.6.3.2.4.3)の結果から、吸入投与以外の投与経路でもラットの死亡及び肺病変を再現できることが確認された。そのため、ラット特異的な死亡が抗コリン作用によるという薬理学的根拠をさらに裏付けることを目的として皮下投与探索的試験を 2 試

験追加して実施した。

追加のラット皮下投与探索毒性試験(T.34273.05 及び FD [REDACTED] 1JM)で、アクリジニウム臭化物投与後の摂餌中に窒息が生じることが示された。この結果は、推察した窒息の機序にはほぼ一致していた。1つ目の試験(2.6.6.3.2.4.2)では、ラットにアクリジニウム臭化物 0、5 又は 10 mg/kg/day を 1 日 1 回 28 日間反復皮下投与した。通常の作業時間中にラットの摂餌行動を詳細に観察できるように、9:00 から 16:30 までの給餌環境に慣れさせてから投与を開始した。ラットには給餌前にアクリジニウム臭化物を 1 日 1 回皮下投与した。試験の結果、薬剤の投与開始から 1 週間後にかけて 5 及び 10 mg/kg 投与群のほとんどの動物で食物の嚥下で窒息及び呼吸困難が繰り返し観察されたが、対照群では認められなかった(これらの症状はビデオにて確認された)。投与 4 週目では、昼間の給餌時間に飲水できないようにしたところ、窒息の発現率及び程度が上昇した。高用量群の 1 匹では窒息を繰り返し、また摂餌量及び体重増加率に明らかな減少がみられ、投与 2 週目に切迫屠殺した。肺で観察された病理所見は、肺出血と関連した重度の力みが観察された他のラット試験の所見と一致していた。

並行して実施した 2 つ目の試験(2.6.6.3.2.4.1)では、テレメトリー送信機装着覚醒下ラットにアクリジニウム臭化物 0 又は 2.5 mg/kg を 1 日 2 回 25 日間反復皮下投与した。ラットにはテレメータ送信機を埋め込み、胸腔内圧、心電図、体温及び自発運動などの生理学的パラメータを測定した。この結果、投与開始 1 週間後に胸腔内圧が陽圧及び陰圧の両方向に激しく変動し、窒息及び急性呼吸障害と関連していた。これらの所見は、アクリジニウム臭化物投与群で夜間のみ記録された。シグナルの記録結果と窒息及び呼吸困難の目視観察結果との相関を確認するため、給餌時間を日中に制限した。

投与 4 週目に、24 時間の絶食期間の後、給餌時間を 9:00～17:00 に制限した。また窒息の発生数を増加させるため、飲水を制限した。摂餌中に一部の動物で散発的であるが窒息が繰り返して観察された。これらの窒息及び呼吸困難発現の時刻は、テレメータの記録で胸腔内圧異常が測定された時刻と正確に一致した。2 週間の休薬後、胸腔内圧を再度テレメータにより測定したが、測定結果に変化はみられなかった。したがって、これらの結果から胸腔内圧異常と窒息の関係が確認され、ラットで誘発された窒息は完全に可逆的であることが判明した。

皮下投与探索的試験(T.34273.05 及び FD [REDACTED] 1JM)によって、食塊により口咽頭が閉塞し、結果として重度の力み及び肺間質出血が生じ、一部の個体では窒息のため死亡に至るという発症機序が確認された。一方で、いずれの毒性試験又は安全性薬理試験でも心毒性、不整脈、痙攣、感染、直接的な肺毒性、又はアレルギー反応などの他の死因を示唆するような所見は認められなかった。ラットに対するこの作用は唾液産生を抑制するアクリジニウム臭化物の過剰な薬理作用に起因すると考えられる。以上、ラットにおける変化は、臨床上の安全性に懸念を及ぼす変化ではないと考えられた。

ラットで観察された所見は、チオトロピウム臭化物、イプラトロピウム臭化物、トルテロジンなどの他の抗コリン薬でも認められている^{2), 14), 15)}。ラット反復投与毒性試験では、チオトロピウム臭化物の吸入投与によって唾液分泌が減少したために食道近位部で食物残留が発生し、続けて窒息が発現した¹⁴⁾。トルテロジンの経口投与のラット 13 週間試験では、高用量群(40 mg/kg 投与群)で死亡が認められ、肺では鉄陽性色素含有肺胞マクロファージが認められた。肺胞マクロファージの発現率及び程度の上昇は、トルテロジンのラットがん原性試験で高用量(30 mg/kg 投与群)の雄ラットでも観察された¹⁵⁾。イプラトロピウム臭化物の薬理試験及び毒性試験では、典型的な抗コリン作用性の所見が認められた²⁾。イプラトロピウム臭化物を投与した動物で観察された所見は、散瞳、結膜炎、粘膜乾燥などであった。

2.4.4.2.4 反復経口及び静脈内投与毒性試験の結果

ラット 2 週間及び 4 週間反復経口投与毒性試験では、高用量反復投与群でアクリジニウム臭化物の抗コリン作用による所見(宿便、散瞳など)が観察された([2.6.6.3.2.2.1](#) 及び [2.6.6.3.2.2.2](#))。4 週間反復経口投与毒性試験の NOAEL は最高用量(450 mg/kg/day)であった。ラット 14 日間反復静脈内(ボーラス)投与試験では、全ての用量群(0.06~0.6 mg/kg/day)でアクリジニウム臭化物の薬理作用と関連した散瞳が観察され、NOAEL は最高用量であった([2.6.6.3.2.3.2](#))。当該試験の静脈内投与時の NOAEL に対し、ヒトに 400 μg を 1 日 2 回投与する場合([2.7.2.2.2.1](#))、安全域は AUC を基準として 54 倍となった。

イヌにアクリジニウム臭化物 0、50、100 又は 200 mg/kg/day を 2 週間反復経口投与した結果、投与による影響として、重度の一般状態の異常及び心拍数増加が認められた([2.6.6.3.3.2.1](#))。イヌ 4 週間反復経口投与毒性試験では、アクリジニウム臭化物の忍容性は概ね良好で、死亡例はみられなかった([2.6.6.3.3.2.2](#))。当該試験では心拍数増加及び眼における所見などの薬理作用に関連すると考えられる変化がみられた。NOAEL は 125 mg/kg/day と推察された。イヌ 14 日間反復静脈内投与毒性試験では、全ての用量群でアクリジニウム臭化物の薬理作用と関連する作用が観察され、NOAEL は最高用量の 0.6 mg/kg/day であった([2.6.6.3.3.3.2](#))。当該試験の静脈内投与時の NOAEL に対し、ヒトに 400 μg を 1 日 2 回投与する場合([2.7.2.2.2.1](#))、安全域は AUC を基準として 90 倍となった。

ラット及びイヌのいずれでも、ヒト臨床用量よりも明らかに高い用量でのみ有害な所見が認められ、反復静脈内及び経口投与による毒性学的懸念は低いと考えられた。

2.4.4.3 遺伝毒性([2.6.6.4](#))

遺伝毒性試験の結果から、*in vitro* の細菌を用いる復帰突然変異試験(Ames 試験)及びマウスリンフォーマ試験で、アクリジニウム臭化物は試験及び使用したアクリジニウム臭化物のバッチに依存して、代謝活性化系の存在下で陰性、不確か、又は弱い変異原性を示した。ネズミチフス菌 TA98 株では、代謝活性化系の存在下で、高濃度のアクリジニウム臭化物を用いた場合にコロニー数の増加が認められた。この増加は対照群の約 2 倍であったが、明らかな用量反応性は認められなかった。マウスリンフォーマ試験では明らかな用量反応性はみられず、代謝活性化系の存在下でのみ弱い変異原性が認められた。

使用したアクリジニウム臭化物のバッチの純度とすべての Ames 試験及びマウスリンフォーマ試験結果に相関はなかった([表 2.4.4-3](#))。

表 2.4.4-3 *In vitro* 遺伝毒性試験結果及び使用したアクリジニウム臭化物のバッチの純度との関係

試験種	試験番号	Batch No.	純度 (%)	試験結果
Ames 試験 マウスリンフォーマ試験	[REDACTED] 656100 [REDACTED] 663200	FR-0276-99	99.1	陰性 陰性
Ames 試験 マウスリンフォーマ試験	[REDACTED] AA93FW.503.BTL [REDACTED] AA93FW.704.BTL	T003M001	99.6	陽性 陽性
Ames 試験 TA98 + S9(Non-GLP) マウスリンフォーマ試験 (Non-GLP)	[REDACTED] AA93FW.501.BTL [REDACTED] AA93FW, AB2VH, [REDACTED] AB02VJ.702.BTL	U003R1	99.8	Ames 試験 : 陰性 マウスリンフォーマ 試験 : 陽性
Ames 試験 マウスリンフォーマ試験 (Non-GLP)	[REDACTED] AB02VH.503.BTL [REDACTED] AA93FW, AB2VH, [REDACTED] AB02VJ.702.BTL	MG-0764-47	100.0	陽性 陽性
Ames 試験 マウスリンフォーマ試験 (Non-GLP)	[REDACTED] AB02VJ.503.BTL [REDACTED] AA93FW, AB2VH, [REDACTED] AB02VJ.702.BTL	MG-0805-50	100.0	Ames 試験 : 陰性 マウスリンフォーマ 試験 : 陽性
Ames 試験 TA98 + S9(Non-GLP) マウスリンフォーマ試験 (Non-GLP)	[REDACTED] AA93FW.501.BTL [REDACTED] AA93FW, AB2VH, [REDACTED] AB02VJ.702.BTL	MG-0805-63	100.0	Ames 試験 : 不確か/ 陰性 マウスリンフォーマ 試験 : 陽性

しかし、マウス骨髓小核試験(経口投与 500～2000 mg/kg)及びラット肝臓不定期 DNA 合成(UDS)試験(皮下投与 8 及び 20 mg/kg)で、高用量の全身曝露時にアクリジニウム臭化物は *in vivo* の遺伝毒性を示さなかった(表 2.6.6.4-1 及び表 2.6.6.4-2)。これらの結果に加えて、ラット及びマウスを用いたがん原性試験では性別及び用量に係らず薬剤と関連する腫瘍性病変はみられなかったことから、アクリジニウム臭化物は *in vivo* で遺伝毒性を示さないということが明らかになった。

In vivo 遺伝毒性試験で得られたアクリジニウム臭化物の NOAEL での曝露量を、ヒト曝露量(臨床用量(400 μg 1 日 2 回)の吸入投与による)と比較し、安全域を算出した(表 2.4.4-4)。いずれの用量でも遺伝毒性の徵候はみられず、安全域は非常に広かった。*In vitro* 試験では弱い変異原性がみられたが、適切な *in vivo* 遺伝毒性試験(TK 試験実施)の定性的結果及び定量的評価から、アクリジニウム臭化物は遺伝毒性のリスクを示さないと考えられた。

表 2.4.4-4 *In vivo* 遺伝毒性試験の NOAEL 及びヒトにアクリジニウム臭化物を臨床用量(400 μg 1 日 2 回)で投与した際の曝露量との比較

試験種 (試験番号)	NOAEL (mg/kg/day)	Aclidinium bromide ^a C_{max} (ng/mL) AUC(ng·h/mL)	ヒト曝露量 ^b との比較
マウス骨髓小核試験 [REDACTED] 691000, TK 報告書 : B.34273.31)	2000	C_{max} : 187.5 AUC : 1776.5	837 × 1843 ×
ラット肝不定期 DNA 合成試験 [REDACTED] 655/142, TK 報告書 : B.34273.29)	20	C_{max} : 419	1871 ×

a : 雄、雌及び投与日の全体平均値

b : C_{max} : 2.7.2.2.2.1、表 2.7.2.2-3 参照、AUC : 2.7.2.2.2.1、表 2.7.2.2-3 の $AUC_{t,ss}$ を一日投与量(800 μg)に換算

2.4.4.4 がん原性(2.6.6.5)

マウス及びラット 104 週間吸入がん原性試験では、両動物種の反復投与試験の結果に基づき用量を選択した(2.6.6.5.1.1 及び 2.6.6.5.2.1)。マウス 13 週間反復吸入投与毒性試験の NOAEL は 0.61 mg/kg/day、ラット 6 箇月間反復吸入投与毒性試験の NOAEL は 0.035 mg/kg/day であった。両がん原性試験の用量選択は、FDA がん原性評価委員会の勧告など、専門家による評価を交えて行った²⁰⁾。

マウスがん原性試験(0.3～2.5 mg/kg/day の吸入投与)では、低用量群(実投与量 0.29 mg/kg/day、目標投与量 0.3 mg/kg/day)の雄(生存率 53%)を除いて各投与群の生存率は 72～82% であった。また、対照群の生存率は 72～78% であった。対照群と比較して、中及び高用量群の体重増加量には試験終了時までに用量に依存して統計学的に有意な影響が認められた(-15.1～-21.8%、p < 0.01～0.05)。ラット試験(0.02～0.2 mg/kg/day の吸入投与)では、各用量群の生存率は 67～82% であった。対照群の生存率は 67～73% であった。対照群と比較して、高用量群の体重増加量には試験終了時までに統計学的に有意な影響が認められた(-16.8～-26.7%、p < 0.01)。対照群と比較して、低、中用量群の体重増加量は減少した(-8.8～-23.8%、雌を除いて統計学的に有意、p < 0.01)。これらの吸入試験の生存率及び用量は許容範囲内であると考えられた。

両動物種ともに、性別を問わず、検討した全用量で被験物質と関連がある腫瘍性所見の徴候はみられなかった。

マウスで非腫瘍性変化が検出された部位は鼻腔に限られており、この結果はアクリジニウム臭化物の軽微な刺激性を反映している。ラットの気道及びハーダー腺で認められた非腫瘍性変化は、過去の反復吸入試験の場合と同様にアクリジニウム臭化物の薬理作用又は投与経路と関連していた。アクリジニウム臭化物投与群では各群 1 匹の死亡が観察され、これらの死亡例の一部では喉頭及び食道に残留した食物が認められた。この所見は、ラット反復投与試験での変化と同様と考えられ(2.4.4.2.3)、ラットに特異的にみられる薬理作用であると推察された。マウス及びラットがん原性試験で使用した高用量はそれぞれ 2.4 mg/kg/day(目標投与量 2.5 mg/kg/day) 及び 0.20 mg/kg/day(目標投与量 0.2 mg/kg/day) であった。

マウスでは、投与 1 日目、26 週目及び 52 週目に TK を評価した。ラットでは、投与 1 日目、26 週目、52 週目及び 104 週目に TK を評価した。

ラット及びマウスがん原性試験の高用量群でのアクリジニウム臭化物の曝露量とヒト曝露量(臨床用量 400 μg 1 日 2 回吸入投与時)を比較して安全域を算出した(表 2.4.4-5)。AUC に基づいた曝露量は臨床用量と比較してマウスでは 51 倍、ラットでは 16 倍となり、マウス及びラットがん原性試験で用いた用量で十分な曝露量が得られたことを確認した。

表 2.4.4-5 がん原性試験の NOAEL 及び臨床用量(400 μg 1 日 2 回)投与時のアクリジニウム臭化物の曝露量との比較

試験種 (試験番号)	NOAEL (mg/kg/day)	Aclidinium bromide ^a C _{max} (ng/mL) AUC(ng·h/m)	ヒト曝露量 ^b との比較
マウス 104 週間吸入がん原性試験 ██████████ 852075、 TK 報告書 : B.34273.28)	2.4	C _{max} : 12.39	55 ×
		AUC : 48.7	51 ×
ラット 104 週間吸入がん原性試験 ██████████ 852076、 TK 報告書 : B.34273.27)	0.20	C _{max} : 5.59 AUC : 15.9	25 × 16 ×

a : 雄、雌及び高用量投与日の全体平均値

b : C_{max} : 2.7.2.2.2.1、表 2.7.2.2-3 参照、AUC : 2.7.2.2.2.1、表 2.7.2.2-3 の AUC_{t,ss} を一日投与量(800 μg)に換算

2.4.4.5 生殖発生毒性(2.6.6.6)

ラットを用いた他の毒性試験でもみられたように、ラットの受胎能及び初期胚発生に関する吸入投与試験(1日2回投与)では、被験物質投与と関連がある少数の死亡が認められた(2.6.6.6.1)。これらの死亡は、ラットの反復投与毒性試験及びがん原性試験と同一の薬理作用によるものと考えられた。ほとんどの受胎能パラメータに対し、用量に依存しない変化が全ての投与群で認められたため、基本試験を延長し、雄又は雌の受胎能への影響を検討した。延長試験として、アクリジニウム臭化物投与を継続して投与した雄を未投与の雌と交配させた。その結果、対照群と比較して 2.4 mg/kg/回群でのみ、わずかな変化が認められ(着床前及び着床後胚死亡率の増加)、基本試験でみられた変化と同様であった。したがって、被験物質と関連した変化である可能性が考えられた。しかし、基本試験の精子検査では精子の量、運動性又は形態に対する作用は認められなかっただため、投与による影響はごく軽度と考えられた。延長試験では、アクリジニウム臭化物を投与した雌と未投与の雄を交配させた。1.0 及び 2.4 mg/kg/回群の受胎率は対照群よりわずかに低く、黄体数、着床数及び胚数はアクリジニウム臭化物を曝露した全投与群で減少していた。しかし、統計学的有意差を示したパラメータは、中及び高用量群の平均黄体数及び平均着床数のみであった。以上から雄及び雌の受胎能に対する NOAEL は、それぞれ 1.0 及び 0.4 mg/kg/回(目標投与量、1日2回投与)と考えられた。

ラット及びウサギにアクリジニウム臭化物をそれぞれ最高 2.4 及び 1.8 mg/kgまでの用量で 1 日 2 回吸入投与した胚・胎児発生に関する試験では、催奇形性及び胚毒性は認められなかった(2.6.6.2.1.2 及び 2.6.6.2.2.4)。ラット及びウサギの本試験では、検討した全ての用量群で体重又は摂餌量への影響を示す母体の毒性が観察された。ラット吸入試験のアクリジニウム臭化物投与群では、胎児重量及び骨形成に対する用量非依存的な作用がわずかに認められた。これらの作用は母体の摂餌量及び体重増加率の減少と関連していると考えられた。

ウサギにアクリジニウム臭化物の非常に高い用量(最高 600 mg/kg/day)を経口投与した胚・胎児発生に関する試験では、300 及び 600 mg/kg 投与群で胎児重量の減少がみられたのみで、胚毒性及び催奇形性は認められなかった(2.6.6.2.2.6)。母動物では、全ての用量群で、用量に依存して摂餌量が減少した。最高用量群では母動物 2 匹が死亡し、剖検にてこれらの動物の腸にガス及び液体が認められ、結腸には硬便がみられた。

出生前及び出生後の発生に関するラット吸入投与試験では、0.2 及び 2.4 mg/kg 投与群の母動物で摂餌量減少並びに母動物及び出生児の体重増加量の減少が観察された(2.6.6.3.1)。2.4 mg/kg 投与群の出生児の身体発育の 3 指標(精巣下降、亀頭包皮分離及び膣開口)でごく軽度の遅延を示したが、発育遅延を示す出生児の体重減少と関連した変化と考えられた。F0 の母動物及び F1 の出生児に対する NOEL(最大無作用量)は 0.02 mg/kg/day と考えられた。F1 親動物の生殖能に対する影響は認められなかったため、生殖能に対する NOAEL は、1.9 mg/kg/day(目標投与量 2.4 mg/kg/day)であった。

ラット及びウサギ生殖発生毒性試験の NOAEL 投与時のアクリジニウム臭化物の曝露量とヒト曝露量(臨床用量 400 μg 1 日 2 回吸入投与時)を比較して安全域を算出した(表 2.4.4-6)。これらの試験の NOAEL に対し安全域が算出され、いずれの用量でも被験物質と関連がある催奇形性の徵候はなく、生殖パラメータに対する影響も低かった。

表 2.4.4-6 生殖発生毒性試験 NOAEL 及び臨床用量(400 μg 1 日 2 回)投与時のアクリジニウム臭化物の曝露量との比較

試験種 (試験番号)	NOAEL (mg/kg/day)	Aclidinium bromide ^a C _{max} (ng/mL) AUC(ng·h/mL)	ヒト曝露量 ^b との比較
ラット胚・胎児発生に関する吸入投与試験 ██████████826637、 TK 報告書 : B.34273.05)	2.51 × 2 ^c	C _{max} : 25.1 AUC : 69.9	112× 73×
ウサギ胚・胎児発生に関する吸入投与試験 ██████████838776、 TK 報告書 : B.34273.12)	1.79 × 2 ^c	C _{max} : 5.97 AUC : 10.8	27× 11×
ウサギ胚・胎児発生に関する経口投与試験 ██████████A19056、TK 報告書 : B.34273.34)	600 ^c	C _{max} : 2.46 AUC : 23.1	11× 24×
ラット受胎能及び初期胚発生に関する 吸入投与試験 ██████████A10934、 TK 報告書 : B.34273.33)	雄受胎能 : 0.99 × 2 雌受胎能 : 0.39 × 2	C _{max} : 11.6 AUC : 73.2 C _{max} : 17.1 AUC : 62.7	52× 76× 76× 65×
ラット出生前及び出生後の発生及び母体機能に 関する吸入投与試験 ██████████A35381)	F0 母動物/F1 出生 児 : 0.018(NOEL) F1 親動物の生殖 能 : 1.9	C _{max} : 0.4 AUC : 1.6 C _{max} : 11 AUC : 57	1.8× 1.7× 49× 59× (外挿による推測値)

a : 雄、雌及び投与日の全体平均値

b : C_{max} : 2.7.2.2.1、表 2.7.2.2-3 参照、AUC : 2.7.2.2.1、表 2.7.2.2-3 の AUC_{t,ss} を一日投与量(800 μg)に換算

c : 催奇形性を誘発しない用量

2.4.4.6 局所刺激性

ウサギを用いた *in vivo* 局所刺激性試験で、アクリジニウム臭化物を皮膚に塗布しても刺激性は認められなかつたが、点眼では散瞳を伴う可逆性の結膜発赤がみられた(2.6.6.7.1 及び 2.6.6.7.2)。マウスを用いた局所リンパ節試験では、アクリジニウム臭化物による軽度の刺激性は認められたが、感作作用はみられなかつた(2.4.4.7.1)。これらの所見は、ラット反復吸入投与毒性試験で観察された局所作用が気道でのわずかな所見があることと整合しており、免疫学的な要因ではないことを示唆した。

2.4.4.7 他の毒性試験

2.4.4.7.1 抗原性及び免疫毒性

ラット及びモルモットを用いてアクリジニウム臭化物の感作性を検討した。アクリジニウム臭化物 2 mg/kg/day を吸入投与したラット(██████████845322)から血清サンプルを採取し、受動皮膚アナフィラキシー(PCA)試験を実施し、感作性を評価した(2.6.6.8.1.1)。血清を皮下投与し、23 時間後アクリジニウム臭化物(0.1 及び 1 mg/kg)を静脈内投与した。その結果、アナフィラキシー反応は惹起されなかつた。また、モルモットにアクリジニウム臭化物 1 及び 3 mg/mL を 30 秒間吸入投与して感作誘導及び惹起処置を行つたが、感作作用は認められなかつた(2.6.6.8.1.2)。この結果から、アクリジニウム臭化物は臨床で呼吸器の感作作用を示さないことが示唆された。

さらに、マウスを用いた局所リンパ節試験を実施し(2.6.6.8.1.3)、様々な濃度でアクリジニウム臭化物を曝露したが感作の徴候は認められなかつた。

アクリジニウム臭化物の毒性試験結果から、免疫抑制作用を含め免疫系に対する有害作用の徴候はみられなかった。

2.4.4.7.2 不純物

アクリジニウム臭化物の純度の規格は [REDACTED] %である。不純物プロファイルの観点から市販用の原薬を代表する被験物質のバッチを毒性試験に使用した。

原薬中の不純物は、バリデートされた安定性評価法を用いて測定し、以下に従って評価した(2.6.6.9.7)。

- ICH Q3A ガイドラインに従い、報告が必要な閾値である 0.05%以上の不純物が含まれる場合は、すべて報告した(表 2.4.4-7 及び表 2.6.6.9-2)。
- 不純物の濃度が同ガイドラインで規定された構造決定の必要な閾値である 0.10%以上の場合は、3.2.S.3.2 項に記載の通り構造決定を行った。
- DEREK ソフトウェアを用いて構造を評価した。
- 構造から遺伝毒性が懸念された場合、以下の手順で評価した。
 - (1) 細菌を用いる復帰突然変異試験(Ames 試験)を実施した。
 - (2) 試験結果が陽性の場合は、遺伝毒性を有する不純物の TTC(本製剤では [REDACTED] ppm に相当する [REDACTED] μg/日)を検討した。
 - (3) 不純物の濃度が安全性確認の必要な閾値である 0.15%以上の場合は、適切に安全性を確認した。

アクリジニウム臭化物中の個別規格設定不純物には毒性学的懸念が小さいものもある一方、少數の不純物では構造から遺伝毒性が懸念されるため(表 2.6.6.9-1)、該当する不純物について評価した。原薬中の濃度が 0.15%(ICH Q3 A(R2)ガイドライン、安全性確認の必要な閾値)を超える不純物は、毒性試験で用いられたアクリジニウム臭化物のバッチ中に含まれる不純物濃度を参照し安全性を確認した。不純物のうち、遺伝毒性を有するもの及び遺伝毒性が懸念されるものは全て、原薬中の濃度が TTC より十分に低くなるように管理している。アクリジニウム臭化物の臨床用量は 400 μg 1 日 2 回と低いため、ヒトで曝露される不純物濃度は極めて低い。

また、ICH Q6A 及び Q3 B(R2)ガイドラインに従い、[REDACTED] を管理した。[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]

表 2.4.4-7 原薬に含まれる不純物

不純物		
A	[REDACTED]	[REDACTED]
B	[REDACTED]	[REDACTED]
C	[REDACTED]	[REDACTED]
D	[REDACTED]	[REDACTED]
E	[REDACTED]	[REDACTED]
F	[REDACTED]	[REDACTED]
G	[REDACTED]	[REDACTED]
H	[REDACTED]	[REDACTED]
I	[REDACTED]	[REDACTED]
J	[REDACTED]	[REDACTED]

不純物* (B : [REDACTED] [REDACTED]) 及び

不純物* (C : [REDACTED] [REDACTED]) は、DEREK 分析からいずれの [REDACTED] も遺伝毒性を示唆する警告構造を有さないことが示されている。このため、最終的な規格に設定した判定基準は妥当と考えられる。

不純物* (B) 及び

不純物* (C) の規格値は、それぞれ [REDACTED] % 以下及び [REDACTED] % 以下と設定されている。

(F : [REDACTED] ば [REDACTED] である。 不純物* (F)

の規格値は [REDACTED] % であり、安全性確認の必要な閾値である 0.15%(ICH Q3A ガイドライン)を [REDACTED] ため、特別に安全性確認を行う必要はないと判断した。

不純物* (A : [REDACTED]) 及び

不純物* (G :

[REDACTED]) の規格値は、それぞれ [REDACTED] % 以下及び [REDACTED] % 以下と設定されており、両者とも安全性確認の必要な閾値(0.15%)より [REDACTED] 安定性試験では、これらの不純物は [REDACTED] [REDACTED] ラット及びイヌ長期投与毒性試験で、両不純物の安全性を確認した。その際に使用したバッチ R001 では、

不純物* (A) 及び

不純物* (G) の不純物含量は

それぞれ [REDACTED] 及び [REDACTED] % であり、これらは設定した規格値 [REDACTED] イヌ/ヒト安全率は両不純物とも 8.9 である(表 2.6.6.9-2)。DEREK 分析に基づき、いずれの不純物も遺伝毒性を示唆する警告構造を有さないと予測された。バッチ T003M001 を用いたがん原性試験では、

不純物* (G) の含量は [REDACTED] % であり、動物/ヒト安全率はラットの場合で 7.2、マウスの場合で 86 である(表 2.6.6.9-2)。

他の全ての個別規格設定不純物は、含量が安全性確認の必要な閾値である 0.15% より低くなるよう管理している。

原薬中に極めて低濃度で存在する 3 つの [REDACTED] 不純物の細菌を用いた復帰突然変異試験を行った。これらのうち 2 つの不純物、

不純物* (J : [REDACTED]

又は LASW372) 及び

不純物* (E : [REDACTED] 又は LASW374) の結果は陽性で

あった。

不純物* (J) を、代謝活性化系の存在下及び非存在下で TA100 株及び TA1535 株を用いて検討した場合、いずれも陽性であった。

不純物* (E) を、

代謝活性化系の存在下で TA1535 株を用いて検討した場合、陽性を示した。対照的に、

不純物* (D : [REDACTED] 又は LASW373) の Ames 試験では、代謝活性化の有無に係わらず、結果

*新薬承認情報提供時に置き換えた。

は陰性であった。ヒト最大 1 日摂取量と遺伝毒性を示す不純物* (J) と不純物* (E) の TTC の比を表 2.4.4-8 に示す。

表 2.4.4-8 ヒト最大 1 日摂取量と遺伝毒性を示す不純物の TTC の比及び規格値での安全率

不純物	規格値(%)	ヒト最大 1 日 摂取量 (μg/日)	ヒト最大 1 日 摂取量/ TTC の比	規格値での 安全率
[REDACTED] (J)	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	9.4
[REDACTED] (E)	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	1.9
遺伝毒性を示す全ての個別規格設定不純物	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	1.6

a : 計算に用いた規格値

TTC : [REDACTED] μg/日 [REDACTED] ppm/日

ヒトのアクリジニウム臭化物臨床用量 : 400 μg/1 日 2 回

DEREK 分析から、不純物([REDACTED])の不純物* (H : [REDACTED]) 及び *p*-Allyl 不純物* (I : [REDACTED]) には遺伝毒性を示唆する警告構造があることが示された。しかし、代謝活性化の有無に係わらず、Ames 試験の結果は、両不純物とも陰性であった。したがって、両不純物とも遺伝毒性を有さないと考えられた。

不純物* (H) 及び 不純物* (I) の規格値は [REDACTED] % 以下と設定された。バッヂ R001 を用いた長期投与毒性試験では、両不純物とも原薬中に [REDACTED] % 存在するため、両不純物のイヌ/ヒト安全率は 19 となった(表 2.6.6.9-2)。バッヂ T003M001 を用いたがん原性試験では、原薬中の不純物* (H) 及び 不純物* (I) の含量はそれぞれ [REDACTED] 及び [REDACTED] % であり、そのためラット/ヒト安全率はそれぞれ 6.3 及び 2.5、マウス/ヒト安全率はそれぞれ 75 及び 30 となった(表 2.6.6.9-2)。

以上より、アクリジニウム臭化物中のこれらの不純物は、臨床安全性に懸念を示さないと判断した。

2.4.4.7.3 光毒性

非臨床試験及び臨床試験から光安全性上の懸念が認められておらず(2.5.5 : 安全性の概括評価)、臨床用量が極めて低いこと、全身循環中のアクリジニウム臭化物の代謝が速やかであること、薬物動態試験及び分布試験でアクリジニウム臭化物及び代謝物の皮膚及び眼への顕著な取り込みが認められなかったこと、波長 290~700 nm の範囲でアクリジニウム臭化物及び代謝物による光吸収が認められなかったこと(3.2.S.3.1 参照)、光毒性を示唆する警告構造(ヘテロ原子を含む平面的な部分の存在など)が認められなかったことから、アクリジニウム臭化物の光安全性上の懸念は少ないと考えられた。

2.4.4.7.4 依存性

アクリジニウム臭化物の臨床用量は低く(400 μg 1 日 2 回)、吸入投与であること、さらに以下の要素も考慮すると、アクリジニウム臭化物の依存性は小さいと考えられた。

- 2.4.3 項で詳述したように、吸入投与時の全身循環中に吸収されるアクリジニウム臭化物は少量で、ヒト血漿中で速やかに加水分解される。
- ムスカリリン受容体以外の様々な受容体に対するアクリジニウム臭化物及びその主要代謝物の親和性を確認する試験で、アクリジニウム臭化物は検討した受容体の一部に対し中

*新薬承認情報提供時に置き換えた。

程度の親和性しか示さなかった。[2.4.2](#) 項で詳述したように、アクリジニウム臭化物の 2 つの主要代謝物は、検討したいずれの受容体に対しても顕著な親和性を示さなかった。

- アクリジニウム臭化物は中枢神経系に対し薬理活性を示さず、安全性薬理試験では極めて高用量でも中枢神経系に対する *in vivo* での有害作用を示さなかった。

2.4.4.7.5 代謝物

2.4.3 項に詳述したように、*in vitro* 及び *in vivo* での検討に基づき、アクリジニウム臭化物の代謝は毒性試験に使用した動物種及びヒトで同様であることが示されている。ヒトに特異的な代謝物は同定されていない。

主要代謝物である LAS34823 及び LAS34850 の安全域を表 [2.6.6.9-5](#) に要約する。全ての重要な毒性試験の C_{max} 及び AUC に基づいて算出した安全率は大きかった。ただし、ラット 26 週間吸入毒性試験の NOAEL は低かったため、AUC に基づいて算出した安全率は両代謝物とも 1 未満となつた。ラットでは抗コリン薬の薬理作用が過度に働き唾液分泌が抑制されるが、両代謝物とも薬理活性を持たないため、安全性への懸念はほとんどないと考えられた。ラット及びイヌを用いた 4 週間反復経口投与毒性試験によって、LAS34823 及び LAS34850 の安全性が確認された。ラット及びイヌのアクリジニウム臭化物の NOAEL はそれぞれ 450 及び 125 mg/kg/day であった。LAS34823 及び LAS34850 の全身曝露量(AUC)は、ラットではヒトよりそれぞれ 10 及び 1737 倍高く、イヌではヒトよりそれぞれ 199 及び 2210 倍高かつたが、アクリジニウム臭化物は血漿中に検出されなかつた。

アクリジニウム臭化物の臨床用量は低いため(400 μg、1 日 2 回吸入投与)、臭化物イオンの摂取量は 25 μg/回を下回ると考えられる。医薬品からの臭化物イオンの許容摂取量は KBr として 4 mg/kg/日と考えられているため [21\)](#)、臭化物イオンの摂取量が本剤の重大な安全性の懸念となるとは考えられなかつた。

2.4.5 総括及び結論

アクリジニウム臭化物並びに対照物質のチオトロピウム臭化物及びイプラトロピウム臭化物の抗コリン作用を *in vitro* 及び *in vivo* 薬理試験で評価した結果、アクリジニウム臭化物は長時間作用性で可逆的な M₃ 受容体拮抗薬であり、作用発現も早いことが示された。

また、アクリジニウム臭化物並びに代謝物の LAS34850 及び LAS34823 は、心血管系、中枢神経系、呼吸器系、腎/尿路系及び消化管系の様々な系で顕著な作用を示さなかつた。アクリジニウム臭化物によって生じるムスカリン受容体(特に M₃ 受容体)の阻害による既知の薬理作用(心拍数増加、尿閉/排尿困難、並びに口内乾燥及び便秘の発現など)は、チオトロピウム臭化物及びイプラトロピウム臭化物によるものより弱いことが示された([2.6.2.4](#))。

非臨床試験([2.4.2.3.2](#))及び臨床試験([2.7.4.4.2](#))の結果から、臨床用量でアクリジニウム臭化物並びにその代謝物である LAS34850 及び LAS34823 は QT 間隔延長を生じないことが示された。非臨床試験でアクリジニウム臭化物又はその代謝物に臨床症状に関連する心血管系の毒性所見は認められない。さらに、これらの非臨床安全性薬理モデルの所見による予測は妥当と考えられ、これまでに実施された臨床試験でアクリジニウム臭化物による心血管系への有害事象の発現率はプラセボ投与時と同程度であった([2.5.5.14](#))。

吸入、静脈内、又は経口投与後、アクリジニウム臭化物は非酵素的及び酵素的加水分解により投与後 24 時間以内に大部分は体内から消失する。血漿中の主要代謝物はカルボン酸代謝物

LAS34850 で、アルコール代謝物 LAS34823 の血漿中濃度はアクリジニウム臭化物と同程度である。吸入投与後にアクリジニウム臭化物は肺から吸収されるが、経口投与された際のバイオアベイラビリティは低い。

臨床用量(400 μg 1 日 2 回)を投与した時のアクリジニウム臭化物の血漿中濃度は低いため([2.7.2.2.1](#)、KRPAB1102-D202 臨床試験の最終投与後結果より算出、 $C_{max} : 0.224 \text{ ng/mL}$ 及び $AUC : 0.964 \text{ ng}\cdot\text{h/mL}$)、アクリジニウム臭化物又は 2 つの主要代謝物がヒト CYP450 又はエステラーゼによって代謝される薬剤の体内動態に影響を与えることはないと考えられる。アクリジニウム臭化物、LAS34823 及び LAS34850 を用いた P-gp の基質活性に関する試験の結果から、アクリジニウム臭化物及び LAS34850 は P-gp の基質ではなく、LAS34823 は弱い P-gp の基質であるか、P-gp の基質ではないことが示された。したがって、ヒトで P-gp はアクリジニウム臭化物とその代謝物の ADME に影響を与えないと考えられた。また P-gp の阻害活性試験の結果から、アクリジニウム臭化物とその主要代謝物は P-gp の阻害剤ではないことが示された。このため併用投与した薬剤が P-gp 基質である場合でも、その ADME はアクリジニウム臭化物又はその代謝物によって影響を受けないと考えられた。

アクリジニウム臭化物から反応性代謝物が生成し、ヒト肝ミクロソームタンパクと共有結合することが *in vitro* で認められた。反応性代謝物の生成には主に CYP3A4 及び CYP2D6 が関与していた。アクリジニウム臭化物は全身循環に達すると血漿中で速やかに代謝され、LAS34850 及び LAS34823 となる。LAS34850 のタンパクへの共有結合率はアクリジニウム臭化物より低く、また LAS34823 は共有結合しないこと、ヒト肝ミクロソームとの共有結合率はトラッピング剤である GSH を加えることで大幅に減少することなどから、アクリジニウム臭化物又は代謝物は生体内的 GSH の総量(0.2 mmol/L)を超えない限り、生成した反応性代謝物は速やかに不活性化すると考えられた。また、ヒト肺の CYP3A4 及び CYP2D6 はヒト肝より少ないとから、ヒト肺で反応性代謝物が生成する可能性は低いと考えられた。

アクリジニウム臭化物には光学異性体が存在するが、実験動物種又はヒトでの光学的な安定性は検討されていない。しかし、アクリジニウム臭化物のエステル結合は血漿中で速やかに分解されることを考慮すると、*in vivo* でのキラル反転が起こることは考えにくい。さらに、(S)-Enantiomer の薬理活性は(R)-Enantiomer であるアクリジニウム臭化物よりはるかに低く([2.4.2.1](#))、そのためキラル反転が少量起きても、アクリジニウム臭化物の薬理学的プロファイルに対する影響はごくわずかと考えられる。臨床用量をヒトに吸入投与した時のアクリジニウム臭化物の血漿中濃度は低く、そのため *in vivo* でアクリジニウム臭化物の(S)-Enantiomer の生成を評価することは困難であった。

アクリジニウム臭化物の非酵素的及び酵素的加水分解によって、(R)-構造を維持した LAS34823 が生成する。この代謝物が *in vivo* でラセミ化するかは検討していないが、ラセミ化には特異的なエピメラーゼが作用するか、quinuclidine 環の 2 級アルコールがケトン体となり、さらにそれが還元されてラセミアルコールを生成する 2 段階反応が必要である。LAS34823 のケトン体は *in vitro* 又は *in vivo* 代謝試験のいずれでも認められていないため、この反応が生体内で進行する可能性は低く、また(R)- LAS34823 には薬理活性がないため、このキラル反転の生物学的意義は低いと考えられた。

アクリジニウム臭化物の臨床用量(400 μg 1 日 2 回)を吸入投与したとき、吸収後に 5%が加水分解しないと仮定すると、最大 40 μg(0.071 μmol)の原薬がアクリジニウム臭化物として全身循環血中に存在する。アクリジニウム臭化物の肝臓への移行は、*in vitro* の共有結合試験で検討した濃度(20 μmol/L)では 0.001%未満であったが、*in vivo* の最高血漿中濃度は低いため(0.224 ng/mL；0.397 nmol/L、[2.7.2.2.1](#)、KRPAB1102-D202)、*in vivo* の肝臓で共有結合が起こる可能性は低いと

考えられる。

薬物動態試験では、マウス、ラット及びイヌでのアクリジニウム臭化物並びに2つの主要代謝物である LAS34823 及び LAS34850 の曝露が確認された。血漿中の主要代謝物は LAS34850 であったが、アクリジニウム臭化物と LAS34823 の曝露量(C_{max} 及び AUC)は投与経路とは無関係にほぼ同程度で、LAS34850 より低かった。アクリジニウム臭化物は実施したすべての薬物動態試験で血漿中濃度が急速に減少したことから、速やかに代謝されることは明らかである。実施したすべての試験で、ヒトでの曝露量に対して広い安全域が得られた。

毒性試験で観察された主な所見は、アクリジニウム臭化物の抗コリン性の薬理作用に関連していると考えられる。特に、唾液分泌に対する既知の薬理作用のために、過去にチオトロピウム臭化物及びトルテロジンなどの他のムスカリン受容体拮抗薬で報告されたものと同様の毒性所見がラットで観察された^{14), 15)}。ヒトにアクリジニウム臭化物 400 μg を1日2回投与した際の全身曝露量と様々な毒性試験で得られた NOAEL での曝露量を比較し、安全域が十分広いことが確認された(表 2.4.4-2、表 2.4.4-4、表 2.4.4-5 及び表 2.4.4-6)。このように安全域が広い理由としては、主にアクリジニウム臭化物のヒト臨床用量が非常に低いこと及び体循環中で未変化体が速やかに代謝されることが推測される。

マウス及びラットの小核試験及び不定期 DNA 合成試験で得られる安全域は極めて広いことが確認された(表 2.4.4-4)。in vitro 遺伝毒性試験では弱い、不明確又は陰性の変異原性が認められたが、in vivo 遺伝毒性試験で得られた陰性の結果及び広い安全域、がん原性で得られた陰性の結果及び AUC に基づく広い安全域(マウスで 51 倍、ラットで 16 倍)から、アクリジニウム臭化物が in vivo で示す遺伝毒性及びがん原性のリスクは明らかに低いと考えられた。

ラットの受胎能及び初期胚発生に関する吸入試験で得られた雌雄ラット受胎能の NOAEL から、臨床曝露の広い安全域が算出された。ラット又はウサギを用いた胚・胎児発生に関する試験で、アクリジニウム臭化物は催奇形性又は胚毒性を示さなかったが、高用量群で軽微な胎児毒性を示した。出生前及び出生後の発生に関するラット吸入試験で、臨床曝露量と比較して高用量を投与しても出生児への影響は非常に軽度であった。

動物試験では、催奇形性及び胚毒性はみられなかつたが、最大ヒト曝露量よりはるかに高い曝露量では胎児毒性が観察された(2.6.6.6)。また、妊娠によるアクリジニウム臭化物の使用に関するデータはない。したがって、妊娠期に対するアクリジニウム臭化物の使用に関しては、今後の安全性情報が確立するまでは、投与を慎重にすべきと判断した。

ラットの受胎能及び初期胚発生に関する試験から、最大ヒト曝露量よりはるかに高い曝露量で受胎能の軽微な影響が認められた(2.6.6.1)。よって、ヒト臨床用量でアクリジニウム臭化物を投与した場合に受胎能への影響の可能性は低いと考えられた。

一般毒性試験及び局所刺激性試験の結果に基づき、アクリジニウム臭化物を単回投与又は反復投与しても刺激性又は免疫機能に基づく反応の徴候は認められなかつた。アクリジニウム臭化物中に認められた低濃度の不純物についての安全性は担保された。

以上、アクリジニウム臭化物は安全な毒性プロファイルを示すことから、患者に臨床用量(400 μg 1 日 2 回)で投与する場合、安全性の担保は可能と判断した。

2.4.6 参考文献

- 1) Kesten S, Celli B, Decramer M, Leimer I, Tashkin D. Tiotropium HandiHaler in the treatment of COPD: a safety review. Int J Chron Obstruct Pulmon Dis 2009;4:397-409.

- 2) Engelhardt A. Pharmacology and Toxicology of Atrovent. Scand J Respir Dis Suppl 1979; 103: 110-5. [資料番号 4.3-2]
- 3) Leusch A, Eichhorn B, Müller G, Rominger KL. Pharmacokinetics and tissue distribution of the anticholinergics tiotropium and ipratropium in the rat and dog. Biopharm. Drug Dispos 2001; 22: 199-212. [資料番号 4.3-3]
- 4) Center for Drug Evaluation and Research, NDA 21-395 for tiotropium bromide / Spiriva, 2004. [資料番号 4.3-4]
- 5) Shimada T, Yamazaki H, Mimura M, Wakamiya N, Ueng YF, Guengerich FP, et al. Characterization of microsomal cytochrome P450 enzymes involved in the oxidation of xenobiotic chemicals in human fetal liver and adult lungs. Drug Metab Disp 1996; 24: 515-22. [資料番号 4.3-5]
- 6) Castell JV, Donato MT, Gomez-Lechon MJ. Metabolism and bioactivation of toxicants in the lung. The in vitro cellular approach. Exp Toxicol Pathol 2005; 57: 189-204. [資料番号 4.3-6]
- 7) Nishimura M, Yaguti H, Yoshitsugu H, Naito S, Satoh T. Tissue distribution of mRNA expression of human cytochrome P450 isoforms assessed by high-sensitivity real-time reverse transcription PCR. Yakugaku Zasshi 2003; 123: 369-75. [資料番号 4.3-7]
- 8) Rinaldi R, Eliasson E, Swedmark S, Morgenstern R. Reactive intermediates and the dynamics of glutathione transferases. Drug Metabolism and Disposition 2002; 30:1053-8. [資料番号 4.3-8]
- 9) Cantin AM, North SL, Hubbard RC, Crystal RG. Normal alveolar epithelial lining fluid contains high levels of glutathione. J Appl Physiol 1987; 63: 152-7. [資料番号 4.3-9]
- 10) Roum JH, Buhl R, McElvaney NG, Borok Z, Crystal RG. Systemic deficiency of glutathione in cystic fibrosis. J Appl Physiol 1993; 75: 2419-24. [資料番号 4.3-10]
- 11) Morrison D, Rahman I, Lannan S, MacNee W. Epithelial permeability, inflammation, and oxidant stress in the air spaces of smokers. Am J Respir Crit Care Med 1999; 159: 473-9. [資料番号 4.3-11]
- 12) Behr J, Degenkolb B, Beinart T, Krombach F, Vogelmeier C. Pulmonary glutathione levels in acute episodes of Farmer's lung. Am J Respir Crit Care Med 2000; 161: 1968-71. [資料番号 4.3-12]
- 13) Cavallito CJ, O'Dell TB. Modification of rates of gastrointestinal absorption of drugs II. Quaternary ammonium salts. J Am Pharm Assoc Am Pharm Assoc 1958; 47: 169-73. [資料番号 4.3-13]
- 14) Medicines Evaluation Board, Public Assessment Report for tiotropium bromide / Spiriva, 2002. [資料番号 4.3-14]
- 15) Center for Drug Evaluation and Research, NDA 20-771 for tolterodine / Detrusitol, 1997. [資料番号 4.3-15]
- 16) Iwai H, Tagawa Y, Hayasaka I, Yanai T, Masegi T. Effects of atropine sulphate on rat harderian glands: correlation between morphological changes and porphyrin levels. J Toxicol Sci 2000; 25: 151-9. [資料番号 4.3-16]
- 17) Bockman CS, Bradley ME, Dang HK, Zeng W, Scofield MA, Dowd FJ. Molecular and Pharmacological Characterization of Muscarinic Receptor Subtypes in a Rat Parotid Gland Cell Line: Comparison with Native Parotid Gland. J Pharm Exp Therap. 2001; 297: 718-26. [資料番号 4.3-17]

- 18) Yamada M, Miyakawa T, Duttaroy A, Yamanaka A, Moriguchi T, Makita R, et al. Mice lacking the M3 muscarinic acetylcholine receptor are hypophagic and lean. *Nature* 2001; 410: 207-12.
[資料番号 4.3-18]
- 19) Nakamura T, Matsui M, Uchida K, Futatsugi A, Kusakawa S, Matsumoto N, et al. M3 muscarinic acetylcholine receptor plays a critical role in parasympathetic control of salivation in mice. *J Physiol* 2004; 558: 561-75. [資料番号 4.3-19]
- 20) FDA Executive CAC Meeting Minutes; March 30, 2004. Response to Carcinogenicity Special Protocol Assessment. IND: 68,653. Aclidinium bromide. [資料番号 4.3-20]
- 21) van Gelderen CE, Savelkoul TJ, Blom JL, van Dokkum W, Kroes R. The no-effect level of sodium bromide in healthy volunteers. *Hum Exp Toxicol* 1993; 12: 9-14. [資料番号 4.3-21]