
第2部 CTDの概要

一般名：ブデソニド

グリコピロニウム臭化物

ホルモテロールフマル酸塩水和物

版番号：■

2.6.6 毒性試験の概要文

PT010

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	頁
目次	2
略語及び専門用語一覧表	5
2.6.6.1 まとめ	6
2.6.6.2 単回吸入投与毒性試験	12
2.6.6.2.1 BD MDI (試験番号 FY13-150 ^{4.2.3.1.1} 、FY13-151 ^{4.2.3.1.2})	12
2.6.6.2.2 FF MDI (試験番号 FY08-042B ^{4.2.3.1.3} 、FY08-041B ^{4.2.3.1.4})	12
2.6.6.2.3 GP MDI (試験番号 FY08-042A ^{4.2.3.1.5} 、FY08-041A ^{4.2.3.1.6})	12
2.6.6.2.4 BFF MDI (試験番号 FY13-150 ^{4.2.3.1.1} 、FY13-151 ^{4.2.3.1.2})	12
2.6.6.2.5 BGP MDI (試験番号 FY13-151 ^{4.2.3.1.2})	13
2.6.6.2.6 GFF MDI (試験番号 FY08-042D ^{4.2.3.1.7} 、FY08-041D ^{4.2.3.1.8})	13
2.6.6.2.7 BGF MDI (試験番号 FY13-150 ^{4.2.3.1.1} 、FY13-151 ^{4.2.3.1.2})	13
2.6.6.3 反復吸入投与毒性試験	14
2.6.6.3.1 14 日間反復吸入投与毒性試験	14
2.6.6.3.1.1 BD MDI (試験番号 FY14-035 ^{4.2.3.2.1} 、FY14-036B ^{4.2.3.2.2})	14
2.6.6.3.1.2 FF MDI (試験番号 FY09-039 ^{4.2.3.2.3} 、FY09-038 ^{4.2.3.2.4})	14
2.6.6.3.1.3 GP MDI (試験番号 FY14-111 ^{4.2.3.2.5} 、FY08-076 ^{4.2.3.2.6} 、FY08-077 ^{4.2.3.2.7})	15
2.6.6.3.1.4 BFF MDI (試験番号 FY14-034 ^{4.2.3.2.8} 、FY14-036A ^{4.2.3.2.9})	16
2.6.6.3.1.5 BGP MDI (試験番号 FY15-040 ^{4.2.3.2.10} 、FY14-036B ^{4.2.3.2.2})	16
2.6.6.3.1.6 GFF MDI (試験番号 FY09-086 ^{4.2.3.2.11} 、FY09-087 ^{4.2.3.2.12})	17
2.6.6.3.1.7 BGF MDI (試験番号 FY14-033 ^{4.2.3.2.13} 、FY14-036A ^{4.2.3.2.9})	18
2.6.6.3.1.7.1 ラット 14 日間反復吸入投与毒性試験 (試験番号 FY14-033 ^{4.2.3.2.13})	18
2.6.6.3.1.7.2 イヌ 14 日間反復吸入投与毒性試験 (試験番号 FY14-36A ^{4.2.3.2.9})	21
2.6.6.3.2 3 カ月間反復吸入投与毒性試験	23
2.6.6.3.2.1 BD MDI、BGP MDI (試験番号 FY14-148B ^{4.2.3.2.14})	23
2.6.6.3.2.2 GFF MDI:イヌを用いた 3 カ月間反復吸入投与毒性試験 (試験番号 FY10-129 ^{4.2.3.2.15})	24
2.6.6.3.2.3 BGF MDI、BFF MDI (試験番号 FA14-148A ^{4.2.3.2.16})	27
2.6.6.3.3 6 カ月間反復吸入投与毒性試験	29
2.6.6.3.3.1 GP MDI: ラットを用いた 6 カ月間反復吸入投与毒性試験 (試験番号 FY10-120 ^{4.2.3.2.17})	29
2.6.6.3.3.2 GP MDI: イヌを用いた 6 カ月間反復吸入投与毒性試験 (試験番号 FY12-073 ^{4.2.3.2.18})	30
2.6.6.3.4 9 カ月間反復吸入投与毒性試験	33

2.6.6 毒性試験の概要文

一般名：ブデソニド/グリコピロニウム臭化物/ホルモテロールフマル酸塩水和物

2.6.6.3.4.1	GP MDI: 非げっ歯類を用いた9カ月間反復吸入投与毒性試験.....	33
2.6.6.4	遺伝毒性試験.....	33
2.6.6.4.1	ブデソニド.....	33
2.6.6.4.2	ホルモテロール.....	33
2.6.6.4.3	グリコピロニウム.....	34
2.6.6.4.3.1	<i>In vitro</i>	34
2.6.6.4.3.1.1	細菌復帰突然変異試験（試験番号 AD91RW.502ICH.BTL ^{4.2.3.3.1.1} ）.....	34
2.6.6.4.3.1.2	TK6細胞を用いた <i>in vitro</i> 哺乳類細胞小核試験（試験番号 AD91RW.361ICH.BTL ^{4.2.3.3.1.2} ）.....	34
2.6.6.4.3.2	<i>In vivo</i>	35
2.6.6.4.3.2.1	ラットにおける <i>in vivo</i> 小核試験（試験番号 AD91RW.125M012ICH.BTL ^{4.2.3.3.2.1} ）.....	35
2.6.6.4.4	ブデソニド/グリコピロニウム/ホルモテロール.....	36
2.6.6.5	がん原性試験.....	36
2.6.6.5.1	ブデソニド.....	36
2.6.6.5.2	ホルモテロール.....	36
2.6.6.5.3	グリコピロニウム.....	36
2.6.6.5.3.1	マウスを用いた104週間の吸入毒性試験（試験番号 FY14-128 ^{4.2.3.4.1.1} ）.....	36
2.6.6.5.3.2	ラットを用いた104週間の吸入毒性試験（試験番号 FY12-072 ^{4.2.3.4.1.2} ）.....	39
2.6.6.5.4	ブデソニド/グリコピロニウム/ホルモテロール.....	42
2.6.6.6	生殖発生毒性試験.....	42
2.6.6.6.1	ブデソニド.....	42
2.6.6.6.2	ホルモテロール.....	43
2.6.6.6.3	グリコピロニウム.....	43
2.6.6.6.3.1	受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験（試験番号 14-764 ^{4.2.3.5.1.1} ）.....	43
2.6.6.6.3.2	胚・胎児発生に関する試験.....	45
2.6.6.6.3.2.1	ラット胚・胎児発生に関する試験（試験番号 14-760 ^{4.2.3.5.2.1} 、14-762 ^{4.2.3.5.2.2} ）.....	45
2.6.6.6.3.2.2	ウサギ胚・胎児発生に関する試験（試験番号 14-761 ^{4.2.3.5.2.3} 、14-763 ^{4.2.3.5.2.4} ）.....	46
2.6.6.6.3.3	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（試験番号 14-765 ^{4.2.3.5.3.1} ）.....	47
2.6.6.6.4	ブデソニド/グリコピロニウム/ホルモテロール.....	48
2.6.6.7	局所刺激性試験.....	48
2.6.6.7.1	ブデソニド.....	48

2.6.6 毒性試験の概要文

一般名：ブデソニド/グリコピロニウム臭化物/ホルモテロールフマル酸塩水和物

2.6.6.7.2	ホルモテロール	48
2.6.6.7.3	グリコピロニウム	49
2.6.6.7.4	ブデソニド/グリコピロニウム/ホルモテロール	49
2.6.6.8	その他の毒性試験	49
2.6.6.8.1	不純物及び分解生成物に関する試験	49
2.6.6.8.1.1	ブデソニド	49
2.6.6.8.1.2	ホルモテロール	49
2.6.6.8.1.3	グリコピロニウム	50
2.6.6.8.1.4	ブデソニド/グリコピロニウム/ホルモテロール	50
2.6.6.9	考察	50
2.6.6.9.1	総合的なリスク評価	50
2.6.6.9.2	ヒトにおける推定曝露量	52
2.6.6.9.3	主要毒性試験における曝露量	53
2.6.6.10	結論	54
2.6.6.11	参考文献	54

表目次

表 1	BD MDI、FF MDI、GP MDI、BFF MDI、BGP MDI、GFF MDI 及び BGF MDI の毒性試験一覧	7
表 2	BGF を用いた主要 3 カ月間毒性試験における重要所見及び曝露量データの概要：単一成分製剤との比較	53

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
AUC	Area under plasma concentration-time curve from zero to infinity : 投与後 0 時間から無限大時間までの血中濃度-時間曲線下面積
AUC _{last}	Area under plasma concentration-time curve from zero to time t : 投与後 0 時間から最終測定可能時点までの血中濃度-時間曲線下面積
AUC ₀₋₁₂	Area under plasma concentration-time curve from zero to 12 hours : 投与後 0 時間から 12 時間までの血中濃度-時間曲線下面積
BD	ブデソニド
BFF	ブデソニド/ホルモテロール fumarate 水和物
BGP	ブデソニド/グリコピロニウム臭化物
BGF	ブデソニド/グリコピロニウム臭化物/ホルモテロール fumarate 水和物
CaCl ₂	Calcium Chloride : 塩化カルシウム
C _{max}	Maximum Concentration : 最高血漿中薬物濃度
DRF	Dose range finding : 用量設定
DSPC	1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine : ジステアロイルホスファチジルコリン
EC	Erythrocyte : 赤血球
ECG	Electrocardiogram : 心電図
F ₀	Maternal generation : 母動物世代
F ₁	First generation : 第一世代
F ₂	Second generation : 第二世代
FF	Formoterol Fumarate : ホルモテロール fumarate 水和物
GFF	Glycopyrrolate/Formoterol Fumarate : グリコピロニウム臭化物/ホルモテロール fumarate 水和物
GP	Glycopyrrolate or glycopyrronium bromide : グリコピロニウム臭化物
GSD	Geometric Standard Deviation : 幾何標準偏差
HR	Heart Rate : 心拍数
ICH	International Conference on Harmonisation : 日米 EU 医薬品規制調和国際会議
MDI	Metered Dose Inhaler : 定量噴霧式吸入剤
MMAD	Mass Median Aerodynamic Diameter : 空気動力学的中央粒子径
MPCE	Micronucleated Polychromatic Erythrocyte : 小核を有する多染性赤血球
MTD	Maximum Tolerated Dose : 最大耐量
ND	None Detected : 検出限界以下
NOAEL	No Observed Adverse Effect Level : 無毒性量
NOEL	No Observed Effect Level : 無影響量
OECD	Organisation for Economic Co-operation and Development : 経済協力開発機構
PCE	Polychromatic Erythrocyte : 多染性赤血球
TK	Toxicokinetics : トキシコキネティクス
t _{1/2}	Elimination half-life : 消失半減期
t _{max}	Time to reach peak or maximum concentration : 最高血漿中濃度到達時間

2.6.6.1 まとめ

ブデソニド (BD)、グリコピロニウム臭化物 (GP) 及びホルモテロールフマル酸塩水和物 (FF) (それぞれ、糖質コルチコイド薬、M₃拮抗薬及びβ₂刺激薬) の3剤固定用量吸入配合剤 (BGF) は、COPD 患者に対する吸入維持療法薬として、ジステアロイルホスファチジルコリン (DSPC)、塩化カルシウム (CaCl₂) 及びヒドロフルオロアルカン-134a (HFA-134a) を含有する定量噴霧式吸入剤 (MDI) として開発された。上記3つの各有効成分は幅広く研究され、医療用医薬品として使用されていることから、BGF については、ラット及びイヌを用いた単回吸入投与毒性試験 (非 GLP 試験) 及び14日間反復吸入投与毒性試験、並びにイヌを用いた3カ月間反復吸入投与毒性試験でその毒性を評価した (安全性薬理データは毒性試験の一部として収集、薬理試験の概要文 2.6.2 を参照)。

本 2.6.6 毒性試験の概要文では、ホルモテロールフマル酸塩水和物をホルモテロール、グリコピロニウム臭化物をグリコピロニウムと略して表記している。なお、本 2.6.6 毒性試験の概要文及び個々の毒性試験報告書では、その投与量は、ホルモテロールフマル酸塩 (水和物としてではない) 及び/あるいはグリコピロニウム臭化物 (グリコピロニウムとしてではない) として表記している。

ブデソニド、ホルモテロール及びグリコピロニウムのそれぞれについて、ラット及びイヌを用いた単回吸入投与毒性試験 (非 GLP 試験) 及び14日間反復吸入投与毒性試験、並びにイヌを用いた3カ月間反復吸入投与毒性試験を実施した。更に、2剤配合剤 [ブデソニド/ホルモテロール (BFF)、ブデソニド/グリコピロニウム (BGP) 及びグリコピロニウム/ホルモテロール (GFF)] についても同様の試験を実施した。また、GP のみを用いて、ラット及びイヌにおける6カ月間反復吸入投与毒性試験、並びにマウス及びラットにおけるがん原性試験を実施した。上記の試験ではすべて、DSPC、CaCl₂ 及び HFA-134a を含有する MDI 製剤を用いて実施し、溶媒対照群及び空気対照群 (空気のみ吸入投与) を設けていることから、有効成分及び添加物の安全性を裏付けるための広範なデータが得られている。

主要毒性試験はすべて、OECD の加盟国において、OECD テストガイドライン及び GLP、並びに関連する ICH ガイドラインに準拠して実施した。

BD MDI、FF MDI、GP MDI (以上単剤)、BFF MDI、BGP MDI、GFF MDI (以上2剤配合剤) 及び BGF MDI (3剤配合剤) を用いて実施した毒性試験の一覧を表 1 に示す。

2.6.6 毒性試験の概要文

一般名：ブデソニド／グリコピロニウム臭化物／ホルモテロールフマル酸塩水和物

表 1 BD MDI、FF MDI、GP MDI、BFF MDI、BGP MDI、GFF MDI 及び BGF MDI の毒性試験一覧

試験の種類 及び投与期間	投与経路	動物種	被験物質	試験番号	GLP
単回投与	吸入	ラット及びイヌ	BD MDI	FY13-150 / FY13-151	非 GLP
			FF MDI	FY08-042B / FY08-041B	非 GLP
			GP MDI	FY08-042A / FY08-041A	非 GLP
			BFF MDI	FY13-150 / FY13-151	非 GLP
			BGP MDI	FY13-151 (イヌのみ)	非 GLP
			GFF MDI	FY08-042D / FY08-041D	非 GLP
			BGF MDI	FY13-150 / FY13-151	非 GLP
反復投与					
14 日間	吸入	ラット及びイヌ マウス (FY14-111 のみ)	BD MDI	FY14-035 / FY14-036B	GLP
			FF MDI	FY09-039 / FY09-038	GLP
			GP MDI	FY08-076/ FY08-077、FY14-111 (マウス)	GLP
			BFF MDI	FY14-034 / FY14-036A	GLP
			BGP MDI	FY15-040 / FY14-036B	GLP
			GFF MDI	FY09-086 / FY09-087	GLP
			BGF MDI	FY14-033 / FY14-036A	GLP
3 カ月間	吸入	イヌ	BD MDI	FY14-148B	GLP
			FF MDI	FY10-129	GLP
			GP MDI	FY10-129	GLP
			BFF MDI	FY14-148A	GLP
			BGP MDI	FY14-148B	GLP
			GFF MDI	FY10-129	GLP
			BGF MDI	FY14-148A	GLP
6 カ月間	吸入	ラット及びイヌ	GP MDI	FY10-120 / FY12-073	GLP

次頁へ続く

2.6.6 毒性試験の概要文

一般名：ブデソニド/グリコピロニウム臭化物/ホルモテロールフマル酸塩水和物

試験の種類 及び投与期間	投与経路	動物種	被験物質	試験番号	GLP
遺伝毒性					
復帰突然変異試験	<i>In Vitro</i>		GP	AD91RW.502ICH.BTL	GLP
<i>In vitro</i> 小核試験	<i>In Vitro</i>		GP	AD91RW.361ICH.BTL	GLP
<i>In vivo</i> 小核試験	経口	ラット	GP	AD91RW.125M012ICH.BTL	GLP
がん原性					
	吸入	マウス	GP MDI	FY14-128	GLP
		ラット	GP MDI	FY12-072	GLP
生殖発生毒性					
Seg I		ラット	GP	14-764	GLP
Seg II, DRF	皮下	ラット及びウサギ	GP	14-760 / 14-761	GLP
Seg II		ラット及びウサギ	GP	14-762 / 14-763	GLP
Seg III		ラット	GP	14-765	GLP

BD = ブデソニド; FF = ホルモテロール; GP = グリコピロニウム; BFF = ブデソニド/ホルモテロール; BGP = ブデソニド/グリコピロニウム; GFF = グリコピロニウム/ホルモテロール; BGF = ブデソニド/グリコピロニウム/ホルモテロール; Seg I = 受胎能及び着床までの初期発生に関する試験、Seg II = 胚・胎児発生に関する試験、Seg III = 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、DRF = 用量設定試験
 全ての吸入毒性試験においては、HFA-134a 噴射剤中に添加物を含む溶媒のみを投与した溶媒対照群が含まれる。
 添加物（多孔性粒子）は塩化カルシウム（CaCl₂）及びジステアロイルホスファチジルコリン（DSPC）で構成される。
 更にこれら試験では空気のみを吸入投与する空気対照群も設定した。

2.6.6 毒性試験の概要文

一般名：ブデソニド/グリコピロニウム臭化物/ホルモテロールフマル酸塩水和物

臨床試験では、1吸入あたり 80/9.0/5.0 µg 及び 160/9.0/5.0 µg (ブデソニド/グリコピロニウム/ホルモテロール) という有効成分含量の異なる 2 種類の BGF が使用されており、1 回の delivered dose (容器から放出される量) に、ブデソニド 80 又は 160 µg、グリコピロニウム臭化物 9.0 µg (グリコピロニウム 7.2 µg に相当) 及びホルモテロールフマル酸塩水和物 5.0 µg (ホルモテロールフマル酸塩 4.8 µg に相当) が含まれる。これは、ブデソニド 92.5 及び 185 µg、グリコピロニウム臭化物 10.4 µg (グリコピロニウム 8.3 µg に相当) 及びホルモテロールフマル酸塩水和物 5.8 µg (ホルモテロールフマル酸塩 5.6 µg に相当) の metered dose (容器内で測り取られる量) に相当する。

患者への投与は 1 回 2 吸入、1 日 2 回であることから、1 日あたりの最大総投与量は、ブデソニドで 640 µg、グリコピロニウム臭化物で 36 µg、ホルモテロールフマル酸塩水和物で 20 µg である。BGF の毒性試験では、1 吸入あたり 160/9.0/5.0 µg の治験用製剤を使用した。単剤 MDI 及び 2 剤配合剤 MDI を用いて実施した試験では、同程度の添加物 (DSPC、CaCl₂ 及び HFA-134a) を含有する同様の MDI に、様々な有効成分含量及び配合比を設定し試験を実施した。

毒性試験で観察された主な所見の概要を以下に示す。試験デザイン及び主な所見の詳細については、2.6.6.2項～ 2.6.6.9項 及び 2.6.7 毒性試験の概要表に示す。

毒性試験で観察された主な所見を以下に要約する。

3 剤配合剤：

ラットでは、BGF を 1890/100/58、3810/204/118 及び 7910/421/244 µg/kg/日 (ブデソニド/グリコピロニウム/ホルモテロール、雄雌の平均値) の用量で経鼻吸入投与により 1 日 1 回、14 日間反復投与した結果、副腎、肝臓、胃、並びに胸腺、脾臓、リンパ節及び骨髄を含むリンパ組織に病理組織学的変化が認められ、器官重量及び血液学的検査並びに血液生化学的検査所見を含む複数の評価項目において変化が認められた。気道内にみられた変化は軽微であり、非特異的な影響であると判断された。また、体重減少が、用量依存的に認められた。すべての被験物質投与群で早期死亡が用量依存的に観察され、この早期死亡は、ブデソニドの免疫抑制作用に起因する全身性細菌感染が原因であると考えられた。全用量群で、投与の影響がみられたパラメータの完全又は部分的な回復が認められた。この試験で観察された病理組織学的検査及び血液学的検査や血液生化学的検査における変化は、糖質コルチコイドの影響による特徴に一致しており、BGF 配合剤中のブデソニドに対する反応である可能性が高いと考えられた。この試験では、非常に高い用量を用いたため、無毒性量 (NOAEL) は決定できなかった。

イヌでは、BGF を 132/6.7/4.2、260/13/8.5 及び 428/22/14 µg/kg/日 (ブデソニド/グリコピロニウム/ホルモテロール、雄雌の平均値) の用量でフェイスマスクを用いて 14 日間反復吸入投与した結果、血液学的検査、血液生化学的検査、器官重量及び病理組織学的検査において、糖質コルチコイドに典型的な反応である変化が認められた。主な所見は、末梢血中の好中球数増加及びリンパ球数減少と器官重量の変化 (副腎及び胸腺重量の減少並びに代謝要求の増大及び/又は脂質/グルコース代謝の変化に起因すると考えられる肝重量の増加) であり、これに一致する所見 (副腎皮質萎縮、肝細胞変化、並びに胸腺及びリンパ節の細胞数減少) が病理組織学的検査において観察された。製剤中にグリコピロニウム及びホルモテロールが含有されていても、全体として予測されるブデソニドに対する反応に影響を及ぼさないと考えられた。14 日間の回復期間後には、大半の動物で、投与の影響がみられたすべての組織において回復が認められた。血液学的検査、血液生化学的検査及び器官重量 (胸腺を除く) のパラメータは、すべて正常に回復した。病理組織学的所見は、肝臓では正常に回復したが、副腎及び胸腺では、軽減はしたもののある程度の影響が依然認められた。反復投与後に観察された一般状態所見は、主として水様便又は軟便であっ

2.6.6 毒性試験の概要文

一般名：ブデソニド/グリコピロニウム臭化物/ホルモテロールフマル酸塩水和物

た。体重、眼科学的検査、心電図検査又は呼吸パラメータには被験物質に関連した変化は認められなかった。この試験では、NOAEL は決定できなかった。

同様に、イヌを用いた 3 カ月間反復吸入投与毒性試験では、雄雌のビーグル犬に、3 剤を配合した BGF MDI を 3.3/0.21/0.11、17/1.1/0.62 及び 60/3.5/2.0 µg/kg/日（ブデソニド/グリコピロニウム/ホルモテロール、雄雌の平均値）の用量でフェイスマスクを用いた吸入によって 90 日間反復吸入投与した結果、副腎、肝臓及び胸腺に、糖質コルチコイドの影響に一致する反応が認められた。このような変化は、複数の病理学的評価項目（器官重量、血液学的検査や血液生化学的検査及び病理組織学的検査など）でも認められた。病理学的評価項目全体を通じて、性差は認められなかった。いずれの投与群においても、気道への影響は観察されなかった。投与に起因する器官重量の変化は、副腎重量の減少、肝重量の増加、及び胸腺重量の減少であった。これらの器官重量の変化は、副腎皮質萎縮（束状帯及び網状帯）、グリコーゲン蓄積及び/又は代謝活性亢進（適応性変化）に一致する肝細胞の変化、並びに胸腺皮質のリンパ球数減少に一致する所見であった。臨床病理学的検査パラメータにみられた投与に起因する変化は、血液生化学的検査値における軽微な変化（アルカリホスファターゼ、γ-グルタミルトランスフェラーゼ、アルブミン及びトリグリセリドの軽微な上昇）であった。この試験では無影響量（NOEL）は決定できなかったが、低用量群でみられた影響（少数のイヌにおける軽微な肝細胞変化及び軽微な胸腺皮質のリンパ球数減少）は概して軽微なものであり、この用量が NOAEL に相当すると判断された。この試験で観察された病理組織学的変化、血液生化学的検査並びに血液生化学的検査における変化は、これまでに報告されている糖質コルチコイドの影響の特徴に一致していたことから、ブデソニドに起因する変化であると考えられた。本 3 剤配合剤の成分比率に基づくと、グリコピロニウム又はホルモテロールに関連する有意な影響はみられず、グリコピロニウム及びホルモテロールが含まれていても、予想されるブデソニドに対する反応には影響しないと考えられた。

単剤：

ブデソニドは 1981 年に承認を受けた薬剤であり、110 カ国以上の国々で様々な吸入剤に利用されている。アストラゼネカ社は、単回及び反復投与毒性試験、生殖発生毒性試験、抗原性試験、遺伝毒性試験、がん原性試験並びに局所刺激性試験を含めた完全な毒性試験データを既に日本の規制当局にも提出している。このデータの一部を、参考のために本承認申請資料に提示する。

観察された主な影響は、体重増加抑制、肥満、皮膚炎及び脱毛の発生増加、リンパ系器官及び副腎の萎縮、胃潰瘍、総白血球数及びリンパ球数の減少、血漿コルチゾール濃度低下、肝グリコーゲン増加、並びに高用量でみられた肝酵素上昇又は病理組織学的変化であり、糖質コルチコイドの薬理作用による典型的な影響であった。呼吸器系に対する影響は認められなかった。ブデソニドは、一連の遺伝毒性試験において遺伝毒性を示さなかった。がん原性試験ではラットにおいて肝腫瘍の増加が観察されたが、このような所見は他の糖質コルチコイドの投与時にもみられるものであり、臨床的意義はないと考えられる。ラット及びウサギを用いて皮下投与により実施した生殖発生毒性試験では、糖質コルチコイドのクラスエフェクトに一致する影響（胎児損失増加、出生児体重減少、骨格異常など）が認められた。

ホルモテロールは 1996 年に最初の承認（アストラゼネカ社の製品中）を受けた薬剤であり、約 120 カ国の国々で単剤製品（OXIS[®]、本邦ではオーキシス[®]）又はブデソニドとの固定用量配合剤（SYMBICORT[®]、本邦ではシムビコート[®]）として使用されている。アストラゼネカ社は、単回及び反復投与毒性試験、生殖発生毒性試験、遺伝毒性試験、並びにがん原性試験を含めた完全な毒性試験データを既に日本の規制当局にも提出している。このデータの一部を、参考のために本承認申請資料に提示する。

2.6.6 毒性試験の概要文

一般名：ブデソニド/グリコピロニウム臭化物/ホルモテロールフマル酸塩水和物

ホルモテロールの単回及び反復吸入投与毒性試験では、 β_2 刺激薬の投与に関連してみられる共通の所見（充血、頻脈、並びに高用量でみられた不整脈、心重量増加及び心筋線維化など）を除き、毒性学的に意義のある所見は認められなかった。ホルモテロールは、一連の遺伝毒性試験において遺伝毒性を示さなかった。マウス及びラットを用いたがん原性試験では、ホルモテロールによって子宮平滑筋腫（マウス）及び卵巣間膜平滑筋腫（ラット）が誘発されたが、これらの所見は、高用量の β 刺激薬を投与されたげっ歯類にみられるクラスエフェクトであると考えられ、臨床的意義はないと考えられる。ラットを用いた受胎能/生殖発生毒性試験では、高用量において、雄の受胎能に対する影響、並びに出生児の発育への影響及び奇形の増加が認められた。胚・胎児発生に関する試験では、ホルモテロールはラットに対して催奇形性を示さなかったが、ウサギでは、高用量において肝嚢胞又は骨格変異を有する胎児の出現率の増加がみられた。

グリコピロニウムは、長年にわたり様々な医療用医薬品として利用されている。しかし、オリジナルデータを利用できる参考文献が十分に存在しなかったこと、及び最近のデータの参照には制限があることから、単回及び反復吸入投与毒性試験、生殖発生毒性試験、遺伝毒性試験及びがん原性試験を含む、グリコピロニウムについての毒性試験を実施した。これらの試験の結果を、本承認申請資料として提示する。

グリコピロニウムの単回及び反復吸入投与毒性試験では、MDI 製剤により制限される投与可能な最大用量まで投与したが、いずれの用量においても有意な所見は認められなかった（2.6.6.2及び2.6.6.3項を参照）。グリコピロニウムは、一連の遺伝毒性試験において遺伝毒性を示さなかった（2.6.6.4項を参照）。マウス及びラットを用いた 2 年間吸入投与がん原性試験（2.6.6.5項を参照）では、GP MDI を長期投与したとき、いずれの用量においてもがん原性は認められなかった。皮下投与により実施した生殖発生毒性試験（2.6.6.6項を参照）では、受胎能、胚・胎児発生、又は出生前及び出生後の発生に対する有意な影響は認められなかった。

2 剤配合剤：

各 2 剤配合剤では、各単剤及び 3 剤配合剤と同様の MDI 製剤を用いたラット（投与期間は 14 日間まで）及びイヌ（投与期間は 3 カ月間まで）における反復吸入投与毒性試験で得られたデータから、各成分の用量及び配合比との関連において一貫した所見が得られた。ブデソニドを含有する製剤では、ブデソニドにおいて予測される影響のみが認められ、グリコピロニウム/ホルモテロールの配合剤では、ホルモテロールにおいて予測される影響のみが認められたことから、これらの 3 つの有効成分間に有害な相互作用が起こる可能性はないことが確認された。

結論：

ブデソニド、グリコピロニウム及びホルモテロールは既に幅広く研究され、医療用医薬品として使用されている。加えて、これら 3 剤の固定用量配合剤を用いた毒性試験において、有害な相互作用は起こらないことが確認された。したがって、この吸入投与毒性試験プログラムにより、1 吸入あたり 80 又は 160/9.0/5.0 μg （ブデソニド/グリコピロニウム/ホルモテロール）の固定用量配合剤を 1 回 2 吸入、1 日 2 回投与（1 日の総投与量はブデソニド 320 又は 640 μg 、グリコピロニウム臭化物 36 μg 、ホルモテロールフマル酸塩水和物 20 μg ）として使用することが支持される。

2.6.6.2 単回吸入投与毒性試験

2.6.6.2.1 BD MDI（試験番号 FY13-150^{4.2.3.1.1}、FY13-151^{4.2.3.1.2}）

BD MDI の忍容性を評価するため、ラット（FY13-150）及びイヌ（FY13-151）を用いて単回吸入投与毒性試験（非 GLP）を実施した。その結果、ラット及びイヌのいずれにおいても、本 MDI 製剤において投与可能な最大用量まで投与したが、用量制限毒性は認められなかった。BD MDI の単回吸入投与毒性試験における最大非致死量は、ラット及びイヌでそれぞれ、3460 µg/kg 及び 363 µg/kg（雄雌の平均値）であった。

2.6.6.2.2 FF MDI（試験番号 FY08-042B^{4.2.3.1.3}、FY08-041B^{4.2.3.1.4}）

FF MDI の忍容性を評価するため、ラット（FY08-042B）及びイヌ（FY08-041B）を用いて単回吸入投与毒性試験（非 GLP）を実施した。ラット及びイヌを用いた単回吸入投与毒性試験の結果から、シムビコート®などのホルモテロールを含有する既承認薬での以前の報告から予測される心臓への影響以外、FF MDI は重大な毒性は引き起こさないという仮定が裏付けられる。

ラット単回吸入投与毒性試験（FY08-042B）では、FF MDI 投与に起因する異常所見はみられなかった。剖検時に中用量及び高用量群では軽度～中等度の血管鬱血及び肺の白色あるいは赤色化が観察された。イヌ単回吸入投与毒性試験（FY08-041B）では、高用量群において、血液学的検査及び血液生化学的検査では影響はみられなかったが、体温上昇（103.0 F=約 39°C）、呼吸数増加（ベースラインの約 2 倍）及び心拍数増加（ベースラインの約 2 倍）がみられた。FF MDI 単回吸入投与毒性試験における最大非致死量はラット及びイヌでそれぞれ、52 µg/kg 及び 14 µg/kg（雄雌の平均値）であった。

2.6.6.2.3 GP MDI（試験番号 FY08-042A^{4.2.3.1.5}、FY08-041A^{4.2.3.1.6}）

GP MDI の忍容性を評価するため、ラット（FY08-042A）及びイヌ（FY08-041A）を用いて単回吸入投与毒性試験（非 GLP）を実施した。ラット及びイヌを用いた単回吸入投与毒性試験の結果から、グリコピロニウムの結晶と多孔質粒子を混合し、HFA-134a に懸濁した製剤は、投与可能な最高濃度においても重大な毒性を引き起こさないという仮定が裏付けられる。

ラット単回吸入投与毒性試験（FY08-042A）及びイヌ単回吸入投与毒性試験（FY08-041A）では、いずれの動物種においても GP MDI 投与に起因する異常所見はみられず、いずれの用量においても血液生化学的検査及び血液学的検査に影響はみられなかった。GP MDI 単回吸入投与毒性試験における最大非致死量はラット及びイヌでそれぞれ、1.01 mg/kg 及び 0.16 mg/kg（雄雌の平均値）であった。

2.6.6.2.4 BFF MDI（試験番号 FY13-150^{4.2.3.1.1}、FY13-151^{4.2.3.1.2}）

BFF MDI の忍容性を評価するため、ラット（FY13-150）及びイヌ（FY13-151）を用いて単回吸入投与毒性試験（非 GLP）を実施した。その結果、イヌを用いた試験で心拍数の軽度な増加が観察された。その他には、ラット及びイヌのいずれにおいても、本 MDI 製剤において投与可能な最大用量まで投与したが、用量制限毒性は認められなかった。BFF MDI の単回吸入投与毒性試

験における最大非致死量は、ラット及びイヌでそれぞれ、4240/129 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 及び 391/11 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (ブデソニド/ホルモテロール、雄雌の平均値) であった。

2.6.6.2.5 BGP MDI (試験番号 FY13-151^{4.2.3.1.2})

BGP MDI の忍容性を評価するため、イヌのみ (FY13-151) を用いて単回吸入投与毒性試験 (非 GLP) を実施した。その結果、イヌでは、本 MDI 製剤において投与可能な最大用量まで投与したが、用量制限毒性は認められなかった。BGP MDI 単回吸入投与毒性試験におけるイヌの最大非致死量は、455/22 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (ブデソニド/グリコピロニウム、雄雌の平均値) であった。

2.6.6.2.6 GFF MDI (試験番号 FY08-042D^{4.2.3.1.7}、FY08-041D^{4.2.3.1.8})

GFF MDI の忍容性を評価するため、ラット (FY08-042D) とイヌ (FY08-041D) を用いて単回吸入投与毒性試験を実施 (非 GLP) した。ラットとイヌを用いた単回吸入投与毒性試験の結果は、シムビコート®などのホルモテロールを含有する既承認薬で以前の報告から予測される心臓への影響以外、GFF MDI が重大な毒性を引き起こさないことを裏付けている。

ラット単回吸入投与毒性試験 (FY08-042D) では、高用量群の雄 1 匹に投与 3 時間後に努力性呼吸がみられたが、その他の動物に一般状態の変化はみられなかった。投与 24 時間後、高用量群の雄雌各 1 匹に肺の変色 (赤色) がみられた。イヌ単回吸入投与毒性試験 (FY08-041D) では、血液学的検査及び血液生化学的検査に影響はみられなかったが、高用量群で紅斑、呼吸数増加 (ベースラインの約 2 倍)、心拍数増加 (ベースラインの約 2 倍) がみられた。GFF MDI 単回吸入投与毒性試験における最大非致死量はラット及びイヌでそれぞれ、341/69 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 及び 78.6/15.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (グリコピロニウム/ホルモテロール、雄雌の平均値) であった。

2.6.6.2.7 BGF MDI (試験番号 FY13-150^{4.2.3.1.1}、FY13-151^{4.2.3.1.2})

BGF MDI の忍容性を評価するため、ラット (FY13-150) 及びイヌ (FY13-151) を用いて単回吸入投与毒性試験 (非 GLP) を実施した。ラットを用いた試験では、投与 24 時間後の観察時、雄 1 匹及び雌 2 匹に呼吸困難が認められ、これらの雌のうち 1 匹では頻呼吸もみられた。加えて、ごく軽微な肺の線状陥凹が、投与 180 分後の剖検時点で雌 2 匹に、投与 24 時間後の剖検時点で雌 1 匹に認められた。また、イヌを用いた試験で心拍数の軽度の増加が観察されたが、その他には、ラット及びイヌのいずれにおいても、本 MDI 製剤において投与可能な最大用量まで用量制限毒性は認められなかった。BGF MDI 単回吸入投与毒性試験における最大非致死量は、ラット及びイヌでそれぞれ、2010/375/199 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 及び 474/26/14 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (ブデソニド/グリコピロニウム/ホルモテロール、雄雌の平均値) であった。

2.6.6.3 反復吸入投与毒性試験

2.6.6.3.1 14 日間反復吸入投与毒性試験

2.6.6.3.1.1 BD MDI (試験番号 FY14-035^{4.2.3.2.1}、FY14-036B^{4.2.3.2.2})

ラットを用いた 14 日間反復吸入投与毒性試験 (FY14-035) では、主試験の動物を 1 群雄雌各 10 匹として (更に回復試験及びトキシコキネティクス (TK) 試験の動物を追加)、BD MDI を 713、2270 及び 4550 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$ (雄雌の平均値) の用量で経鼻吸入投与し、同様の動物数の空気対照群 (空気のみ吸入投与) 及び溶媒対照群を設けた。その結果、BD MDI の投与により、体重減少及び死亡/病的状態 (この病的状態の原因は、ブデソニドの免疫抑制作用に起因する全身性細菌感染である可能性が高い) が認められ、これに一致する組織反応が喉頭、肺、副腎、肝臓 (肝細胞の変化 (肝臓門脈域))、胃及びリンパ組織 (胸腺、脾臓、リンパ節及び骨髄を含む) で観察された。呼吸器以外にみられた反応は糖質コルチコイドによる影響の特徴を示すものであり、これを裏付ける変化が器官重量、血液学的検査及び血液生化学的検査において認められた。14 日間の回復期間後には、投与の影響がみられたすべてのパラメータにおいて完全又は部分的な回復が認められた。本試験で観察された病理組織学的検査及び血液学的検査や血液生化学的検査における変化は、これまでに報告されている糖質コルチコイドの影響の特徴に一致するものであり、ブデソニドに対する反応である可能性が高いと考えられた。この試験では NOAEL は決定されなかった。

イヌを用いた 14 日間反復吸入投与毒性試験 (FY14-036B) では、BD MDI の評価を BGP MDI と同時に評価したため、BD MDI についての概要は 2.6.6.3.1.5 項に併せて記載する。

2.6.6.3.1.2 FF MDI (試験番号 FY09-039^{4.2.3.2.3}、FY09-038^{4.2.3.2.4})

各動物種における 14 日間反復吸入投与毒性試験 (ラット：FY09-039、イヌ：FY09-038) を実施し、回復性、TK、及び安全性薬理に関連した項目などを含めて一連の安全性評価を行った。

14 日間ラット試験 (FY09-039) では、主試験の動物を 1 群雄雌各 10 匹として (更に回復試験及び TK 試験の動物を追加)、FF MDI を 36、91 及び 158 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$ (雄雌の平均値) の用量で経鼻吸入投与し、同様の動物数の空気対照群及び溶媒対照群を設けた。FF MDI 吸入投与の結果、血液学的検査及び血液生化学的検査パラメータに軽微な変化がみられたが、14 日間の回復期間中に概ねベースラインまで回復した。これらの変化は、相関する病理組織学的所見及びその他の様々な血液生化学的検査値の変化がみられなかったため、毒性所見ではないと考えられた。いずれの用量群でも病理組織学的所見は認められなかった。ラットを用いた本試験の NOAEL は高用量と考えられ、雄では 153 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$ 、雌では 163 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$ であった。

14 日間イヌ試験 (FY09-038) では、主試験の動物を 1 群雄雌各 4 頭として (更に回復試験の動物 2 頭を追加)、FF MDI を 9.2、13 及び 24 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$ (雄雌の平均値) の用量でフェイスマスクを用いて吸入投与し、同様の動物数の空気対照群及び溶媒対照群を設けた。その結果、心臓パラメータ及び一般状態の変化が認められ、これら変化は以前から報告されているホルモテロールによる症状と一致していた。中用量及び高用量群のイヌでは、左心室の乳頭筋に軽微～中等度の線維化が認められた。低用量群の 1 頭において、乳頭筋に紡錘状細胞が認められた。高用量を投与したイヌでは、回復群においても同様の所見 (程度は軽微) が認められた。この部位に認めら

れたコラーゲンは、心拍数の持続的増加とその後の虚血の結果として、心筋細胞が障害されたことによるものと考えられた。予想されたように、すべての用量群で、肝臓における肝細胞の変化が観察された。これらの変化の発現率と重症度は、いずれの投与群でもほぼ同等であった。心拍数増加及び肝臓の代謝化活性亢進は、病理組織学的所見からも裏付けられた。主試験では、溶媒対照群と比較して、ホルモテロールによる血液学的検査又は血液生化学検査パラメータの有意な変化はみられなかった。回復期間中これらパラメータに変動がみられたが、関連するその他のパラメータに変化はみられなかった。その他の関連する影響がみられなかったことから、回復期間中のパラメータの変動には生物学的意味はほとんどないと考えられる。低用量群の1頭に乳頭筋に紡錘状細胞が認められたため、本試験では明確なNOAELが観察されなかった。しかし、この低用量群の1頭の投与1日における $t_{1/2}$ 値は9.3時間であり、低用量群のその他の動物の $t_{1/2}$ 値が2.4時間であったことを考慮すると、この $t_{1/2}$ 値の延長が軽微な心臓所見（紡錘状細胞）を引き起こした可能性がある。従って、本試験のNOAELは低用量の9.2 µg/kg/日（雄：9.02 µg/kg/日、雌：9.38 µg/kg/日）と考えるのが妥当である。この心臓所見は、各投与時における心拍数の大幅な増加（ β_2 刺激薬の影響として知られる）によるものと考えられ、イヌは非常に感受性が高いことが知られている。イヌ試験における臨床的にモニタリング可能な安全性所見と、ラット試験における広い安全域に基づき、これらの14日間毒性試験によって、提案するヒト臨床用量が妥当かつ安全であることが再確認された。

2.6.6.3.1.3 GP MDI（試験番号 FY14-111^{4.2.3.2.5}、FY08-076^{4.2.3.2.6}、FY08-077^{4.2.3.2.7}）

各動物種における14日間反復吸入投与毒性試験（ラット：FY08-076、イヌ：FY08-077）を実施し、回復性、TK、及び安全性薬理に関連した項目などを含めて一連の安全性評価を行った。また、マウスがん原性試験の用量設定のために、マウスを用いた14日間反復吸入毒性試験（FY14-111）も実施した。

14日間ラット試験（FY08-076）で投与した最高用量は、平均で535 µg/kg/日（雄雌の平均値）であった。主試験の動物を1群雄雌各8又は10匹として（更に回復試験及びTK試験の動物を追加）、GP MDIを48、267及び535 µg/kg/日（雄雌の平均値）の用量で経鼻吸入投与し、同様の動物数の空気対照群及び溶媒対照群を設けた。GP MDI投与に起因する重要な所見はみられず、本試験におけるNOAELは高用量と考えられ、雄では514 µg/kg/日、雌では555 µg/kg/日であった。

14日間イヌ試験（FY08-077）で投与した最高用量は、平均で80 µg/kg/日（雄雌の平均値）であった。主試験の動物を1群雄雌各3又は4頭として（更に回復試験の動物2頭を追加）、GP MDIを17、30及び80 µg/kg/日（雄雌の平均値）の用量でフェイスマスクを用いて吸入投与し、同様の動物数の空気対照群及び溶媒対照群を設けた。GP MDI投与に起因する重要な所見はみられず、本試験におけるNOAELは高用量と考えられ、雄では77 µg/kg/日、雌では83 µg/kg/日であった。

14日間のマウス試験（FY14-111）では、330、640及び1380 µg/kg/日（雄雌の平均値）の用量を吸入投与した。高用量（1380 µg/kg/日）群において、投与6日に平均体重の減少がみられたが、14日間の投与期間終了時までには溶媒対照と同様の体重に回復した。投与に関連する病理組織学的変化として、特に高用量群の雌において鼻部鼻腔前方の呼吸器上皮の軽微から軽度のヒアリン変性（好酸性球状物資の存在としても知られる）及び嗅上皮減少が認められた。本所見は、げっ歯類を用いた吸入試験において一般的に認められる非特異的な所見である。これらの結果に基づいて、本試験におけるNOAELは1380 µg/kg/日（投与可能最大用量）と考えられ、がん原性試験の高用量として適切であると考えられた。

2.6.6.3.1.4 BFF MDI (試験番号 FY14-034^{4.2.3.2.8}、FY14-036A^{4.2.3.2.9})

ラットを用いた 14 日間反復吸入投与毒性試験 (FY14-034) では、主試験の動物を 1 群雄雌各 10 匹として (更に回復試験及び TK 試験の動物を追加) BFF MDI を 465/14、1540/45 及び 3160/93 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$ (ブデソニド/ホルモテロール、雄雌の平均値) の用量で経鼻吸入投与し、同様の動物数の空気対照群及び溶媒対照群を設けた。その結果、BFF MDI の投与により、喉頭、肺、副腎、肝臓 (肝細胞の変化 (肝臓門脈域))、胃及びリンパ組織 (胸腺、脾臓、リンパ節及び骨髄を含む) に病理組織学的変化が認められた。呼吸器以外にみられた反応は糖質コルチコイドによる影響の特徴を示すものであり、これを裏付ける変化が器官重量、血液学的検査及び血液生化学的検査に認められた。呼吸器にみられた変化は非常に軽微であり、非特異的な影響であると判断された。また、体重減少が、用量依存的に認められた。低用量群 (雌 1 匹) 及び高用量群 (雄 1 匹、雌 3 匹) で早期死亡が観察され、ブデソニドの免疫抑制作用に起因する全身性細菌感染が原因である可能性が最も高いと考えられた。投与の影響がみられたすべてのパラメータにおいて、完全又は部分的な回復が認められた。本試験で観察された病理組織学的検査及び血液学的検査や血液生化学的検査における変化は、これまでに報告されている糖質コルチコイドの影響の特徴に一致するものであり、被験物質である BFF 中のブデソニドに対する反応である可能性が高いと考えられた。本試験では NOAEL は決定されなかった。

イヌを用いた 14 日間反復吸入投与毒性試験 (FY14-036A) では、BFF MDI の評価を BGF MDI と同時に評価したため、BFF MDI についての概要は 2.6.6.3.1.7.2 項に併せて記載する。

2.6.6.3.1.5 BGP MDI (試験番号 FY15-040^{4.2.3.2.10}、FY14-036B^{4.2.3.2.2})

ラットを用いた 14 日間反復吸入投与毒性試験 (FY15-040) では、主試験の動物を 1 群雄雌各 10 匹として (更に回復試験及び TK 試験の動物を追加) BGP MDI を 641/34、2190/118 及び 4500/243 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$ (ブデソニド/グリコピロニウム、雄雌の平均値) の用量で経鼻吸入投与し、同様の動物数の空気対照群及び溶媒対照群を設けた。この結果、BGP MDI の投与により、糖質コルチコイドの典型的な全身作用に起因する所見が観察された。死亡及び/又は病的状態は中用量群 (死亡 1 匹) 及び高用量群 (瀕死 1 匹及び死亡 1 匹) で認められ、ブデソニドに関連した免疫抑制に起因する全身性細菌感染が原因である可能性が最も高いと考えられた。雄雌ともにすべての用量群で体重減少が用量依存的に認められた。呼吸器には、喉頭の扁平上皮化生及び肺泡マクロファージ集積がみられたが、これらの変化は非常に軽微であった。ブデソニドの免疫抑制作用は、糖質コルチコイド投与時にみられる典型的な白血球像が臨床病理学的検査で認められたこと、脾臓/胸腺/副腎の器官重量が減少したこと、及びこれに対応する病理組織学的変化 (副腎萎縮、免疫系の細胞数減少など) が観察されたことによって示された。また、トリグリセリド及びグルコースの有意な上昇並びにカリウム低下により、曝露後に代謝変化が生じたことが示された。肝機能のパラメータ (ALT、AST など) も高用量群の雄雌及び全用量群の雌で上昇し、これに一致して、主試験動物の 3 用量群すべてにおいて肝細胞の変化 (肝臓門脈域) がみられた。更に、主試験動物の 3 用量群すべてで胃潰瘍が観察され、用量依存性が認められた。投与の影響がみられたすべてのパラメータにおいて、完全又は部分的な回復が認められた。本試験では NOAEL は決定されなかった。

イヌを用いた 14 日間反復吸入投与毒性試験 (FY14-036B) の目的は、ビーグル犬において、2 種類の異なる配合剤の MDI 製剤、すなわち、BD MDI 又は BGP MDI の毒性及び影響の可逆性を評価することであった。この試験では、1 群雄雌各 3~4 頭 (主試験) 及び 2 頭 (回復試験) のイヌに、141、286 及び 360 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$ (ブデソニド、雄雌の平均値) 又は 169/9.3、389/21 及び 534/29 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$ (ブデソニド/グリコピロニウム、雄雌の平均値) の用量で 14 日間フェイスマスクを用

2.6.6 毒性試験の概要文

一般名：ブデソニド／グリコピロニウム臭化物／ホルモテロールフマル酸塩水和物

いて吸入投与した後、回復群では、14 日間の回復期間を設けた。また、同様の動物数の空気対照群及び溶媒対照群を設けた。空気動力学的中央粒子径 (MMAD) 及び幾何標準偏差 (GSD) は、BD 群で 4.54~4.82 (1.57~1.62) μm 、BGP 群で 4.40~4.80 (1.71~1.75) μm 、溶媒対照群では 3.50~4.61 (1.60~1.74) μm であった。

TK 測定のため、血漿検体を計画された各時点において採取した。投与 1 日において、BD の低用量群及び中用量群ではその曝露量に用量依存性が認められたが、中用量群と高用量群の曝露量は、投与したエアゾル濃度変動のため同様の曝露量となった。最高血漿中濃度 (C_{max}) は主に投与直後あるいは投与 30 分後の採血時点に観察された。14 日間の投与後には、 C_{max} 及び AUC の増加が観察され、明確な薬物蓄積が認められた。BD を投与された雄雌間に明確な性差は認められなかった。同様に、BGP 群でも雄雌の双方で曝露量にいくらかの用量依存性が認められ、ブデソニド及びグリコピロニウムの C_{max} は主に 1 回目あるいは 2 回目の採血時点で観察され、雄雌間に明らかな性差は認められなかった。投与 1 日と投与 14 日とで $t_{1/2}$ にはほとんど差はなかったが、AUC が増加したことから、試験期間中に被験物質の蓄積が生じていたことが示唆された。

イヌに BD 又は BGP MDI をフェイスマスクを用いて 14 日間反復吸入投与した結果、臨床病理学的検査所見、器官重量及び病理組織学的所見に、糖質コルチコイドに対する典型的な反応と一致する変化が認められた。BGP 高用量投与群の雄 1 頭に、ブデソニドの免疫抑制作用に起因すると考えられる日和見感染と一致する結果 (広範囲の好中球及び組織球性肺炎) による瀕死状態がみられたため、投与 7 日に安楽死させた。血液学的検査では、末梢血中のリンパ球及び好酸球の減少、好中球及び単球の増加を含むブデソニド投与後の典型的なストレス性の白血球像がみられた。血液生化学的検査では、主に肝機能及び脂肪代謝に関連するパラメータであるアルカリホスファターゼ (ALP) 及び γ -グルタミルトランスフェラーゼ (GGT) の増加が認められた。器官重量の変化では、主に副腎及び胸腺重量の減少並びに肝臓重量の増加が糖質コルチコイドの影響として認められた。これら影響は、必ずしも用量依存的ではなかったが、すべて糖質コルチコイドに対する予期された影響であった。病理組織学的検査では、BD 又は BGP を投与されたすべての動物において、副腎皮質 (束状帯及び網状帯) の萎縮、胸腺皮質リンパ球の減少、投与群間でその程度は様々ではあるが、気管気管支リンパ節における皮質リンパ球の減少、更に、肝細胞の変化 (肝臓門脈域) が一貫して観察された。14 日間の回復期間終了時では、回復性が認められたが、すべてのパラメータが完全に回復した群はなかった。その他の検査項目である体重、眼科学的検査、ECG (心電図)、あるいは呼吸パラメータには投与に起因した影響はみられなかった。全体として、本試験でみられた影響は典型的な糖質コルチコイド (ブデソニド) に対する影響であった。更に、BD 単剤と BGP 配合剤との間で、ブデソニドの影響に差は認められなかった。本試験において明らかな性差はみられなかった。本試験では、BD 又は BGP MDI のいずれに対しても NOAEL は決定できなかった。

2.6.6.3.1.6 GFF MDI (試験番号 FY09-086^{4.2.3.2.11}、FY09-087^{4.2.3.2.12})

各動物種における 14 日間反復吸入投与毒性試験 (ラット : FY09-086、イヌ : FY09-087) を実施し、回復性、TK、及び安全性薬理に関連した項目などを含めて一連の安全性評価を行った。

14 日間ラット試験 (FY09-086) では、主試験の動物を 1 群雄雌各 10 匹として (更に回復試験及び TK 試験の動物を追加)、GFF MDI を 75/15、234/44 及び 381/71 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$ (グリコピロニウム/ホルモテロール、雄雌の平均値) の用量で経鼻吸入投与し、同様の動物数の空気対照群及び溶媒対照群を設けた。GFF MDI の吸入投与の結果、ホルモテロールの代謝に伴う一部の血液学的検査及び血液生化学的検査パラメータに軽微な変化がみられたが、14 日間の回復期間で概ねベースラインに回復し、いずれの値も概ね従来の正常範囲内であった。相関する病理組織学的所見や、

2.6.6 毒性試験の概要文

一般名：ブデソニド／グリコピロニウム臭化物／ホルモテロールフマル酸塩水和物

他の様々な関連血液生化学的検査パラメータの変化が認められなかったことから、これらの変化は毒性所見ではないと考えられた。いずれの用量群においても、病理組織学的所見は認められなかった。溶媒対照群又は空気対照群では測定可能な被験物質は血漿中に検出されず、被験物質を投与したすべての動物でグリコピロニウムとホルモテロールが検出されたことにより、曝露が確認された。ラットを用いた本試験における GFF MDI の NOAEL は高用量（投与可能最大量）群の用量と考えられ、雄では 368/69 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$ 、雌では 394/73 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$ （グリコピロニウム/ホルモテロール）であった。

14 日間イヌ試験（FY09-087）では、主試験の動物を 1 群雄雌各 4 頭として（更に回復試験の動物 2 頭を追加）、GFF MDI を 17/3.4、52/8.9 及び 75/13 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$ （グリコピロニウム/ホルモテロール、雄雌の平均値）の用量でフェイスマスクを用いて吸入投与し、同様の動物数の空気対照群及び溶媒対照群を設けた。GFF MDI に処方されたグリコピロニウムとホルモテロールの吸入投与による曝露は、投与したすべての動物の血漿中でグリコピロニウムとホルモテロールを検出したことにより確認された。溶媒対照群又は空気対照群では測定可能な被験物質は検出されなかった。ホルモテロール投与により予測されたとおり、イヌは心臓パラメータ、呼吸パラメータ及び一般状態（紅斑）の変化を示し、これらの変化は文献で報告されているホルモテロール投与に関連した症状及び徴候と一致していた。また、認められた病理組織学的所見（心室乳頭筋線維化、肝細胞質腫脹）は、持続的な心拍数の増加及び細胞質腫脹を特徴とする肝臓の適応的な代謝活動の結果によるものと考えられた。グリコピロニウムとホルモテロールの吸入によって、様々な血液学的検査及び血液生化学的検査パラメータに一過性で生物学的に有意ではない変化がみられたが、14 日間の回復期間でベースラインまで回復した。肝細胞質の腫脹を有害所見とみなす場合、本試験では明確な NOAEL は確認できなかったが、肝酵素値の変化などの肝毒性の徴候は認められなかった。肝細胞質の腫脹は薬物代謝亢進に対する適応反応であることと、いずれの用量群でも肝臓の変化が軽微で可逆的であったとの事実を考慮すると、低用量を NOAEL とみなすのが妥当と考えられる。本試験における NOAEL は、雄雌とも低用量である 17/3 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$ （グリコピロニウム/ホルモテロール）であった。空気対照群と溶媒対照群の間に有意な群間差は認められなかった。

2.6.6.3.1.7 BGF MDI（試験番号 FY14-033^{4.2.3.2.13}、FY14-036A^{4.2.3.2.9}）

2.6.6.3.1.7.1 ラット 14 日間反復吸入投与毒性試験（試験番号 FY14-033^{4.2.3.2.13}）

ラットを用いた 14 日間反復吸入投与毒性試験（FY14-033）の目的は、ブデソニド、グリコピロニウム及びホルモテロール（BGF）を配合した MDI 製剤をラットに 14 日間経鼻吸入投与した後、回復群ではその後 14 日間の回復期間を設けたときの BGF MDI の毒性及び影響の可逆性を評価することであった。この試験では、主試験の動物を 1 群雌雄各 10 匹として（更に回復試験及びトキシコキネティクス試験の動物を追加）BGF（ブデソニド／グリコピロニウム／ホルモテロール）を 1890/100/58、3810/204/118 及び 7910/421/244 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$ （雄雌の平均値）の用量で投与し、同様の動物数の空気対照群及び溶媒対照群を設けた。溶媒対照エアロゾルの空気力学的中央粒子径（MMAD）は 4.3～4.6 μm （GSD は 1.7～1.9）であり、BGF エアロゾルの MMAD は 4.4～4.6 μm （GSD は 1.6）であった。

トキシコキネティクスの評価は、主試験と並行して実施した。血漿検体は投与 1 日の初回投与後並びに投与 14 日の最終投与後にそれぞれの 3 時点（投与後 30 分、3 時間及び 24 時間）で採取し、血漿検体中のグリコピロニウム、ホルモテロール及びブデソニド濃度を測定した。検体数が少数であったため、完全な薬物動態解析を行うのに十分なデータではなかったが、このデータを

2.6.6 毒性試験の概要文

一般名：ブデソニド／グリコピロニウム臭化物／ホルモテロールフマル酸塩水和物

検討することにより、観察的な C_{max} 及び T_{max} 、性別との相関、並びに試験期間を通じての蓄積を確認した。全体として、このデータにより、すべての測定対象物において各投与群内及び雄雌間でばらつきのあることが示された。吸入投与 24 時間後の検体の多くにグリコピロニウム及びホルモテロールの残留が認められ、試験期間中に雄又は雌ラットで反復吸入投与による血漿中への蓄積が生じたことが示唆された。ブデソニドの測定においては、概して同様の結果は認められなかった。

一般状態観察において、3 群すべての被験物質群で用量依存的に死亡が認められた。低用量 BGF 群の雄 1 匹、中用量群の雌 2 匹、並びに高用量群の雌 2 匹に試験中の死亡がみられた。また、高用量群の雌 2 匹は人道的理由により安楽死された。これらの動物は安楽死前に、円背位及び被毛粗剛を呈し、嗜眠傾向を示していた。病理組織学的検査では、肺、心臓、肝臓及び／又は腎臓を含む複数の組織に、好中球性及び組織球性炎症、細菌並びに／若しくは壊死が認められた。観察された多臓器感染の原因として、被験物質製剤中のブデソニドの免疫抑制作用に起因する細菌日和見感染による可能性が高いと考えられた。空気対照群及び溶媒対照群の動物はすべて、苦痛の徴候を呈することなく試験期間終了時まで生存した。

BGF 投与群の動物で最も多く観察された一般状態の変化は、皮膚病変及び体重減少であった。皮膚病変の発生頻度は 3 用量群のすべてにおいて 1 群雄雌各 5～6 匹であり、用量依存性は認められなかった。体重減少には用量依存性があると考えられ、最も大きな減少は投与期間終了時に観察された。この時点での高用量群の動物における体重減少量は、2 つの対照群の動物における体重の 21～32%であった。回復期には、対照群の体重との比較における体重減少量が投与 15 日以降、次第に縮小したが、中用量群及び高用量群の体重はいずれも雄雌ともに回復期間終了時の投与 29 日においても、一方又は双方の対照群に比べて有意に低値であった。

投与後の眼科学的検査では、投与前の検査記録との比較において被験物質に関連した影響は認められなかった。

主試験動物にみられた血液学的検査パラメータの変化は、いずれの用量群においても糖質コルチコイドに対する典型的な反応を示すものであり、回復試験動物において可逆性の変化であることが示された。主試験動物では、用量依存的で、統計学的に有意な末梢血中リンパ球数及び好酸球数の減少、好中球数の増加、並びにこれより程度の低い単球数増加が認められた。回復の徴候はある程度みられたものの、リンパ球数の減少は、全用量群の回復試験動物（雄雌）において依然として統計学的に有意であった。しかしながら、単球数及び好中球数の増加、並びに好酸球数減少は、溶媒対照群と同様のレベルにまで回復した。

血液生化学的検査パラメータにみられた変化は、主として肝機能に関連したパラメータの変化であった。中程度の ALT 上昇が主試験の全用量群の雄雌で用量依存的に認められ、低用量群の雄を除く全群で統計学的に有意な上昇であった。同様に主試験動物で、AST、総ビリルビン及びトリグリセリドの上昇も認められた（ただし、低用量群及び中用量群の雄の AST 上昇並びに高用量群の雌の総ビリルビン上昇は統計学的に有意ではなかった）。その他の血液生化学的検査パラメータにおける変化は概して顕著なものではなく、大部分は生物学的変動の範囲内であった。回復試験の動物では、生物学的意義が乏しい変化がみられたいくつかの例を除いて、上記のすべてのパラメータが溶媒対照群と同様のレベルにまで回復した。

最終体重は、雄雌ともに溶媒対照群に比べて統計学的に有意かつ用量依存的に減少した。ある程度までの可逆性はみられたものの、回復試験動物においても全用量群の雄雌でなお最終体重が低値を示し、低用量群の雄を除く全群で統計学的有意差が認められた。この結果として、全用量群の雄雌で脳、心臓、肺、肝臓、腎臓、及び精巣（又は卵巣）の器官／体重重量比が統計学的に有意に増加したが、他の 2 つのパラメータ（器官の絶対重量及び器官／脳重量比）では変化が認

2.6.6 毒性試験の概要文

一般名：ブデソニド／グリコピロニウム臭化物／ホルモテロールフマル酸塩水和物

められないか、又は非常に軽微かつ一貫性のない変化が認められたのみであった。したがって、上記の器官における器官／体重重量比の増加は、投与に関連した直接的な変化ではないものと判断された。

主試験の全用量群の雄雌で、副腎、脾臓及び胸腺において3つのパラメータ（器官の絶対重量、器官／体重重量比及び器官／脳重量比）のすべてに有意な減少が認められた。回復試験においては、脾臓重量は全用量群の雌雄ともに溶媒対照群と同等であった。回復試験動物の副腎及び胸腺にもある程度の回復がみられたが、中用量群（胸腺）及び高用量群（副腎及び胸腺）の雄、並びに全用量群の雌（副腎及び胸腺）では統計学的に有意な減少が引き続き認められた。その他の器官重量の変化は、概して顕著な変化ではないか、又は本試験における臨床的意義は乏しいと判断された。

病理組織学的検査では、気道内に被験物質の投与に関連した変化がわずかに認められた（ごく軽微な喉頭の扁平上皮化生、及びごく軽微な散在性の肺泡マクロファージ集積など）。これらの所見はいずれも、吸入試験に供した実験動物に多くみられる適応性変化であり、BGF投与による特異的な影響というよりも、異物吸入による有害ではない物理的な影響である可能性が高い。

BGF投与に起因する主な変化は呼吸器以外の組織で観察され、副腎萎縮、免疫器官／組織における細胞数減少、並びに肝細胞脂肪蓄積及び胃粘膜上皮の潰瘍等を認めた。副腎、肝臓、胃及びリンパ組織（胸腺、脾臓、リンパ節及び骨髄を含む）には一貫した変化が認められた。組織内並びに血液学的及び血液生化学的パラメータにみられた変化の大部分は糖質コルチコイドに対する典型的な反応と一致しており、主として被験物質中の糖質コルチコイド成分（ブデソニド）に起因する可能性が高いと考えられた。このような変化は、組織内及び組織間の複数の病理学的評価項目（器官重量、臨床病理学的検査及び病理組織学的検査など）における変化を裏付けるものであり、概して1つ以上の評価項目で用量依存性が認められた。肝重量の変化は非常に軽微であったにもかかわらず、血液生化学的検査パラメータの変化に一致して、投与に起因する肝臓の脂肪蓄積が観察された。

全用量群において回復を示す十分なエビデンスが認められたが、空気対照群及び溶媒対照群で観察された所見にまで完全に回復した試験群はなかった。副腎（束状帯及び網状帯の萎縮）及び胃（びらん／潰瘍）における変化は、回復試験動物では消失していた。末梢血リンパ球数の減少並びに骨髄、脾臓、リンパ節及び胸腺のリンパ球数の減少は改善したものの、複数例の動物では持続して認められた。また、病理組織学的検査において、低用量群の動物では、ほとんどの組織で正常範囲内にまで回復した。

以上をまとめると、雄雌ラットにBGF MDIを経鼻吸入投与によって14日間投与した結果、副腎、肝臓、胃、並びに胸腺、脾臓、リンパ節及び骨髄を含むリンパ組織に病理組織学的変化が生じ、器官重量及び血液学的検査並びに血液生化学的検査所見を含む複数の評価項目にわたって変化が認められた。気道内にみられた変化は軽微であり、非特異的な影響であると判断された。また、体重減少が、用量依存的に認められた。すべての被験物質投与群で死亡及び瀕死による安楽死を含めた早期死亡が用量依存的に観察され、ブデソニドの免疫抑制作用に起因する全身性細菌感染が原因である可能性が高いと考えられた。全用量群で、投与の影響がみられたパラメータの完全又は部分的な回復が認められた。この試験で観察された病理組織学的検査及び血液学的検査や血液生化学的検査における変化は、糖質コルチコイドの影響の特徴に一致しており、BGF配合剤中のブデソニドに対する反応である可能性が高いと考えられた。本試験ではNOAELは決定できなかった。

2.6.6.3.1.7.2 イヌ 14 日間反復吸入投与毒性試験（試験番号 FY14-36A^{4.2.3.2.9}）

イヌを用いた 14 日間反復吸入投与毒性試験（FY14-036A）の目的は、ビーグル犬において、2 種類の異なる配合剤の MDI 製剤、すなわち、ブデソニド/グリコピロニウム/ホルモテロール（BGF）MDI 又はブデソニド/ホルモテロール（BFF）MDI の毒性及び影響の可逆性を評価することであった。この試験では、1 群雄雌各 3~4 頭（主試験）及び 2 頭（回復試験）のイヌに、132/6.7/4.2、260/13/8.5 及び 428/22/14 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$ （ブデソニド/グリコピロニウム/ホルモテロール、雄雌の平均値）又は 89/3.0、175/6.0 及び 306/10 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$ （ブデソニド/ホルモテロール、雄雌の平均値）の用量で 14 日間フェイスマスクを用いて吸入投与した後、回復群では 14 日間の回復期間を設けた。また、同様の動物数の空気対照群及び溶媒対照群を設けた。空気動力学的中央粒子径（MMAD）及び幾何標準偏差（GSD）は、BGF 群で 4.19~4.52（1.68~1.69） μm 、BFF 群で 4.46~4.87（1.61~1.99） μm 、溶媒対照群では 4.82~5.04（1.59~1.71） μm であった。

雄雌のビーグル犬に、空気のみ、溶媒対照 MDI、BGF MDI 又は BFF MDI を、吸入投与により 1 日 30 分間、14 日間連続して投与した。主試験の動物は、全身毒性（一般状態、体重、眼科学的検査、心電図検査、呼吸パラメータ、臨床病理学的検査、器官重量、病理組織学的検査、トキシコキネティクス）を評価した後、14 日間の投与期間終了後（投与 15 日）に安楽死させた。各投与群から雄雌各 2 匹を回復試験動物として用い、全身毒性の回復を評価するために 14 日間の回復期間後（投与 29 日）に安楽死させた。

血漿検体は、投与 1 日及び 14 日の投与前、投与直後、並びに投与後 30 分、1 時間、3 時間、6 時間及び 24 時間の時点で採取した。BGF 群では用量依存性が認められ、最高血漿中濃度（ C_{max} ）は主に投与直後の採血時に観察された。14 日間の投与後には、 C_{max} の増加及び $t_{1/2}$ の延長が観察され、明確な薬物蓄積が認められた。BGF を投与された雄雌間に、明確な性差は認められなかった。同様に、BFF 群でも雄雌の双方で明確な用量依存性が認められ、 C_{max} は主に最初の採血時点で観察され、雄雌間に性差は認められなかった。同群では、投与 1 日と投与 14 日とで $t_{1/2}$ にはほとんど変化がなかったが、 AUC_{last} が増加したことから、投与期間中に被験物質の蓄積が生じていたことが示唆された。

いずれかの被験物質の MDI 又は溶媒対照 MDI の投与に起因する死亡又は病的状態は認められず、すべての動物が計画剖検時まで生存した。いずれの被験物質群においても、溶媒対照群と比較して有意な体重の変化は認められなかった。眼科学的検査では、被験物質に関連した眼への影響は観察されなかった。また、心電図検査のパラメータには BGF 又は BFF MDI の投与に関連した異常な変化は認められなかった。

試験中に最も多くみられた一般状態所見は水様便又は軟便に関連した所見であり、全体として、これらの所見の発生率は空気対照群及び溶媒対照群で被験物質群に比べて低値であった。被験物質投与群では、この所見の発生時期又は用量依存性に関して一貫したパターンは認められなかったが、概して投与第 2 週は、他の試験期間（第 1 週及び回復期間）と比べて発生率が高値を示した。水様便/軟便の一般状態所見は空気対照群では認められなかったことから、溶媒対照/BGF/BFF の投与と関連があると考えられたが、これらの所見はいずれも重篤ではないか又は当該動物の試験を中止する必要がない程度のものであった。挫傷又は擦過傷のようなその他の一般状態所見は発生頻度が低く、用量依存的な傾向は認められなかった。

呼吸数（ f ）、1 回換気量（TV）及び分時換気量（MV）について各個体の呼吸パラメータを評価した結果、BGF 又は BFF を投与されたイヌで、投与 1 日に TV 及び/又は MV の増加がみられた。しかし、TV 及び f の測定値のほとんどは生理的基準範囲内であり、イヌでは BGF 又は BFF の曝露は呼吸パラメータに顕著な変化を生じさせないと結論された。

臨床病理学的検査では、血液学的検査及び血液生化学的検査パラメータに顕著な変化は認められなかった。主試験の動物において特に中用量群及び高用量群でみられた白血球パラメータの変化は、ある程度の好中球数及び単球数の増加並びにリンパ球数及び好酸球数の減少によって特徴付けられる糖質コルチコイドに対する典型的な反応を示唆するものであった。中用量及び高用量の BGF 群における変化は、溶媒対照群との比較においては必ずしも各群で統計学的に有意ではなかったが、中用量及び高用量の BFF 群にみられた変化よりも更に一貫した傾向を示した。赤血球指標には概して特記すべき変化は認められなかった。他のいくつかの血液学的パラメータにおいて、溶媒対照群に対して統計学的に有意な変化が特定の投与群で散発的に認められたが、これらの変化には概して雄雌間での一貫性、又は一貫した用量依存性が認められず、いずれも生物学的に重要な変化ではないと判断された。

血液生化学的検査パラメータにわずかな変化が認められ、その大半が、糖質コルチコイドの反応に概ね一致する肝機能に関連したパラメータの変化であった。BGF 又は BFF を投与された主試験動物では、アルカリホスファターゼ (ALP) が用量依存的に上昇する傾向がみられたが、統計学的に有意な上昇が認められたのは、高用量 BFF 群の雄並びに中用量及び高用量 BGF 群の雌のみであった。また、 γ -グルタミルトランスフェラーゼ (GGT) にもごく軽微な上昇傾向がみられ、主試験の中用量 BGF 群の雄及び高用量 BGF 群の雌で統計学的に有意な上昇が認められた。回復試験動物では、上記のいずれの変化も認められなかった。その他の血液生化学的検査パラメータには投与に起因する有意な変化は認められず、また、血液凝固検査又は尿検査のパラメータにも投与に関連した有意な変化は認められなかった。

剖検では、肉眼的所見は概ね認められなかった。ごく少数の動物で限局性かつ軽微な肉眼的変化が認められたが、多くは、偶発的又は背景変化であるか若しくは安楽死の過程で生じた変化であると考えられた。重要であると判断された器官重量の変化は、副腎及び胸腺重量の減少並びに肝重量の増加であり、これらはすべて病理組織学的所見を裏付けるものであった。

主試験動物では、副腎重量が溶媒対照群に比べて減少した。主試験の高用量 BFF 群の雄及び雌では副腎重量が溶媒対照群に比べて有意に低値であり、用量依存性が若干示唆された。また、主試験の中用量及び高用量 BGF 群の雌でも副腎重量が溶媒対照群に比べて有意に低値であった。肝重量は、主試験動物のすべての被験物質投与群で溶媒対照群に比べて増加したが、溶媒対照群と比較して統計学的に有意であったのは、低用量、中用量及び高用量の BGF 群、並びに高用量及び／又は中用量、低用量の BFF 群のみであった。一部の投与群については体重及び／又は脳重量で補正した場合にも統計学的有意差が認められたが、すべての投与群間及び重量比の指標（体重及び脳重量に対する重量比）において一貫性のある統計学的有意差は認められず、一貫した用量依存性は明らかではなかった。回復試験動物では、副腎及び肝臓の双方における重量の差が消失した。

主試験動物では、胸腺重量も溶媒対照群に比べて減少した。主試験動物の雌では、BFF のすべての用量群、並びに低用量及び高用量 BGF 群において胸腺重量が有意に低値であった。胸腺重量の低値に関して、回復試験動物でも、特に高用量群では、3 つのパラメータ（絶対重量、胸腺／体重重量比、胸腺／脳重量比）のすべてにおいて持続する傾向がみられた。その他の器官重量には、概して溶媒対照群と比較して顕著な変化は認められなかった。

本試験における病理組織学的検査では、肺又は気道内のその他の部位には、投与に関連した病理組織学的所見は認められなかった。

被験物質投与群で、副腎、胸腺、リンパ節及び肝臓に、投与に起因する病理組織学的変化がすべての被験物質投与群において認められた。ある程度の副腎皮質萎縮、胸腺及びリンパ節皮質のリンパ球数減少、並びに肝細胞の変化（肝臓門脈域）が BGF 及び BFF 投与群の全群にみられた

が、溶媒対照群又は空気対照群ではこのような所見は認められなかった。すべての投与群に回復が認められたものの、空気対照群及び溶媒対照群で観察された所見にまで完全に回復した投与群はなかった。副腎の変化（束状帯及び網状帯の萎縮）はその重症度において、わずかに改善する傾向を示したが、副腎は 14 日間の回復期間における病理組織学的変化の改善が、最も小さい組織であると判断された。胸腺皮質のリンパ球数減少は回復期間後に改善がみられ、総じて大半の回復試験動物における減少はごく軽微であった。リンパ節皮質のリンパ球数減少は、偶発的所見であった可能性のある中用量 BGF 群の雄 1 頭を除き、大部分が回復した。肝臓の病理組織学的変化は、すべての用量群の回復試験動物で完全に回復した。

以上をまとめると、イヌに BGF 又は BFF を 14 日間反復吸入投与した結果、臨床病理学的検査所見、器官重量及び病理組織学的所見に、糖質コルチコイドに対する典型的な反応を裏付ける変化が生じた。末梢血中のストレス性の白血球像（好中球数増加、リンパ球数減少など）はブデソニドの投与後にみられる典型的な所見であった。単球及び好酸球のような細胞数の少ない白血球の数の変化には、大きなばらつきが認められた。観察された器官重量の変化は、主として糖質コルチコイドによる典型的な所見である副腎及び胸腺重量の減少、並びに代謝要求の増大及び／又は脂質／グルコース代謝の変化に起因すると考えられる肝重量の増加であり、これに一致する所見（副腎皮質萎縮、肝細胞の変化（肝臓門脈域）、並びに胸腺及びリンパ節の皮質における細胞数減少）が病理組織学的検査において観察された。末梢血中及び免疫系組織の双方におけるリンパ球数減少は、ブデソニドによる免疫抑制の結果として生じたものであった。製剤中にグリコピロニウム及び／又はホルモテロールが含有されていても、全体として予測されるブデソニドに対する病理学的反応に変化を及ぼさないと考えられた。14 日間の回復期間後には、大半の動物で、投与の影響がみられたすべての組織に回復の徴候が認められた。血液学的検査、血液生化学的検査及び大部分の器官重量（胸腺を除く）のパラメータはすべて回復した。病理組織学的所見は、肝臓では回復したが、副腎及び胸腺では、軽減はしたものの依然ある程度の変化が認められた。反復投与後に観察された一般状態所見は、主として水様便又は軟便であった。体重、眼科学的検査、心電図検査又は呼吸パラメータには、被験物質に関連した変化は認められなかった。

結論として、本試験では、BGF 又は BFF MDI のいずれに対しても NOAEL は決定できなかった。

2.6.6.3.2 3 カ月間反復吸入投与毒性試験

2.6.6.3.2.1 BD MDI、BGP MDI（試験番号 FY14-148B^{4.2.3.2.14}）

イヌを用いた 3 カ月間反復吸入投与毒性試験（FY014-148B）の目的は、2 種類の異なる MDI 製剤、すなわち、ブデソニド（BD）MDI 又はブデソニド／グリコピロニウム（BGP）MDI の毒性を評価することであった。主試験の動物を 1 群雄雌各 4 頭としてブデソニド 3.4、31 及び 104 µg/kg/日（雄雌の平均値）又はブデソニド／グリコピロニウム配合剤 3.6/0.21、31/1.7 及び 98/5.4 µg/kg/日（雄雌の平均値）を 90 日間、フェイスマスクを用いて吸入投与し、同様の動物数の空気対照群及び溶媒対照群を設けた。空気動力学的中央粒子径（MMAD）及び幾何標準偏差（GSD）は、BD 群で 3.54（1.69）µm、BGP 群で 3.39（1.75）µm、溶媒対照群では 3.59（1.80）µm であった。

TK 解析用の血漿検体は、投与 1 日の初回投与後並びに投与 90 日の最終投与後の指定の時点（投与前、投与直後、投与後 30 分、1 時間、3 時間、6 時間及び 24 時間）で採取した。BGP 及び BD を投与された動物では明確な用量依存性が認められ、最高血漿中薬物濃度（C_{max}）は主に

投与直後に観察された。血中濃度-時間曲線下面積（AUC_{last}）が投与 1 日から投与 90 日の間に増加したことから、試験期間中に薬物の蓄積が生じたことが示唆された。t_{1/2}には、投与 1 日から投与 90 日の間に大きな変化はなかった。また、雄雌間に明確な性差は認められなかった。

フェイスマスク吸入によって雄雌のビーグル犬に BGP 及び BD の MDI 製剤を 90 日間反復吸入投与した結果、副腎、肝臓及び胸腺に、糖質コルチコイドの影響に一致する組織反応が生じた。これを裏付ける変化が器官重量に認められ、いくつかの血液学的検査及び血液生化学的検査パラメータにおいてもある程度認められた。気道への影響は、いずれの投与群においても観察されなかった。投与に起因する特異的な器官重量の変化は、副腎重量の減少、肝重量の増加、及び胸腺重量の減少であった。これらの器官重量の変化は、副腎皮質萎縮（束状帯及び網状帯）の組織学的所見、肝細胞の変化（肝臓門脈域）、並びに胸腺皮質のリンパ球数減少に一致する所見であった。血液学的検査で観察された投与に起因する変化は、軽微な好酸球数減少、及び血液生化学的検査における軽微な変化はアルブミン及びトリグリセリドの軽微な上昇であった。この試験では NOAEL を決定することはできなかったが、全体として、BGP 及び BD のいずれにおいても、低用量でみられた少数の影響（軽微な肝細胞の変化（肝臓門脈域）、軽微～軽度の胸腺皮質のリンパ球減少）は軽微なものであった。本試験で観察された病理組織学的検査及び血液学的検査や血液生化学的検査における変化は、これまでに報告されている糖質コルチコイドの影響の特徴に一致しており、両被験物質配合剤中のブデソニドに対する反応である可能性が高いと考えられた。

2.6.6.3.2.2 GFF MDI:イヌを用いた 3 カ月間反復吸入投与毒性試験（試験番号 FY10-129^{4.2.3.2.15}）

本試験の目的は、フェイスマスク吸入によりビーグル犬に投与した際のグリコピロニウム（GP）単剤、ホルモテロール（FF）単剤、及びグリコピロニウム/ホルモテロール配合剤（GFF）のそれぞれの MDI 製剤の毒性を評価することであった。イヌに対して 1 日 1 回の吸入投与を 90 日間行った。各薬剤の用量は、ホルモテロール単剤の MDI 用量が、配合剤 MDI 投与群のホルモテロール用量に近似することを目標とし、同様に、グリコピロニウム単剤の用量が、高用量配合剤 MDI 投与群のグリコピロニウム用量に近似することを目標とした。グリコピロニウム/ホルモテロール配合剤投与群の動物には、目標総エアロゾール質量濃度を 0.08 mg/L（上記 2 剤＋溶媒の合計質量）とした製剤を、低用量、中用量及び高用量群に対してそれぞれ 10、20 及び 30 分間投与した。ホルモテロール単剤群には、目標総エアロゾール質量濃度 0.08 mg/L を、低用量、中用量及び高用量群に対してそれぞれ 10、20 及び 30 分間投与した。グリコピロニウム単剤群は 1 群（高用量群のみ）とし、目標総エアロゾール質量濃度 0.12 mg/L を 30 分間投与した。溶媒対照群には溶媒のみを 0.08 mg/L を 30 分間投与した。空気対照群には空気のみを 30 分間投与した。試験の評価項目は、一般状態の観察、体重、血液学的検査、血液生化学的検査、眼科学的検査、器官重量、呼吸生理学、心血管生理学及び病理組織学的検査であった。

2.6.6 毒性試験の概要文

一般名：ブデソニド/グリコピロニウム臭化物/ホルモテロールフマル酸塩水和物

群	グリコピロニウム/ホルモテロール 用量 (µg/kg/日)	
	雄	雌
空気対照	ND*	ND*
溶媒対照	ND*	ND*
グリコピロニウム/ホルモテロール 低用量	17.26/4.36	18.01/4.54
グリコピロニウム/ホルモテロール 中用量	42.69/10.14	44.08/10.78
グリコピロニウム/ホルモテロール 高用量	59.38/14.03	62.11/14.67
グリコピロニウム 高用量	85.10/--	89.23/--
ホルモテロール 低用量	--/4.36	--/4.53
ホルモテロール 中用量	--/10.18	--/10.46
ホルモテロール 高用量	--/14.05	--/14.51

*ND = 検出限界以下

被験物質の組成は、グリコピロニウム及び/あるいはホルモテロール、DSPC、CaCl₂ 及び HFA-134a である。これら組成の被験物質を、グリコピロニウム及びホルモテロールを含有しない溶媒のみの溶媒対照エアロゾールと直接比較した。エアロゾールの目標濃度は各投与群とも同一であった。動物を 10 分間（低用量）、20 分間（中用量）、あるいは 30 分間（高用量/溶媒対照/空気対照）投与することにより、用量の差を達成した。

溶媒対照及び空気対照群における被験物質のエアロゾール濃度は、それぞれの検出限界以下であった。

試験期間中にグリコピロニウム単剤、ホルモテロール単剤、配合剤の MDI、及び溶媒対照 MDI の試験環境から採取した代表試料により、粒径分布を測定した。空気動学的中央粒子径 (MMAD) と幾何標準偏差 (GSD) で示す被験物質 MDI エアロゾールの平均粒径は、ホルモテロール単剤群が 3.51 (1.68) µm、グリコピロニウム単剤群が 3.90 (1.78) µm、配合剤群が 3.51 (1.98) µm、溶媒対照が 4.66 (1.82) µm であった。

グリコピロニウム及び/又はホルモテロールの曝露の証明は、血漿中薬物濃度分析により示された。一部の例外を除き、C_{max} 及び AUC 推定値に関しては概して用量依存性が認められた。いずれの用量群でも、グリコピロニウムとホルモテロールの若干の薬物蓄積が存在すると考えられた。グリコピロニウムは概ね、投与直後又は 0.5 時間後に C_{max} に到達した。グリコピロニウムが血漿から消失する平均 t_{1/2} 値は 6.34~11.7 時間であった。一部の例外を除き、ホルモテロールは概ね、投与直後又は 1 時間以内に C_{max} に到達した。ホルモテロールが血漿から消失する平均 t_{1/2} 値は 4.85~11.5 時間であった。薬物間相互作用の徴候はみられなかった。

雄イヌでは、試験全体でいずれの MDI 投与群でも、溶媒対照群と比べて体重増減に有意差はみられなかった。雌イヌでは、配合剤の中用量群並びにホルモテロール単剤の中用量及び高用量群で、溶媒対照群と比べて有意な体重増加がみられた。また、グリコピロニウム単剤の高用量群の雌イヌでは、溶媒対照群よりも体重増加が有意に少なかった。全頭とも予定された剖検時まで生存しており、被験物質投与に起因する一般状態の観察での異常所見はほとんどみられなかった。全頭とも、試験期間中に軟便や液状便が時々みられた。その他の便の異常として、粘性便、血便、変色便（緑又は赤）、便減少あるいは無便が認められた。軟便と液状便のみが認められた配合剤の低用量群を除き、すべての投与群にわたって 25/72 頭でこれらの便異常が 1 件以上（複数回）

2.6.6 毒性試験の概要文

一般名：ブデソニド／グリコピロニウム臭化物／ホルモテロールフマル酸塩水和物

みられた。その他の異常所見としては、擦創/裂創/その他の創傷やそれに伴う皮膚腫脹又は発赤、創傷とは関連しない紅斑又は脱毛、嘔吐、眼漏、腫瘤、瘦衰、食欲の低下又は不振がみられた。こうした所見は対照群（溶媒対照群及び空気対照群）でも認められ、投与群で一貫していなかったことから、被験物質投与関連の影響とはみなされなかった。眼科学的検査においても、被験物質投与関連の影響はみられなかった。投与前と投与後の記録に基づき、いずれの用量でも、ECGには律動又は波形形態に異常はみられなかった。ホルモテロール単剤、グリコピロニウム単剤、又は配合剤投与群の全頭で心拍数の増加が観察された。ホルモテロールは β_2 刺激薬であり、心拍数増加の副作用が既知であるため、対照群と比べて心拍数が増加したことは予想された反応であった。認められた平均心拍数の増加は正常範囲内であり、平均値には投与後の洞性頻脈を示すものはなかった。グリコピロニウム、ホルモテロール単剤又は配合剤のMDIの投与に起因しうる他のECG所見はなかった。

評価したいずれの時点でも、呼吸数又は換気量パラメータに臨床的に重要な影響はみられなかった。

血液学的検査、血液生化学的検査又は尿検査パラメータに顕著な変化は生じなかった。若干の変化がみられたが、一貫した用量依存性を示さず、いずれも正常イヌの背景データ範囲内であった。いずれの変化も、投与に関連した生物学的に有意なものとは判定されなかった。

統計解析では、溶媒対照群と比較した器官重量に有意な変化が散発的にみられた。雌イヌの肝重量は、絶対重量（配合剤の中用量及び高用量群、ホルモテロール単剤の中用量及び高用量群）と肝/脳重量比（配合剤の低用量、中用量及び高用量群、ホルモテロール単剤の中用量及び高用量群）において比較的一貫した増加を示した。肝重量を体重比で検討すると、配合剤の高用量群のみが統計学的に有意であった。雄イヌでは、配合剤及びホルモテロール単剤群では肝重量値の視覚的な増加傾向が認められたが、いずれの解析でも統計学的有意差は認められなかった。観察された肝重量増加は、投与期間中のホルモテロール又は配合剤の肝代謝に関連したものと考えられた。統計学的有意差が認められた他の器官重量は、概ね用量依存性や性別間の一貫性を欠いており、生物学的に有意なものとは判定されなかった。

剖検時の肉眼検査では、溶媒対照群及び薬剤投与群の一部の動物の肺において、散在した小さな限局性（20 mm未満）の黄～灰の変色領域が認められた。一貫した用量依存性は明白ではなかった。これらの肉眼的変化は概ね、胸膜下領域で認められた小さく限局性で境界が明瞭な軽微な線維化を伴う上皮肥大/過形成と組織学的に相関していた。これらの所見は吸入試験でよくみられるものであり、吸入物質に対する正常の生理反応と考えられた。

組織学的に一貫した投与関連の所見は、肺と肝臓に限られていた。他のすべての組織は概ね正常範囲内であり、薬剤投与の影響はないと考えられた。

肺では、限局性の肺泡マクロファージ増加が、すべての群（空気対照群を含む）で認められた。その程度は概ね軽微であり、空気及び溶媒対照群で認められたものと識別不能な程度の変化がわずかに亢進したものと考えられた。肺に蓄積する外来物質に対する正常な生理反応として肺泡マクロファージがある程度増加することは、ほとんどの吸入試験で予想されている。また、溶媒対照群とすべての被験物質投与群において、まれで（通常は1カ所、多くて2カ所の小さな病巣）、小さく、概ね胸膜下の間質性線維化を伴う上皮肥大/過形成病巣が認められた（空気対照群の雄1頭でも、基本的に同じであるが大幅に小さく活動性も低い病巣が1カ所生じていた）。配合剤の中用量及び低用量群とホルモテロール単剤の中用量あるいは低用量群での肺の組織学的変化は、溶媒対照群と同程度であった。配合剤の高用量群とホルモテロールの高用量群での肺組織学的変化は、発現率がやや高く、軽微で限局性の肺の肉眼的変化と概ね相関していた。

肝細胞の変化が、ホルモテロール単剤及び配合剤の全群に認められたが、グリコピロニウム、溶媒対照、並びに空気対照群には認められなかった。これらの肝細胞の変化は、肝臓でのホルモテロールのグルクロン酸抱合（P450）代謝活性が亢進した結果としての、薬剤曝露に対する肝臓の適応によるものと考えられた。こうした肝細胞所見は、ホルモテロールの先行試験でも認められ、適応的な可逆性の反応と考えられた。

以上をまとめると、グリコピロニウムとホルモテロールの各単剤あるいはその配合剤（グリコピロニウム/ホルモテロール）の吸入投与による曝露は、投与したすべての動物の血漿中からグリコピロニウム及び/あるいはホルモテロールが検出されたことにより確認された。ホルモテロール投与では予測されたとおり、イヌは心臓及び呼吸パラメータの変化がみられ、これらは裏付けとなる文献で報告されているホルモテロールの症状及び徴候と一致した。また、認められた肝細胞の変化は、肝臓の適応的な代謝活動の結果と考えられた。本3カ月間反復吸入投与毒性試験では、グリコピロニウム及びホルモテロールの吸入により、様々な血液学的検査及び血液生化学的検査パラメータに一過性で生物学的には重要ではない変化がみられた。仮に肝細胞の変化を有害所見とみなす場合は、本試験では明確なNOAELは認められなかったことになるが、肝酵素変化や細胞壊死などの肝毒性を示唆する徴候は認められなかった。肝細胞の変化を毒性反応ではなく適応反応と考えると、ホルモテロール単剤及び配合剤投与群のNOAELは中用量と推定された（ホルモテロール単剤：10.32 µg/kg/日（雄雌の平均値）、グリコピロニウム/ホルモテロール配合剤：43.4/10.5 µg/kg/日（雄雌の平均値））。中用量がNOAELであるとの推定は、肺胞マクロファージ凝集及び関連所見の全発現率が、ホルモテロール高用量群並びに配合剤高用量群において、残りの投与群並びに対照群よりも高かったことに基づいている。グリコピロニウム単剤投与群のNOAELは高用量（87 µg/kg/日（雄雌の平均値））であった。また、本試験のいずれの投与群でも、前癌病変又は腫瘍性病変は認められなかった。更に、空気対照群とプラセボ対照群で有意な群間差も認められなかった。

2.6.6.3.2.3 BGF MDI、BFF MDI（試験番号 FA14-148A^{4.2.3.2.16}）

イヌを用いた3カ月間反復吸入投与毒性試験（FY014-148A）の目的は、2種類の異なる配合剤のMDI製剤、具体的には、ブデソニド/グリコピロニウム/ホルモテロール（BGF）MDI又はブデソニド/ホルモテロール（BFF）MDIの毒性を評価することであった。主試験の動物を1群雄雌各4頭としてブデソニド/グリコピロニウム/ホルモテロール配合剤3.3/0.21/0.11、17/1.1/0.62及び60/3.5/2.0 µg/kg/日（雄雌の平均値）又はブデソニド/ホルモテロール配合剤3.1/0.11、14/0.48及び70/2.3 µg/kg/日（雄雌の平均値）を90日間、フェイスマスクを用いて吸入投与し、同様の動物数の空気対照群及び溶媒対照群を設けた。空気動学的中央粒子径（MMAD）及び幾何標準偏差（GSD）は、BGF群で3.38（1.77）µm、BFF群で3.69（1.86）µm、溶媒対照群では3.19（1.70）µmであった。

血漿検体は、投与前、投与1日の初回投与後の連続する各時点、並びに第90日の最終投与後の各時点で採取し、グリコピロニウム、ホルモテロール及びブデソニドの血漿中濃度を測定した。BGF投与群では用量依存性が認められた。最高血漿中濃度は主に投与直後の採血時に観察された。90日間の投与後、最高血漿中濃度の増加及び半減期の延長した薬物の蓄積が認められた。BGFを投与された雄雌間に明確な差は認められなかった。BGFの場合と同様に、BFFを投与された雄雌の双方で明確な用量依存性が認められ、最高血漿中濃度は主として初回の採血時点で観察され、雄雌差は認められなかった。投与1日と投与90日とで半減期にはほとんど変化がなかったが、血中濃度-時間曲線下面積が増加したことから、試験期間中に薬物の蓄積が生じていたことが示唆された。

供試動物の全頭が投与 91 日の計画剖検時まで生存し、薬物投与に起因する病的状態又は死亡はみられなかった。平均体重は、いずれの測定時点においても雄雌ともに対照群と投与群との間に統計学的有意差は認められなかった。また、この試験期間中に、対照群の雄と投与群の雄とで発育に差があることを示す実質的な証拠も認められなかった。しかし、雌イヌでは、試験中に投与群間で体重増加率に差がみられた。体重増加率は、溶媒対照群で空気対照群に比べて有意に大きく、BGF 投与群の雌で溶媒対照群に比べて有意に小さかった。BGF 投与群の雌における体重増加抑制は用量依存的であると考えられた（すなわち、低用量群、中用量群及び高用量群でそれぞれ溶媒対照群の体重増加率に比べて 62%、26%及び 15%の体重増加）。BGF の投与に関連した影響は空気対照群に対しても統計学的に有意であり、高用量 BGF 群の雌における体重増加率は空気対照群で観察された体重増加率の 24%であった。雌における BFF の影響は中用量群のみで観察され、同群における体重増加の推定値は溶媒対照群の約 35%であった。

試験期間を通じて最も多くみられた一般状態所見は、水様便又は軟便に関連した所見であり、同様の所見は空気対照群及び溶媒対照群の動物を含めた全試験群で観察された。その他の所見として、滲出液を伴うか又は伴わない皮膚の擦過傷、皮膚の発赤、眼脂又は眼刺激症状、脱毛、腫瘍、裂傷等が低頻度に観察され、いずれの所見も当該動物の試験中止を検討する必要のないもの又は被験物質との関連はないものと考えられた。

投与後の眼科学的検査では、被験物質の投与に関連した影響は認められなかった。

すべての被験物質投与群で心拍数の増加が観察されたが、軽度かつ正常範囲内の増加であり、有害な影響ではないと判断された。心電図検査のパラメータ及び本試験で評価したすべての心電図は、定性的にも定量的にもイヌにおける正常所見であると判断された。3 回の測定時点で雄雌別に分析したすべての呼吸パラメータにおいて、BGF 群又は BFF 群と対照群との間に統計学的有意差は認められなかった。

血液学的検査、血液凝固検査及び尿検査のパラメータには被験物質に関連した有意な変化は認められなかったが、いくつかの血液生化学的検査パラメータにわずかな変化が認められ、その大半が肝機能に関連した変化であった。BGF 又は BFF を投与された動物では、アルカリホスファターゼ (ALP) が用量依存的に上昇する傾向がみられ、高用量 BGF 群の雌、及び高用量 BFF 群の雄雌で統計学的に有意な上昇を認めた。また、 γ -グルタミルトランスフェラーゼ (GGT) にも、ごく軽微な上昇傾向がみられたが、ばらつきが大きく、統計学的に有意な変化ではなかった。血清アルブミンはわずかではあるが用量依存的に上昇し、BGF 及び BFF の双方の中用量群及び高用量群の雄、BGF の低用量群及び高用量群の雌、並びに BFF の高用量群の雌における上昇は統計学的に有意であった。トリグリセリドの上昇も、BGF 及び BFF の双方のいくつかの中用量群及び高用量群（特に雄）で統計学的に有意であった。その他の血液生化学的検査パラメータには、投与に起因する有意な変化は認められなかった。その他の変化は概して、雄雌間での一貫性又は一貫した用量依存性は認められず、正常対照における既存の基準範囲内であり、かつ非常に軽微なものであった。空気対照群と比較することによって溶媒対照群との比較における統計学的有意性が低下することがあり、逆の場合も同様であった。これらのその他の変化はいずれも、生物学的に重要な変化ではないと判断された。

これらの動物の剖検では、肉眼的所見は概ね認められなかった。ごく少数の動物で限局性かつ軽微な肉眼的な変化が認められたが、多くは、偶発的又は背景変化であるか若しくは安楽死の過程で生じた変化であると考えられた。

本試験結果の解釈において重要であると判断された器官重量の変化は、観察された病理組織学的変化を裏付けるものであり、副腎、肝臓及び胸腺において認められた。BGF 及び BFF 投与群の全群の雄雌で、空気対照群及び溶媒対照群の双方との比較において副腎重量の減少が認められ

2.6.6 毒性試験の概要文

一般名：ブデソニド／グリコピロニウム臭化物／ホルモテロールフマル酸塩水和物

た。投与群間、及び重量比の指標（体重及び脳重量に対する重量比）には必ずしも一貫した統計学的有意差は認められず、一貫した用量依存性は必ずしも明らかではなかった。肝重量は、空気対照群及び溶媒対照群の双方に比べて増加する傾向がみられ、高用量 BFF 群の雄雌では一貫して統計学的有意差が認められた。これ以外には、投与群間及び重量比の指標（体重及び脳重量に対する重量比）に統計学的有意差はほぼ認められず、用量依存性が示唆されることはあったが、必ずしも一貫性を示すものではなかった。中用量及び高用量の BFF 群の雄、並びに BGF 及び BFF 群の雌で、対照群の一方又は双方との比較において胸腺重量の減少が認められた。BGF 群及び BFF 群の双方で、概して複数の投与群間及び重量比の指標（体重及び脳重量に対する重量比）に統計学的有意差が認められ、用量依存性が認められた。その他の器官重量には、溶媒対照群との比較において顕著な変化は認められなかった。統計学的に有意な器官重量の変化が散発的に認められたが（肺葉重量など）、病理組織学的所見におけるこれを裏付ける変化、雄雌間での一貫性、又は一貫した用量依存性は認められず、概して軽度な変化であった。これらのその他の器官重量の変化はいずれも、生物学的に重要な変化ではないと判断された。

副腎皮質萎縮（束状帯及び網状帯）が BGF 及び BFF 投与群の中用量及び高用量で認められた。肝細胞の変化（肝臓門脈域）、並びに胸腺皮質のリンパ球数減少が、BGF 及び BFF 投与群すべての用量で、ある程度認められた。更に、高用量 BGF 及び BFF 投与群の一部の動物において、リンパ球数が減少したリンパ節（気管気管支リンパ節及び膝窩リンパ節）が散見された。本試験の全群の肺又は気道内に、投与に関連した病理組織学的所見は認められなかった。肺組織には、予測された軽微な偶発的（背景的）変化が認められた。

以上をまとめると、雄雌のビーグル犬に、BGF 及び BFF MDI をフェイスマスク吸入を用いて 90 日間反復吸入投与した結果、副腎、肝臓及び胸腺に、糖質コルチコイド投与の影響に一致する変化が認められた。このような変化は複数の病理学的評価項目（器官重量、血液学的検査や血液生化学的検査及び病理組織学的検査など）にわたって認められる変化であった。また、病理学的評価項目に性差を示す一貫した変化は認められなかった。気道への影響は、いずれの投与群においても観察されなかった。確認された投与に起因する特異的な器官重量の変化は、副腎重量の減少、肝重量の増加、及び胸腺重量の減少であった。これらの器官重量の変化は、副腎皮質萎縮（束状帯及び網状帯）の組織学的所見、肝細胞の変化（肝臓門脈域）、並びに胸腺皮質のリンパ球数減少に一致する所見であった。血液生化学的検査で観察された投与に起因する変化は、軽微な変化（アルカリホスファターゼ、 γ -グルタミルトランスフェラーゼ、アルブミン及びトリグリセリドの軽微な上昇）であった。本試験では NOAEL を決定できなかったが、BGF 及び BFF 投与群のいずれにおいても、低用量群でみられた影響（少数のイヌにおける軽微な肝細胞の変化及び軽微な胸腺皮質のリンパ球数減少）は軽微なものであった。本試験で観察された病理組織学的変化、血液学的検査及び血液生化学的検査における変化は、これまでに報告されている糖質コルチコイドの影響の特徴に一致するものであり、BGF 及び BFF 配合剤中のブデソニドに対する反応である可能性が高いと考えられた。

2.6.6.3.3 6 カ月間反復吸入投与毒性試験

2.6.6.3.3.1 GP MDI: ラットを用いた 6 カ月間反復吸入投与毒性試験（試験番号 FY10-120^{4.2.3.2.17}）

本試験は、空気対照群、溶媒対照群、及び 3 用量の GP MDI 群で実施した。

2.6.6 毒性試験の概要文

一般名：ブデソニド/グリコピロニウム臭化物/ホルモテロールフマル酸塩水和物

ラットを用いた GP MDI の 6 カ月間吸入試験において、グリコピロニウムを投与した各動物の曝露は、投与最終日の投与 30 分後の血漿中濃度分析によって確認した。血漿中グリコピロニウム濃度は、雄雌とも用量反応関係が認められた。低用量、中用量及び高用量群における平均（標準偏差）血漿中濃度はそれぞれ、雄では 34.96 (10.51)、183.70 (77.61) 及び 311.11 (58.33) pg/mL、雌では 35.09 (14.65)、357.72 (515.24) 及び 413.87 (208.58) pg/mL であった。溶媒対照群あるいは空気対照群では測定可能な被験物質は検出されなかった。

本試験で達成された各用量（沈着率を 100%と想定）は以下のとおりであった：

群	グリコピロニウム 用量 (µg/kg/日)	
	雄	雌
空気対照	ND*	ND*
溶媒対照	ND*	ND*
グリコピロニウム 低用量	65	70
グリコピロニウム 中用量	264	286
グリコピロニウム 高用量	523	572

*ND = 検出限界以下

生存、一般状態の観察、眼科的検査、体重に関して、投与に関連した影響はみられなかった。

尿検査パラメータに投与に関連した大幅な変化はみられなかった。血液学的検査及び血液生化学的検査パラメータに様々な統計学的に有意な変化がみられたが、これら変化は全般的に剖検所見及び病理組織学的所見を伴っておらず、用量依存性もみられず、臨床的意義は低く、生物学的に意味のある変化ではないと考えられた。

溶媒対照群及び被験物質投与群の動物では、空気対照群と比べて喉頭扁平上皮化生の用量依存的な発現率上昇が認められたが、この所見の程度は軽微であった。軽微な喉頭扁平上皮化生は吸入試験ではよくみられる所見であり、げっ歯類の喉頭部位におけるあらゆる種類の微粒子吸入に対する可逆的な適応反応と考えられた。溶媒対照群では、低用量群と同等の発現率と重症度の喉頭扁平上皮化生が認められた。空気対照群を含むすべての投与群で、微粒子吸入に関連する軽微な影響、特に鼻甲介の軽微なヒアリン変性が認められた。高用量群では溶媒対照群と比較してこの発現率が高かった。この所見も、げっ歯類の吸入試験でよくみられる軽微な適応反応と考えられた。軽微な肺胞マクロファージ蓄積が、空気対照群及び溶媒対照群を含むすべての投与群で認められたが、被験物質投与群での重症度又は発現率の有意な上昇は認められなかった。

いずれの呼吸器以外の組織でも、被験物質投与に関連した有意な剖検所見又は病理組織学的所見は認められなかった。また、いずれの被験物質投与群でも、前癌病変又は腫瘍性病変は認められなかった。

いずれの被験物質投与群でも有害所見はみられなかったことに基づき、ラットを用いた本試験における GP MDI の NOAEL は高用量（投与可能最大量）と考えられ、雄では 523 µg/kg/日、雌では 572 µg/kg/日であった。

2.6.6.3.3.2 GP MDI: イヌを用いた 6 カ月間反復吸入投与毒性試験（試験番号 FY12-073^{4.2.3.2.18}）

本試験の目的は、フェイスマスク吸入によりビーグル犬に投与した際のグリコピロニウム MDI の影響を評価することであった。イヌに 1 日 1 回の吸入投与を 180 日間実施し、空気対照群と溶

2.6.6 毒性試験の概要文

一般名：ブデソニド/グリコピロニウム臭化物/ホルモテロールフマル酸塩水和物

媒対照群には 30 分間、グリコピロニウムの低用量、中用量及び高用量群にはそれぞれ、10、20 及び 30 分間の吸入投与を行った。被験物質及び溶媒対照群 MDI の総エアロゾール（溶媒のみもしくは薬剤＋溶媒）の規定目標濃度は 0.08 ± 0.04 mg/L であった。試験の評価項目は、一般状態の観察、体重、血液学的検査、血液生化学的検査、眼科学的検査、ECG 検査、呼吸生理学、トキシコキネティクス解析、器官重量、尿検査及び病理組織学的検査であった。

被験物質の組成は、グリコピロニウム、CaCl₂、DSPC 及び HFA-134a であった。これらの製剤の毒性を、グリコピロニウムを含有しない溶媒のみの溶媒対照エアロゾール群と直接比較した。各投与日に動物を 10 分間（低用量）、20 分間（中用量）、又は 30 分間（高用量/溶媒対照/空気対照）投与することにより、用量の差を達成した。

溶媒対照群の平均（標準偏差）総エアロゾール質量濃度は 0.09（0.02）mg/L、グリコピロニウムの低用量、中用量及び高用量群の平均（標準偏差）総エアロゾール質量濃度はそれぞれ、0.09（0.01）、0.12（0.02）及び 0.10（0.02）mg/L であった。これに対応する被験物質投与における各群（低用量、中用量及び高用量群）の平均（標準偏差）グリコピロニウムエアロゾール質量濃度は、5.64（1.06）、8.80（1.38）及び 7.46（1.59）µg/L であった。溶媒対照群及び空気対照群における被験物質エアロゾール濃度は、それぞれの検出限界以下であった。

本試験で達成された各用量（沈着率を 100%と想定）は以下のとおりであった：

群	グリコピロニウム 用量 (µg/kg/日)	
	雄	雌
空気対照	ND*	ND*
溶媒対照	ND*	ND*
グリコピロニウム 低用量	17.72	19.44
グリコピロニウム 中用量	59.05	57.41
グリコピロニウム 高用量	76.50	72.77

*ND = 検出限界以下

投与期間中にグリコピロニウム MDI 及び溶媒対照 MDI の試験環境から収集した代表試料により、粒径分布を測定した。空気動学的中央粒子径（MMAD）と幾何標準偏差（GSD）で示す被験物質 MDI エアロゾールの平均粒子径は、グリコピロニウム群が 3.74（1.78）µm、溶媒対照群が 4.23（1.82）µm であった。

グリコピロニウムの曝露の証明は、血漿中薬物濃度分析により示された。C_{max} 及び AUC 推定値に関して用量依存性が認められた。いずれの用量群でも、若干の限られたグリコピロニウムの薬物蓄積がみられた。グリコピロニウムは概ね、投与直後又は 0.5 時間後（まれ）に C_{max} に到達した。グリコピロニウムが血漿から消失する平均 t_{1/2} 値は 6.10～12.45 時間であった。

グリコピロニウム又は溶媒対照 MDI 投与に起因する死亡例はなく、全頭とも投与 181 日に予定された剖検まで生存した。雌雄とも、いずれの投与群においても溶媒対照群と比べて体重に有意差はみられなかった。

その他のまれな一般状態として、創傷に関連しない軽微～中等度の脱毛症、円背位、嗜眠、軽微な脱水、原因不明の軽微な擦創（非滲出性で 4～8 日以内に回復）、明らかな眼漏及び眼球刺激（1 頭）、ケージ内の緑色便及び血便（2 頭）、嘔吐（1 頭で 1 日）、原因不明の足指損傷（2 頭）、及び跛行（1 頭で 1 日）が認められた。これらの一般状態変化はいずれも、投与期間の延

長に伴う重症度や発現率の上昇傾向はみられず、用量依存的な傾向もみられなかったことから、被験物質投与に関連する有害所見とは考えなかった。

眼科学的検査において被験物質投与関連の影響は認められなかった。

グリコピロニウム MDI 投与に関連する ECG 検査パラメータの変化は認められず、本試験で評価した ECG はいずれも質的及び量的に正常なイヌのものとは判定された。

評価したいずれの時点でも、呼吸数又は 1 回換気量パラメータに臨床的に重大な群間差は認められなかった。

血液学的検査、血液生化学的検査あるいは尿検査パラメータに大幅な変化は生じなかった。若干の変化がみられたが、一貫した用量依存性を示さず、いずれも正常イヌの背景データ範囲内であった。いずれの変化も、投与に関連した生物学的に有意なものとは判定されなかった。

統計解析では、溶媒対照群と比較した器官重量に有意な変化が散発のみ見られた。高用量群の雄の心臓重量は溶媒対照群より有意に低く、用量依存性が若干示唆された。この傾向は体重及び脳重量で補正しても同様であった。心臓ではこれに関連する病理組織学的変化は認められなかった。空気対照群との比較ではこの影響はある程度軽減され、雌では統計学的及び生物学的な差は認められなかった。本所見の原因及び意義は不明であるが、他の用量群の雄の体重に比べ高用量群の雄の体重がわずかに低いことに関連する偶発的変化の可能性が考えられた。

心臓以外の一部の器官重量パラメータ（例えば生殖器系臓器など）にも、様々な投与群で溶媒対照群と比較して統計学的に有意な変化がみられた。生殖器系器官重量のばらつきは、成熟及び/又は発情段階が異なる場合には通常認められる。これら所見は概ね、一貫した用量依存性が認められず、比較的軽度であった。数頭において、溶媒対照群との比較で見られたこれら所見は、空気対照群との比較では若干軽減された。いずれの変化も生物学的に意味のあるものとは考えられなかった。

剖検所見では、概ね組織に顕著な影響は認められなかった。本試験で認められた軽微な変化は、この齢のイヌにおける偶発的又は「背景」変化の範囲内のもの、あるいは安楽死処置の結果によるものとみなされた。このような偶発的な変化としては、数頭で認められた肺表面の変色領域や癒着があった。

散発的あるいは偶発的所見や「背景」所見は、本試験の多数の組織及び動物で認められた。こうした所見は、その変化や重症度が対照群と区別できず、被験物質との関連が認められず、広範に散在しており、生物学的な意義はないと判定された。背景所見としては、リンパ節の洞赤血球増加症（しばしば赤血球貪食を伴う）、様々な組織（肝臓、腎臓）の軽微な（しばしば慢性的な）炎症、個別の筋線維変性、甲状腺内の顕著な C 細胞領域、大動脈弓検体の粘液性変化、大動脈根及び腎盂内の小さな鉍物巣、複数の組織内の非腫瘍性嚢胞、顕著ではない肝細胞変性が認められた。

いずれの動物種でも肺尖部組織中に肺泡中隔の肥厚を伴う又は伴わない極めて軽微な上皮の肥大領域がみられることは稀ではなく、このような領域が生じていても概ね正常限度内とみなされる（Scudamore 2012）ため、本試験でもこの所見は正常範囲と考えた。

すべての群から得た肝組織切片の大半で、軽度～中等度の小葉中心肝細胞変性、空胞化又は「透明化」が認められ、これら所見は概ねグリコーゲン蓄積又は高い代謝活性と一致した。これはイヌでよくみられる偶発的所見であり、薬剤投与群と空気対照群又は溶媒対照群との間に差は認められなかった。

2.6.6 毒性試験の概要文

一般名：ブデソニド／グリコピロニウム臭化物／ホルモテロールフマル酸塩水和物

以上をまとめると、グリコピロニウムの吸入投与による曝露は、投与したすべての動物の血漿中でグリコピロニウムが検出されたことにより確認された。投与群の病理組織学的所見は空気又は溶媒対照と差がみられなかったため、生物学的意義はないと考えられた。6 カ月間試験では、グリコピロニウムの吸入投与によって、様々な血液学的検査及び血液生化学的検査パラメータに一過性の変化がみられたが、生物学的に有意ではなかった。空気対照群と溶媒対照群で有意な群間差は認められなかった。本試験における NOAEL は雌雄とも高用量と考えられた（雄は 76.50 µg/kg/日、雌は 72.77 µg/kg/日）。

2.6.6.3.4 9 カ月間反復吸入投与毒性試験

2.6.6.3.4.1 GP MDI: 非げっ歯類を用いた 9 カ月間反復吸入投与毒性試験

非げっ歯類（例えばイヌなど）を用いた GP MDI の 9 カ月間反復吸入投与毒性試験は実施しなかった。これは GP MDI のイヌを用いた 3 カ月間反復吸入投与毒性試験（FY10-129）と 6 カ月間反復吸入投与毒性試験（FY12-073）の結果を比較したとき、その所見に差は認められず、更に投与期間を 9 カ月に延長しても新しい所見は認められないと考えられたためである。

2.6.6.4 遺伝毒性試験

2.6.6.4.1 ブデソニド

シムビコート®タービュヘイラー®の概要

本邦において、ブデソニドの遺伝毒性試験結果はシムビコート®タービュヘイラー®承認申請時に提出されている。

細菌を用いた復帰突然変異試験、哺乳類の培養細胞を用いた染色体異常試験及びマウスの小核試験では、ブデソニドに変異原性は認められなかった。更に、6 種類の試験系を用いてブデソニドの遺伝毒性について検討した結果、いずれの試験系においてもブデソニドの突然変異誘発性又は染色体異常誘発性は認められなかった。

2.6.6.4.2 ホルモテロール

シムビコート®タービュヘイラー®の概要

本邦において、ホルモテロールの遺伝毒性試験結果はシムビコート®タービュヘイラー®承認申請時に提出されている。

ホルモテロールの遺伝毒性は復帰突然変異試験、マウスリンフォーマ TK 試験、ヒトリンパ球を用いた染色体異常試験及びラット小核試験にて評価した。復帰突然変異試験では 2 つのバッチのホルモテロールを、それぞれ 2 回ずつ別々に試験した。どちらのバッチも一つの試験でわずかではあるが有意な復帰変異コロニー数の増加がみられた。しかしながら、この結果に再現性はみられず、また用量依存性も認められなかったことから、ホルモテロールは復帰突然変異試験において変異原性をもたないと結論した。マウスリンフォーマ TK 試験、ヒトリンパ球を用いた染色体異常試験及びホルモテロール吸入投与によるラット小核試験において染色体異常誘発性は認め

られなかった。これらのことから、ホルモテロールは *in vitro*、*in vivo* のいずれにおいても変異原性物質ではないと結論した。

2.6.6.4.3 グリコピロニウム

2.6.6.4.3.1 *In vitro*

2.6.6.4.3.1.1 細菌復帰突然変異試験（試験番号 AD91RW.502ICH.BTL^{4.2.3.3.1.1}）

被験物質であるグリコピロニウムについて、*Salmonella typhimurium* 試験株 TA98、TA100、TA1535 及び TA1537 並びに、*Escherichia coli* 試験株 WP2 *uvrA* を用いた細菌復帰突然変異試験を、Aroclor 誘導ラット肝 S9 の存在下及び非存在下において実施した。試験は 2 つの段階に分けて実施され、プレート法が用いられた。1 段階目は、予備的な毒性試験であり、本試験で用いる用量範囲を決定するために実施された。2 段階目は、本試験であり、被験物質の突然変異誘発性を評価するために実施された。

最適な溶媒としては、被験物質の溶解性及び標的細胞との適合性に基づいて、水が選択された。被験物質は、溶解度試験において用いられた最大濃度 50 mg/mL で、注射用滅菌水品質の細胞培養グレード水（以下、「滅菌水」という）に溶解すると、澄明な溶液となった。

予備的な毒性試験では、試験された最大用量は 1 プレートあたり 5000 µg であった。この用量は、濃度 50 mg/mL の溶液を 1 プレートあたり 100 µL 添加することによって得られた。検討した用量は、1 プレートあたり 6.7、10、33、67、100、333、667、1000、3333 及び 5000 µg であった。沈殿物や毒性は観察されなかった。予備的な毒性試験の所見に基づいて、本試験で評価する最大用量は、1 プレートあたり 5000 µg とされた。

本試験では、いずれの試験菌株においても、S9 添加による活性化の有無に関わらず、突然変異誘発を示す所見は観察されなかった。試験で評価された用量は、1 プレートあたり 100、333、1000、3333 及び 5000 µg であった。沈殿物や、背景細菌叢における毒性は観察されなかった。

本試験の条件下では、グリコピロニウムは細菌復帰突然変異試験において突然変異誘発性を示さないと結論された。

2.6.6.4.3.1.2 TK6 細胞を用いた *in vitro* 哺乳類細胞小核試験（試験番号 AD91RW.361ICH.BTL^{4.2.3.3.1.2}）

被験物質であるグリコピロニウムについて、TK6 細胞を用いた *in vitro* 哺乳類細胞小核試験を、Aroclor 誘導肝 S9 活性化系の存在下及び非存在下において実施した。小核試験において用いる用量範囲を決定するために、予備的な毒性試験が実施された。小核試験は、被験物質の異数性誘発性及び染色体異常誘発性を評価するために用いられた。予備試験及び本試験のいずれにおいても、TK6 細胞の被験物質曝露時間は、非活性化試験系では 4 及び 27 時間、S9 活性化試験系では 4 時間であった。すべての細胞を、曝露開始から 27 時間後に回収した。

溶媒は、被験物質の溶解性及び標的細胞との適合性に基づいて、水が用いられた。被験物質は、溶解度試験において最大濃度である約 50 mg/mL で水に溶解した。

予備的な毒性試験では、評価された用量の範囲は 0.0398～398 µg/mL (1 mM) であった。いずれの用量群においても、顕著な毒性（溶媒対照群と比較して、相対細胞倍加率が 50～60%に減少

する状態)は観察されなかった。これらの所見に基づいて、*in vitro* 小核試験の3群が含まれる用量範囲として、50～398 µg/mLが選択された。

小核試験では、いずれの用量群においても、顕著な細胞毒性は観察されなかった。各曝露条件下で分析した最高用量は、本小核試験で検討した最高用量であり、小核試験の試験法ガイドラインで推奨されている用量設定に合致するものであった。各条件下の培養細胞から、1000個以上の単核細胞を試験に供し、小核の有無をスコア化した。

S9の存在下又は非存在下で4時間の曝露を行った場合、並びに、S9非存在下で27時間の曝露を行った場合のいずれについても、またいずれの用量においても、被験物質曝露群における小核を有する単核細胞の割合は、溶媒対照群と比較して有意に増加しなかった($p>0.05$ 、Fisherの片側直接検定)。陽性対照(MMC:マイトマイシンC、VB:ビンプラスチン、CP:シクロホスファミド)及び陰性対照(溶媒)について得られた試験結果から、試験条件は妥当であったことが示唆された。

本試験の所見に基づいて、グリコピロニウムは、TK6細胞を用いた*in vitro* 哺乳類細胞小核試験において、S9による活性化の存在下及び非存在下のいずれにおいても、小核誘発性を示さなかった。

2.6.6.4.3.2 *In vivo*

2.6.6.4.3.2.1 ラットにおける*in vivo*小核試験(試験番号AD91RW.125M012ICH.BTL^{4.2.3.3.2.1})

被験物質であるグリコピロニウムについて、ラット細胞骨髄中の多染性赤血球(PCE)の小核を検出することによって、染色体異常誘発性及び/又は細胞分裂時の分裂装置の異常の有無を評価した。溶媒として脱イオン水を選択した。被験物質及び/又は溶媒対照物質の製剤を投与容量10 mL/kgで強制単回経口投与した。

用量設定試験で用いられた最高用量は、2000 mg/kgであった。用量段階を500、1000及び2000 mg/kgとして、各群の雄及び雌それぞれ3匹ずつにおいて試験を実施した。いずれの用量においても死亡はみられなかった。2000 mg/kgを投与した雄ラットに立毛及び下痢がみられ、雌ラットでは立毛のみがみられた。その他のすべてのラットに一般状態の変化はみられなかった。

この試験の結果に基づいて、最終的な小核試験で用いる高用量は2000 mg/kg(推定MTD)とした。

本試験で使用された用量は、500、1000及び2000 mg/kgであった。毒性の臨床徴候について性差は認められなかったため、雄ラットのみを用いて最終的な試験が実施された。グループ1(溶媒)及び4(2000 mg/kg)は、24時間又は48時間目に骨髄を採取予定のラット10匹で構成され、グループ2(500 mg/kg)、3(1000 mg/kg)及び5(シクロホスファミド:陽性対照)は、24時間目に骨髄を採取予定のラット5匹で構成された。予定されていた時点での安楽死の実施後に、大腿骨の骨髄を採取し、骨髄細胞のスライドの作成後、アクリジンオレンジで染色した。骨髄細胞[ラット1匹あたり多染性赤血球(PCE)2000個]について、小核(小核を有するPCE:MPCE)の有無を顕微鏡により検査し、Kastenbaum-Bowmanの数表を用いてデータの統計解析を行った(2項分布、 $p\leq 0.05$)。また、被験物質の細胞毒性を反映する指標として、総赤血球数(EC)に対するPCE数の比率(PCE/EC比)を被験物質群と溶媒対照群の間で比較検討した。

2.6.6 毒性試験の概要文

一般名：ブデソニド/グリコピロニウム臭化物/ホルモテロールフマル酸塩水和物

溶媒対照群と比較した被験物質群との間で PCE/EC 比を比較した結果、細胞毒性を示す差は認められなかった。本試験の条件下では、グリコピロニウムを最大 2000 mg/kg まで投与したときに、小核試験において陰性であるという結論が得られた。

2.6.6.4.4 ブデソニド/グリコピロニウム/ホルモテロール

ブデソニド、グリコピロニウム及びホルモテロールの個々の活性成分について遺伝毒性が検討されていることから、これら 3 剤の配合剤を用いた遺伝毒性試験は実施していない。ブデソニド、グリコピロニウムあるいはホルモテロール各単剤の遺伝毒性は認められなかったことから、ブデソニド/グリコピロニウム/ホルモテロールの 3 剤配合剤に遺伝毒性の問題はないと考えられる。

2.6.6.5 がん原性試験

2.6.6.5.1 ブデソニド

シムビコート®タービュヘイラー®の概要

本邦において、ブデソニドのがん原性試験結果はシムビコート®タービュヘイラー®承認申請時に提出されている。

CD-1 系マウスでの 91 週間、SD 系ラットでの 104 週間、Fischer 系ラットでの 104 週間の経口投与によるがん原性試験で、脳における星状神経膠腫の発生率の増加が SD 系ラットの雄に認められたが、他の試験では観察されなかった。また肝細胞腫の発生率の増加が SD 系ラットの雄に認められたが、累積対照データの変動範囲内であった。以上のことから、ブデソニドに問題となるようながん原性はないものと推察された。

2.6.6.5.2 ホルモテロール

シムビコート®タービュヘイラー®の概要

本邦において、ホルモテロールのがん原性試験結果はシムビコート®タービュヘイラー®承認申請時に提出されている。

マウス及びラットを用いたがん原性試験の結論として、投与に関連して子宮平滑筋腫あるいは卵巣間膜平滑筋腫の増加がそれぞれ認められたが、げっ歯類における β_2 刺激薬のよく知られている薬理作用に起因するものであり臨床的関連はないとされる。その他に、ホルモテロールに起因する発がん性は検出されなかった。

2.6.6.5.3 グリコピロニウム

2.6.6.5.3.1 マウスを用いた 104 週間の吸入毒性試験（試験番号 FY14-128^{4.2.3.4.1.1}）

本試験の目的は、GP MDI を B6C3F1 系雄及び雌マウスに 104 週間経鼻吸入投与したときの発癌性を評価することであった。

2.6.6 毒性試験の概要文

一般名：ブデソニド/グリコピロニウム臭化物/ホルモテロールフマル酸塩水和物

試験開始時、すべての動物に眼科学的検査を実施し、異常がみられないことが確認された動物のみを試験に供した。動物を体重により無作為に群分けし、空気のみ、溶媒、グリコピロニウムの低、中、または高用量を投与した。グリコピロニウム投与群の1日の曝露持続時間は、目標用量を達成するために調整され、空気のみ及び溶媒の曝露持続時間は、高用量群の曝露持続時間、すなわち120分と一致させた。最終剖検は第104週及び第105週に実施した。

曝露エアロゾルは、エアロゾル質量濃度及び粒度分布をモニタリングした。グリコピロニウムエアロゾルの空気動学的中央粒子径（MMAD）は3.24 µmから3.86 µmの範囲であり、幾何標準偏差（GSD）は1.51から1.70の範囲であった。エアロゾル質量濃度は、適格なHPLC-UV法によって分析した。本試験で肺に送達された用量を下表にまとめる。空気対照群又は溶媒対照群エアロゾルでは、被験物質は検出されなかった。

群	グリコピロニウム 用量 (µg/kg/日)	
	雄	雌
空気対照	ND*	ND*
溶媒対照	ND*	ND*
グリコピロニウム 低用量	347	335
グリコピロニウム 中用量	705	700
グリコピロニウム 高用量	1460	1420

*ND = 検出限界以下

本試験では、被験物質に関連した死亡又は罹患は観察されなかった。第103週（すなわち最初の最終的な予定剖検の前の週）の死亡率は、両対象群を含む雄及び雌両方のすべての群において23%から37%までの変動がみられた。生存率は、動物供給業者から発表された成長曲線よりも予想以上に高かった。各群の生存率はKaplan-Meier曲線を用いて推定した。いずれの用量の被験物質群と空気対照群又は溶媒対照群の間に有意差はみられなかった。

慢性吸入試験でよく観察されるのと同様に、最も一般的に見られた所見は、雄雌を問わずいずれの群においても皮膚病変であった。すべての群において、浅速呼吸、喘ぎ/努力呼吸を含むそのほかの所見がみられたが、有意ではなく、性差、用量依存性も認められなかった。腫瘍が主に雄では63週目、雌では67週目から観察されたが、性差、用量依存性もなくすべての群においてみられた。いずれの一般状態の変化も被験物質に関連したものではないと考えられた。

被験物質に関連すると考えられる眼毒性は見られなかった。水晶体硬化がみられたが、これは加齢したマウスでは予想されたものであった。白内障及び硝子体不透明のような所見が散発的にみられたが、性差、用量依存性もなく対照群及び被験物質投与群すべての群においてみられた。

用量依存的な体重抑制が高用量群及び中用量群の雄雌の両方でみられた。高用量群では、投与1週間で体重抑制がみられ、溶媒対照群と比較して、雄では1週目、雌では2週目に統計学的有意差がみられた。中用量群では、雄で3週目に統計学的有意差がみられたが、雌では42週目まで有意差はみられなかった。投与期間終了時には、低用量群の雄及び雌でわずかな体重抑制がみられたが、一貫した統計的有意差は認められなかった。空気対照群と溶媒対照群との間に差はみられなかった。

概して、すべての群において器官重量の変化はみられなかった。

病理組織学的検査では、グリコピロニウム投与に関連する腫瘍性病変は認められなかった。グリコピロニウム投与に関連すると考えられる非腫瘍性病変が鼻腔及び腺胃で観察された。鼻腔

(レベル I、II、III、IV の各部位) では、溶媒対照群を含む全ての投与群において、外因性物質吸入との関連を示唆する呼吸器及び鼻粘膜上皮のヒアリン変性の発生率の増加が観察された。しかし、グリコピロニウム投与群では用量依存性がみられ、変性の重症度は高用量群でより高くなる傾向があることから、グリコピロニウム投与に関連したものと考えられた。鼻腔におけるその他の所見として、鼻気道における好酸性物出現頻度の増加、及び/あるいは鼻孔における急性多形核細胞の存在を特徴とする急性炎症発生率の増加であった。

呼吸器系組織以外では、グリコピロニウムを投与した雄及び雌マウスにおいて、腺胃の粘膜過形成の発生率増加が観察された。空気対照群及び溶媒対照群と比較した場合、概してグリコピロニウム投与群で高かったが、その発生率の増加に用量依存性は認められなかった。この所見は、不定の混合炎症性細胞浸潤の存在によってさらに特徴づけられた。試験終了時、この所見が進行している証拠は認められなかった。

さらに、甲状腺において、雄雌を問わず、空気対照群及び溶媒対照群を含むすべての群において、異常に高い発生率で、グリコピロニウム投与とは無関係の濾胞細胞の過形成及び腺腫が認められた。濾胞細胞の増殖性病変の発生率及び重症度は、すべての群で類似していることから、グリコピロニウム投与に関連したものではないと考えられる。濾胞細胞腺腫はしばしば濾胞細胞過形成を含む腺に存在していた。試験終了時に甲状腺に腺癌が認められなかったことから、この所見は悪性腫瘍に進行するようなものではなかった。この所見が認められたマウスの脳下垂体、脳、または他の器官に病変は認められなかった。

本試験における腫瘍発生率について統計解析を実施した。1) 腫瘍の発生率は、腫瘍が観察された状況 (偶発的または致命的) を反映した連続性補正なしの Peto's mortality-prevalence method によって分析した。2) さらに poly-3 statistical analysis 統計解析も用いて分析した。

雄では、1) ハーダー腺における腺癌の発現個体数が、空気対照群、溶媒対照群及びグリコピロニウム投与群 (低、中、高) でそれぞれ、0、3、1、2 及び 5 匹に、2) 全身性組織球肉腫の発現個体数が、空気対照群、溶媒対照群及びグリコピロニウム投与群 (低、中、高) でそれぞれ、2、0、2、3 及び 0 匹に、及び 3) 甲状腺における濾胞細胞腺腫の発現個体数が空気対照群、溶媒対照群及びグリコピロニウム投与群 (低、中、高) でそれぞれ、8、19、11、14 及び 9 匹に、観察された。全身性組織球性肉腫または甲状腺における濾胞細胞腺腫には用量依存性は認められなかった。ハーダー腺における腺癌は、空気対照群とグリコピロニウム投与群との間で統計学的な有意差がみられたが、溶媒対照群との間には有意差は認められなかった。更に、ハーダー腺の腺癌は一般的に観察されるものであり、一対評価比較 (pairwise comparisons) では統計学的有意差は認められなかった。

雌では、1) 十二指腸における腺腫の発現個体数が、空気対照群、溶媒対照群及びグリコピロニウム投与群 (低、中、高) でそれぞれ、0、0、3、0 及び 0 匹に、2) 右肺における肺胞腺腫の発現個体数が、空気対照群、溶媒対照群及びグリコピロニウム投与群 (低、中、高) でそれぞれ、0、0、7、1 及び 6 匹に、3) 乳腺における腺癌の発現個体数が、空気対照群、溶媒対照群及びグリコピロニウム投与群 (低、中、高) でそれぞれ、0、0、0、0 及び 2 匹に、4) 皮膚における線維肉腫の発現個体数が、空気対照群、溶媒対照群及びグリコピロニウム投与群 (低、中、高) でそれぞれ、1、1、5、2 及び 1 匹に、及び 5) 甲状腺における濾胞細胞の腺腫の発現個体数が、空気対照群、溶媒対照群及びグリコピロニウム投与群 (低、中、高) でそれぞれ、12、27、17、14 及び 12 匹に、観察された。上記のそれぞれでは一部統計学的有意差がみられたが、用量依存性は認められなかった。

2.6.6 毒性試験の概要文

一般名：ブデソニド/グリコピロニウム臭化物/ホルモテロールフマル酸塩水和物

病理組織学的検査所見のピアレビューは、XXXXXXXXXXのXXXXXXXXXXによって実施された。試験実施病理学者によって報告された全体的な結果は、すべての関連データの診断と解釈についてピアレビューアーと相互に合意されたものである。

要約すると、本試験の条件下でマウスにグリコピロニウムを長期投与したところ、いずれの用量においてもがん原性は認められなかった。いずれの臨床所見も、被験物質の投与に関連したものではないと考えられたものの、すべての用量において統計学的に有意な体重増加量の減少が認められた。病理組織学的検査では、被験物質投与により、限定的な非腫瘍性の影響が認められた。結論として、鼻部における毒性所見は、吸入の非特異的影響であり、グリコピロニウム投与に関連したものではなく、外因性物質の吸入による高い負荷によって生じた物理的影響であると考えられた。

2.6.6.5.3.2 ラットを用いた 104 週間の吸入毒性試験（試験番号 FY12-072^{4.2.3.4.1.2}）

本試験の目的は、GP MDI を Sprague Dawley 系ラットに 104 週間まで経鼻吸入投与したときの潜在的毒性を評価することであった。

すべてのラットを鼻部吸入用の固定器に馴化させ、曝露前に体重測定及び眼科学的検査によって本試験への適応性を評価した。正常であることが確認された動物のみを試験に使用し、各投与群に無作為に割り付けた。

事前に適格性を確認した吸入曝露システムを用いて、低用量、中用量、又は高用量のグリコピロニウムを投与した。溶媒対照群及び空気対照群は、同一システムを用いて別個に投与した。エアロゾル質量濃度は、動物ポートの呼吸領域からエアロゾルを Pallflex 47 mm メンブレンフィルター上に採取することによって直接モニタリングした。このフィルターはエアロゾルの総質量濃度を測定するために重量測定法によって分析され、グリコピロニウムの存在を決定するために適格な HPLC-UV 法によって分析した。本試験で肺に送達された用量を下表にまとめる。空気対照群又は溶媒対照群エアロゾルでは、被験物質は検出されなかった。

群	グリコピロニウム 用量 (µg/kg/日)	
	雄	雌
空気対照	ND*	ND*
溶媒対照	ND*	ND*
グリコピロニウム 低用量	151.70	165.93
グリコピロニウム 中用量	302.92	330.66
グリコピロニウム 高用量	620.45	684.14

*ND = 検出限界以下

空気対照群を除いて、各曝露システムから採取した代表的試料を用いて、エアロゾルの粒径を測定した。空気動力学的中央粒子径 (MMAD) 及び幾何標準偏差 (GSD) は、グリコピロニウム群で 3.64 (1.91) µm、溶媒対照群で 4.20 (1.68) µm であった。

52 週時点で、予定されていた 1 回目の安楽死を実施し、1 群あたり雌雄各 10 匹のラットを安楽死させ、病理組織学的検査に供した。1 回目の安楽死時点における平均生存率は、空気対照群の雌で 88.6%であったのを除いて、すべての群において雌雄とも 90%以上であった。

投与期間に応じて、生存率は持続的に低下した。空気対照群の雌において生存率が低かったため（80 週目終了時までには 36.7%）、病理組織学的検査に十分な組織標本を確保するために、81～82 週時点で試験を中止した。空気対照群は 81 週目で終了とし、他のすべての群は 82 週時点で安楽死させた。空気対照群における最終的な生存率は、雄で約 63.3%、雌で約 36.7%であった。他の 4 群における最終的な生存率は、雄では溶媒対照群で約 45.0%、低用量群で約 58.3%、中用量群で約 58.3%、高用量群で約 63.3%、雌では溶媒対照群で約 43.3%、低用量群で約 48.3%、中用量群で約 41.7%、高用量群で約 48.3%であった。

投与期間中のすべての時点を通して、雌雄とも、両対照群と比較して統計学的に有意な、投与に関連した体重減少が認められた。全体として、被験物質を投与した雄では両対照群と比較して成長率が有意に低下し、低用量群では両対照群の 84%、中用量群及び高用量群では両対照群の 68%であった。雌でも、投与に関連して雄と同程度の成長率の低下がみられた。低用量、中用量及び高用量群における成長率は、空気対照群と比較して、それぞれ 74%、77%及び 64%であり、溶媒対照群と比較して、それぞれ 82%、87%及び 71%であった。

空気対照群を含めて、被験動物において最も多く観察された所見は、腫瘍/腫瘍であった。その発現率は、高用量群の 14 匹から溶媒対照群の 31 匹までの範囲であった。腫瘍/腫瘍は、ラットが 12 カ月齢に達した頃から出現し始め、試験期間が 500 日を超えた後には、更に頻度が高まった。投与期間中に次に多くみられた臨床徴候は、病変や発疹などの皮膚所見であった。低用量群の雄 1 匹及び高用量群の雌 1 匹において、努力性呼吸のような呼吸症状が認められた。しかし、いずれも軽度であり、短期間で回復した。その他に、旋回/振戦/攣縮/頭位傾斜、粗毛又は脱毛、眼刺激、及び消耗などの臨床症状が低頻度で認められた。これらの所見は、いずれも被験物質の投与に関連したものではないとみなされた。

剖検時の肉眼検査では、種々の組織において散在性の肉眼病変が広範囲に認められたが、これらは高齢ラットにおいて予想される所見であった。最終安楽死時点では、両対照群を含めたすべての群において、多くの（概ね 40～50%）動物で肺表面に褪色領域が目視された（これに対応する病理組織学的所見として、肺胞マクロファージの蓄積が認められた）。また、両対照群を含めたすべての群において、足皮膚炎、様々な組織における結節や腫瘍（特に皮下乳房腫瘍）、下垂体肥大及びそれに対応する脳腹側表面の陥凹、乳房過形成、腎臓内嚢胞などの肉眼的変化がみられた動物が散見されたが、これらは高齢ラットで予想される所見であった。これらの肉眼的所見は、いずれも被験物質に関連したものではないとみなされた。

統計学的に有意な器官重量変化の多くは、実際には体重変化の影響を示すものであり、体重変化によって最終的には被験物質投与群における器官/体重重量比を増大させた。したがって、高齢ラットにおける器官重量データの解釈には注意が必要である。器官重量（絶対器官重量、器官/体重重量比、又は器官/脳重量比）の統計学的に有意な変化が認められたのは、心臓、腎臓、肝臓、脾臓及び胸腺であった。心臓及び腎臓については、雄又は雌において絶対器官重量及び器官/脳重量比が溶媒対照群に比べて若干減少し、ある程度の用量依存性がみられた。心臓については、高用量群の雌においてのみ、器官/脳重量比の統計学的に有意な低下が認められた。腎臓については、すべての用量群の雄において、溶媒対照群と比較して器官/脳重量比の統計学的に有意な低下が認められた。これらの変化の病因及び意義は不明である。これらに対応する病理組織学的変化は認められなかったことから、器官重量変化の生物学的に意義は低いと判断された。脾臓については、溶媒対照群と比較して、絶対器官重量では高用量群の雌でのみ、器官/脳重量比では低用量及び高用量の雌にのみ統計学的有意な低下が認められたが、この低下は体重低下とほぼ比例していた。

肝臓については、被験物質投与群の雄雌において重量減少が認められた。この変化は、主に雌において、溶媒対照群に比べて一貫して統計学的に有意であった。しかし、これは溶媒対照群の

2.6.6 毒性試験の概要文

一般名：ブデソニド/グリコピロニウム臭化物/ホルモテロールフマル酸塩水和物

雌において肝重量が異常に高値であったことによるものであり、これらの雌では肝臓においてグリコーゲン蓄積の特徴を示す病理組織学的変化が認められた。空気対照群と比較した場合は、一貫した減少は認められなかった。総合すると、被験物質投与群における肝重量及び肝/脳重量比の減少は、概して、投与に関連して両対照群に比べて体重が減少したことに関連したものであると考えられた。

被験物質投与群の雄雌において、胸腺の絶対器官重量及び胸腺/脳重量比が溶媒対照群に比べて若干減少し、特に雄ラットにおいて、ある程度の用量依存性が認められた。この変化は、各投与群間で、また雄雌間で比較的一貫していたが、その病因は不明である。これは、被験物質を投与したラットにおける胸腺退縮速度の若干の加速を反映している可能性がある。この変化は、被験物質に特異的に関連したものである可能性もあるし、あるいは疑似的あるいは偶発的なものである可能性もあるが、この年齢のラットにおいて退縮した胸腺に正常に存在する大量の脂肪が他の体脂肪とともに減少したことを反映しているとみられる。被験物質を投与した動物において薬物曝露量が増加したことによる生理的ストレスも一因であったとも考えられる。

溶媒対照群の雌における肝重量増加を除いて、投与と関連する可能性のある上記器官重量変化のうち、一貫して対応する組織学的変化が認められた臓器はなかった。

病理組織学的検査では、グリコピロニウム投与に伴う増殖性（過形成性、前腫瘍性、又は腫瘍性）変化は認められなかった。

投与に伴い、喉頭内及び鼻部において限定的な非腫瘍性の影響が認められた。喉頭内では、扁平上皮化生の用量依存的な増加が認められた。これは、ラットの吸入試験において、幅広い被験物質で共通して認められる変化であり、適応性の非有害影響であると考えられる。

鼻腔内における鼻/鼻甲介の変化は、尾側鼻部上皮におけるヒアリン変性及び吻側鼻部における好中球性炎症のみであった。嗅上皮のヒアリン変性（好酸性小球の存在としても知られる）については、強い用量依存性が認められた。これは、通常、ラットの加齢に伴い尾側鼻部で増加する一般的な偶発的变化である（Renne et al 2009）。また、吸入試験において、幅広い不活性吸入物質に反応して増加することも明らかになっている（Harkema et al 2006）。本試験におけるこの変化の特異的病因及び意義は不明であるが、被験物質の特異的作用によるものではなく、外因性物質の吸入によって引き起こされたものと考えられる。同様に、低用量群及び高用量群において好中球性炎症が若干増加した。その発現部位は吻側鼻部であり、発現は限定的かつ散発的であり、12 カ月時点と最終時点の間でばらつきがあり、溶媒対照群でも認められたことから、この変化も、被験物質グリコピロニウムに特異的な影響ではなく、物質の吸入による物理的影響に関連した散発的特徴であることが示唆される。

すべての用量群のすべての動物において、肺の所見は概して正常範囲内であった。すべての被験物質投与群のほとんどの動物において、肺の所見は正常範囲内であり、空気対照群及び溶媒対照群と差がなく、病理組織学的検査では、高用量群においても被験物質に起因する明確な影響は認められなかった。

鼻部及び喉頭の変化に関連したいくつかの毒性所見は、吸入の非特異的影響であり、グリコピロニウム投与に関連したものではないとみなされた。これらの所見は、外因性物質の吸入による高い負荷に対する反応から生じた単純な物理的作用である可能性が高い。

本試験における腫瘍発生率について統計解析を実施した。1) 腫瘍の発生率は、腫瘍が観察された状況（偶発的または致命的）を反映した連続性補正なしの Peto's mortality-prevalence method によって分析した。2) さらに poly-3 statistical analysis 統計解析も用いて分析した。その結果、雄では統計的な差はみられなかった。雌では、1) 空気対照群と低用量群との間で乳腺腺腫、及び 2)

2.6.6 毒性試験の概要文

一般名：ブデソニド/グリコピロニウム臭化物/ホルモテロールフマル酸塩水和物

溶媒対照群と中用量群との間で甲状腺 C-細胞の腫瘍発生率の増加がみられた。両腫瘍とも一般的に観察されるものであり、一対評価比較 (pairwise comparisons) では統計的に有意ではなかった (すなわち、腫瘍発生に対して統計学的に有意な用量関連傾向はみられなかった)。

病理組織学的検査所見のピアレビューは、XXXXXXXXXX の XXXXXXXXXX によって実施された。試験実施病理学者によって報告された全体的な結果は、すべての関連データの診断と解釈についてピアレビューアーと相互に合意されたものである。

要約すると、本試験の条件下でラットにグリコピロニウムを長期投与したところ、いずれの用量においてもがん原性は認められなかった。いずれの臨床所見も、被験物質の投与に関連したものではないと考えられたものの、すべての用量において統計学的に有意な体重増加量の減少が認められた。病理組織学的検査では、被験物質投与に伴い、喉頭内及び鼻部において限定的な非腫瘍性の影響が認められた。投与に関連した増殖性 (過形成性、前腫瘍性、又は腫瘍性) 変化は認められなかった。結論として、鼻部及び喉頭における毒性所見は、吸入の非特異的影響であり、グリコピロニウム投与に関連したものではなく、外因性物質の吸入による高い負荷によって生じた物理的影響であると考えられた。

2.6.6.5.4 ブデソニド/グリコピロニウム/ホルモテロール

ブデソニド、グリコピロニウム及びホルモテロールの個々の活性成分についてマウス及びラットを用いたがん原性試験が行われているため、これら3剤の配合剤を用いたがん原性試験は実施していない。上記に記載したように、ブデソニドにがん原性を示唆する影響はなく、ホルモテロールではクラスエフェクトとして知られているヒトとの関連性のない変化が認められ、グリコピロニウムのマウス及びラットを用いたがん原性試験ではいずれの用量においてもがん原性を示唆する影響は認められなかった。従って、ブデソニド/グリコピロニウム/ホルモテロール配合剤をヒトに投与した際においても、発がんが問題となる可能性は低いと思われる。

2.6.6.6 生殖発生毒性試験

2.6.6.6.1 ブデソニド

シムビコート®タービュヘイラー®の概要

本邦において、ブデソニドの生殖発生毒性試験はシムビコート®タービュヘイラー®承認申請時に提出されている。

ブデソニドの生殖に及ぼす影響について、ラットを用いた吸入投与による胎児の器官形成期投与試験を FDA のガイドラインに従った試験デザインで検討した。なお、吸入投与による「妊娠前及び妊娠初期投与試験」及び「周産期及び授乳期投与試験」では、妊娠動物を保定装置に長時間拘束して曝露すること及び授乳中の母体を連日長時間出生時から離し曝露する操作による、妊娠経過あるいは出生児への悪影響が考えられたこと、並びに既に実施されている皮下投与試験において全身を介した影響を評価できると考えられたことから、吸入投与試験を実施しなかった。

ラットを用いた吸入投与による胎児の器官形成期投与試験では、用量依存的な母動物の体重増加抑制及び胸腺重量低下、高用量での胎児重量の低下が認められたが、胎児発達に及ぼす影響はみとめられなかった。

2.6.6 毒性試験の概要文

一般名：ブデソニド／グリコピロニウム臭化物／ホルモテロールフマル酸塩水和物

皮下投与によるラットの妊娠前及び妊娠初期投与試験では、雌雄親動物の摂餌量の減少、体重増加の抑制、死亡胚・胎児数の増加、骨化遅延等がみられた。胎児の器官形成期投与試験では、母体の摂餌量の減少、体重増加の抑制、胸腺、脾臓、副腎及び子宮重量の低下、妊娠日数の延長、胎児体重、生存胎児数及び出生時生存児体重の減少、胎児の胸骨の骨化遅延、出生児の体重増加抑制等が認められた。皮下投与によるラットの周産期及び授乳期投与試験では、母体の摂餌量の減少、体重増加抑制、母体の胸腺の退縮・重量低下、出生児の眼瞼開裂日齢の促進が認められた。また、ウサギの皮下投与による胎児の器官形成期投与試験では、母体の体重増加抑制、体重減少、胎児体重の低下、発育遅延による骨格異常の増加が認められた。

2.6.6.6.2 ホルモテロール

シムビコート®タービュヘイラー®の概要

本邦において、ホルモテロールの生殖発生毒性試験はシムビコート®タービュヘイラー®承認申請時に提出されている。

ホルモテロールのラット妊娠前及び妊娠中・授乳期経口投与試験では、15 mg/kg/日群において、雄ラットの授胎能の低下、受精率及び胎児の形態異常が軽度のみられた。一方、3 mg/kg/日を投与した母動物では、胎児及び同腹児重量の減少が認められた。ラット胚・胎児発生に関する試験では、最高 1.2 mg/kg/日までホルモテロールを吸入投与したが、ラットの胎児発生に影響は認められなかった。ウサギ胚・胎児発生に関する経口投与試験では、3.5 mg/kg/日群では胎児発生に影響は認められなかったが、60 mg/kg/日群では肝臓被膜下嚢胞を伴う胎児の出現率の増加及び骨格変異を呈する胎児数の増加がみられた。ラット出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験では、ホルモテロールを高用量（3.4 mg/kg/日）経口投与しても出生児の発育、生殖機能あるいは受胎能力に影響は認められなかった。

2.6.6.6.3 グリコピロニウム

2.6.6.6.3.1 受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験（試験番号 14-764^{4.2.3.5.1.1}）

雌雄の Sprague Dawley 系ラットに、生理食塩水を溶媒として調製したグリコピロニウムを 0（溶媒対照）、0.1、1 及び 10 mg/kg/日の用量で皮下注射した。1 群雌雄各 25 匹とし、ほかに雄雌各 6 匹のトキシコキネティクス（TK）群を設けた。投与容量を 1 日 1 mL/kg とし、雄には交配前 4 週間、交配期間、及びその後剖検予定日まで、雌には交配前 2 週間以上、交配期間、及びその後妊娠 6 日（すなわち、着床）まで連日投与した。TK 評価用の血液検体は、交配前の初回投与日及び最終投与日（雄では投与 1 日及び投与 28±2 日、雌では投与 1 日及び投与 14 日目に相当）に、投与前並びに投与後 0.5、1、2 及び 4 時間の各時点で TK 群の雄雌各 3 匹から採取した。母動物は 28 日間の連日投与後、妊娠 13 日に帝王切開を行ったが、雄には 52 日間以上連日投与し、交配後に屠殺した。同一群内で、雄雌 1 対 1 で交配させた。評価した毒性パラメータは、体重、摂餌量、一般状態、交配能力、発情周期、生殖能力、精子分析、器官重量及び剖検所見であった。

グリコピロニウムの全身曝露は、投与した雄及び雌の TK ラットの血漿中濃度測定にて確認した。グリコピロニウムの血漿中濃度から、その t_{max} は、投与後 0.5 時間であった。 C_{max} はすべて

2.6.6 毒性試験の概要文

一般名：ブデソニド／グリコピロニウム臭化物／ホルモテロールフマル酸塩水和物

の採血時間で明確な用量依存性がみられた。投与 1 日における曝露量に明らかな性差は認められなかった。また、雄雌ともにすべての投与群で用量依存性が認められた。

投与期間中、投与に関連した死亡は認められなかった。10 mg/kg/日群の雄 1 匹が投与 1 日に死亡したが、死亡の原因は取り扱い操作による事故死と考えられた。10 mg/kg/日を投与された TK 群の別の雄は膀胱／腎感染に伴う一般状態悪化により瀕死状態となったため安楽死させた。観察された一般状態の変化の大半は 10 mg/kg/日群でみられた注射部位の脱毛、及び同群の少数のラットで観察された注射（投与）部位のびらん／痂皮であった。投与に関連した体重及び体重増加量の減少が、雄では 0.1 mg/kg/日以上で、雌では 1 mg/kg/日以上で認められた。これらの体重増加量の減少は投与開始直後から観察され始め、1 及び 10 mg/kg/日群のラットで持続的に認められた。

投与群のラットの交配能力（精子の存在によって示される交尾行動）には、グリコピロニウムの投与による影響は認められなかった。投与群における妊娠成功率は 92～100%であり、精子が確認された雌での妊娠成立の割合は、溶媒対照群及び 0.1 mg/kg/日群で 100%（25 匹中 25 匹）、1 mg/kg/日群で 96%（25 匹中 24 匹）、10 mg/kg/日群では 92%（25 匹中 23 匹）であった。

同腹の胚生存率も全試験群を通じて同様であり、投与群と対照群との間で黄体数、総着床数、吸収胚数、着床前又は着床後の胚損失数の平均値に差は認められなかった。

精子の運動性及び直進性は全試験群で同様であり、それぞれ 77.3～87.3%（運動率）及び 21.2～25.7%（直進率）であった。精巣上体の精子濃度（精子数）及び精子形態のパラメータには、グリコピロニウムの投与による影響は認められなかった。精巣上体尾部 1 g あたりの精子数は全試験群で同様であり、約 $10.01\sim 11.38\times 10^8$ 個/g であった。

生殖器重量（精巣上体又は卵巣の絶対重量）は、10 mg/kg/日群で対照群に比べてわずかに減少した。10 mg/kg/日群の雄では精巣/体重重量比の有意な増加が認められたが、投与群 3 群の全群で最終体重が有意に減少していた。また、10 mg/kg/日群の雌では、最終体重は減少していたが、卵巣/体重重量比及び妊娠子宮重量には投与の影響はみられなかった。絶対及び相対器官重量における変化は、体重減少に起因するものであった可能性が高く、投与の二次的な影響であると考えられた。

剖検時の肉眼検査における異常所見（精巣／精巣上体／精囊の萎縮）は、発生頻度が低く、試験群間の分布は不規則であり、対照群の雄 1 匹、低用量群の雄 1 匹及び高用量群の雄 1 匹のみで認められた。雌ラットには、肉眼病変は認められなかった。観察された肉眼病変は自然発生病変であると考えられ、供試ラットの系統、性別及び週齢における正常動物の背景データの範囲内とみなされた。

全体的な交配能力（精子の存在に基づいた交配成功率、発情周期、精子の運動性及び形態）には、投与による影響は認められなかった。絶対及び相対器官重量における変化は、著しい体重減少に起因する可能性が高いと考えられた。この試験の結果に基づくと、生殖能力には投与による影響が認められなかったことから、生殖機能に対するグリコピロニウムの NOAEL は雄雌ともに 10 mg/kg/日であった。しかし、投与期間中に観察された体重及び体重増加量の変化に基づくと、雄雌親動物に対する NOAEL は 1 mg/kg/日未満であった。

2.6.6.6.3.2 胚・胎児発生に関する試験

2.6.6.6.3.2.1 ラット胚・胎児発生に関する試験（試験番号 14-760^{4.2.3.5.2.1}、14-762^{4.2.3.5.2.2}）

ラット胚・胎児発生に関する試験のための用量設定試験（試験番号 14-760）では、最高用量を 10 mg/kg/日として 0.2、1 及び 5 mg/kg/日の用量で妊娠 6 日から 17 日まで皮下投与した結果、忍容性は良好であったが、1 mg/kg/日以上用量で母動物の摂餌量減少並びに体重及び／又は体重増加量の減少が認められた。しかしながら、胚・胎児発生への影響は 10 mg/kg/日の用量でも認められなかった。従って、10 mg/kg/日が、本試験（試験番号 14-762）に用いる最高用量として適切であると判断された。

本試験（試験番号 14-762）では、時期を合わせて交配させた Sprague-Dawley 系ラットの雌（1 群 23 匹）に、生理食塩水を溶媒として調製したグリコピロニウムを 0（溶媒対照）、0.1、1 及び 10 mg/kg/日の用量で皮下注射した。投与期間は主要器官形成期（妊娠 6 日から 17 日）とし、1 日 1 回 1 mL/kg の一定容量で投与を行い、妊娠期間を通して母動物の体重、体重増加量及び摂餌量を測定した。母動物は妊娠 21 日に安楽死させ、帝王切開及び剖検時肉眼検査を行った。子宮の重量を測定し、切開して着床部位を調べた後、胎児を摘出して重量を測定し、外表の肉眼検査を行った。全群の各同腹児の半数について内臓検査を行い、対照群及び高用量群の胎児については頭部検査も実施した。溶媒対照群及び高用量群の各同腹児の半数について骨格検査を実施した。

妊娠 6 日又は 17 日のグリコピロニウム血漿中濃度は、用量依存的であった。

投与期間中に死亡例はなく、いずれの母動物にも、投与に関連した有害な徴候はほとんど認められなかった（各投与群の 1～3 匹のラットに不規則呼吸が数回みられた）。0.1 mg/kg/日以上用量でグリコピロニウムを投与された母動物で摂餌量減少が認められ、この所見は、0.1 又は 1 mg/kg/日群では一時的であったが、10 mg/kg/日群では試験期間中持続して観察された。この結果として体重及び／又は体重増加量も減少し、変化のパターンが類似していた（0.1 又は 1 mg/kg/日群で一時的な減少、10 mg/kg/日群では持続的な減少）。子宮重量で補正した体重の総増加量、体重及び体重増加量は、10 mg/kg/日群で有意に減少した。一方、子宮重量は全試験群を通じて同様であり、投与による影響は認められなかった。特に、子宮重量には投与の影響が認められなかったことから体重の総増加量、子宮重量で補正した体重及び体重増加量の減少は母体自体の減少であったことが強く示唆されるため、これらの減少は母体への毒性を示すものである。

2 例の例外（対照群の 1 例及び 1 mg/kg/日群の 1 例）を除いて全動物の組織が正常であり、剖検時の肉眼検査所見に著変は認められなかった。

同腹児数、生存胎児数、総着床数及び死亡胚・胎児数は全試験群を通じてほぼ同様であったが、同腹児数（総着床数及び生存胎児数）は 10 mg/kg/日群でわずかに多かった（6%）。10 mg/kg/日群では同腹児数がわずかに増加した結果及び母体毒性の結果として胎児体重の減少が認められたが、0.1 及び 1 mg/kg/日群における胎児体重は両群ともに溶媒対照群と同様であった。胎児の異常は発生頻度が低く、試験群間の分布は不規則であった。胎児の検査（外表の肉眼検査、骨格検査、内臓検査及び頭部検査）では、投与に関連した催奇形性の明白なパターンは認められなかった。

この試験の結果に基づくと、10 mg/kg/日の投与で母体及び胎児の体重に影響がみられたことから、グリコピロニウムの母体毒性及び胚・胎児発生に対する NOAEL は 1 mg/kg であった。

2.6.6.6.3.2.2 ウサギ胚・胎児発生に関する試験（試験番号 14-761^{4.2.3.5.2.3}、14-763^{4.2.3.5.2.4}）

ウサギ胚・胎児発生に関する試験のための用量設定試験（試験番号 14-761）では、妊娠第 6 日の単回皮下投与により、300 mg/kg/日の用量で死亡が、10、50 又は 100 mg/kg/日の用量では著しい母体毒性が認められた。2 日間の休薬後、妊娠 8 日又は 9 日から 18 日には 0.2、1、5 及び 10 mg/kg/日の用量で投与を再開した。300/10、100/5 及び 50/1 mg/kg/日群で胎児体重の明らかな減少が認められたが、この所見は初回の高用量投与の結果として生じていた毒性に起因するものであり、10 mg/kg/日が、本試験（試験番号 14-763）に用いる最高用量として適切であると判断された。

本試験（試験番号 14-763）では、時期を合わせて交配させたニュージーランド白色種ウサギの雌（1 群 23 羽）に、生理食塩水を溶媒として調製したグリコピロニウムを 0（溶媒対照）、0.1、1 及び 10 mg/kg/日の用量で皮下注射した。また、各投与群に、トキシコキネティクス（TK）評価用のサテライト動物として雌ウサギ 3 羽を追加した。投与期間は主要器官形成期（妊娠 6 日から 18 日）とし、1 日 1 回、1 mL/kg の一定容量で投与を行い、妊娠期間を通して母動物の体重、体重増加量及び摂餌量を測定した。母動物は妊娠 29 日に安楽死させ、帝王切開及び剖検時肉眼検査を行った。子宮は、重量を測定した後、切開して着床部位を調べた。また、全胎児について内臓検査及び骨格評価のための処理を行い（溶媒対照群、中用量群及び高用量群を検査）、各同腹児の約 3 分の 1 を頭部検査に供した（溶媒対照群及び高用量群を検査）。

グリコピロニウムの全身暴露は、投与した TK ラットの血漿中濃度測定にて確認した。投与 6 日及び 18 日の C_{max} において明確な用量依存性が認められ、すべての投与群で全身曝露が認められた。

投与期間中に死亡例は認められなかった。各試験群で 1 羽以上の動物に糞便量減少が認められ、1 及び 10 mg/kg/日群では大部分のウサギが投与期間中（妊娠 6～18 日）数日間にわたってこの状態を呈した（発生頻度は 0、0.1、1 及び 10 mg/kg/日群でそれぞれ 23 羽中 3 羽、6 羽、21 羽及び 23 羽）。この状態は概して、摂餌量減少に伴って観察された。少数のウサギ（対照群で 3 羽、低用量群で 0 羽、中用量群で 2 羽、高用量群で 5 羽）が流産の徴候を示し、妊娠 17 日頃から 24 日までケージトレイに赤色の分泌物又は胎盤が確認された。投与群と対照群との間で、流産の発生率に有意差はなかった。注射（投与）部位の発赤などのその他の徴候は、発生頻度が低く、対照群を含めた全試験群に散見された。

摂餌量減少並びにその結果として生じた体重／体重増加量減少及び糞便量減少によって示される母体毒性が、1 及び 10 mg/kg/日群で明らかに認められた。0.1 mg/kg/日群でも摂餌量の減少がみられたが、体重又は体重増加量には変化が認められなかった。子宮重量で補正した体重の総増加量は、1 及び 10 mg/kg/日群における母体毒性を示唆するものであった。

投与群で子宮重量及び生存胎児数の減少が認められたが、用量依存関係は認められず、着床可能な卵子数（黄体数によって示される）の減少との関連性が証明された。これらの事象（子宮重量及び生存胎児数の減少）はいずれも、投与とは関連がない偶発的な事象であると判断された。胎児の生存率には投与による影響はなく、胎児損失（着床後胚損失）の増加は認められなかった。10 mg/kg/日群で胎児体重の減少傾向がみられ、雄の胎児で有意な体重減少が認められたが、この所見は母体毒性による二次的な影響である可能性が高いと考えられた。0.1 又は 1 mg/kg/日群では胎児体重に差が認められなかった。投与群の胎児における外表の肉眼検査、内臓検査、頭部検査又は骨格検査では、明白な形態学的変化は認められなかった。観察された所見は発生頻度が低く、かつ背景データの範囲内であった。既存対照の範囲内ではあったが 10 mg/kg/日群で観察された変化（特に胎児体重の減少）は、母体毒性による二次的な影響である可能性が高いと考えられた。

本試験の結果、母体毒性に対する NOAEL は母動物の体重／体重増加量に変化が認められなかったことに基づいて 0.1 mg/kg/日とされたが、胚・胎児発生毒性に対する NOAEL は 10 mg/kg/日群の胎児における胎児体重の減少に基づいて 1 mg/kg/日とされた。

2.6.6.6.3.3 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（試験番号 14-765^{4.2.3.5.3.1}）

母動物の生殖機能／分娩、出生前及び出生後の発生（発育に対する影響を含む）、性成熟に達するまでの行動及び全般的な発達（出生児の生殖能力の評価を含む）を評価するため、精子が確認された母動物（F₀、Sprague-Dawley ラット）（1 群 24 匹）に、生理食塩水を溶媒として調製したグリコピロニウムを 0（溶媒対照）、0.1、1 及び 10 mg/kg/日の用量で皮下注射した。母動物（F₀）に、妊娠 6 日から分娩まで、及び離乳（出生後 21 日目）までの授乳期間を通して皮下注射による投与を行った。F₂ 世代の親動物として選択された F₁ ラットには、グリコピロニウムの意図的な曝露を行わなかった。F₀ 及び F₁ 母動物から生まれた同腹新生児は、出生後 4 日目に、同腹児数を調整した。投与期間中は摂餌量、体重、体重増加量、生殖能力及び器官重量を評価し、併せて、出生児の体重（発育）、生存及び発達指標（F₁ 世代の膈開口及び包皮分離）を評価した。また、F₂ 世代の親動物として選択された F₁ 出生児において、感覚機能及び反射反応の肉眼検査、並びに自動聴覚性驚愕反応、自発運動量及び水迷路試験（学習・記憶パラダイム）を評価した。投与用量は直近の体重に基づいて決定し、1 mL/kg の一定容量で投与を行った。

母体血漿中のグリコピロニウム測定結果は、投与後 0.5 時間で T_{max} を示し、低、中及び高用量群の C_{max} はそれぞれ、11.3、158 及び 1610 ng/mL であった。一方、新生児から採取した血液サンプル（同腹児の新生児からのプールしたサンプル）における T_{max} は、低用量群及び高用量群では 1 時間、中用量群では 0.5 時間であり、C_{max} は低、中及び高用量群でそれぞれ、2.5、12.1 及び 96.0 ng/mL であった。新生児血漿中のグリコピロニウム濃度は、母体の濃度よりもはるかに低いことから、授乳期間中に乳汁を介した制限された曝露であることを示唆している。グリコピロニウムを投与した母体及び新生児のいずれにおいても、グリコピロニウムの全身曝露とその用量依存性が確認された（新生児で見られた低い曝露量は乳汁を介した制限された曝露）。

F₀ 成熟動物では投与に関連した死亡は認められず、投与の最初の数日間（妊娠 6 日及び／又は 7 日）に 1 及び 10 mg/kg/日群で一時的な努力呼吸の徴候が高頻度にみられた。この徴候は、投与直後に観察され、同日中に回復した。10 mg/kg/日を投与された母体では、肩甲部領域（注射（投与）部位）の皮膚に脱毛症、赤色及び／又は痂皮が認められた。投与期間中、投与に関連したその他の一般毒性徴候は認められなかった。投与の最初の 2 日間（妊娠 7 日及び 8 日）以降、1 及び 10 mg/kg/日群で摂餌量の有意な減少が認められ、10 mg/kg/日群では試験期間の大半にわたって摂餌量減少が持続した。この結果として生じた体重及び体重増加量の減少が、10 mg/kg/日群の母動物で観察された。

溶媒対照を含めた投与動物すべての平均妊娠期間は 22 日間であり（F₀）、母動物（F₀）における分娩成功率は対照群及び投与群の双方で 100%であった。着床部位数及び平均 F₁ 同腹児数（雄雌併合の総出生児数）は対照群と投与群とで同様であり、着床前後の損失でも差は認められなかった。本試験の出生時～出生後 4 日における全生存率は 97～100%であった。10 mg/kg/日群で出生後 4 日における生存率が有意に低かったが、全生存率（出生後 0 日～21 日）は 10 mg/kg 日群では影響を受けなかった。離乳前の期間を通じて 10 mg/kg/日群で、F₁ 世代における新生児の体重の最小減少（約 6～8%）が、時に 1 mg/kg/日（出生後 0 日及び 14 日）群でも認められた。

発達指標（F₁ 及び F₂ 世代の開眼及び背地走性、F₁ 世代の包皮分離及び膈開口）には投与による影響は認められなかったが、F₁ 世代の春機発動期（包皮分離開始時）の雄において、1 及び 10

2.6.6 毒性試験の概要文

一般名：ブデソニド/グリコピロニウム臭化物/ホルモテロールフマル酸塩水和物

mg/kg/日群で有意な体重減少が認められた。F₁ 世代の感覚機能（瞳孔反射、触覚性踏み直り反応）、反射反応（空中立ち直り反射及び後肢伸展反射）、聴覚性驚愕反応、自発運動量、又は学習及び記憶（水迷路）の評価においては、投与に関連した明確な差は認められなかった。

F₁ 世代の交配能力及び受胎能は、全試験群を通じて同様であった。F₂ 世代の離乳前体重及び発達指標（開眼及び背地走性）も、全試験群を通じて同様であった。

1 及び 10 mg/kg/日のグリコピロニウムを投与された F₀ 母動物で、摂餌量、体重及び体重増加量の有意な減少を特徴とする明らかな母体毒性が認められた。10 mg/kg/日群、時に 1 mg/kg/日群でも認められた F₁ 世代の新生児体重の軽微な減少は母体毒性に起因する可能性が高い。全体として、10 mg/kg/日を投与した母体由来の新生児で認められた低体重は、新生児が乳汁を介してグリコピロニウムにわずかに曝露される授乳期間中も維持された（出生時の 6%から離乳時の 8%）。このことは、母体毒性と F₁ 世代の新生児の体重減少との間の関連を更に支持している。母体毒性もまたわずかな体重減少に影響しているかもしれないが、10 mg/kg/日群の出生後 4 日の生存率には若干の不明確な変化がみられた。

全パラメータの総合的な検査に基づくと、F₀ 世代の全身毒性に対する NOAEL は、高用量で摂餌量、体重及び体重増加量の減少が認められたことから 0.1 mg/kg/日であった。F₀ 世代の生殖毒性に対する NOAEL は、受胎能、分娩及び母体に対する影響が認められなかったことから、10 mg/kg/日であった。F₁ 世代の雄及び雌の生殖毒性に対する NOAEL は、交配率、受胎能及び母体に対する影響が認められなかったことから、10 mg/kg/日であった。一方、F₁ 世代の出生児の生後発育に対する NOAEL は、10 mg/kg/日で一貫した出生時の体重減少（F₁ 世代の離乳前体重）が認められたため、1 mg/kg/日であった。

2.6.6.6.4 ブデソニド/グリコピロニウム/ホルモテロール

ブデソニド、グリコピロニウム及びホルモテロールの個々の活性成分について生殖・発生毒性が検討されているため、これら 3 剤の配合剤を用いた生殖発生毒性試験は実施していない。

2.6.6.7 局所刺激性試験

2.6.6.7.1 ブデソニド

ブデソニド 200 及び 400 µg を 1 日 2 回 3 カ月間イヌの鼻腔内に噴霧した試験では、鼻粘膜刺激性は認められなかった（シムビコート®タービュヘイラー®の概要）。

BD MDI を用いたラット 14 日間（試験番号 FY14-035）、イヌ 14 日間（試験番号 FY14-036B）、及びイヌ 3 カ月間（試験番号 FY14-148B）反復吸入投与毒性試験を実施したが、気道に局所刺激性や病理組織学的変化は認められなかった。

2.6.6.7.2 ホルモテロール

乾燥粉末のホルモテロールをラットでは 870 µg/kg の用量まで（3 及び 6 ヶ月間）、イヌでは 15 µg/kg の用量まで（1 カ月間）反復吸入投与したが、気道に局所刺激性を示唆するような病理組織学的変化は認められなかった（シムビコート®タービュヘイラー®の概要）。

2.6.6 毒性試験の概要文

一般名：ブデソニド/グリコピロニウム臭化物/ホルモテロールフマル酸塩水和物

FF MDI を用いたラット 14 日間（試験番号 FY09-039）、イヌ 14 日間（試験番号 FY09-038）、及びイヌ 3 カ月間（試験番号 FY10-129）反復吸入投与毒性試験を実施したが、気道に局所刺激性や病理組織学的変化は認められなかった。

2.6.6.7.3 グリコピロニウム

GP MDI を用いたマウス及びラット 14 日間（マウス：試験番号 FY14-111、ラット：試験番号 FY08-076）、イヌ 3 カ月間（試験番号 FY10-129）、ラット及びイヌ 6 カ月間（ラット：試験番号 FY10-120、イヌ：試験番号 FY12-073）反復吸入投与毒性試験並びに吸入投与経路によるマウス及びラットがん原性試験（マウス：試験番号 FY14-128、ラット：試験番号 FY12-072）を実施したが、気道に局所刺激性や病理組織学的変化は認められなかった。

2.6.6.7.4 ブデソニド/グリコピロニウム/ホルモテロール

ブデソニド、グリコピロニウム及びホルモテロールの配合剤（BGF MDI）のラット及びイヌ 14 日間（ラット：試験番号 FY14-033、イヌ：試験番号 FY14-036A）並びにイヌ 3 カ月間（試験番号 FY14-148A）反復吸入投与毒性試験を実施したが、気道に局所刺激性や病理組織学的変化は認められなかった。

2.6.6.8 その他の毒性試験

2.6.6.8.1 不純物及び分解生成物に関する試験

2.6.6.8.1.1 ブデソニド

ブデソニドの原薬は局外規収載品につき、不純物は局外規の規格により管理されている。ブデソニドに含まれる不純物/分解物の規格値は製剤の不純物に関するガイドラインにおける安全性確認の必要な閾値（1.0%）以下である（シムビコート®タービュヘイラー®の概要）。

類縁物質の構造は明らかになっており、製剤中における濃度は、ICH ガイドライン Q3A 及び Q3B に概略が示されている ICH の安全性確認閾値である原薬中 0.15%、製剤中 1.0%を下回る。毒性試験に用いたバッチにおけるこれら化合物の濃度及び予定されている製剤規格を毒性試験概要表 2.6.7.4 毒性試験：被験物質（バッチ毎）一覧 表 8 Toxicology: Drug Substance (Budesonide : inhalation aerosol) に示す。

2.6.6.8.1.2 ホルモテロール

ホルモテロールの原薬は、日本薬局方収載品につき、不純物は日本薬局方の規格により管理されている。ホルモテロールに含まれる不純物/分解物の規格値は製剤の不純物に関するガイドラインにおける安全性確認の必要な閾値（1.0%）以下である（シムビコート®タービュヘイラー®の概要）。

2.6.6 毒性試験の概要文

一般名：ブデソニド/グリコピロニウム臭化物/ホルモテロールフマル酸塩水和物

類縁物質の構造は明らかになっており、製剤中における濃度は、ICH ガイドライン Q3A 及び Q3B に概略が示されている ICH の安全性確認閾値である原薬中 0.15%、製剤中 1.0%を下回る。毒性試験に用いたバッチにおけるこれら化合物の濃度及び予定されている製剤規格を毒性試験概要表 2.6.7.4 毒性試験：被験物質（バッチ毎）一覧 表 9 Toxicology: Drug Substance (Formoterol Fumarate : inhalation aerosol) に示す。

2.6.6.8.1.3 グリコピロニウム

BGF MDI 製剤の安定性試験において、3.2.P.5.5 Characterization of Impurities in Drug Product に記載されているいずれの保管条件においても、グリコピロニウムの分解を示す所見は得られなかった。原薬の規格には、グリコピロニウムの個別規格設定不純物が 4 種類含まれている。製剤の規格には、欧州薬局方の不純物 ●●●* も含まれている。原薬の強制分解試験から、主な分解経路は、エステル部分の加水分解による不純物 ●●●* の生成であることが示された。欧州薬局方の不純物 ▲▲▲*、不純物 ■■■*、及び不純物 ◆◆◆* は、原薬製造中の不純物であり、保管中に濃度が増大することはない。したがって、これらの不純物は原薬レベルで管理されており、製剤の規格には含まれていない。

類縁物質の構造は明らかになっており、製剤中における濃度は、ICH ガイドライン Q3A 及び Q3B に概略が示されている ICH の安全性確認閾値である原薬中 0.15%、製剤中 1.0%を下回る。毒性試験に用いたバッチにおけるこれら化合物の濃度及び予定されている製剤規格を毒性試験概要表 2.6.7.4 毒性試験：被験物質（バッチ毎）一覧 表 10 Toxicology: Drug Substance (Glycopyrrolate; inhalation aerosol) 及び表 11 Toxicology : Drug Substance (Glycopyrrolate; micronized powder) に示す。

2.6.6.8.1.4 ブデソニド/グリコピロニウム/ホルモテロール

ブデソニド/グリコピロニウム/ホルモテロール配合剤の原薬は、ブデソニド、グリコピロニウム及びホルモテロールであり、ブデソニド/グリコピロニウム/ホルモテロールの原薬の不純物/分解物に関わる規格はそれぞれの原薬に由来する。ブデソニド、ホルモテロール及びグリコピロニウムの不純物/分解物に関してはこれまでにそれぞれ記載したとおりである。ブデソニド/グリコピロニウム/ホルモテロールの 3 剤配合剤に新たな不純物/分解物は認められない。

2.6.6.9 考察

2.6.6.9.1 総合的なリスク評価

ブデソニド、グリコピロニウム及びホルモテロール（それぞれ、糖質コルチコイド薬、M₃ 拮抗薬及び β₂ 刺激薬）の 3 剤固定用量吸入配合剤（BGF）は、COPD 患者に対する吸入維持療法薬として、DSPC、CaCl₂ 及び HFA-134a を含有する MDI 製剤の形で開発された。各有効成分は幅広く研究され、医療用医薬品として使用されていることから、本固定用量配合剤については、ラット及びイヌを用いた単回吸入投与毒性試験（非 GLP）及び 14 日間反復吸入投与毒性試験、並びにイヌを用いた 3 カ月間反復吸入投与毒性試験を実施した（安全性薬理データは毒性試験の一部

として収集)。表 2に、主要試験である 3 カ月間反復吸入投与毒性試験について、投与に関連した主要所見並びにブデソニド、グリコピロニウム及びホルモテロールの全身曝露量の比較を要約して示す。

併用投与時のブデソニド、グリコピロニウム及びホルモテロールの毒性プロファイルは、それぞれ糖質コルチコイド薬、M₃拮抗薬及びβ₂刺激薬において報告されている毒性プロファイルと一致する。ラット及びイヌを用いた 3 剤配合剤の吸入毒性試験では、3 種すべての有効成分の吸収は速やかであり、概して初回の採血時点で最高血漿中濃度に到達した。予測された用量依存的な糖質コルチコイドの影響（体重減少及びリンパ組織の萎縮など）は、ラット及びイヌ双方の動物種で認められた。予測されたホルモテロールに関連する心血管系への影響（充血及び頻脈）は、イヌを用いた試験でごく軽微な影響がみられたのみであった。また、グリコピロニウムに起因する影響は認められなかった。気道内には、投与に関連した刺激症状又は病理組織学的変化は認められなかった。本固定用量配合剤を投与することによって、個々の成分に予測される影響が増強されることはなかった。

ラットでは、BGF を 1890/100/58、3810/204/118 及び 7910/421/244 µg/kg/日（ブデソニド/グリコピロニウム/ホルモテロール、雄雌の平均値）の用量で経鼻吸入投与により 1 日 1 回、14 日間反復吸入投与した結果、副腎、肝臓、胃、並びに胸腺、脾臓、リンパ節及び骨髄を含むリンパ組織に病理組織学的変化が認められ、器官重量及び臨床病理学的所見を含む複数の評価項目において病理組織学的変化を裏付ける変化が認められた。気道内にみられた変化は非常に軽微であり、非特異的な影響であると判断された。また、体重減少が、用量依存的に認められた。すべての被験物質投与群で早期死亡が用量依存的に観察され、この早期死亡は、ブデソニドの免疫抑制作用に起因する全身性細菌感染が原因である可能性が高いと考えられた。全用量群で、投与の影響がみられたパラメータの完全又は部分的な回復が認められた。この試験で観察された病理組織学的検査及び血液学的検査や血液生化学的検査における変化は、糖質コルチコイドの影響の特徴に一致しており、BGF 配合剤中のブデソニドに対する反応である可能性が高いと考えられた。ブデソニドの過去のデータから予測されたとおり、非常に高い用量を用いたため（ラットにおける肺沈着量を 10%と仮定すれば、最低用量の 1890/100/58 µg/kg/日は治療用量の約 15 倍に相当）、本試験では NOAEL は決定できなかった。

イヌでは、BGF を 3.3/0.21/0.11、17/1.1/0.62 及び 60/3.5/2.0 µg/kg/日（ブデソニド/グリコピロニウム/ホルモテロール、雄雌の平均値）の用量でフェイスマスク吸入によって 90 日間反復吸入投与した結果、副腎、肝臓及び胸腺に、糖質コルチコイド投与の影響に一致する変化が認められた。このような変化は複数の病理学的評価項目（器官重量、血液学的検査や血液生化学的検査及び病理組織学的検査など）でも認められた。気道への影響は、いずれの投与群においても観察されなかった。投与に起因する器官重量の変化は、副腎重量の減少、肝重量の増加、及び胸腺重量の減少であった。これらの器官重量の変化は、副腎皮質萎縮（束状帯及び網状帯）の組織学的所見、グリコーゲン蓄積及び／又は代謝活性亢進（適応性変化）に一致する肝細胞の変化、並びに胸腺皮質のリンパ球数減少に一致する所見であった。臨床病理学的検査パラメータにみられた投与に起因する変化は、血液生化学的検査値における軽微な変化（アルカリホスファターゼ、γ-グルタミルトランスフェラーゼ、アルブミン及びトリグリセリドの軽微な上昇）であった。本試験では NOEL を決定できなかったが、低用量群でみられた影響（少数のイヌにおける軽微な肝細胞変化及び軽微な胸腺皮質のリンパ球数減少）は概して軽微なものであり、この用量が NOAEL に相当すると判断された。この試験で観察された病理組織学的変化及び血液生化学的検査における変化は、これまでに報告されている糖質コルチコイドの影響の特徴に一致していたことから、ブデソニドに起因する変化であると考えられた。本 3 剤配合剤の成分比率に基づくと、グリコピ

2.6.6 毒性試験の概要文

一般名：ブデソニド/グリコピロニウム臭化物/ホルモテロールフマル酸塩水和物

ロニウム又はホルモテロールに関連する有意な影響は生じないと予測された（有意ではない、軽微かつ一過性の心拍数増加のみが認められた）。

表 2に示すように、イヌを用いた 3 カ月間反復吸入投与毒性試験では、この動物のブデソニドに対する感受性のために、NOAEL において臨床用量に対する安全域を求めることができなかった。しかし、ブデソニド製品は臨床現場で広く処方されており、ヒトにおける膨大な安全性データベースが存在するため、このことが全体的な安全性の評価に影響することはないと考えられる。

本 3 剤配合剤を用いた生殖発生毒性試験は実施していない。ブデソニド（皮下投与時）は、ラット及びウサギに対し、糖質コルチコイドのクラスエフェクトとして胚・胎児毒性を引き起こすことが示されている。ホルモテロールは、高用量で雄ラットの受胎能を低下させ、胚損失並びに出生時体重及び出生後早期の生存率の減少が認められたが、このときの全身曝露量は臨床用量をはるかに上回っていた。グリコピロニウム（皮下投与時）は、受胎能又は生殖に対して有意な影響を及ぼさなかった。妊娠中にブデソニド吸入剤を使用した妊婦ではブデソニドによる胚・胎児への影響が認められていないことから、動物でみられた所見には臨床的意義はないと考えられる。しかしながら、妊娠中、特に妊娠早期の女性において本 3 剤配合吸入剤の臨床使用経験が更に蓄積されるまで、注意を払う必要がある。

本 3 剤配合剤を用いた遺伝毒性試験又はがん原性試験は実施していない。一連の遺伝毒性試験で検討した結果、個々の成分はいずれも遺伝毒性を示さなかった。がん原性試験では、動物に対するクラスエフェクトに一致する影響（ホルモテロールによるげっ歯類の子宮平滑筋腫及び卵巣間膜平滑筋腫、ブデソニドによるラットの肝腫瘍）が観察されたが、双方の単剤製品における広範な臨床使用経験に基づくと、動物におけるこれらの所見に臨床的意義はないと考えられる。また、グリコピロニウムにはがん原性は認められなかった。

MDI 製剤を用いて実施したすべての試験に溶媒対照群及び空気対照群を設け、全試験において添加物に起因する有意な毒性は生じないことが示された。また、添加物の存在下でブデソニド、グリコピロニウム又はホルモテロールの毒性プロファイルが変化したことを示す証拠も認められなかった。GP MDI を用いて実施したラット及びイヌにおける 6 カ月間反復吸入投与毒性試験、並びにマウス及びラットにおけるがん原性試験で得られたデータにより、慢性投与時の添加物（HFA-134a、DSPC 及び CaCl₂）の忍容性は良好であり、がん原性に対する懸念はないことが示されている。

ブデソニド、グリコピロニウム及びホルモテロールの原薬、並びにこれら 3 剤の固定用量配合剤 MDI 中の不純物の規格値は、現行の ICH ガイドラインで安全性の評価が求められる閾値未満である。

以上のことから、毒性試験における安全性プロファイルは、COPD の慢性維持療法におけるブデソニド、グリコピロニウム及びホルモテロールの 3 剤配合固定用量吸入剤の使用を支持するものであると考えられる。

2.6.6.9.2 ヒトにおける推定曝露量

臨床試験では、1 吸入で 80/9.0/5.0 及び 160/9.0/5.0 µg（ブデソニド/グリコピロニウム/ホルモテロール）に相当する、有効成分含量の異なる 2 種類の BGF を使用した。患者への投与は 1 回 2 吸入、1 日 2 回であることから、1 日あたりの最大総投与量は、ブデソニドで 640 µg、グリコピロニウム臭化物で 36 µg、ホルモテロールフマル酸塩水和物で 20 µg である。患者の体重を 50 kg

2.6.6 毒性試験の概要文

一般名：ブデソニド／グリコピロニウム臭化物／ホルモテロールフマル酸塩水和物

と仮定すると、1日あたりの総投与量はブデソニド、グリコピロニウム臭化物及びホルモテロールフマル酸塩水和物でそれぞれ12.8、0.72及び0.40 µg/kg/日である。

臨床試験（PT010018試験）で中等度ないし重度のCOPD患者に1日2回、7日間投与したときの平均C_{max}値及びAUC₀₋₁₂値はそれぞれ、663/18/8.4 pg/mL及び3005/74/55 pg·h/mLであることから、24時間AUCは6010/148/110 pg·h/mLと推定される。

2.6.6.9.3 主要毒性試験における曝露量

表 2 BGF を用いた主要 3 カ月間毒性試験における重要所見及び曝露量データの概要：単一成分製剤との比較

重要な毒性学的所見の概要	総投与量 (µg/kg/日)	肺沈着量 ^a (µg/kg/日)	総薬物の C _{max} (pg/mL)	総薬物の AUC ₀₋₂₄ (pg·h/mL)
BGF – 試験番号 FY14-148A				
NOAEL – 体重増加抑制（雌）、Alb 上昇（雌）、副腎及び胸腺重量減少（雌）、胸腺萎縮	3.3/0.21/0.11	0.83/0.05/0.03	634/nd/nd^b	356/nd/nd^b
体重増加抑制（雌）、Alb 及び Trig 上昇、副腎及び胸腺重量減少、副腎及び胸腺萎縮、肝臓の変化	17/1.1/0.62	4.3/0.28/0.16	3450/43/37	2540/34/43
体重増加抑制（雌）、Alb、ALP 及び Trig 上昇、副腎及び胸腺重量減少、副腎及び胸腺萎縮、肝臓の変化	60/3.5/2.0	15/0.88/0.50	20800/352/283	13500/661/347
BD – 試験番号 FY14-148B				
NOAEL – 肝重量増加（雌のみ）、胸腺重量減少（雄のみ）、胸腺萎縮（雄のみ）、肝臓の変化	3.4/ - / -	0.85/ - / -	485	263
Alb 及び Trig 上昇、肝重量増加、副腎及び胸腺重量減少、副腎及び胸腺萎縮、肝臓の変化	31/ - / -	7.8/ - / -	11900	9590
Alb 及び Trig 上昇、肝重量増加、副腎及び胸腺重量減少、副腎及び胸腺萎縮、肝臓の変化	104/ - / -	26/ - / -	24600	23100
GP – 試験番号 FY10-129				
NOAEL – 体重増加抑制	- /87/ -	- /22/ -	6490	11400
FF – 試験番号 FY10-129				
肝重量増加（雌のみ）	- / - /4.5	- / - /1.1	339	1105
NOAEL – 体重増加促進、心拍数増加、肝重量増加	- / - /10	- / - /2.5	994	2995

2.6.6 毒性試験の概要文

一般名：ブデソニド／グリコピロニウム臭化物／ホルモテロールフマル酸塩水和物

重要な毒性学的所見の概要	総投与量 ($\mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$)	肺沈着量 ^a ($\mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$)	総薬物の C_{max} (pg/mL)	総薬物の AUC_{0-24} (pg·h/mL)
体重増加促進、心拍数増加、肝重量増加 軽微な肺泡マクロファージ凝集増加及び軽微な肺上皮の肥大/過形成	- / - /14	- / - /3.5	838	2870

^a イヌにおける肺沈着率を25%と仮定

^b nd : 検出限界以下

Alb:アルブミン、Trig:トリグリセリド、ALP:アルカリホスファターゼ

2.6.6.10 結論

ブデソニド、グリコピロニウム及びホルモテロールの安全性は、既に幅広く研究され、これらの各成分は医療用医薬品として使用されている。加えて、これら3剤の固定用量配合剤を用いた毒性試験において、有害な相互作用は起こらないことが確認された。したがって、本吸入投与毒性試験プログラムにより、COPDの慢性治療におけるブデソニド(80又は160 μg)、グリコピロニウム臭化物(9.0 μg)及びホルモテロールフマル酸塩水和物(5.0 μg)の3剤固定用量吸入配合剤の使用が支持される。3剤配合剤を1回2吸入、1日2回投与したときの1日あたりの最大総投与量は、ブデソニドで320又は640 μg 、グリコピロニウム臭化物で36 μg 、ホルモテロールフマル酸塩水和物で20 μg である。

2.6.6.11 参考文献

Harkema et al 2006

Harkema JR, Carey SA, and Wagner JG. The nose revisited: A brief review of the comparative structure, function, and toxicologic pathology of the epithelium. *Toxicol Pathol* 2006 ; 34 : 252-269.

Renne et al 2009

Renne R, Brix A, Harkema J, Herbert R, Kittel B, Lewis D, et al. Proliferative and nonproliferative lesions of the rat and mouse respiratory tract. *Toxicol Pathol* 2009 ; 37 : 5S-73S.

Scudamore 2012

Scudamore C. Beagle dog. In: McInnes EF (ed), *Background lesions in laboratory animals. A color atlas*. Elsevier, London, p37-44.

第2部 CTDの概要

一般名：ブデソニド

グリコピロニウム臭化物

ホルモテロールフマル酸塩

版番号：■

2.6.7 毒性試験概要表

PT010

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	頁
目次	2
2.6.7.1 毒性試験：一覧表	5
2.6.7.2 トキシコキネティクス：トキシコキネテキクス試験の一覧表	20
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	23
2.6.7.4 毒性試験：被験物質（バッチ毎）一覧	28
2.6.7.5 単回投与毒性試験	36
2.6.7.6 反復投与毒性試験：重要な試験以外の試験	43
2.6.7.7 反復投与毒性試験：重要な試験	44
2.6.7.7.1 ブデソニド	44
2.6.7.7.2 ホルモテロール	61
2.6.7.7.3 グリコピロニウム	69
2.6.7.7.4 ブデソニド/ホルモテロール	84
2.6.7.7.5 ブデソニド/グリコピロニウム	101
2.6.7.7.6 グリコピロニウム/ホルモテロール	118
2.6.7.7.7 ブデソニド/グリコピロニウム/ホルモテロール	127
2.6.7.8 <i>In Vitro</i> 遺伝毒性試験	144
2.6.7.9 <i>In Vivo</i> 遺伝毒性試験	148
2.6.7.10 がん原性試験	150
2.6.7.11 生殖発生毒性試験：重要な試験以外の試験	162
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	164
2.6.7.13 生殖発生毒性試験：胚・胎児発生に関する試験	168
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	174
2.6.7.15 新生児を用いた試験	179
2.6.7.16 局所刺激性試験	180
2.6.7.17 その他の毒性試験	181

表目次

表 1	Overview of Toxicology Studies with BD MDI	5
表 2	Overview of Toxicology Studies with FF MDI.....	7
表 3	Overview of Toxicology Studies with GP MDI and Glycopyrronium bromide (Glycopyrrolate)	9
表 4	Overview of Toxicology Studies with BFF MDI	13
表 5	Overview of Toxicology Studies with BGP MDI	15
表 6	Overview of Toxicology Studies with GFF MDI.....	16
表 7	Overview of Toxicology Studies with BGF MDI	18
表 8	Toxicology: Drug Substance (Budesonide; inhalation aerosol)	28
表 9	Toxicology: Drug Substance (Formoterol Fumarate; inhalation aerosol)	30
表 10	Toxicology: Drug Substance (Glycopyrrolate; inhalation aerosol)	32
表 11	Toxicology: Drug Substance (Glycopyrrolate: micronized powder)	35
表 12	Single Dose Toxicity Studies with BD MDI ^{4.2.3.1.1、4.2.3.1.2}	36
表 13	Single Dose Toxicity Studies with FF MDI ^{4.2.3.1.3、4.2.3.1.4}	37
表 14	Single Dose Toxicity Studies with GP MDI ^{4.2.3.1.5、4.2.3.1.6}	38
表 15	Single Dose Toxicity Studies with BFF MDI ^{4.2.3.1.1、4.2.3.1.2}	39
表 16	Single Dose Toxicity Studies with BGP MDI ^{4.2.3.1.2}	40
表 17	Single Dose Toxicity Studies with GFF MDI ^{4.2.3.1.7、4.2.3.1.8}	41
表 18	Single Dose Toxicity Studies with BGF MDI ^{4.2.3.1.1、4.2.3.1.2}	42
表 19	14-day Inhalation Toxicity Study in Rats with BD MDI ^{4.2.3.2.1}	44
表 20	14-day Inhalation Toxicity Study in Dogs with BD MDI ^{4.2.3.2.2}	53
表 21	3-Month Inhalation Toxicity Study in Dogs with BD MDI ^{4.2.3.2.14}	59
表 22	14-day Inhalation Toxicity Study in Rats with FF MDI ^{4.2.3.2.3}	61
表 23	14-day Inhalation Toxicity Study in Dogs with FF MDI ^{4.2.3.2.4}	63
表 24	3-Month Inhalation Toxicity Study in Dogs with FF MDI ^{4.2.3.2.15}	66
表 25	14-Day Inhalation Toxicity Study in Mice with GP MDI ^{4.2.3.2.5}	69
表 26	14-Day Inhalation Toxicity Study in Rats with GP MDI ^{4.2.3.2.6}	73
表 27	14-Day Inhalation Toxicity Study in Dogs with GP MDI ^{4.2.3.2.7}	75
表 28	3-Month Inhalation Toxicity Study in Dogs with GP MDI ^{4.2.3.2.15}	77
表 29	6-Month Inhalation Toxicity Study in Rats with GP MDI ^{4.2.3.2.17}	79
表 30	6-Month Inhalation Toxicity Study in Dogs with GP MDI ^{4.2.3.2.18}	81
表 31	14-Day Inhalation Toxicity Study in Rats with BFF MDI ^{4.2.3.2.8}	84
表 32	14-Day Inhalation Toxicity Study in Dogs with BFF MDI ^{4.2.3.2.9}	93
表 33	3-Month Inhalation Toxicity Study in Dogs with BFF MDI ^{4.2.3.2.16}	98
表 34	14-Day Inhalation Toxicity Study in Rats with BGP MDI ^{4.2.3.2.10}	101
表 35	14-Day Inhalation Toxicity Study in Dogs with BGP MDI ^{4.2.3.2.2}	109
表 36	3-Month Inhalation Toxicity Study in Dogs with BGP MDI ^{4.2.3.2.14}	115
表 37	14-Day Inhalation Toxicity Study in Rats with GFF MDI ^{4.2.3.2.11}	118
表 38	14-Day Inhalation Toxicity Study in Dogs with GFF MDI ^{4.2.3.2.12}	120
表 39	3-Month Inhalation Toxicity Study in Dogs with GFF MDI ^{4.2.3.2.15}	123
表 40	14-Day Inhalation Toxicity Study in Rats with BGF MDI ^{4.2.3.2.13}	127
表 41	14-Day Inhalation Toxicity Study in Dogs with BGF MDI ^{4.2.3.2.9}	135
表 42	3-Month Inhalation Toxicity Study in Dogs with BGF MDI ^{4.2.3.2.16}	141

2.6.7 毒性試験概要表

一般名：ブデソニド／グリコピロニウム臭化物／ホルモテロールフマル酸塩水和物

表 43	Bacterial Reverse Mutation Assay with Glycopyrronium Bromide (Glycopyrrolate) ^{4.2.3.3.1.1}	144
表 44	<i>In Vitro</i> Mammalian Cell Micronucleus Assay in TK6 Cells with Glycopyrronium Bromide (Glycopyrrolate) ^{4.2.3.3.1.2}	146
表 45	<i>In Vivo</i> Micronucleus Assay in Rats with Glycopyrronium Bromide (Glycopyrrolate) ^{4.2.3.3.2.1}	148
表 46	104-Week Inhalation Toxicity Study in Mice with GP MDI ^{4.2.3.4.1.1}	150
表 47	104-Week Inhalation Toxicity Study in Rats with GP MDI ^{4.2.3.4.1.2}	155
表 48	Embryo-fetal development toxicity study of Glycopyrronium Bromide (Glycopyrrolate) in rats and rabbits -Dose range finding- ^{4.2.3.5.2.1、4.2.3.5.2.3}	162
表 49	Fertility and early embryonic development to implantation study of Glycopyrronium Bromide (Glycopyrrolate) in rats ^{4.2.3.5.1.1}	164
表 50	Embryo-fetal development toxicity study of Glycopyrronium Bromide (Glycopyrrolate) in rats ^{4.2.3.5.2.2}	168
表 51	Embryo-fetal development toxicity study of Glycopyrronium Bromide (Glycopyrrolate) in rabbits ^{4.2.3.5.2.4}	171
表 52	Effects on pre- and post-natal development including maternal function of Glycopyrronium Bromide (Glycopyrrolate) in rats ^{4.2.3.5.3.1}	174

2.6.7 毒性試験概要表

一般名：ブデソニド／グリコピロニウム臭化物／ホルモテロールフマル酸塩水和物

2.6.7.1 毒性試験：一覧表

表 1 Overview of Toxicology Studies with BD MDI

Type of Study/Species/Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Dose (µg/kg/day)		GLP ¹	Testing Facility	Study Number	Location in CTD
Single Dose Toxicity								
Rats / Sprague-Dawley	Inhalation	Single dose	Low Male	1950	No	■■■■ ³	FY13-150	4.2.3.1.1
			Mid Male	2186				
			High Male	3328 ²				
			Low Female	2083				
			Mid Female	2412				
			High Female	3586				
Dogs / Beagle	Inhalation	Single dose	Male	361	No	■■■■	FY13-151	4.2.3.1.2
			Female	364				
Repeat Dose Toxicity								
Rats / Sprague-Dawley	Inhalation	14 days	Low Male	691	Yes	■■■■	FY14-035	4.2.3.2.1
			Mid Male	2200				
			High Male	4420				
			Low Female	734				
			Mid Female	2340				
			High female	4680				
Dogs / Beagle	Inhalation	14 days	Low Male	138	Yes	■■■■	FY14-036B	4.2.3.2.2
			Mid Male	280				
			High Male	354				
			Low Female	144				
			Mid Female	291				
			High Female	366				

次頁へ続く

2.6.7 毒性試験概要表

一般名：ブデソニド／グリコピロニウム臭化物／ホルモテロールフマル酸塩水和物

Type of Study/Species/Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Dose (µg/kg/day)		GLP ¹	Testing Facility	Study Number	Location in CTD
Dogs / Beagle	Inhalation	3 months	Low Male	3.33	Yes	████	FY14-148B	4.2.3.2.14
			Mid Male	30.61				
			High Male	102.83				
			Low Female	3.39				
			Mid Female	31.56				
			High Female	106.06				

1 Indicates study has a GLP compliance statement.

2 The maximum nonlethal dose is bold-underlined.

3 █████ (████████████████████)

2.6.7 毒性試験概要表

一般名：ブデソニド／グリコピロニウム臭化物／ホルモテロールフマル酸塩水和物

表 2 Overview of Toxicology Studies with FF MDI

Type of Study/Species/Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Dose (µg/kg/day)		GLP ¹	Testing Facility	Study Number	Location in CTD
Single Dose Toxicity								
Rats / Sprague-Dawley	Inhalation	Single dose	Low Male	20	No	■■■■ ³	FY08-042B	4.2.3.1.3
			Mid 1 Male	16				
			Mid 2 Male	25				
			High Male	<u>50²</u>				
			Low Female	22				
			Mid 1 Female	17				
			Mid 2 Female	27				
High Female	<u>53</u>							
Dogs / Beagle	Inhalation	Single dose	Low Male	5	No	■■■■	FY08-041B	4.2.3.1.4
			Mid Male	9				
			High Male	<u>14</u>				
			Low Female	5				
			Mid Female	Not included				
			High Female	<u>14</u>				
Repeat Dose Toxicity								
Rats / Sprague-Dawley	Inhalation	14 days	Low Male	35.37	Yes	■■■■	FY09-039	4.2.3.2.3
			Mid Male	87.91				
			High Male	<u>153.19</u>				
			Low Female	37.59				
			Mid Female	94.24				
			High female	<u>163.40</u>				

次頁へ続く

2.6.7 毒性試験概要表

一般名：ブデソニド／グリコピロニウム臭化物／ホルモテロールフマル酸塩水和物

表 3 Overview of Toxicology Studies with GP MDI and Glycopyrronium bromide (Glycopyrrolate)

Type of Study/Species/Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Dose ($\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$)	GLP ¹	Testing Facility	Study Number	Location in CTD
Single-Dose Toxicity							
Rats / Sprague-Dawley	Inhalation	Single dose	Low 0.48 mg/kg High 1.01 mg/kg²	No	■■■■ ³	FY08-042A	4.2.3.1.5
Dogs / Beagle	Inhalation	Single dose	Male 0.155 mg/kg Female 0.161 mg/kg	No	■■■■	FY08-041A	4.2.3.1.6
Repeated-Dose Toxicity							
Mouse	Inhalation	14 days	Low Male 320 Mid Male 620 High Male 1340 Low Female 340 Mid Female 660 High Female 1420	Yes	■■■■	FY14-111	4.2.3.2.5
Rats / Sprague-Dawley	Inhalation	14 days	Low Male 46 Mid Male 254 High Male 514 Low Female 49 Mid Female 279 High Female 555	Yes	■■■■	FY08-076	4.2.3.2.6
Dogs / Beagle	Inhalation	14 days	Low Male 16 Mid Male 29 High Male 77 Low Female 17 Mid Female 31 High Female 83	Yes	■■■■	FY08-077	4.2.3.2.7
Dogs / Beagle	Inhalation	3 months	High Male 85.10 High Female 89.23	Yes	■■■■	FY10-129	4.2.3.2.15

次頁へ続く

2.6.7 毒性試験概要表

一般名：ブデソニド／グリコピロニウム臭化物／ホルモテロールフマル酸塩水和物

Type of Study/Species/Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Dose (µg/kg/day)	GLP ¹	Testing Facility	Study Number	Location in CTD
Rats / Sprague-Dawley	Inhalation	6 months	Low Male 65 Mid Male 264 High Male <u>523</u> Low Female 70 Mid Female 286 High Female <u>572</u>	Yes	■■■■	FY10-120	4.2.3.2.17
Dogs / Beagle	Inhalation	6 months	Low Male 17.72 Mid Male 59.05 High Male <u>76.50</u> Low Female 19.44 Mid Female 57.41 High Female <u>72.77</u>	Yes	■■■■ ^B	FY12-073	4.2.3.2.18
Genotoxicity							
Bacterial reverse mutation (<i>S. typhimurium</i> , <i>E.coli</i>)	<i>In vitro</i>	48 - 72 hours	6.7 – 5000 µg/plate	Yes	■■■■■	AD91RW.502ICH.BTL	4.2.3.3.1.1
<i>In vitro</i> cytogenetics (TK6 cells)	<i>In vitro</i>	4/27 hours	50 - 398 µg/mL	Yes	■■■■■	AD91RW.361I CH.BTL	4.2.3.3.1.2
Micronucleus (Hsd: SD rats)	Oral	Single	500 – 2000 mg/kg	Yes	■■■■■	AD91RW.125M 012ICH.BTL	4.2.3.3.2.1
Carcinogenicity							
B6C3F1 Mice	Inhalation	104 Weeks	Low Male 347 Mid Male 705 High Male 1460 Low Female 335 Mid Female 700 High Female 1420	Yes	■■■■	FY14-128	4.2.3.4.1.1

2.6.7 毒性試験概要表

一般名：ブデソニド／グリコピロニウム臭化物／ホルモテロールフマル酸塩水和物

Type of Study/Species/Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Dose (µg/kg/day)	GLP ¹	Testing Facility	Study Number	Location in CTD
Rats / Sprague-Dawley	Inhalation	104 Weeks	Low Male 151.70 Mid Male 302.92 High Male 620.45 Low Female 165.93 Mid Female 330.66	Yes	■	FY12-072	4.2.3.4.1.2
Reproduction Toxicity (Glycopyrronium Bromide, not GP MDI)							
Fertility and early embryonic development Rats / Sprague-Dawley	Subcutaneous injection	Male: up to 8 weeks Female: up to 5 weeks ⁴	0.1, 1, 10 mg/kg/day	Yes	■	14-764	4.2.3.5.1.1
Embryo-fetal development (DRF) Rats / Sprague-Dawley	Subcutaneous injection	12 days (Gestation Day 6-17)	0.2, 1, 5 10 mg/kg/day	Yes	■	14-760	4.2.3.5.2.1
Embryo-fetal development Rats / Sprague-Dawley	Subcutaneous injection	12 days (Gestation Day 6-17)	0.1, 1, 10 mg/kg/day	Yes	■	14-762	4.2.3.5.2.2
Embryo-fetal development (DRF) Rabbits / New Zealand White	Subcutaneous injection	13 days (Gestation Day 6-18) ⁵	10/0.2, 50/1, 100/5, 300/10 mg/kg/day ⁵	Yes	■	14-761	4.2.3.5.2.3
Embryo-fetal development Rabbits / New Zealand White	Subcutaneous injection	13 days (Gestation Day 6-18)	0.1, 1, 10 mg/kg/day	Yes	■	14-763	4.2.3.5.2.4

次頁へ続く

2.6.7 毒性試験概要表

一般名：ブデソニド／グリコピロニウム臭化物／ホルモテロールフマル酸塩水和物

Type of Study/Species/Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Dose (µg/kg/day)	GLP ¹	Testing Facility	Study Number	Location in CTD
Pre- and post-natal development Rats / Sprague-Dawley	Subcutaneous injection	6 weeks (Gestation Day 6 to Post-natal Day 21)	0.1, 1, 10 mg/kg/day	Yes	██████████	14-765	4.2.3.5.3.1
Local Tolerance	No studies were conducted						
Other Toxicity Studies	No studies were conducted.						
Antigenicity	No studies were conducted.						
Impurities	No studies were conducted.						

1 Indicates study has a GLP compliance statement.

2 The maximum nonlethal dose or the NOAEL is bold-underlined.

3 ██████████ (████████████████████)

4 Males were dosed for 4 weeks prior to and during mating and until their scheduled necropsy, females were dosed for at least 2 weeks prior to mating, during mating and through gestation Day 6.

5 Dosed at 10, 50, 100, 300 mg/kg/day on Gestation Day 6. Due to severe adverse effects, placed on a dosing holiday over gestation Days 7 and 8 and returned to lower doses of 0.2, 1, 5 and 10 mg/kg/day over Gestation Days 8 or 9-18.

DRF = dose range finding

2.6.7 毒性試験概要表

一般名：ブデソニド／グリコピロニウム臭化物／ホルモテロールフマル酸塩水和物

表 4 Overview of Toxicology Studies with BFF MDI

Type of Study/Species/Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Dose BD/FF (µg/kg/day)	GLP ¹	Testing Facility	Study Number	Location in CTD	
Single-Dose Toxicity								
Rats / Sprague-Dawley	Inhalation	Single dose	Low Male	1817/65	No	■■■■ ³	FY13-150	4.2.3.1.1
			Mid Male	1889/145				
			High Male	<u>4082/124</u> ²				
			Low Female	1949/70				
			Mid Female	2034/157				
			High Female	<u>4405/134</u>				
Dogs / Beagle	Inhalation	Single dose	Male	<u>389/11.3</u>	No	■■■■	FY13-151	4.2.3.1.2
			Female	<u>392/11.4</u>				
Repeated-Dose Toxicity								
Rats / Sprague-Dawley	Inhalation	14 days	Low Male	450/13	Yes	■■■■	FY14-034	4.2.3.2.8
			Mid Male	1500/44				
			High Male	3060/90				
			Low Female	480/14				
			Mid Female	1580/46				
			High Female	3260/95				
Dogs / Beagle	Inhalation	14 days	Low Male	88/3	Yes	■■■■	FY14-036A	4.2.3.2.9
			Mid Male	174/6				
			High Male	304/10				
			Low Female	89/3				
			Mid Female	176/6				
			High Female	308/10				

次頁へ続く

2.6.7 毒性試験概要表

一般名：ブデソニド／グリコピロニウム臭化物／ホルモテロールフマル酸塩水和物

Type of Study/Species/Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Dose BD/FF (µg/kg/day)	GLP ¹	Testing Facility	Study Number	Location in CTD	
Dogs / Beagle	Inhalation	3 months	Low Male	3.02/0.10	Yes	[REDACTED]	FY14-148A	4.2.3.2.16
			Mid Male	<u>13.48/0.47</u>				
			High Male	<u>67.73/2.28</u>				
			Low Female	3.16/0.11				
			Mid Female	14.08/0.49				
			High Female	71.34/2.40				

1 Indicates study has a GLP compliance statement.

2 The maximum nonlethal dose is bold-underlined.

3 [REDACTED] ([REDACTED])

2.6.7 毒性試験概要表

一般名：ブデソニド／グリコピロニウム臭化物／ホルモテロールフマル酸塩水和物

表 5 Overview of Toxicology Studies with BGP MDI

Type of Study/Species/Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Dose BD/GP (µg/kg/day)	GLP ¹	Testing Facility	Study Number	Location in CTD
Single-Dose Toxicity							
Dogs / Beagle	Inhalation	Single dose	Male <u>454/22.2</u> ² Female <u>456/22.3</u>	No	■	FY13-151	4.2.3.1.2
Repeated-Dose Toxicity							
Rats / Sprague-Dawley	Inhalation	14 days	Low Male 621/33 Mid Male 2110/114 High Male 4350/235 Low Female 660/35 Mid Female 2260/122 High Female 4650/251	Yes	■	FY15-040	4.2.3.2.10
Dogs / Beagle	Inhalation	14 days	Low Male 199/9.14 Mid Male 382/20.8 High Male 524/28.6 Low Female 172/9.50 Mid Female 396/21.6 High Female 544/29.6	Yes	■	FY14-036B	4.2.3.2.2
Dogs / Beagle	Inhalation	3 months	Low Male 3.55/0.21 Mid Male 30.63/1.67 High Male 97.03/5.35 Low Female 3.65/0.21 Mid Female 31.22/1.70 High Female 99.72/5.50	Yes	■	FY14-148B	4.2.3.2.14

1 Indicates study has a GLP compliance statement.

2 The maximum nonlethal dose is bold-underlined.

3 ■ (■)

2.6.7 毒性試験概要表

一般名：ブデソニド／グリコピロニウム臭化物／ホルモテロールフマル酸塩水和物

表 6 Overview of Toxicology Studies with GFF MDI

Type of Study/Species/Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Dose GP/FF (µg/kg/day)	GLP ¹	Testing Facility	Study Number	Location in CTD
Single-Dose Toxicity							
Rats / Sprague-Dawley	Inhalation	Single dose	Low Male 120/24 Mid Male 195/39 High Male 327/66² Low Female 132/26 Mid Female 214/42 High Female 354/72	No	■■■■ ³	FY08-042D	4.2.3.1.7
Dogs / Beagle	Inhalation	Single dose	Low Male 13.9/2.6 High Male 78.0/15.2 Low Female 14.4/2.7 High Female 79.2/15.4 High Female 128.5/16.5 (repeat) ⁴	No	■■■■	FY08-041D	4.2.3.1.8
Repeated-Dose Toxicity							
Rats / Sprague-Dawley	Inhalation	14 days	Low Male 72/14 Mid Male 226/42 High Male 368/69 Low Female 77/15 Mid Female 241/45 High Female 394/73	Yes	■■■■	FY09-086	4.2.3.2.11
Dogs / Beagle	Inhalation	14 days	Low Male 17.0/3.3 Mid Male 51.3/8.8 High Male 73.8/12.5 Low Female 17.3/3.4 Mid Female 52.3/9.0 High Female 75.4/12.8	Yes	■■■■	FY09-087	4.2.3.2.12

次頁へ続く

2.6.7 毒性試験概要表

一般名：ブデソニド／グリコピロニウム臭化物／ホルモテロールフマル酸塩水和物

Type of Study/Species/Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Dose GP/FF (µg/kg/day)	GLP ¹	Testing Facility	Study Number	Location in CTD
Dogs / Beagle	Inhalation	3 months	Low Male 17.3/4.4 Mid Male <u>42.7/10.1</u> High Male 59.4/14.0 Low Female 18.0/4.5 Mid Female <u>44.1/10.8</u> High Female 62.1/14.7	Yes	████	FY10-129	4.2.3.2.15

1 Study has a GLP compliance statement.

2 The maximum nonlethal dose or the NOAEL is bold-underlined.

3 █████ (████████████████████)

2.6.7 毒性試験概要表

一般名：ブデソニド/グリコピロニウム臭化物/ホルモテロールフマル酸塩水和物

表 7 Overview of Toxicology Studies with BGF MDI

Type of Study/Species/Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Dose BD/GP/FF (µg/kg/day)	GLP ¹	Testing Facility	Study Number	Location in CTD
Single-Dose Toxicity							
Rats / Sprague-Dawley	Inhalation	Single dose	Male 2643/283/162 Male <u>1944/362/192</u> ² Female 2817/302/172 Female <u>2083/388/206</u>	No	■ ³	FY13-150	4.2.3.1.1
Dogs / Beagle	Inhalation	Single dose	Male 218/14/8 Male <u>472/26/14</u> Female 222/14/8 Female <u>476/26/14</u>	No	■	FY13-151	4.2.3.1.2
Repeated-Dose Toxicity							
Rats / Sprague-Dawley	Inhalation	14 days	Low Male 1820/96.4/56.2 Mid Male 3680/197/114 High Male 7660/407/236 Low Female 1950/103/63.0 Mid Female 3940/211/122 High Female 8160/434/251	Yes	■	FY14-033	4.2.3.2.13
Dogs / Beagle	Inhalation	14 days	Low Male 131/6.7/4.22 Mid Male 257/13.3/8.40 High Male 424/21.6/13.5 Low Female 132/6.77/4.25 Mid Female 263/13.6/8.59 High Female 431/21.9/13.7	Yes	■	FY14-036A	4.2.3.2.9

次頁へ続く

2.6.7 毒性試験概要表

一般名：ブデソニド／グリコピロニウム臭化物／ホルモテロールフマル酸塩水和物

Type of Study/Species/Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Dose BD/GP/FF (µg/kg/day)	GLP ¹	Testing Facility	Study Number	Location in CTD
Dogs / Beagle	Inhalation	3 months	Low Male 3.16/0.20/0.10 Mid Male 16.73/1.06/0.60 High Male 58.39/3.39/1.94 Low Female 3.35/0.21/0.11 Mid Female 17.55/1.11/0.63 High Female 61.37/3.56/2.03	Yes	████	FY14-148A	4.2.3.2.16
Genotoxicity	No studies were conducted with BGF MDI						
Carcinogenicity							
Reproduction Toxicity							
Local Tolerance							
Other Toxicity Studies							
Antigenicity							
Impurities							

- 1 Study has a GLP compliance statement.
- 2 The maximum nonlethal dose is bold-underlined.
- 3 █████ (████████████████████)

2.6.7 毒性試験概要表

一般名：ブデソニド／グリコピロニウム臭化物／ホルモテロールフマル酸塩水和物

2.6.7.2 トキシコキネティクス：トキシコキネテキクス試験の一覧表

Type of Study	Test System	Method of Administration	Dose BD/GP/FF (µg/kg) (male + female combined)	GLP Compliance	Testing Facility	Study Number
BD MDI						
Single dose ¹	Rat	Inhalation	2020, 2300, 3460	No	■	FY13-150
Single dose	Dog	Inhalation	363	No	■	FY13-151
14-Day repeat dose ¹	Rat	Inhalation	713, 2270, 4550	Yes	■	FY14-035
14-Day repeat dose	Dog	Inhalation	141, 286, 360	Yes	■	FY14-036B
3-Month repeat dose	Dog	Inhalation	3.4, 31, 104	Yes	■	FY14-148B
FF MDI						
Single dose ¹	Rat	Inhalation	21, 17, 26, 52	No	■	FY08-042B
Single dose	Dog	Inhalation	5, 9, 14	No	■	FY08-041B
14-Day repeat dose ¹	Rat	Inhalation	36, 91, 158	Yes	■	FY09-039
14-Day repeat dose	Dog	Inhalation	9, 13, 24	Yes	■	FY09-038
3-Month repeat dose	Dog	Inhalation	4, 10, 14	Yes	■	FY10-129
GP MDI						
Single dose ¹	Rat	Inhalation	480, 1010	No	■	FY08-042A
Single dose	Dog	Inhalation	160	No	■	FY08-041A
14-Day repeat dose	Mouse	Inhalation	330, 640, 1380	Yes	■	FY14-111
14-Day repeat dose ¹	Rat	Inhalation	48, 267, 535	Yes	■	FY08-076
14-Day repeat dose	Dog	Inhalation	17, 30, 80	Yes	■	FY08-077
3-Month repeat dose	Dog	Inhalation	87	Yes	■	FY10-129
6-Month repeat dose ¹	Rat	Inhalation	68, 275, 548	Yes	■	FY10-120
6-Month repeat dose	Dog	Inhalation	19, 58, 75	Yes	■	FY12-073

次頁へ続く

2.6.7 毒性試験概要表

一般名：ブデソニド／グリコピロニウム臭化物／ホルモテロールフマル酸塩水和物

Type of Study	Test System	Method of Administration	Dose BD/GP/FF (µg/kg) (male + female combined)	GLP Compliance	Testing Facility	Study Number
GP						
Seg I ¹	Rat	Subcutaneous	0.1, 1, 10 (mg/kg/day)	Yes	■■■■	14-764
Seg II ¹	Rat	Subcutaneous	0.1, 1, 10 (mg/kg/day)	Yes	■■■■	14-762
	Rabbit	Subcutaneous	0.1, 1, 10 (mg/kg/day)	Yes	■■■■	14-763
Seg III ¹	Rats	Subcutaneous	0.1, 1, 10 (mg/kg/day)	Yes	■■■■	14-765
BFF MDI						
Single dose ¹	Rat	Inhalation	1880/67, 1960/151, 4240/129	No	■■■	FY13-150
Single dose	Dog	Inhalation	391/11	No	■■■	FY13-151
14-Day repeat dose ¹	Rat	Inhalation	465/14, 1540/45, 3160/93	Yes	■■■	FY14-034
14-Day repeat dose	Dog	Inhalation	89/3.0, 175/6.0, 306/10	Yes	■■■	FY14-036A
3-Month repeat dose	Dog	Inhalation	3.1/0.11, 14/0.48, 70/2.3	Yes	■■■	FY14-148A
BGP MDI						
Single dose	Dog	Inhalation	455/22	No	■■■	FY13-151
14-Day repeat dose ¹	Rat	Inhalation	643/34, 2190/118, 4500/243	Yes	■■■	FY15-040
14-Day repeat dose	Dog	Inhalation	169/9.3, 389/21, 534/29	Yes	■■■	FY14-036B
3-Month repeat dose	Dog	Inhalation	3.6/0.21, 31/1.7, 98/5.4	Yes	■■■	FY14-148B

次頁へ続く

2.6.7 毒性試験概要表

一般名：ブデソニド／グリコピロニウム臭化物／ホルモテロールフマル酸塩水和物

Type of Study	Test System	Method of Administration	Dose BD/GP/FF (µg/kg) (male + female combined)	GLP Compliance	Testing Facility	Study Number
GFF MDI						
Single dose ¹	Rat	Inhalation	126/25, 205/41, 341/69	No	■	FY08-042D
Single dose	Dog	Inhalation	14/3, 79/15, 129/17	No	■	FY08-041D
14-Day repeat dose ¹	Rat	Inhalation	75/15, 234/44, 381/71	Yes	■	FY09-086
14-Day repeat dose	Dog	Inhalation	17/3, 52/9, 75/13	Yes	■	FY09-087
3-Month repeat dose	Dog	Inhalation	18/4, 43/10, 61/14	Yes	■	FY10-129
BGF MDI						
Single dose ¹	Rat	Inhalation	2730/293/167, 2010/375/199	No	■	FY13-150
Single dose	Dog	Inhalation	220/14/8.0, 474/26/14	No	■	FY13-151
14-Day repeat dose ¹	Rat	Inhalation	1890/100/58, 3810/204/118, 7910/421/244	Yes	■	FY14-033
14-Day repeat dose	Dog	Inhalation	132/6.7/4.2, 260/13/8.5, 428/22/14	Yes	■	FY14-036A
3-Month repeat dose	Dog	Inhalation	3.3/0.21/0.11, 17/1.1/0.62, 60/3.5/2.0	Yes	■	FY14-148A

■ = development, Seg I = Fertility and early embryonic development, Seg II = Embryo-fetal development, Seg III = Pre- and post-natal

¹ Limited sampling time points, insufficient to calculate AUC

2.6.7 毒性試験概要表

一般名：ブデソニド／グリコピロニウム臭化物／ホルモテロールフマル酸塩水和物

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

Steady State AUC (pg-h/mL) for Budesonide			Steady State AUC (pg-h/mL) for Glycopyrrolate			Steady State AUC (pg-h/mL) for Formoterol		
Daily Dose (µg/kg/day)	Dog	Humans ^a	Daily Dose (µg/kg/day)	Dog	Humans ^a	Daily Dose (µg/kg/day)	Dog	Humans ^a
BGF MDI (FY14-148A)								
3.16	426		0.20	ND		0.10	ND	
3.35	285		0.21	ND		0.11	ND	
12.8		6010	0.72		148	0.40		110
16.73	1960		1.06	38.8		0.60	34.7	
17.55	3120		1.11	29.1		0.63	50.6	
58.39	13800		3.39	634		1.94	370	
61.37	13100		3.56	688		2.03	324	
BD MDI (FY14-148B)								
3.33	310							
3.39	215							
30.61	7770							
31.56	11400							
102.83	22200							
106.06	23900							

次頁へ続く

2.6.7 毒性試験概要表

一般名：ブデソニド／グリコピロニウム臭化物／ホルモテロールフマル酸塩水和物

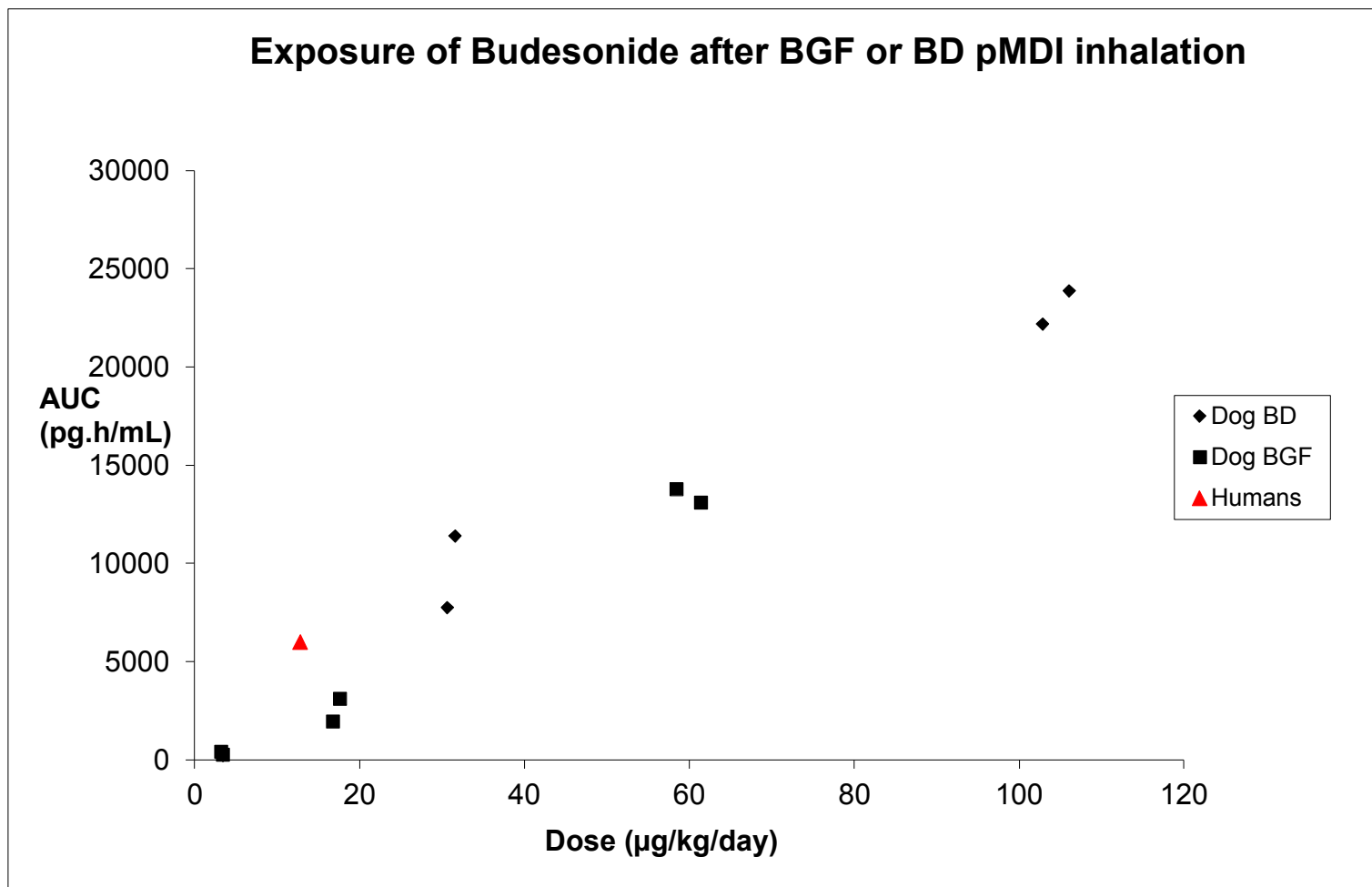
Steady State AUC (pg.h/mL) for Budesonide			Steady State AUC (pg.h/mL) for Glycopyrrolate			Steady State AUC (pg.h/mL) for Formoterol		
Daily Dose (µg/kg/day)	Dog	Humans ^a	Daily Dose (µg/kg/day)	Dog	Humans ^a	Daily Dose (µg/kg/day)	Dog	Humans ^a
GP MDI (FY10-129 & FY12-073)								
			18	1995				
			19	2480				
			57	8837				
			59	10143				
			73	21483				
			77	30651				
			85	11500				
			89	11300				
FF MDI (FY10-129)								
						4.4	1160	
						4.5	1050	
						10	2480	
						10	3510	
						14	3300	
					15	2440		

^a Assumed 24h AUC values from 7 day clinical study PT010018. Doses of 640 µg budesonide, 36 µg of glycopyrrolate and 20 µg of formoterol fumarate dihydrate in combination, ex-actuator per day (given as 2 actuations of 160/9.0/5.0 µg BID) given to COPD patients. Assumes a patient body weight of 50 kg.

ND Not detected

2.6.7 毒性試験概要表

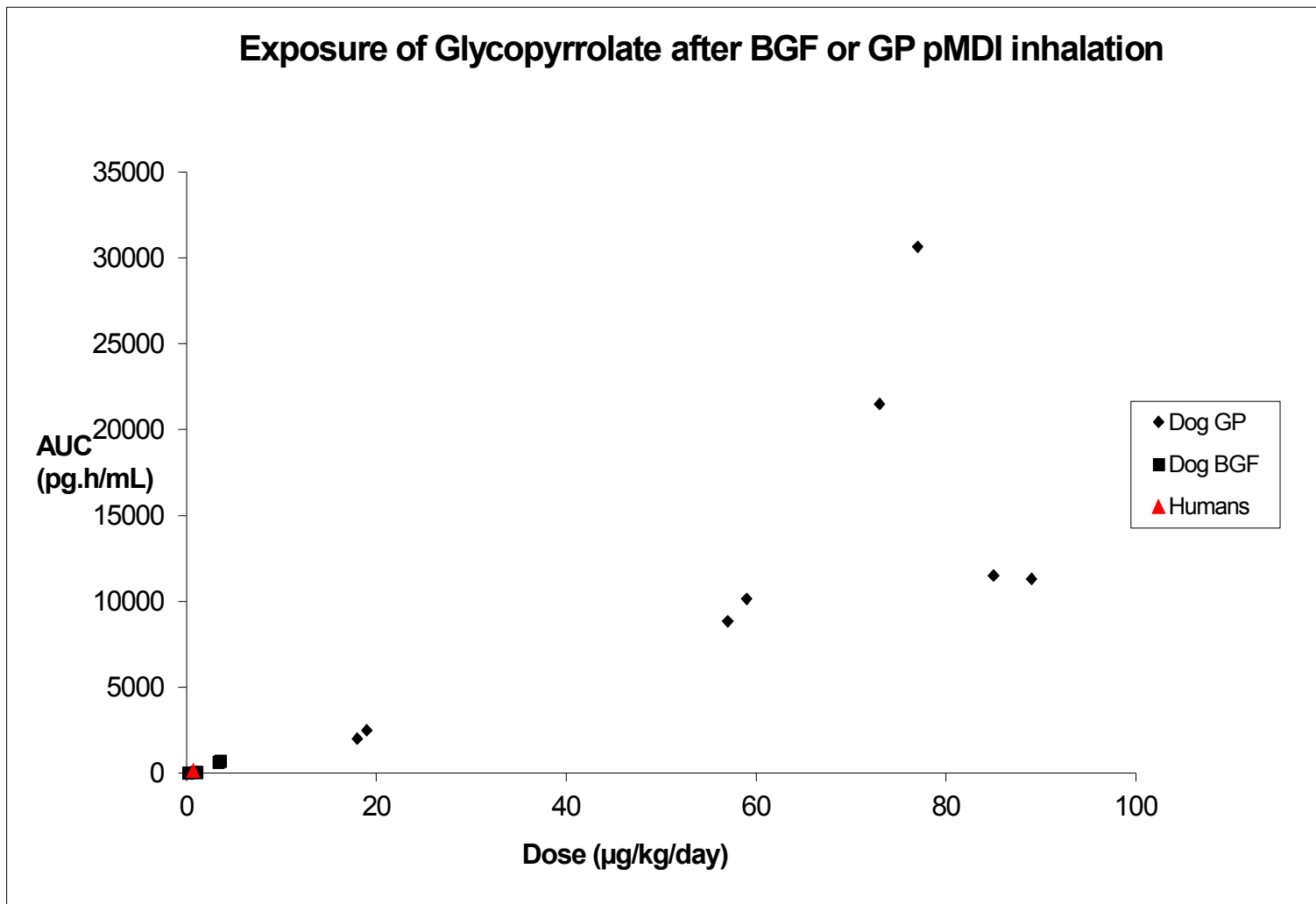
一般名：ブデソニド／グリコピロニウム臭化物／ホルモテロールフマル酸塩水和物



Steady state exposure (AUC) of budesonide after repeated inhalation in humans and dogs

2.6.7 毒性試験概要表

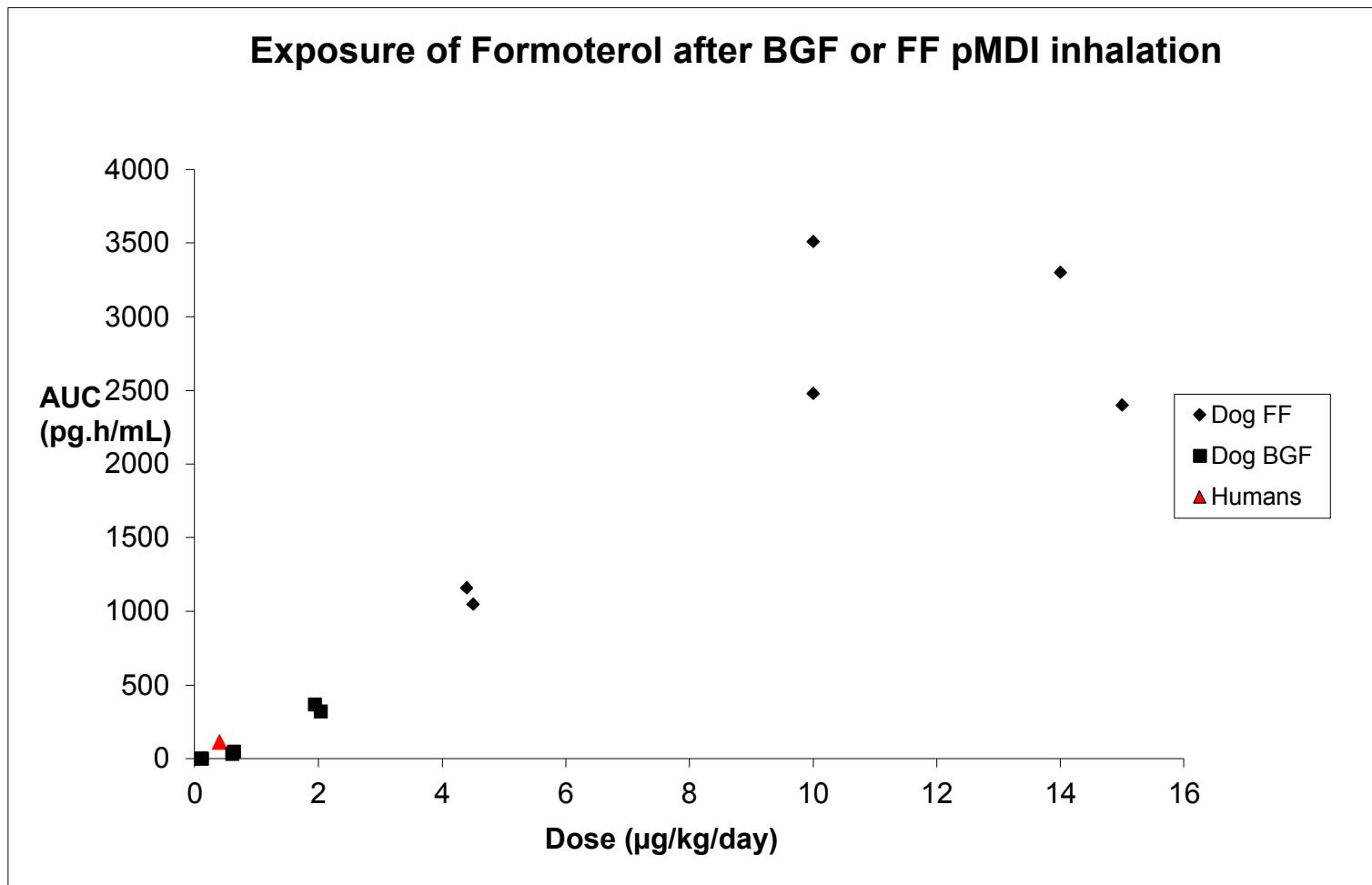
一般名：ブデソニド／グリコピロニウム臭化物／ホルモテロールフマル酸塩水和物



Steady state exposure (AUC) of glycopyrrolate after repeated inhalation in humans and dogs.

2.6.7 毒性試験概要表

一般名：ブデソニド／グリコピロニウム臭化物／ホルモテロールフマル酸塩水和物



Steady state exposure (AUC) of formoterol after repeated inhalation in humans and dogs.

2.6.7 毒性試験概要表

一般名：ブデソニド/グリコピロニウム臭化物/ホルモテロールフマル酸塩水和物

2.6.7.4 毒性試験：被験物質（バッチ毎）一覧

表 8 Toxicology: Drug Substance (Budesonide; inhalation aerosol)

Batch number	Assay (mg/canister)	Related substances				Study number	Type of study
		11-Keto budesonide	17-Keto-16- butyrate	17- Carboxylic acid	16 α hydroxy prednisolone		
Proposed specification:	■ ^b	■%	■%	■%	-		
(BGF): ■	NT	NT	NT	NT	NT	FY13-150	Rat acute inhalation
(BFF): ■	NT	NT	NT	NT	NT		
(BD): ■	NT	NT	NT	NT	NT		
(BGF): ■	NT	NT	NT	NT	NT	FY13-151	Dog acute inhalation
(BFF): ■	NT	NT	NT	NT	NT		
(BD): ■	NT	NT	NT	NT	NT		
(BGP): ■	NT	NT	NT	NT	NT		
(BGF): ■	52.01	NT	NT	NT	0.13%	FY14-033	Rat 14-day inhalation
(BFF): ■	54.38	NT	NT	NT	0.13%	FY14-034	Rat 14-day inhalation
(BD): ■	51.32	NT	NT	NT	0.07%	FY14-035	Rat 14-day inhalation
(BGP): ■	51.52	NT	NT	NT	0.12%	FY15-040	Rat 14-day inhalation
(BGF): ■ ^a	53.62	<0.05%	<0.05%	<0.05%	0.06%	FY14-036A	Dog 14-day inhalation
(BFF): ■ ^a	53.03	<0.05%	<0.05%	<0.05%	0.06%		
(BD): ■ ^a	53.30	<0.05%	<0.05%	<0.05%	0.06%	FY14-036B	Dog 14-day inhalation
(BGP): ■	51.71	NT	NT	NT	0.11%		

次頁へ続く

2.6.7 毒性試験概要表

一般名：ブデソニド／グリコピロニウム臭化物／ホルモテロールフマル酸塩水和物

Batch number	Assay (mg/canister)	Related substances				Study number	Type of study
		11-Keto budesonide	17-Keto-16- butyrate	17- Carboxylic acid	16 α hydroxy prednisolone		
(BGF): █████	52.01	NT	NT	NT	0.13%	FY14-148A	Dog 3-month inhalation
(BFF): █████	54.38	NT	NT	NT	0.13%		
(BD): █████	51.32	NT	NT	NT	0.07%	FY14-148B	Dog 3-month inhalation
(BGP): █████	51.52	NT	NT	NT	0.12%		

^a Impurities: 11-Ketobudesonide, 14,15-Dehydrobudesonide, 17-Carboxylic Acid, 17-Keto-16-butyrate, 21-Dehydrobudesonide, Unknown RT 0.51, Unknown RT 0.08, D5722, D-Homobudesonide – were all recorded as < 0.05%.

^b Various canister sizes, fill weights, and drug product concentrations were used in the toxicology studies, therefore the Commercial Specification for Total Can Contents (mg/canister) is not applicable.

ND Not detected.

NT Not tested.

2.6.7 毒性試験概要表

一般名：ブデソニド／グリコピロニウム臭化物／ホルモテロール fumarate 水和物

表 9 Toxicology: Drug Substance (Formoterol Fumarate; inhalation aerosol)

Batch number	Assay (mg/canister)	Related substances				Study number	Type of study
		A ^a	F ^b	G ^c	S ^d		
Proposed specification:	■	■	■	■	■		
(FF): ■	NT	NT	NT	NT	NT	FY08-042B	Rat acute inhalation
(GFF): ■	1.21	NT	NT	NT	NT	FY08-042D	Rat acute inhalation
(BGF): ■	NT	NT	NT	NT	NT	FY13-150	Rat acute inhalation
(BFF): ■	NT	NT	NT	NT	NT		
(FF): ■	NT	NT	NT	NT	NT	FY08-041B	Dog acute inhalation
(GFF): ■	1.3	NT	NT	NT	NT	FY08-041D	Dog acute inhalation
(BGF): ■	NT	NT	NT	NT	NT	FY13-151	Dog acute inhalation
(BFF): ■	NT	NT	NT	NT	NT		
(FF): ■	1.33	0.3%	ND	ND	ND	FY09-039	Rat 14-day inhalation
(FF): ■	1.33	0.4%	ND	ND	ND		
(FF): ■	1.37	0.1%	ND	ND	ND		
(FF): ■	1.40	0.1%	ND	ND	ND		
(GFF): ■	1.24	0.26%	ND	0.05%	ND	FY09-086	Rat 14-day inhalation
(GFF): ■	1.18	0.25%	ND	0.05%	ND		
(BGF): ■	1.55	0.06%	<0.05%	ND	ND	FY14-033	Rat 14-day inhalation
(BFF): ■	1.62	<0.05%	<0.05%	ND	ND	FY14-034	Rat 14-day inhalation
(FF): ■	1.40	0.1%	ND	ND	ND	FY09-038	Dog 14-day inhalation
(FF): ■	1.36	0.2%	ND	ND	ND		
(FF): ■	1.40	0.2%	ND	ND	ND		

次頁へ続く

2.6.7 毒性試験概要表

一般名：ブデソニド／グリコピロニウム臭化物／ホルモテロールフマル酸塩水和物

Batch number	Assay (mg/canister)	Related substances				Study number	Type of study
		A ^a	F ^b	G ^c	5 ^d		
(FF): ██████████	1.32	0.2%	ND	ND	ND		
(GFF): ██████████	1.18	0.25%	ND	0.05%	ND	FY09-087	Dog 14-day inhalation
(GFF): ██████████	1.21	0.20%	0.14%	0.06%	ND		
(BGF): ██████████	1.61	0.05%	ND	ND	ND	FY14-036A	Dog 14-day inhalation
(BFF): ██████████	1.60	0.05%	ND	ND	ND		
(FF): ██████████	1.66	0.08%	0.20%	ND	ND	FY10-129	Dog 3-month inhalation
(FF): ██████████	1.62	0.09%	0.20%	ND	ND		
(FF): ██████████	162	0.09%	0.14%	0.07%	ND		
(GFF): ██████████	1.61	0.09%	0.18%	0.07%	ND		
(GFF): ██████████	1.64	0.12%	0.17%	0.08%	ND		
(GFF): ██████████	1.70	0.10%	0.18%	0.08%	ND	FY10-129	Dog 3-month inhalation
(BGF): ██████████	1.55	0.06%	<0.05%	ND	ND		
(BFF): ██████████	1.62	<0.05%	<0.05%	ND	ND	FY14-148A	Dog 3-month inhalation

^a Compound A is (1RS)-1-3-amino-4-hydroxyphenyl)-2-[[[(1RS)-2-(4-methoxyphenyl)-1-methylethyl]amino] ethanol.

^b Compound F is N-[2-hydroxy-5-[1-[[2-hydroxy-5-[1-hydroxy-2-[[2-(4-methoxyphenyl)-1-methylethyl]amino]ethyl]phenyl]amino]-2-[[2-(4-methoxyphenyl)-1-methylethyl]amino]ethyl]phenyl]formamide.

^c Compound G is (2RS)-1-(4-methoxyphenyl)propan-2-amine.

^d Impurity 5 is N-(5-formyl-2-hydroxyphenyl)formamide, and is controlled by the Ph. Eur. limit for unspecified impurities.

^e Various canister sizes, fill weights, and drug product concentrations were used in the toxicology studies, therefore the Commercial Specification for Total Can Contents (mg/canister) is not applicable.

ND Not detected.

NT Not tested.

2.6.7 毒性試験概要表

一般名：ブデソニド/グリコピロニウム臭化物/ホルモテロールフマル酸塩水和物

表 10 Toxicology: Drug Substance (Glycopyrrolate; inhalation aerosol)

Batch number	Assay (mg/canister)	Related substances	Study number	Type of study
		Impurity J ^a		
Proposed specifications:	■	■		
(GP): ■	NT	NT	FY08-042A	Rat acute inhalation
(GFF): ■	8.25	NT	FY08-042D	Rat acute inhalation
(BGF): ■	NT	NT	FY13-150	Rat acute inhalation
(GP): ■	3.25	NT	FY08-041A	Dog acute inhalation
(GFF): ■	8.7	NT	FY08-041D	Dog acute inhalation
(BGF): ■	NT	NT	FY13-151	Dog acute inhalation
(BGP): ■	NT	NT		
(GP): ■	6.64	ND	FY14-111	Mouse 14-day inhalation
(GP): ■	3.24	<0.05%	FY08-076	Rat 14-day inhalation
(GP): ■	3.25	<0.05%		
(GP): ■	3.22	<0.05%		
(GP): ■	4.79	ND		
(GP): ■	4.61	ND		
(GFF): ■	8.53	ND	FY09-086	Rat 14-day inhalation
(GFF): ■	7.94	ND		
(BGF): ■	2.33	ND	FY14-033	Rat 14-day inhalation
(BGP): ■	2.32	ND	FY15-040	Rat 14-day inhalation
(GP): ■	4.96	ND	FY08-077	Dog 14-day inhalation
(GP): ■	4.91	ND		
(GP): ■	4.85	ND		

次頁へ続く

2.6.7 毒性試験概要表

一般名：ブデソニド／グリコピロニウム臭化物／ホルモテロールフマル酸塩水和物

Batch number	Assay (mg/canister)	Related substances	Study number	Type of study
		Impurity J ^a		
(GFF): █████	7.94	ND	FY09-087	Dog 14-day inhalation
(GFF): █████	8.25	ND		
(BGF): █████	2.29	ND	FY14-036A	Dog 14-day inhalation
(BGP): █████	2.32	ND	FY14-036B	Dog 14-day inhalation
(GP): █████	8.37	ND	FY10-129	Dog 3-month inhalation
(GFF): █████	8.21	ND		
(GFF): █████	8.19	ND		
(GFF): █████	8.23	ND		
(BGF): █████	2.33	ND	FY14-148A	Dog 3-month inhalation
(BGP): █████	2.32	ND	FY14-148B	Dog 3-month inhalation
(GP): █████	6.0	ND	FY10-120	Rat 6-month inhalation
(GP): █████	5.97	ND		
(GP): █████	5.92	ND		
(GP): █████	6.03	ND		
(GP): █████	8.32	ND		
(GP): █████	8.45	ND	FY12-073	Dog 6-month inhalation
(GP): █████	8.58	ND	FY12-072	Rat 104-week inhalation
(GP): █████	5.78	ND		
(GP): █████	4.56	ND		
(GP): █████	6.55	ND		
(GP): █████	8.45	ND		

次頁へ続く

2.6.7 毒性試験概要表

一般名：ブデソニド／グリコピロニウム臭化物／ホルモテロールフマル酸塩水和物

Batch number	Assay (mg/canister)	Related substances	Study number	Type of study
		Impurity J ^a		
(GP): ██████████	6.64	ND	FY14-128	Mouse 104-week inhalation
(GP): ██████████	6.55	ND		
(GP): ██████████	4.56	ND		
(GP): ██████████	8.40	ND		
(GP): ██████████	7.29	NT		
(GP): ██████████	7.38	NT		
(GP): ██████████	6.70	NT		

^a Impurity J is cyclopentylmandelic acid (CPMA), and is controlled by the Ph. Eur. Limit for unspecified impurities.

^b Various canister sizes, fill weights, and drug product concentrations were used in the toxicology studies, therefore the Commercial Specification for Total Can Contents (mg/canister) is not applicable.

ND Not detected.

NT Not tested.

2.6.7 毒性試験概要表

一般名：ブデソニド／グリコピロニウム臭化物／ホルモテロールフマル酸塩水和物

表 11 Toxicology: Drug Substance (Glycopyrrolate: micronized powder)

Batch No.	Assay	Impurities					Study number	Type of study
		O ^a	G ^b	J ^c	Others	Total		
Proposed specifications	████████	████	████	████	████	████		
████	99.6%	ND	ND	ND	ND	ND	AD91RW. 502ICH.BTL	Bacterial reverse mutation assay
							AD91RW. 361ICH.BHL	Mammalian cell micronucleus test
							AD91RW. 125M012ICH.BTL	Bone-marrow micronucleus test
████████	99.9%	ND	ND	ND	0.05%	0.05%	14-764	Rat fertility and early embryonic development
							14-760	Rat embryo-fetal development DRF
							14-762	Rat embryo-fetal development
							14-761	Rabbit embryo-fetal development DRF
							14-763	Rabbit embryo-fetal development
							14-765	Rat pre- and post-natal development

^a 5-nitroisophthalic acid.^b Glycopyrrolate base.^c Cyclopentylmandelic acid.

ND = not detected; DRF = dose range finding.

2.6.7 毒性試験概要表

一般名：ブデソニド／グリコピロニウム臭化物／ホルモテロールフマル酸塩水和物

2.6.7.5 単回投与毒性試験

表 12 Single Dose Toxicity Studies with BD MDI^{4.2.3.1.1, 4.2.3.1.2}

Species / Strain	Method of Administration (Vehicle / Formulation)	Doses (µg/kg)	Gender and No. per Group	Observed Maximum Nonlethal Dose ¹ (µg/kg)	Approximate Lethal Dose	Noteworthy Findings	Study Number
Rats / Sprague-Dawley	Nose-only Inhalation	Low Male 1950 Mid Male 2186 High Male <u>3328</u> ² Low Female 2083 Mid Female 2412 High Female <u>3586</u>	6/sex/group	3460 (average male and female)	Not Determined	No drug related significant findings	FY13-150
Dogs / Beagle	Face-mask Inhalation	Male <u>361</u> Female <u>364</u>	One/sex	363 (average male and female)	Not Determined	No drug related significant findings	FY13-151

¹ The maximum feasible inhalation dose achievable was this value. No lethality present.

² The maximum nonlethal dose is bold-underlined.

Studies FY13-150 and FY13-151 do not claim GLP compliance.

2.6.7 毒性試験概要表

一般名：ブデソニド／グリコピロニウム臭化物／ホルモテロールフマル酸塩水和物

表 13 Single Dose Toxicity Studies with FF MDI^{4.2.3.1.3、4.2.3.1.4}

Species / Strain	Method of Administration (Vehicle / Formulation)	Doses (µg/kg)	Gender and No. per Group	Observed Maximum Nonlethal Dose ¹ (µg/kg)	Approximate Lethal Dose	Noteworthy Findings	Study Number
Rats / Sprague-Dawley	Nose-only Inhalation	Low Male 20 Mid 1 Male 16 Mid 2 Male 25 High Male <u>50</u> ² Low Female 22 Mid 1 Female 17 Mid 2 Female 27 High Female <u>53</u>	3/sex/group	High dose average male and female of 52 µg/kg	Not Determined	Mild to moderate vascular congestion and red or white lung modeling was observed at necropsy in the Mid 2 and High Dose groups.	FY08-042B
Dogs / Beagle	Face-mask Inhalation	Low Male 5 Mid Male 9 High Male <u>14</u> Low Female 5 Mid Female Not included High Female <u>14</u>	One/sex	High dose average male and female of 14 µg/kg	Not Determined	Increased body temperature (103.0 F=39°C), respiration (2X baseline) and heart rate (~2X baseline) in the high dose group	FY08-041B

¹ The maximum feasible inhalation dose achievable was this value. No lethality present.

² The maximum nonlethal dose is bold-underlined.

Studies FY08-042B and FY08-041B do not claim GLP compliance.

2.6.7 毒性試験概要表

一般名：ブデソニド／グリコピロニウム臭化物／ホルモテロールフマル酸塩水和物

表 14 Single Dose Toxicity Studies with GP MDI^{4.2.3.1.5、4.2.3.1.6}

Species / Strain	Method of Administration (Vehicle / Formulation)	Doses (mg/kg)	Gender and No. per Group	Observed Maximum Nonlethal Dose ¹ (mg/kg)	Approximate Lethal Dose	Noteworthy Findings	Study Number
Rats / Sprague-Dawley	Nose-only Inhalation	Low 0.48 High <u>1.01</u> ²	3/sex/ group	High- 1.01 (average male and female)	Not Determined	No drug related significant findings	FY08-042A
Dogs / Beagle	Face-mask Inhalation	Male <u>0.155</u> Female <u>0.161</u>	One/sex	0.16 (average male and female)	Not Determined	No drug related significant findings	FY08-041A

¹ The maximum feasible inhalation dose achievable was this value. No lethality present.

² The maximum nonlethal dose is bold-underlined.

Studies FY08-042D and FY08-041D do not claim GLP compliance.

2.6.7 毒性試験概要表

一般名：ブデソニド／グリコピロニウム臭化物／ホルモテロールフマル酸塩水和物

表 15 Single Dose Toxicity Studies with BFF MDI^{4.2.3.1.1、4.2.3.1.2}

Species / Strain	Method of Administration (Vehicle / Formulation)	Doses BD/FF (µg/kg)	Gender and No. per Group	Observed Maximum Nonlethal Dose ¹ BD/FF (µg/kg)	Approximate Lethal Dose	Noteworthy Findings	Study Number
Rats / Sprague-Dawley	Nose-only Inhalation	Low Male 1817/65 Mid Male 1889/145 High Male <u>4082/124</u> ² Low Female 1949/70 Mid Female 2034/157 High Female <u>4405/134</u>	6/sex/ group	4240/129 (average male and female)	Not Determined	No drug related significant findings	FY13-150
Dogs / Beagle	Face-mask Inhalation	Male <u>389/11.3</u> Female <u>392/11.4</u>	1/sex/ group	391/11 (average male and female)	Not Determined	Slight increase in heart rate following dosing	FY13-151

¹ The maximum feasible inhalation dose achievable was this value. No lethality present.

² The maximum nonlethal dose is bold-underlined.

Studies FY13-150 and FY13-151 do not claim GLP compliance.

2.6.7 毒性試験概要表

一般名：ブデソニド／グリコピロニウム臭化物／ホルモテロールフマル酸塩水和物

表 16 Single Dose Toxicity Studies with BGP MDI^{4.2.3.1.2}

Species / Strain	Method of Administration (Vehicle / Formulation)	Doses BD/GP (µg/kg)	Gender and No. per Group	Observed Maximum Nonlethal Dose ¹ BD/GP (µg/kg)	Approximate Lethal Dose	Noteworthy Findings	Study Number
Dogs / Beagle	Face-mask Inhalation	Male <u>454/22.2</u> ² Female <u>456/22.3</u>	1/sex/ group	455/22 (average male and female)	Not Determined	No drug related significant findings	FY13-151

¹ The maximum feasible inhalation dose achievable was this value. No lethality present.

² The maximum nonlethal dose is bold-underlined.

Study FY13-151 does not claim GLP compliance.

2.6.7 毒性試験概要表

一般名：ブデソニド／グリコピロニウム臭化物／ホルモテロールフマル酸塩水和物

表 17 Single Dose Toxicity Studies with GFF MDI^{4.2.3.1.7、4.2.3.1.8}

Species / Strain	Method of Administration (Vehicle / Formulation)	Doses GP/FF (µg/kg)	Gender and No. per Group	Observed Maximum Nonlethal Dose ¹ GP/FF (µg/kg)	Approximate Lethal Dose	Noteworthy Findings	Study Number
Rats / Sprague-Dawley	Nose-only Inhalation	Low Male 120/24 Mid Male 195/39 High Male <u>327/66</u> ³ Low Female 132/26 Mid Female 214/42 High Female <u>354/72</u>	3/sex/ group	High dose average male and female of 341/69 µg/kg	Not Determined	Labored breathing and discolored lungs at gross necropsy in the high dose.	FY08-042D
Dogs / Beagle	Face-mask Inhalation	Low Male 13.9/2.6 High Male <u>78.0/15.2</u> Low Female 14.4/2.7 High Female <u>79.2/15.4</u> High Female 128.5/16.5 (repeat) ²	1/sex/ group	High dose average male and female of 78.6/15.3 µg/kg	Not Determined	Increased respiration (~2x baseline) and heart rate (~2x baseline), and erythema in the high dose.	FY08-041D

¹ The maximum feasible inhalation dose achievable was this value. No lethality present.

² The female repeat data was not included in the maximum nonlethal dose calculation.

³ The maximum nonlethal dose is bold-underlined.

Studies FY08-042D and FY08-041D do not claim GLP compliance.

2.6.7 毒性試験概要表

一般名：ブデソニド／グリコピロニウム臭化物／ホルモテロールフマル酸塩水和物

表 18 Single Dose Toxicity Studies with BGF MDI^{4.2.3.1.1, 4.2.3.1.2}

Species / Strain	Method of Administration (Vehicle / Formulation)	Doses BD/GP/FF (µg/kg)	Gender and No. per Group	Observed Maximum Nonlethal Dose ¹ BD/GP/FF (µg/kg)	Approximate Lethal Dose	Noteworthy Findings	Study Number
Rats / Sprague-Dawley	Nose-only Inhalation	Male 2643/283/162 Male <u>1944/362/192</u> ² Female 2817/302/172 Female <u>2083/388/206</u>	1/sex/ group	2010/375/199 (average male and female)	Not Determined	Dyspnea 24 hour post exposure in 1M+2F, also tachypnea in one of these females. Minimal linear depressions in the lungs in 2F at 180 min necropsy and in 1F at the 24 hour necropsy	FY13-150
Dogs / Beagle	Face-mask Inhalation	Male 218/14/8 Male <u>472/26/14</u> Female 222/14/8 Female <u>476/26/14</u>	1/sex/ group	474/26/14 (average male and female)	Not Determined	Slight increase in heart rate following dosing	FY13-151

¹ The maximum feasible inhalation dose achievable was this value. No lethality present.

² The maximum nonlethal dose is bold-underlined.

Studies FY13-150 and FY13-151 do not claim GLP compliance.

2.6.7 毒性試験概要表

一般名：ブデソニド／グリコピロニウム臭化物／ホルモテロールフマル酸塩水和物

2.6.7.6 反復投与毒性試験：重要な試験以外の試験

該当なし

2.6.7 毒性試験概要表

一般名：ブデソニド／グリコピロニウム臭化物／ホルモテロールフマル酸塩水和物

2.6.7.7 反復投与毒性試験：重要な試験

2.6.7.7.1 ブデソニド

表 19 14-day Inhalation Toxicity Study in Rats with BD MDI^{4.2.3.2.1}

Report Title: Budesonide pMDI: 14-Day Nose-Only Inhalation Exposure Study with Recovery in Rats		Study No. FY14-035
Species / Strain: Rats / Sprague-Dawley	Duration of Dosing: 14 days	Special Features: None
Initial Age: 8-10 weeks	Duration of Post-dose: 14 days	GLP Compliance: Yes
Date of First Dose: ██████████ 20██	Method of Administration: Inhalation Nose Only	
Vehicle / Formulation: budesonide, propellant HFA -134a, DSPC, calcium chloride in an MDI		
No Observed Adverse Effect Level: Not determined		
<p>Conclusion: Treatment of SD rats with a MDI delivering budesonide via nose only inhalation for 14 consecutive days resulted in body weight loss, mortality/morbidity and consistent tissue responses in larynx, lung, adrenal glands, liver, stomach and lymphoid tissues (including the thymus, spleen, lymph nodes and bone marrow). The non-respiratory responses were characteristic of the effects of corticosteroids. Corroborative changes were typically present in organ weights, as well as in haematology and serum chemistry parameters. After a 14-day recovery period, evidence of recovery was present in all affected parameters, though some animals in all dose groups had not fully recovered to Air and Vehicle control values in one or more affected parameters. Reductions in adrenal and thymus weights tended to persist (particularly in females). Decreases in total white blood cell count and circulating lymphocytes also persisted in recovery animals at all dose levels. Histologic evidence of recovery was present in affected tissues in most animals of all dose groups. Tissues from Low dose group recovery animals were within normal limits histologically. Changes in tissues and clinical pathology in this study were characteristic of the well-described effects of corticosteroids, and were likely in response to budesonide. A no observed adverse effect level (NOAEL) was not defined in this study.</p>		

次頁へ続く

2.6.7 毒性試験概要表

一般名：ブデソニド/グリコピロニウム臭化物/ホルモテロールフマル酸塩水和物

Daily Dose (mg/kg/day)	Air Control		Vehicle Control		0.691	0.734	2.20	2.34	4.42	4.68
Number of Animals										
Main Recovery	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10
	M: 5	F: 5	M: 5	F: 5	M: 5	F: 5	M: 5	F: 5	M: 5	F: 5
Toxicokinetics:	Not conducted. ^a									
Noteworthy Findings										
Died or Sacrificed Moribund	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0
Body Weight (g) ^b – Day 15	352.5	225.2	356.8	223.9	289.1**	166.2**	258.3**	151.7**	242.5**	158.5**
Body Weight Gain (%) ^c	(g)		(g)							
Days 1–15	51.2	10.8	46.0	7.6	-127	-680	-180	-700	-241	-768
Clinical Observations ^d	-	-	-	-	+	-	++	+++	++	++
Haematology ^b										
Basophils (10 ³ /μL)	0.07	0.05	0.08	0.10	0.08	0.05*	0.08	0.04*	0.04	0.04*
Eosinophils (10 ³ /μL)	0.06	0.07	0.06	0.08	0.04	0.03**	0.04	0.02**	0.02**	0.02**
Haematocrit (%)	53.2	49.6	50.5	48.1	56.6**	48.1	56.0**	45.6*	55.1**	48.8
Haemoglobin (g/dL)	15.8	15.6	16.0	16.0	17.8**	15.9	18.2**	14.8	18.1**	16.5
Large unstained cells (10 ³ /μL)	0.06	0.09	0.09	0.11	0.05	0.04	0.05	0.04*	0.03**	0.05
Lymphocytes (10 ³ /μL)	5.28	6.08	6.65	6.53	2.51**	1.25**	1.58**	0.61**	0.85**	0.58**
Monocytes (10 ³ /μL)	0.12	0.12	0.17	0.14	0.21	0.21	0.30*	0.41**	0.33*	0.29*
Neutrophils (10 ³ /μL)	0.84	0.50	0.80	0.43	0.97	2.05**	1.96**	5.22**	3.62**	3.92**
Platelets (10 ³ /μL)	1014	1051	1049	1121	1034	917	988	906	839**	894*
Red blood cell count (10 ⁶ /μL)	7.96	8.20	8.14	8.39	9.14**	8.26	9.49**	7.62	9.24**	8.43
Reticulocytes (%)	2.26	1.61	2.48	1.47	1.19**	1.54	0.72**	3.82	0.49**	1.45
White blood cell count (10 ³ /μL)	6.43	6.90	7.85	7.39	3.87**	3.63**	4.01**	6.34	4.89**	4.90*

次頁へ続く

2.6.7 毒性試験概要表

一般名：ブデソニド／グリコピロニウム臭化物／ホルモテロールフマル酸塩水和物

Daily Dose (mg/kg/day)	Air Control		Vehicle Control		0.691	0.734	2.20	2.34	4.42	4.68
Number of Animals										
Main Recovery	M: 10 M: 5	F: 10 F: 5	M: 10 M: 5	F: 10 F: 5	M: 10 M: 5	F: 10 F: 5	M: 10 M: 5	F: 10 F: 5	M: 10 M: 5	F: 10 F: 5
Serum Chemistry										
Albumin (g/dL)	4.2	4.7	4.2	4.6	4.7**	5.1*	4.7**	5.0	5.1**	5.4**
A/G ratio	2.4	3.1	2.3	2.8	2.9**	3.4	2.5*	3.0	2.8**	3.3
ALT (IU/L)	53	44	50	39	47	101*	64	148**	82**	133**
AST (IU/L)	119	94	128	99	104	160*	124	196**	157	206**
Bilirubin (total) (mg/dL)	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.2**	0.2**	0.2**	0.2**	0.2**
Blood urea nitrogen (mg/dL)	18	19	18	18	14**	13**	17	16	16	15
Blood urea nitrogen/creatinine ratio	62	56	66	54	45**	39	62	69	51*	54
Cholesterol (mg/dL)	58	71	61	69	58	83	67	102	99**	76
Glucose (mg/dL)	177	138	135	142	221**	200*	231**	185	248**	206**
Potassium (mmol/L)	5.8	4.9	5.3	5.1	5.3	4.4*	4.9	4.3**	4.6*	4.3**
Total protein (g/dL)	6.0	6.2	6.1	6.3	6.3	6.7	6.6**	6.7	6.9**	7.0*
Triglycerides (mg/dL)	52	46	34	42	110**	140**	118**	197**	209**	146**
Organ Weights (%)^{c,e}	(g)		(g)							
Adrenal glands	0.055	0.060	0.052	0.058	-34.5**	-43.1**	-57.8**	-52.4**	-65.5**	-55.6**
Lungs	1.62	1.32	1.60	1.29	-7.8	-8.9	-13.6**	-4.0	-11.1**	-6.9
Spleen	0.72	0.51	0.65	0.53	-24.9**	-51.5**	-42.7**	-58.5**	-57.5**	-59.0**
Testis	3.18		3.28		-2.9		-10.5**		-8.2*	
Thymus	0.47	0.45	0.55	0.45	-76.2**	-76.9**	-73.1**	-78.1**	-72.1**	-79.5**

次頁へ続く

2.6.7 毒性試験概要表

一般名：ブデソニド／グリコピロニウム臭化物／ホルモテロールフマル酸塩水和物

Daily Dose (mg/kg/day)	Air Control		Vehicle Control		0.691	0.734	2.20	2.34	4.42	4.68
Number of Animals										
Main Recovery	M: 10 M: 5	F: 10 F: 5	M: 10 M: 5	F: 10 F: 5	M: 10 M: 5	F: 10 F: 5	M: 10 M: 5	F: 10 F: 5	M: 10 M: 5	F: 10 F: 5
Histopathology										
Number examined (unless indicated otherwise)	10	10	10	10	10	10	10	9	9	10
Adrenal glands Atrophy (zona fasciculata/reticularis)										
Mild	0	0	0	0	8	9	0	9	0	3
Moderate	0	0	0	0	2	1	10	0	9	7
Bone, sternum with marrow Cellularity, decreased					(0)	(0)	(0)	(0)		
Minimal	0	0	0	0					0	2
Mild	0	0	0	0					8	7
Moderate	0	0	0	0					1	0
Kidneys Inflammation, neutrophilic and histiocytic (focal)					(0)	(0)	(0)	(1)		
Severe	0	0	0	0				1	0	0
Larynx Metaplasia, squamous										
Minimal	2	0	0	0	2	0	0	4	3	0

次頁へ続く

2.6.7 毒性試験概要表

一般名：ブデソニド／グリコピロニウム臭化物／ホルモテロールフマル酸塩水和物

Daily Dose (mg/kg/day)	Air Control		Vehicle Control		0.691	0.734	2.20	2.34	4.42	4.68
Number of Animals	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10
Main Recovery	M: 5	F: 5	M: 5	F: 5	M: 5	F: 5	M: 5	F: 5	M: 5	F: 5
Liver										
Alteration, hepatocellular (periportal)										
Minimal	0	1	0	0	0	0	1	3	0	2
Mild	0	1	0	0	1	1	0	1	4	0
Moderate	2	0	0	0	1	0	0	1	4	1
Lipidosis										
Minimal	1	1	0	1	0	2	2	1	2	1
Mild	0	0	0	0	0	5	0	1	0	6
Moderate	0	0	0	0	0	2	0	4	1	3
Severe	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
Lung										
Aggregates, alveolar macrophage										
Minimal	0	0	1	0	5	7	4	7	8	8
Lymph node, mesenteric					(0)	(0)	(0)	(0)		
Decrease, lymphocyte (cortex)										
Minimal	0	0	0	0					4	1
Mild	0	0	0	0					1	5
Moderate	0	0	0	0					0	1
Lymph node, tracheobronchial		(9)				(9)				(9)
Decrease, lymphocyte (cortex)										
Minimal	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1
Mild	0	0	0	0	0	4	0	6	5	4
Moderate	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2

次頁へ続く

2.6.7 毒性試験概要表

一般名：ブデソニド／グリコピロニウム臭化物／ホルモテロールフマル酸塩水和物

Daily Dose (mg/kg/day)	Air Control		Vehicle Control		0.691	0.734	2.20	2.34	4.42	4.68
Number of Animals										
Main Recovery	M: 10 M: 5	F: 10 F: 5	M: 10 M: 5	F: 10 F: 5	M: 10 M: 5	F: 10 F: 5	M: 10 M: 5	F: 10 F: 5	M: 10 M: 5	F: 10 F: 5
Spleen Decrease, lymphocyte (PALS, follicles)										
Minimal	0	0	0	0	0	1	0	4	2	3
Mild	0	0	0	0	0	1	0	0	0	2
Stomach Degeneration, epithelial (with erosion)					(1)	(2)	(2)	(8)		
Minimal	0	0	0	0	0	0	2	2	1	0
Mild	0	0	0	0	1	1	0	3	2	1
Moderate	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
Ulceration										
Mild	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
Moderate	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0
Thymus Decrease, lymphocyte (cortex)								(8)		
Mild	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0
Moderate	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0
Severe	0	0	0	0	0	10	10	8	9	10

次頁へ続く

2.6.7 毒性試験概要表

一般名：ブデソニド/グリコピロニウム臭化物/ホルモテロールフマル酸塩水和物

Daily Dose (mg/kg/day)	Air Control		Vehicle Control		0.691	0.734	2.20	2.34	4.42	4.68
Number of Animals										
Main Recovery	M: 10 M: 5	F: 10 F: 5	M: 10 M: 5	F: 10 F: 5	M: 10 M: 5	F: 10 F: 5	M: 10 M: 5	F: 10 F: 5	M: 10 M: 5	F: 10 F: 5
Post-dose Evaluation: Noteworthy findings										
Died or Sacrificed Moribund	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
Number Evaluated	5	5	5	5	5	5	5	4	5	4
Body Weight (g)^b										
Day 15	356.9	237.1	353.1	236.9	308.0**	173.0**	279.7**	178.2**	266.5**	167.0**
Day 29	385.8	239.2	396.9	242.3	371.4	215.0*	359.9	214.7*	335.5**	194.8**
Body Weight Gain (%)^c	(g)		(g)							
Days 15-29	28.9	2.1	43.8	5.4	+44.7	+678	+83.1	+576	+57.5	+415
Haematology^b										
Basophils (10 ³ /μL)	0.09	0.08	0.08	0.06	0.04*	0.02**	0.05	0.03**	0.05	0.04**
Large unstained cells (10 ³ /μL)	0.09	0.13	0.11	0.09	0.04*	0.03**	0.04*	0.04**	0.05*	0.05*
Lymphocytes (10 ³ /μL)	4.62	6.55	5.82	5.83	3.45*	1.87**	3.22**	1.85**	3.11**	1.63**
Platelets (10 ³ /μL)	1045	1159	1084	1150	861**	974*	895*	835**	950	998
White blood cell count (10 ³ /μL)	5.52	7.49	7.22	6.57	4.40*	2.40**	4.35**	3.02**	4.30**	2.44**
Serum Chemistry^b										
A/G ratio	2.2	2.7	2.1	2.6	2.4*	2.5	2.2	2.4	2.1	2.4
ALT (IU/L)	41	41	43	36	46	42	49	52*	41	49
AST (IU/L)	107	112	139	131	116	130	96*	113	113	109
Bilirubin (total) (mg/dL)	0.1	0.2	0.1	0.2	0.1	0.2	0.1	0.2	0.2**	0.2
Blood urea nitrogen (mg/dL)	14	18	18	19	16	22	16	23	14**	16
Cholesterol (mg/dL)	56	68	53	56	62	70	77**	71	71*	76

次頁へ続く

2.6.7 毒性試験概要表

一般名：ブデソニド／グリコピロニウム臭化物／ホルモテロールフマル酸塩水和物

Daily Dose (mg/kg/day)	Air Control		Vehicle Control		0.691	0.734	2.20	2.34	4.42	4.68
Number of Animals										
Main Recovery	M: 10 M: 5	F: 10 F: 5	M: 10 M: 5	F: 10 F: 5	M: 10 M: 5	F: 10 F: 5	M: 10 M: 5	F: 10 F: 5	M: 10 M: 5	F: 10 F: 5
Organ Weights (%)^{c,e}	(g)		(g)							
Adrenal glands	0.049	0.059	0.054	0.065	-9.6	-25.6*	-23.0	-28.2*	-20.4	-38.7**
Spleen	0.75	0.48	0.75	0.58	-4.4	-26.4**	+3.5	-22.3*	-2.0	-27.8**
Thymus	0.40	0.35	0.43	0.38	+2.5	-28.1	-37.2*	-52.3**	-36.5*	-52.8**
Histopathology										
Number examined (unless indicated otherwise)	5	5	5	5	5	5	5	4	5	4
Adrenal glands Atrophy (zona fasciculata/reticularis) Minimal	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0
Larynx Metaplasia, squamous Minimal	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0
Liver Alteration, hepatocellular (periportal) Mild Moderate Lipidosis Minimal Mild	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	2 0 0 0	0 1 1 0	0 0 1 0	0 0 1 1

次頁へ続く

2.6.7 毒性試験概要表

一般名：ブデソニド／グリコピロニウム臭化物／ホルモテロールフマル酸塩水和物

Daily Dose (mg/kg/day)	Air Control		Vehicle Control		0.691	0.734	2.20	2.34	4.42	4.68
Number of Animals										
Main Recovery	M: 10 M: 5	F: 10 F: 5	M: 10 M: 5	F: 10 F: 5	M: 10 M: 5	F: 10 F: 5	M: 10 M: 5	F: 10 F: 5	M: 10 M: 5	F: 10 F: 5
Lung Aggregates, alveolar macrophage										
Minimal	0	1	0	0	0	1	1	3	0	3
Mild	0	0	0	0	0	2	0	0	0	1
Stomach Degeneration, epithelial (with erosion)					(0)	(0)	(0)	(0)		
Minimal	0	1	0	0					0	0
Thymus Decrease, lymphocyte (cortex)										
Mild	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1

M = male, F = female.

- No noteworthy findings; + Mild; ++ Moderate; +++ Marked.

* p<0.05; ** p<0.01. Body weight, haematology, serum chemistry and organ weight data analysed using Dunnett's Test.

^a Additional (satellite) animals were used for the pharmacokinetic assessment: no formal TK analysis was required, the plasma analysis was only intended as proof of exposure data.

^b Statistical significance for treated groups calculated against the placebo controls.

^c For controls, group means are shown, for treated groups, percent differences from placebo controls are shown. Statistical significance is based on actual data (not on the percent differences).

^d Main clinical observations were thin appearance and skin lesions.

^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 毒性試験概要表

一般名：ブデソニド／グリコピロニウム臭化物／ホルモテロールフマル酸塩水和物

表 20 14-day Inhalation Toxicity Study in Dogs with BD MDI^{4.2.3.2.2}

Report Title: Glycopyrronium:Budesonide And Budesonide pMDI: 14-Day Face Mask Inhalation Exposure Study With Recovery In Male And Female Beagle Dogs		Study No. FY14-036B
Species / Strain: Dogs/Beagle	Duration of Dosing: 14-days	Special Features: MDI
Initial Age: approximately 6-8 months	Duration of Post-dose: 14-days	GLP Compliance: Yes
Date of First Dose: ■■■■ 20■■■	Method of Administration: Inhalation Face Mask	
Vehicle / Formulation: budesonide, propellant HFA -134a, DSPC, calcium chloride in an MDI		
No Observed Adverse Effect Level: Not determined		
<p>Conclusion: Exposure to inhaled budesonide (BD) MDI in dogs via face mask for 14 days resulted in consistent responses in clinical pathology, organ weights, and histopathology that were characteristic of corticosteroids effects. Changes in haematology demonstrated a typical ‘stress’ leukogram following exposure to budesonide, including increased number of neutrophils (PMN) and monocytes as well as reduced number of lymphocytes and eosinophils in the circulation. Clinical chemistry analyses primarily revealed increases in ALP, GGT, and TRIG, parameters related with liver function and fat metabolism. Organ weight changes were mainly reflected in the decrease of adrenal glands and thymus weights, as well as increase in the liver weight. Statistical significance was not always achieved across dose groups and ratio measures (relative to body weight or brain weight), and a consistent dose response is not always evident, however they were expected responses to budesonide exposures. Weight differences were often resolved in Recovery animals. Consistent findings were observed from the microscopic examinations, including atrophy of the adrenal cortex (zona fasciculata and zona reticularis) and decreased thymic cortical lymphocytes in all the BD treated animals, decreases of cortical lymphocytes in the tracheobronchial lymph node to variable degrees among groups, and hepatocellular alteration in periportal regions of the liver. After the 14-day recovery period, some evidence of recovery was present, but no group had completely recovered to normal as seen in the controls. Atrophy of adrenal glands and hypocellularity in the thymus were still observed in all BD exposed groups but with reduced severity when compared with the main study animals of the same group. Hepatocellular alterations were not observed in most of the recovery animals with the exception of BD Low group. Both females showed minimal changes in the liver. Reduced number of lymphocytes in tracheobronchial lymph node, as observed in the main study animals, was not found in any of the recovery groups. No overt test article related changes were found in other study endpoints including body weights, ophthalmology, ECG, or respiratory parameters. Overall, the findings demonstrated in this study were typical responses to corticosteroids, e.g. budesonide in the formulation. No apparent gender difference was observed in this study. A No Observed Adverse Effect Level (NOAEL) was not defined in this study for BD MDI.</p>		

次頁へ続く

2.6.7 毒性試験概要表

一般名：ブデソニド/グリコピロニウム臭化物/ホルモテロールフマル酸塩水和物

Daily Dose (µg/kg/day)	Air Control		Vehicle Control		138	144	280	291	354	366
Number of Animals										
Main Recovery	M: 4	F: 4	M: 3	F: 3	M: 3	F: 3	M: 3	F: 3	M: 4	F: 4
	M:2	F:2	M:2	F:2	M:2	F:2	M:2	F:2	M:2	F:2
Toxicokinetics ^a:										
AUC _{last} (ng·h/mL)					35.5	32.0	57.4	76.2	104	78.2
C _{max} (ng/mL)					24.9	15.4	42.7	54.3	81.3	48.2
Noteworthy Findings										
Died or Sacrificed Moribund	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Clinical Observations ^b	+	+	++	++	++	++	++	++	++	++
Haematology										
Haematocrit (%)	43.5	42.3	42.6	47.6	42.9	46.1	45.9	47.6	43.2	44.8
Mean corpuscular volume (fL)	68.7	69.2	67.8	66.3	67.2	67.9	69.0	69.2	68.2	70.2*
Neutrophils (10 ³ /µL)	6.30	6.17	4.48	4.38	4.85	4.01	4.73	9.74**	9.00	8.50*
Platelets (10 ³ /µL)	359	295	263	343	326	416	410	388	366	524*
Red blood cell count (10 ⁶ /µL)	6.34	6.12	6.29	7.19	6.39	6.78	6.65	6.89	6.34	6.39
Serum Chemistry										
Albumin (g/dL)	3.4	2.9	3.3	3.5	3.7*	3.7	3.7*	4.0	3.8*	4.0
ALP (IU/L)	77	81	95	91	124	125	140	149	203*	141
BUN/Creatinine ratio	31	26	28	28	41	35	37	46*	44*	38
Chloride (mmol/L)	111	113	112	111	110	109	107	106*	106*	106*
Creatinine (mg/dL)	0.4	0.5	0.5	0.7	0.3	0.5	0.4	0.3*	0.3*	0.4*
GGT (IU/L)	0	0	0	0	3	2	4	5**	4	3
Globulin (g/dL)	2.1	1.8	2.1	1.8	2.2	2.0	2.2	2.2**	2.3	2.1*
Glucose (mg/dL)	73	79	86	84	97	93	79	68*	77	74
Phosphorus (mg/dL)	4.7	6.6	4.8	6.5	5.6	5.7	5.9	5.3*	5.7	5.4*
Total Protein (g/dL)	5.5	4.7	5.4	5.2	5.9	5.7	6.0*	6.2**	6.1*	6.0*
Triglycerides (mg/dL)	43	50	57	52	118*	123*	128*	74	85	75

次頁へ続く

2.6.7 毒性試験概要表

一般名：ブデソニド／グリコピロニウム臭化物／ホルモテロールフマル酸塩水和物

Daily Dose (µg/kg/day)	Air Control		Vehicle Control		138	144	280	291	354	366
Number of Animals										
Main Recovery	M: 4	F: 4	M: 3	F: 3	M: 3	F: 3	M: 3	F: 3	M: 4	F: 4
	M:2	F:2	M:2	F:2	M:2	F:2	M:2	F:2	M:2	F:2
Organ Weights (%) ^{c, d}	(g)		(g)							
Adrenal Glands	0.998	0.843	1.021	0.939	-32.8	-44.5**	-26.7	-34.9*	-36.2*	-38.2*
Liver	270.417	229.609	311.058	231.693	+23.8	+25.0	+28.0*	+52.9*	+30.6*	+68.5**
Lung, Left Cranial	13.462	11.650	13.831	12.191	-19.3	-31.0*	-23.6	-20.6	-21.9	-30.3*
Lung, Right Caudal	20.058	17.509	19.617	17.077	-18.2	-29.1*	-23.2	-17.2	-21.7	-16.1
Ovaries		0.544		0.598		-36.3*		-25.4		-42.5**
Thymus	11.400	8.686	15.304	8.381	-82.1**	-64.1**	-69.0*	-45.6*	-56.6	-70.1**
Histopathology										
Number examined	4	4	3	3	3	4	3	3	4	4
Adrenal Glands Atrophy, cortical (Zona Fasciculata/Reticularis)										
Minimal	0	0	0	0	0	1	0	1	0	2
Mild	0	0	0	0	2	2	2	2	2	2
Moderate	0	0	0	0	1	1	1	0	2	0
Liver Alteration, hepatocellular (periportal)										
Minimal	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
Mild	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Moderate	0	0	0	0	3	3	2	3	4	3
Severe	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0

次頁へ続く

2.6.7 毒性試験概要表

一般名：ブデソニド/グリコピロニウム臭化物/ホルモテロールフマル酸塩水和物

Daily Dose (µg/kg/day)	Air Control		Vehicle Control		138	144	280	291	354	366
Number of Animals										
Main	M: 4	F: 4	M: 3	F: 3	M: 3	F: 3	M: 3	F: 3	M: 4	F: 4
Recovery	M:2	F:2	M:2	F:2	M:2	F:2	M:2	F:2	M:2	F:2
Lung										
Inflammation (histiocytic and neutrophilic)										
Minimal	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Mild	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Inflammation, chronic (peribronchovascular)										
Minimal	4	3	2	2	0	3	0	0	0	1
Mild	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
Lymph node, tracheobronchial										
Lymphocyte decrease (cortex)										
Minimal	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
Mild	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Moderate	0	0	0	0	0	0	0	0	2	1
Thymus										
Lymphocyte decrease (cortex)										
Mild	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Moderate	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0
Severe	0	0	0	0	2	2	3	2	4	4

次頁へ続く

2.6.7 毒性試験概要表

一般名：ブデソニド/グリコピロニウム臭化物/ホルモテロールフマル酸塩水和物

Daily Dose ($\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$)	Air Control		Vehicle Control		138	144	280	291	354	366
Number of Animals										
Main Recovery	M: 4 M:2	F: 4 F:2	M: 3 M:2	F: 3 F:2	M: 3 M:2	F: 3 F:2	M: 3 M:2	F: 3 F:2	M: 4 M:2	F: 4 F:2
Post-dose Evaluation:										
Number Evaluated	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Noteworthy findings										
Haematology										
Basophils ($10^3/\mu\text{L}$)	0.05	0.07	0.06	0.08	0.07	0.03*	0.04	0.05	0.06	0.04*
Serum Chemistry										
Blood Urea Nitrogen (mg/dL)	12	18	13	16	15	15	12	11	16*	12
GGT (IU/L)	0	0	1	1	2	1	4**	3	0	1
Sodium (mmol/L)	148	148	146	147	149	145	147	145*	146	147
Total Bilirubin (mg/dL)	0.1	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1*	0.1*	0.0	0.0
Organ Weights (%)^c	(g)		(g)							
Lung, Left Caudal	20.012	18.011	17.970	14.133	+6.7	+24.0	+2.5	+23.2	+17.3	+39.2*
Uterus		1.217		1.365		-4.9		-9.4		-44.5
Histopathology										
Number examined	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Adrenal Glands										
Atrophy, cortical (Zona Fasciculata/Reticularis)										
Minimal	0	0	0	0	2	0	1	0	0	2
Mild	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0
Liver										
Alteration, hepatocellular (periportal)										
Minimal	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0

次頁へ続く

2.6.7 毒性試験概要表

一般名：ブデソニド／グリコピロニウム臭化物／ホルモテロールフマル酸塩水和物

Daily Dose (µg/kg/day)	Air Control		Vehicle Control		138	144	280	291	354	366
Number of Animals										
Main Recovery	M: 4 M:2	F: 4 F:2	M: 3 M:2	F: 3 F:2	M: 3 M:2	F: 3 F:2	M: 3 M:2	F: 3 F:2	M: 4 M:2	F: 4 F:2
Lung Inflammation (histiocytic and neutrophilic) Severe	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Inflammation, chronic (peribronchovascular) Minimal	1	0	0	1	0	0	2	1	0	1
Mild	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
Lymph node, tracheobronchial Lymphocyte increase (cortex) Moderate	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Thymus Lymphocyte decrease (cortex)	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0
Minimal	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
Mild	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
Severe										

M = male, F = female.

- No noteworthy findings; + Mild; ++ Moderate.

* p<0.05; ** p<0.01. Body weight, haematology, serum chemistry and organ weight data analysed using Dunnett's Test.

^a Day 14 mean data shown.^b The most common clinical observations throughout the study were related to liquid or soft stool.^c 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).^d Both absolute and relative weights differed from controls in the direction indicated. Displayed figures are for the absolute organ weight effects.

2.6.7 毒性試験概要表

一般名：ブデソニド／グリコピロニウム臭化物／ホルモテロールフマル酸塩水和物

表 21 3-Month Inhalation Toxicity Study in Dogs with BD MDI^{4.2.3.2.14}

Report Title: Glycopyrronium:Budesonide pMDI and Budesonide pMDI: 90-Day Face Mask Inhalation Exposure Study in Male and female Beagle Dogs		Study No. FY14-148B
Species / Strain: Dogs / Beagle	Duration of Dosing: 90 days	Special Features: MDI
Initial Age: approximately 5-7 months	Duration of Post-dose: None	GLP Compliance: Yes
Date of First Dose: [REDACTED] 20[REDACTED]	Method of Administration: Inhalation Face Mask	
Vehicle / Formulation: budesonide, propellant HFA-134a, DSPC, calcium chloride in an MDI		
Presumed No Observed Adverse Effect Level: Not determined		
<p>Conclusion: Exposure to inhaled budesonide (BD) MDI in male or female beagle dogs via face mask inhalation for 90 consecutive days resulted in tissue responses in adrenal glands, liver, and thymus, consistent with the effects of corticosteroids. Corroborative changes were present in organ weights, and to a limited degree in some hematology and serum chemistry parameters. Respiratory tract effects were not seen in any dose group.</p> <p>Specific organ weight changes identified and attributed to exposure included decreased adrenal gland weights, increased liver weights and decreased thymus weights. The weight changes corresponded to histologic findings of adrenal cortical atrophy (zona fasciculata and zona reticularis), hepatocellular alteration consistent with glycogen accumulation and/or increased metabolic activity (an adaptive response), and thymic cortex lymphocyte decreases. Changes in clinical pathology parameters attributed to exposure included minor decreases in eosinophil counts and minor alterations in serum chemistry (minor albumin and triglyceride elevations).</p> <p>A clear No Observed Adverse Effect Level (NOAEL) was not observed in this study. However, overall the few possible Low dose effects for BD were minimal in nature. There was a dose related change associated with the known effects of budesonide. At the Low dose level for BD, there were minimal differences from controls. Adrenal cortical changes seen in higher dose groups were not present, while liver hepatocellular alteration (an adaptive response) was present in 8/8 BD Low animals. Thymic cortical lymphocyte decreases persisted in 2/8 BD Low animals at minimal to mild severity. Biologically significant changes in hematology or serum chemistry parameters were not present in Low (or any other) dose animals.</p> <p>The changes in tissues and clinical pathology in this study were characteristic of the well-described effects of corticosteroids, and were likely in response to the budesonide component present in both test article formulations.</p>		

次頁へ続く

2.6.7 毒性試験概要表

一般名：ブデソニド／グリコピロニウム臭化物／ホルモテロールフマル酸塩水和物

Daily Dose (µg/kg/day)	Air Control		Vehicle Control		3.33	3.39	30.61	31.56	102.83	106.06
Number of Animals	M: 4	F: 4	M: 4	F: 4	M: 4	F: 4	M: 4	F: 4	M: 4	F: 4
Toxicokinetics ^a:										
AUC _(last) (ng·h/mL)					0.31	0.215	7.77	11.4	22.2	23.9
C _{max} (ng/mL)					0.563	0.406	8.04	15.8	22.7	26.5
Noteworthy Findings										
Died or Sacrificed Moribund	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Clinical Observations	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Serum Chemistry										
Albumin (g/dL)	3.6	3.5	3.5	3.6	3.5	3.6	3.7	3.9	3.8	3.9
Triglycerides (mg/dL)	30	23	26	27	22	34	49	60**	90*	73*
Organ Weights (%) ^{b, c}	(g)		(g)							
Adrenal	0.889	1.120	0.959	0.885	-7.8	+7.5	-59.6	-44.2	-43.4	-46.2
Liver	309.796	251.304	302.734	244.292	+0.5	+21.1	+10.0	+26.1	+48.2	+33.6
Thymus	8.034	7.186	6.476	5.092	-48.2	-7.4	-70.0	-63.4	-80.3	-62.3
Histopathology										
Number examined	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
Adrenals Atrophy, cortical, zona fasciculate/reticularis	0	0	0	0	0	0	4	4	4	4
Liver Alteration, hepatocellular, periportal	0	0	0	0	4	4	4	4	4	4
Thymus Lymphocyte decrease, cortex	0	0	0	0	2	0	4	4	4	4

M = male, F = female.

- No noteworthy findings.

* p<0.05; ** p<0.01. Serum chemistry data analysed using ANOVA.

^a Day 90 mean data is shown.^b For controls, group means are shown, for treated groups, percent differences from placebo controls are shown. Statistical significance is based on actual data (not on the percent differences).^c Both absolute and relative weights differed from controls in the direction indicated. Displayed figures are for the absolute organ weight effects.

2.6.7 毒性試験概要表

一般名：ブデソニド／グリコピロニウム臭化物／ホルモテロール fumarate 水和物

2.6.7.7.2 ホルモテロール

表 22 14-day Inhalation Toxicity Study in Rats with FF MDI^{4.2.3.2.3}

Report Title: Formoterol Fumarate pMDI: 14-Day Nose-Only Inhalation Exposure Study with Recovery in Rats		Study No. FY09-039
Species / Strain: Rats / Sprague-Dawley	Duration of Dosing: 14 days	Special Features: MDI
Initial Age: 8 weeks	Duration of Post-dose: 14 days	GLP Compliance: Yes
Date of First Dose: [REDACTED] 20 [REDACTED]	Method of Administration: Inhalation Nose Only	
Vehicle / Formulation: Formoterol fumarate, propellant HFA -134a, DSPC, calcium chloride in an MDI		
No Observed Adverse Effect Level: High Dose of 158 µg/kg/day (M 153 µg/kg/day, F 163 µg/kg/day)		
<p>Conclusion: Inhalation of formoterol fumarate MDI resulted in changes in some haematology and clinical chemistry parameters, associated with the metabolism of formoterol fumarate, that generally returned to baseline with a 2-week recovery period. However, values were generally within normal historical ranges. These changes are likely not due to toxicity due to the lack of correlating histopathology findings or changes in various other supporting clinical chemistry parameters. The animals showed no histopathological findings in any dose group. Exposure was confirmed by the presence of formoterol fumarate in all test article treated animals, with no measurable test article in the vehicle or air control groups.</p> <p>The No Observed Adverse Effect dose was considered to be the high dose group (ie the maximum feasible dose group) of 153 and 163 µg/kg/day for the male and female Sprague-Dawley rats.</p>		

次頁へ続く

2.6.7 毒性試験概要表

一般名：ブデソニド／グリコピロニウム臭化物／ホルモテロールフマル酸塩水和物

Daily Dose:	Air Control		Vehicle Control		Low Dose (M 35.37 µg/kg/day) (F 37.59 µg/kg/day)		Mid Dose (M 87.91 µg/kg/day) (F 94.24 µg/kg/day)		High Dose (M 153.19 µg/kg/day) (F 163.40 µg/kg/day)	
	M: 10 M:5	F: 10 F:5	M: 10 M:5	F: 10 F:5	M: 10 M:5	F: 10 F:5	M: 10 M:5	F: 10 F:5	M: 10 M:5	F: 10 F:5
Number of Animals:										
Main Recovery										
Time Period: Min/day	90	90	90	90	25	25	60	60	90	90
Noteworthy Findings	NS ¹	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
TK at Day 14										
C_{max} (pg/mL)	ND	ND	ND	ND	2126	1360	2748	4864	3785	3906
Died or sacrificed moribund	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Body Weight (%)	---	---	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Food Consumption (%)	ND ²	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Water Consumption (units)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Clinical Observations	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Ophthalmoscopy	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Hematology³	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Serum Chemistry³	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Urinalysis	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Organ Weights	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Gross Pathology	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Histopathology	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Additional Examinations	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Post-dose Evaluation: 14 day Recovery Group Findings	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS

1 NS: nothing significant

2 ND: not determined

3 Some parameters were statistically changed compared with controls but all values were within historical limits.

2.6.7 毒性試験概要表

一般名：ブデソニド／グリコピロニウム臭化物／ホルモテロール fumarate 水和物

表 23 14-day Inhalation Toxicity Study in Dogs with FF MDI^{4.2.3.2.4}

Report Title: Formoterol Fumarate pMDI: 14-Day Face-Mask Inhalation Exposure Study with Recovery in Beagle Dogs		Study No. FY09-038
Species / Strain: Dogs / Beagle	Duration of Dosing: 14 days	Special Features: MDI
Initial Age: 7 months	Duration of Post-dose: 14 days	GLP Compliance: Yes
Date of First Dose: ■■■■■ 20■■■	Method of Administration: Inhalation Face Mask	
Vehicle / Formulation: Formoterol fumarate, propellant HFA-134a, DSPC, calcium chloride in a MDI		
Presumed No Observed Adverse Effect Level: Low Dose of 9.2 µg/kg/day (M 9.02 µg/kg/day, F 9.38 µg/kg/day)		
<p>Conclusion: Exposure to inhaled formoterol fumarate was confirmed by the presence of formoterol fumarate in all treated animals, with no measurable test article in the placebo or air control groups. As expected, the dogs showed changes in cardiac parameters and clinical observations consistent with previously reported formoterol symptoms. Additionally, histopathological findings supported the increased heart rate and metabolic activity in the liver. Inhalation of formoterol fumarate resulted in transient and biologically insignificant changes in various clinical chemistry and haematology parameters in the 2-week recovery group that were not present during the main study. A clear No Observed Adverse Effect Level (NOAEL) was not observed in this study. However, considering the single low dose animal that displayed outlier activity in terms of its inability to metabolise formoterol fumarate that resulted in a minimal cardiac finding, the NOAEL might reasonably be considered to be the low dose of 9.2 µg/kg/day. There were no significant differences between the filtered air controls and the vehicle control group.</p>		

次頁へ続く

2.6.7 毒性試験概要表

一般名：ブデソニド／グリコピロニウム臭化物／ホルモテロールフマル酸塩水和物

Daily Dose:	Air Control		Vehicle Control		Low Dose (M 9.02 µg/kg/day) (F 9.38 µg/kg/day)		Mid Dose (M 12.89 µg/kg/day) (F 13.26 µg/kg/day)		High Dose (M 26.58 µg/kg/day) (F 20.50 µg/kg/day)	
	M: 4 F: 4	M: 3 F: 3	M: 4 F: 4	M: 3 F: 3	M: 4 F: 0	M: 4 F: 0	M: 4 F: 0	M: 4 F: 0	M: 4 F: 3	M: 4 F: 3
Number of Animals										
Main	M: 4	F: 4	M: 4	F: 4	M: 4	F: 4	M: 4	F: 4	M: 4	F: 4
Recovery	M: 3	F: 3	M: 3	F: 3	M: 0	F: 0	M: 0	F: 0	M: 3	F: 3
Time Period: Min/day	45	45	45	45	15	15	30	30	45	45
TK at Day 14										
C _{max} (pg/mL)	ND	ND	ND	ND	468.03	468.83	798.78	1212.94	1184.69	1168.66
AUC _{last} (pg·h/mL)					1648.71	807.27	2290.54	2005.51	3063.12	2444.31
Noteworthy Findings	NS ¹	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Died or sacrificed moribund	None	None	None	None	None	None	None	None	None	None
Body Weight (%)	---	---	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Food Consumption (%)	ND ²	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Water Consumption (units)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Clinical Observations	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Ophthalmoscopy	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Hematology	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Serum Chemistry	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Urinalysis	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Organ Weights	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Gross Pathology	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Histopathology										
Number of exam	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
Heart: Myocardium fibrosis	0	0	0	0	0	1	1	2	2	3
Heart: Papillary muscle spindle shaped cells	0	0	0	0	0	1 ³	0	0	0	0
Liver:										
Hepatocellular alteration	0	0	0	0	4	1	3	4	4	4

次頁へ続く

2.6.7 毒性試験概要表

一般名：ブデソニド／グリコピロニウム臭化物／ホルモテロールフマル酸塩水和物

Daily Dose:	Air Control		Vehicle Control		Low Dose (M 9.02 µg/kg/day) (F 9.38 µg/kg/day)		Mid Dose (M 12.89 µg/kg/day) (F 13.26 µg/kg/day)		High Dose (M 26.58 µg/kg/day) (F 20.50 µg/kg/day)	
Number of Animals										
Main	M: 4	F: 4	M: 4	F: 4	M: 4	F: 4	M: 4	F: 4	M: 4	F: 4
Recovery	M: 3	F: 3	M: 3	F: 3	M: 0	F: 0	M: 0	F: 0	M: 3	F: 3
Additional Examinations:										
Respiratory physiology measurements	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Electrocardio-grams	NS	NS	NS	↑HR ⁴	↑HR	↑HR	↑HR	↑HR	↑HR	↑HR
Post-dose Evaluation: 14 day Recovery Group Findings	NS	NS	NS	NS	ND	ND	ND	ND	Myo- cardium fibrosis 2/3	Hepato- cellular Alteration 1/3; Myocardium fibrosis 1/3

¹ NS: nothing significant

² ND: not determined

³ This female was shown to be a metabolic outlier with impaired ability to metabolize formoterol.

⁴ ↑HR: increased heart rate

2.6.7 毒性試験概要表

一般名：ブデソニド／グリコピロニウム臭化物／ホルモテロール fumarate 水和物

表 24 3-Month Inhalation Toxicity Study in Dogs with FF MDI^{4.2.3.2.15}

Report Title: Glycopyrrolate and Formoterol Fumarate pMDI: 90-Day Face Mask Inhalation Exposure Study in Beagle Dogs		Study No. FY10-129
Species / Strain: Dogs / Beagle	Duration of Dosing: 90 days	Special Features: MDI
Initial Age: 9 months	Duration of Post-dose: 1 day	GLP Compliance: Yes
Date of First Dose: ■■■■ 20■■	Method of Administration: Inhalation Face Mask	
Vehicle / Formulation: Formoterol fumarate, propellant HFA-134a, DSPC, calcium chloride in an MDI		
Presumed No Observed Adverse Effect Level: Mid Dose of 10.32 µg/kg/day (M 10.18 µg/kg/day, F 10.46 µg/kg/day)		
<p>Conclusion: Exposure to inhaled formoterol fumarate MDI was confirmed by the presence of formoterol fumarate in the plasma of all treated animals. As expected with formoterol fumarate, the dogs showed changes in cardiac and respiratory parameters consistent with formoterol symptoms and signs reported in the literature. Additionally, the histopathological findings were considered a consequence of adaptive metabolic activity in the liver characterised by swollen cytoplasm. Inhalation of formoterol fumarate resulted in transient and biologically insignificant changes in various clinical chemistry and haematology parameters in the 90-day study. If the liver swollen cytoplasm is considered an adverse finding then a clear No Observed Adverse Effect Level (NOAEL) was not observed in this study. There were no supporting signs of liver toxicity present such as hepatic enzyme changes or cellular necrosis. If the liver swollen cytoplasm was considered to be an adaptive response rather than a toxic response, the NOAEL was the mid dose group. The presumed NOAEL was based on a consideration that the overall incidence of macrophage aggregates and related findings was higher in the high formoterol group compared to the rest of the exposed groups and controls. There were no drug-related pre-neoplastic or neoplastic lesions observed. There were no significant differences between the filtered air controls and the vehicle control group.</p>		

次頁へ続く

2.6.7 毒性試験概要表

一般名：ブデソニド／グリコピロニウム臭化物／ホルモテロールフマル酸塩水和物

Daily Dose:	Air Control		Vehicle Control		Low Dose (M 4.36 µg/kg/day) (F 4.53 µg/kg/day)		Mid Dose (M 10.18 µg/kg/day) (F 10.46 µg/kg/day)		High Dose (M 14.05 µg/kg/day) (F 14.51 µg/kg/day)	
	M: 4	F: 4	M: 4	F: 4	M: 4	F: 4	M: 4	F: 4	M: 4	F: 4
Time Period: Min/day	30	30	30	30	10	10	20	20	30	30
TK at Day 90 C _{max} (pg/mL) AUC _{last} (pg·h/mL)	ND		ND		408 1160	269 1050	1180 2480	807 3510	938 3300	738 2440
Noteworthy Findings	NS		NS		NS		Liver swollen cytoplasm		↑Lung institial hypertrophy; Liver swollen cytoplasm	
Died or sacrificed moribund	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Body Weight	NS ¹	NS	NS	NS	NS	NS	NS	↑ over vehicle	NS	↑ over vehicle
Food Consumption	ND ²	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Water Consumption	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Clinical Observations	NS		NS		NS		NS		NS	
Ophthalmoscopy	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Hematology	NS ³	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Serum Chemistry	NS ³	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Urinalysis	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Organ Weights	NS	NS	NS	NS	NS	Heart and Kidney to brain weight ratio ↑ over vehicle ⁴	NS	Liver weight ↑ over vehicle ⁴	NS	Liver weight ↑ over vehicle ⁴

次頁へ続く

2.6.7 毒性試験概要表

一般名：ブデソニド／グリコピロニウム臭化物／ホルモテロールフマル酸塩水和物

Daily Dose:	Air Control		Vehicle Control		Low Dose (M 4.36 µg/kg/day) (F 4.53 µg/kg/day)		Mid Dose (M 10.18 µg/kg/day) (F 10.46 µg/kg/day)		High Dose (M 14.05 µg/kg/day) (F 14.51 µg/kg/day)	
	M: 4	F: 4	M: 4	F: 4	M: 4	F: 4	M: 4	F: 4	M: 4	F: 4
Number of Animals	M: 4	F: 4	M: 4	F: 4	M: 4	F: 4	M: 4	F: 4	M: 4	F: 4
Gross Pathology	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Histopathology Number of exam	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
Liver: Hepatocellular alteration	0	0	0	0	0	0	0	1 ⁵	1 ⁵	0
Lung:										
Accumulation, alveolar macrophage	0	2	1	0	3	3	2	3	2	2
Aggregate, alveolar macrophage	0	3	1	2	1	1	1	4	3	3
Hypertrophy/hyperplasia, epithelial	1	0	1	0	1	0	0	2	1	0
Hypertrophy/hyperplasia, epithelial with interstitial fibrosis	1	0	0	3	1	1	2	2	4	2
Respiratory physiology measurements	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Electrocardiograms	NS	NS	NS	NS	HR↑	HR↑	HR↑	HR↑	HR↑	HR↑

¹ NS= Nothing Significant² ND= Not Determined³ Some parameters were significantly changed compared with controls but all values were within historical values.⁴ This result was attributed to hepatic enzyme induction in response to metabolism of formoterol over the course of the study.⁵ This finding, generally swollen cytoplasm, was a hepatocyte response to drug metabolism.

HR = heart rate

2.6.7 毒性試験概要表

一般名：ブデソニド／グリコピロニウム臭化物／ホルモテロールフマル酸塩水和物

2.6.7.7.3 グリコピロニウム

表 25 14-Day Inhalation Toxicity Study in Mice with GP MDI^{4.2.3.2.5}

Report Title: Glycopyrrolate pMDI: 14-Day Nose-Only Inhalation Exposure Study with Recovery in Male and Female B6C3F1 Mice		Study No. FY14-111
Species / Strain: Mouse / B6C3F1	Duration of Dosing: 14 days	Special Features: MDI
Initial Age: 8-10 weeks	Duration of Post-dose: 14 days	GLP Compliance: Yes
Date of First Dose: [REDACTED] 20 [REDACTED]	Method of Administration: Inhalation Nose Only	
Vehicle / Formulation: glycopyrrolate, propellant HFA-134a, DSPC, calcium chloride in an MDI		
Presumed No Observed Adverse Effect Level: High Dose of 1380 µg/kg/day (M 1340 µg/kg/day, F 1420 µg/kg/day)		
<p>Conclusion: 14-day nose only inhalation of glycopyrrolate MDI in B6C3F1 mice did not generate any evident abnormal changes in clinical observations or any of the clinical pathology parameters. No ocular toxicity was revealed in the post exposure ophthalmic examinations. On study Day 6, High dose animals of both genders exhibited statistically significant reduction in the average body weight when compared to the Vehicle controls, however, they all returned to the similar body weight level as that in the controls by the end of the 14-day exposure, and no body weight differential was found at any dose level in the recovery mice. Organ weight changes were generally unremarkable. The lung weight in the main study females registered a statistically significant increase when compared with the Vehicle controls. However there were no dose responses, and the changes were typically of small magnitude. Furthermore, histopathological examinations did not reveal any test article related abnormal findings in the lung tissues at any dose level. Therefore, the minor increase of the lung weights was judged to be clinically irrelevant. Treatment related histopathologic findings were limited to minimal or mild “Degeneration, Hyaline” (also known as “eosinophilic globule” presence) of respiratory epithelium, and to a lesser extent olfactory epithelium, of the caudal nose sections, primarily in the High dose females. This change persisted in those female animals without evidence of recovery. However, it is a common finding in rodents with inhalation studies, and believed to be a nonspecific effect. In conclusion, the High dose level of glycopyrrolate (average across gender 1380 µg/kg/day in mice) is defined as the No Observed Adverse Effect Level (NOAEL).</p>		

次頁へ続く

2.6.7 毒性試験概要表

一般名：ブデソニド／グリコピロニウム臭化物／ホルモテロールフマル酸塩水和物

Daily Dose (µg/kg/day)	Air Control		Vehicle Control		320	340	620	660	1340	1420
Number of Animals										
Main	M: 20	F: 20	M: 20	F: 20	M: 20	F: 20	M: 20	F: 20	M: 20	F: 20
Recovery	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10
Toxicokinetics:	Not conducted ^a									
Noteworthy Findings										
Died or Sacrificed Moribund ^b	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0
Body Weight Gain (g)										
Days -1-6	-0.7	-0.4	-0.9	-0.4	-0.5	-0.6	-1.6	-0.5	-4.2**	-1.8
Days -1-13	+0.6	+0.8	-1.1	-0.5	+0.7	+0.7*	-1.6	-0.4	-0.4	0
Clinical Observations	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Organ Weights (%) ^{c, d}	(g)		(g)							
Lungs	0.166	0.146	0.167	0.135	+1.2	+12.6*	+2.4	+17.0**	+0.6	+15.6**
Histopathology										
Number examined	10	10	10	8	10	10	10	10	10	10
Nose/Turbinate 1										
Degeneration, hyaline: Respiratory epithelium										
Minimal	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Mild	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Nose/Turbinate 2										
Degeneration, hyaline: Respiratory epithelium										
Minimal	0	0	1	0	0	0	0	0	1	2
Mild	0	0	0	0	0	1	0	1	1	2

次頁へ続く

2.6.7 毒性試験概要表

一般名：ブデソニド／グリコピロニウム臭化物／ホルモテロールフマル酸塩水和物

Daily Dose (µg/kg/day)	Air Control		Vehicle Control		320	340	620	660	1340	1420
Number of Animals										
Main	M: 20	F: 20	M: 20	F: 20	M: 20	F: 20	M: 20	F: 20	M: 20	F: 20
Recovery	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10
Nose/Turbinates 1										
Degeneration, hyaline:										
Olfactory epithelium										
Mild	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
Respiratory epithelium										
Minimal	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2
Mild	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6
Post-dose Evaluation:										
<u>Noteworthy findings</u>										
Died or Sacrificed Moribund^b	0	2	0	1	0	0	2	0	0	0
Histopathology										
Number examined	5	3	5	4	5	5	3	5	5	5
Nose/Turbinates 1										
Degeneration, hyaline:										
Respiratory epithelium										
Minimal	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Nose/Turbinates 2										
Degeneration, hyaline:										
Respiratory epithelium										
Minimal	0	0	0	0	0	0	3	1	0	2
Mild	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3

次頁へ続く

2.6.7 毒性試験概要表

一般名：ブデソニド／グリコピロニウム臭化物／ホルモテロールフマル酸塩水和物

Daily Dose (µg/kg/day)	Air Control		Vehicle Control		320	340	620	660	1340	1420
Number of Animals										
Main	M: 20	F: 20	M: 20	F: 20	M: 20	F: 20	M: 20	F: 20	M: 20	F: 20
Recovery	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10
Nose/Turbinate 1										
Degeneration, hyaline:										
Olfactory epithelium										
Mild	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
Respiratory epithelium										
Minimal	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
Mild	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4

M = male, F = female.

- No noteworthy findings.

* p<0.05; ** p<0.01. Body and organ weight data analysed using Dunnett's Test.

^a Formal pharmacokinetic analysis was not performed due to the limited number of animals per time point.

^b The causes of death are not considered to be test article-related.

^c For controls, group means are shown, for treated groups, percent differences from placebo controls are shown. Statistical significance is based on actual data (not on the percent differences).

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

2.6.7 毒性試験概要表

一般名：ブデソニド／グリコピロニウム臭化物／ホルモテロールフマル酸塩水和物

表 26 14-Day Inhalation Toxicity Study in Rats with GP MDI^{4.2.3.2.6}

Report Title: Glycopyrrolate: 14-Day Nose-Only Inhalation Exposure Study with Recovery in Rats		Study No. FY08-076
Species / Strain: Rats / Sprague-Dawley	Duration of Dosing: 14 days	Special Features: MDI
Initial Age: 8-weeks	Duration of Post-dose: 14 days	GLP Compliance: Yes
Date of First Dose: ■■■■ 20■■■	Method of Administration: Inhalation Nose Only	
Vehicle / Formulation: Glycopyrrolate, propellant HFA-134a, DSPC, calcium chloride in an MDI		
No Observed Adverse Effect Level: High dose (Maximum Feasible Dose) of 535 µg/kg/day (M 514 µg/kg/day, F 555 µg/kg/day)		
<p>Conclusion: Inhalation of glycopyrrolate MDI resulted in possible transient decreases in some clinical chemistry parameters that generally returned to baseline within a 2-week recovery period. The animals showed no histopathological findings in any dose group. Exposure was confirmed by the presence of glycopyrrolate in all test article treated animals, with no consistent, measurable test article in the vehicle or air control groups.</p> <p>The No Observed Adverse Effect dose was considered to be the high dose group (ie the maximum feasible dose group) of 514 and 555 µg/kg/day for male and female Sprague-Dawley rats.</p>		

次頁へ続く

2.6.7 毒性試験概要表

一般名：ブデソニド／グリコピロニウム臭化物／ホルモテロールフマル酸塩水和物

Daily Dose:	Air Control		Vehicle Control		Low Dose (M 46 µg/kg/day) (F 49 µg/kg/day)		Mid Dose (M 254 µg/kg/day) (F 279 µg/kg/day)		High Dose (M 514 µg/kg/day) (F 555 µg/kg/day)	
	M: 8 M: 4	F: 8 F: 4	M: 8 M: 4	F: 8 F: 4	M: 8 M: 4	F: 8 F: 4	M: 8 M: 4	F: 8 F: 4	M: 10 M: 6	F: 10 F: 6
Number of Animals: Main :Recovery	M: 8 M: 4	F: 8 F: 4	M: 8 M: 4	F: 8 F: 4	M: 8 M: 4	F: 8 F: 4	M: 8 M: 4	F: 8 F: 4	M: 10 M: 6	F: 10 F: 6
Time Period: Min/day	120	120	120	120	15	15	60	60	120	120
TK at Day 14 C _{max} (ng/mL)	ND	ND	ND	ND	0.41	0.68	7.29	3.64	5.39	3.89
Noteworthy Findings	NS ¹	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Died or sacrificed moribund	None	None	None	None	None	None	None	None	None	None
Body Weight (%)	---	---	NS	NS	NS	NS	NS	NS	↓5% ³	↓6% ³
Food Consumption (%)	ND ²	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Water Consumption (units)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Clinical Observations	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Ophthalmoscopy	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Hematology	NS	NS	NS	NS	NS	NS	↓RET	NS	↑RBC, HGB, HCT ↓MCHC, RET	↓NEUT
Serum Chemistry	NS	NS	NS	NS	NS ⁴	NS ⁴	NS ⁴	NS ⁴	NS ⁴	NS ⁴
Urinalysis	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Organ Weights	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Gross Pathology	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Histopathology	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Additional Examinations	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Postdose Evaluation: Recovery Group Findings	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS

¹ NS: nothing significant.

² ND: not determined

³ Body weight decrease not statistically significant but visually trended down throughout the study.

⁴ Some parameters were statistically changed compared with controls but all values were within historical limit.

2.6.7 毒性試験概要表

一般名：ブデソニド／グリコピロニウム臭化物／ホルモテロールフマル酸塩水和物

表 27 14-Day Inhalation Toxicity Study in Dogs with GP MDI^{4.2.3.2.7}

Report Title: Glycopyrrolate: 14-Day Face Mask Inhalation Exposure Study with Recovery in Beagle Dogs		Study No. FY08-077
Species / Strain: Dogs / Beagle	Duration of Dosing: 14 days	Special Features: MDI
Initial Age: 8 months	Duration of Post-dose: 14 days	GLP Compliance: Yes
Date of First Dose: ■■■■ 20■■■	Method of Administration: Inhalation Face Mask	
Vehicle / Formulation: Glycopyrrolate, propellant HFA-134a, DSPC, calcium chloride in an MDI		
No Observed Adverse Effect Level: High dose (Maximum Feasible Dose) of 80 µg/kg/day (M 77 µg/kg/day, F 83 µg/kg/day)		
<p>Conclusion: Inhalation of glycopyrrolate MDI resulted in a transient and biologically insignificant decrease in a clinical chemistry parameter (ALP) that returned to baseline with a 2-week recovery period. The dogs showed no significant histopathological findings in any dose group. Exposure to glycopyrrolate was confirmed by the presence of glycopyrrolate in all test article treated animals, with no measurable test article in the vehicle or air control groups.</p> <p>The No Observed Adverse Effect dose was considered to be the high dose group (ie the maximum feasible dose group) of 77 and 83 µg/kg/day in male and female beagle dogs respectively.</p>		

次頁へ続く

2.6.7 毒性試験概要表

一般名：ブデソニド／グリコピロニウム臭化物／ホルモテロールフマル酸塩水和物

Daily Dose:	Air Control		Vehicle Control		Low Dose (M 16 µg/kg/day) (F 17 µg/kg/day)		Mid Dose (M 29 µg/kg/day) (F 31 µg/kg/day)		High Dose (M 77 µg/kg/day) (F 83 µg/kg/day)	
	: Main : Recovery	M: 4 M: 2	F: 4 F: 2	M: 3 M: 2	F: 3 F: 2	M: 3 M: 0	F: 3 F: 0	M: 3 M: 0	F: 3 F: 0	M: 4 M: 2
Time Period: Min/day	60	60	60	60	10	10	30	30	60	60
TK at Day 14										
C _{max} (pg/mL)	ND	ND	ND	ND	86.48	61.96	70.33	226.80	340.04	592.59
AUC _{last} (pg·h/mL)					215.19	235.33	86.78	833.19	1669.82	3364.04
Noteworthy Findings	NS ¹	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Died or sacrificed moribund	None	None	None	None	None	None	None	None	None	None
Body Weight (%)	---	---	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Food Consumption (%)	ND ²	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Water Consumption (units)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Clinical Observations	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Ophthalmoscopy	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Hematology	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Serum Chemistry	NS	NS	NS	NS	NS	NS	↓ALP	NS	↓ALP	NS
Urinalysis	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Organ Weights	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Gross Pathology	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Histopathology	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Additional Examinations:										
Respiratory physiology measurements	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Cardiovascular measurements	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Postdose Evaluation:										
Recovery Group Findings	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS

¹ NS: nothing significant.² ND: not determined

2.6.7 毒性試験概要表

一般名：ブデソニド／グリコピロニウム臭化物／ホルモテロールフマル酸塩水和物

表 28 3-Month Inhalation Toxicity Study in Dogs with GP MDI^{4.2.3.2.15}

Report Title: Glycopyrrolate and Formoterol Fumarate pMDI: 90-Day Face Mask Inhalation Exposure Study in Beagle Dogs		Study No. FY10-129
Species / Strain: Dogs / Beagle	Duration of Dosing: 90 days	Special Features: MDI
Initial Age: 9 months	Duration of Post-dose: 1 day	GLP Compliance: Yes
Date of First Dose: █████ 20██	Method of Administration: Inhalation Face Mask	
Vehicle / Formulation: glycopyrrolate, propellant HFA-134a, DSPC, calcium chloride in an MDI		
Presumed No Observed Adverse Effect Level: High Dose of 87 µg/kg/day (Male 85.10 µg/kg/day, F 89.23 µg/kg/day)		
Conclusion: Exposure to inhaled glycopyrrolate MDI was confirmed by the presence of glycopyrrolate in the plasma of all treated animals. Inhalation of glycopyrrolate resulted in transient and biologically insignificant changes in various clinical chemistry and haematology parameters in the 90-day study. The No Observed Adverse Effect Level (NOAEL) was the high dose group for the glycopyrrolate only animals. There were no drug-related pre-neoplastic or neoplastic lesions. There were no significant differences between the filtered air controls and the vehicle control group.		

次頁へ続く

2.6.7 毒性試験概要表

一般名：ブデソニド／グリコピロニウム臭化物／ホルモテロールフマル酸塩水和物

Daily Dose:	Air Control		Vehicle Control		High Dose GP (M 85.10 µg/kg/day) (F 89.23 µg/kg/day)	
Number of Animals	M: 4	F: 4	M: 4	F: 4	M: 4	F: 4
Time Period: Min/day	30	30	30	30	30	30
TK at Day 90	ND		ND		5030	7950
C_{max} (pg/mL)	ND		ND		11500	11300
AUC_{last} (pg·h/mL)	NS		NS		NS	
Noteworthy Findings	NS		NS		NS	
Died or sacrificed moribund	None	None	None	None	None	None
Body Weight	NS ¹	NS	NS	NS	NS	↓ over vehicle
Food Consumption	ND ²	ND	ND	ND	ND	ND
Water Consumption	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Clinical Observations	NS		NS		NS	
Ophthalmoscopy	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Hematology	NS ³	NS	NS	NS	NS	NS
Serum Chemistry	NS ³	NS	NS	NS	NS	NS
Urinalysis	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Organ Weights	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Gross Pathology	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Histopathology: Number of exam	4	4	4	4	4	4
Lung:						
Accumulation, alveolar macrophage	0	2	1	0	1	2
Aggregate, alveolar macrophage	0	3	1	2	4	3
Hypertrophy/hyperplasia, epithelial	1	0	1	0	0	1
Hypertrophy/hyperplasia, epithelial with interstitial fibrosis	1	0	0	3	0	1
Additional Examinations, respiratory physiology measurements	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Electrocardiograms	NS	NS	NS	NS	Heart rate↑	Heart rate↑

¹ NS= Nothing Significant² ND= Not Determined³ Some parameters were significantly changed compared with controls but all values were within historical values.

2.6.7 毒性試験概要表

一般名：ブデソニド／グリコピロニウム臭化物／ホルモテロールフマル酸塩水和物

表 29 6-Month Inhalation Toxicity Study in Rats with GP MDI^{4.2.3.2.17}

Report Title: Glycopyrrolate pMDI: 6-Month Nose Only Inhalation Exposure Study In Sprague Dawley Rats		Study No. FY10-120
Species / Strain: Rats / Sprague-Dawley	Duration of Dosing: 181 days	Special Features: MDI
Initial Age: 5-6 weeks	Duration of Post-dose: 1 day	GLP Compliance: Yes
Date of First Dose: [REDACTED] 20 [REDACTED]	Method of Administration: Inhalation Nose Only	
Vehicle / Formulation: glycopyrrolate, propellant HFA-134a, DSPC, calcium chloride in an MDI		
No Observed Adverse Effect Level: High Dose of 548 µg/kg/day (Male 523 µg/kg/day, F 572 µg/kg/day)		
<p>Conclusion: Male and female Sprague-Dawley rats were exposed by inhalation to glycopyrrolate MDI, vehicle MDI or air for up to 120 minutes per day for 6 months (181 consecutive days) with no adverse clinical observations, ophthalmologic, clinical pathology or gross pathology findings related to the test article throughout the study.</p> <p>There was a dose-dependent increased incidence in laryngeal metaplasia among the vehicle and test article exposed animals relative to air controls. This finding is graded as minimal. Minimal laryngeal metaplasia is a common finding in inhalation studies and it was considered as an adaptive, reversible response to particle impaction of any kind in the laryngeal area of rodents. The vehicle group demonstrated a similar incidence and severity to the low dose group. There were minor particle impaction related effects, primarily minimal hyaline degeneration in the nasal turbinates of all groups, including the controls. The incidence was higher in the high dose group compared with vehicle controls. Minimal macrophage accumulation was observed in all groups including the air and vehicle controls, with no significant increase in severity or incidence in the test article exposed groups.</p> <p>There was no significant test article gross pathology or histopathological findings in any non-respiratory tissue. There were no pre-neoplastic or neoplastic findings in any test article exposed group.</p> <p>Based on the absence of adverse findings in any test article exposed groups, the No Observed Adverse Effect Level (NOAEL) of glycopyrrolate MDI was considered to be the high exposure group (ie the maximum feasible dose group) of 523 and 572 µg/kg/day for the male and female Sprague-Dawley rats respectively.</p>		

次頁へ続く

2.6.7 毒性試験概要表

一般名：ブデソニド／グリコピロニウム臭化物／ホルモテロールフマル酸塩水和物

Daily Dose:	Air Control		Vehicle Control		Low Dose (M 65 µg/kg/day) (F 70 µg/kg/day)		Mid Dose (M 264 µg/kg/day) (F 286 µg/kg/day)		High Dose (M 523 µg/kg/day) (F 572 µg/kg/day)	
	M: 15	F: 15	M: 15	F: 15	M: 15	F: 15	M: 15	F: 15	M: 15	F: 15
Number of Animals	M: 15	F: 15	M: 15	F: 15	M: 15	F: 15	M: 15	F: 15	M: 15	F: 15
Time Period: Min/day	120	120	120	120	15	15	60	60	120	120
Plasma level at scheduled necropsy (pg/mL)	ND	ND	ND	ND	34.96	35.09	183.70	357.72	311.11	413.87
Noteworthy Findings	Larynx, lung, and nose pathology		Larynx, lung, and nose pathology		Larynx, lung, and nose pathology		Larynx, lung, and nose pathology		Larynx, lung, and nose pathology	
Died or sacrificed moribund	0	0	0	0	0	0	1 ⁴	0	0	0
Body Weight	NS ¹	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Food Consumption	ND ²	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Water Consumption	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Clinical Observations	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Ophthalmoscopy	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Hematology	NS ³	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Serum Chemistry	NS ³	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Urinalysis	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Organ Weights	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Gross Pathology	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Histopathology Number of exam	15	15	15	15	15	15	14	15	15	15
Larynx: Squamous metaplasia	0	0	0	3	1	2	5	5	10	12
Nasal turbinates, level 2 Hyaline degeneration	1	1	0	1	0	1	5	3	10	14
Nasal turbinates, level 3 Hyaline degeneration	4	3	6	5	5	2	7	6	13	13
Nasal turbinates, level 4 Hyaline degeneration	6	7	6	7	8	10	9	9	8	13

¹ NS= Nothing Significant² ND= Not Determined³ Some parameters were significantly changed compared with controls but all values were within historical values.⁴ One mid-dose male died on study day 28 due to a ruptured bladder that was determined to be unrelated to test article exposure by a veterinary pathologist.

2.6.7 毒性試験概要表

一般名：ブデソニド／グリコピロニウム臭化物／ホルモテロールフマル酸塩水和物

表 30 6-Month Inhalation Toxicity Study in Dogs with GP MDI^{4.2.3.2.18}

Report Title: Glycopyrrolate pMDI: 180-Day Face Mask Inhalation Exposure Study in Beagle Dogs		Study No. FY12-073
Species / Strain: Dogs / Beagle	Duration of Dosing: 180 days	Special Features: MDI
Initial Age: 5-7 months	Duration of Post-dose: 1 day	GLP Compliance: Yes
Date of First Dose: ████████ 20██	Method of Administration: Inhalation Face Mask	
Vehicle / Formulation: Glycopyrrolate, propellant HFA-134a, DSPC, calcium chloride in an MDI		
Presumed No Observed Adverse Effect Level: High Dose of 75 µg/kg/day (M 76.50 µg/kg/day, F 72.77 µg/kg/day)		
Conclusion: Exposure to inhaled glycopyrrolate was confirmed by the presence of glycopyrrolate in the plasma of all treated animals. The histopathological findings of treated animals were indistinguishable from air or vehicle control animals and thus were judged to have no biological significance. Inhalation of glycopyrrolate resulted in transient and biologically insignificant changes in various clinical chemistry and haematology parameters in the 180-day study. There were no significant differences between the filtered air controls and the vehicle control group. The NOAEL (No Observed Adverse Effect Level) was considered to be the high dose group (ie males: 76.50 µg/kg/day and females: 72.77 µg/kg/day).		

次頁へ続く

2.6.7 毒性試験概要表

一般名：ブデソニド／グリコピロニウム臭化物／ホルモテロールフマル酸塩水和物

Daily Dose:	Air Control		Vehicle Control		Low Dose (M 17.72 µg/kg/day) (F 19.44 µg/kg/day)		Mid Dose (M 59.05 µg/kg/day) (F 57.41 µg/kg/day)		High Dose (M 76.50 µg/kg/day) (F 72.77 µg/kg/day)	
	M: 4	F: 4	M: 4	F: 4	M: 4	F: 4	M: 4	F: 4	M: 4	F: 4
Time Period: Min/day	30	30	30	30	10	10	20	20	30	30
TK at Day 180 C _{max} (pg/mL) AUC _{last} (pg·h/mL)	ND		ND		743.03 1994.70	1412.54 2479.80	6536.66 10143.29	3776.50 8836.91	22106.00 30650.48	10631.34 21482.86
Noteworthy Findings	NS		NS		NS		NS		Males: Reduced heart weights	
Died or sacrificed moribund	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Body Weight	NS ¹	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Food Consumption	ND ²	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Water Consumption	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Clinical Observations										
Alopecia	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0
Hunched posture	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Lethargy	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Dehydration	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Abrasions	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0
Ocular discharge/irritation	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
Green/bloody stool	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0
Vomiting	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Injured toes	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0
Limping	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
Ophthalmoscopy	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Hematology	NS ³	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Serum Chemistry	NS ³	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Urinalysis	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS

次頁へ続く

2.6.7 毒性試験概要表

一般名：ブデソニド／グリコピロニウム臭化物／ホルモテロールフマル酸塩水和物

Daily Dose:	Air Control		Vehicle Control		Low Dose (M 17.72 µg/kg/day) (F 19.44 µg/kg/day)		Mid Dose (M 59.05 µg/kg/day) (F 57.41 µg/kg/day)		High Dose (M 76.50 µg/kg/day) (F 72.77 µg/kg/day)	
	M: 4	F: 4	M: 4	F: 4	M: 4	F: 4	M: 4	F: 4	M: 4	F: 4
Number of Animals	M: 4	F: 4	M: 4	F: 4	M: 4	F: 4	M: 4	F: 4	M: 4	F: 4
Organ Weights										
Heart (g)	84.0	65.9	88.2	70.8	79.2	67.2	78.6	64.4	72.8*	64.1
Liver (g)	336.0	279.0	325.0	300.8	280.9	270.6	340.2	274.3	295.4	315.6
Gross Pathology	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Histopathology										
Heart										
Mineralization (Aortic Root)	0	0	2	1	0	0	0	0	1	0
Lung										
Hypertrophy/Hyperplasia, Epithelial with Fibrosis (Focal)	1	1	2	1	2	0	1	0	0	1
Liver										
Inflammation, Chronic	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0
Respiratory physiology measurements	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Electrocardiograms	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS

¹ NS= Nothing Significant² ND= Not Determined³ Some parameters were significantly changed compared with controls but all values were within historical values.

*: p-value ≤ 0.05 vs Vehicle control

2.6.7 毒性試験概要表

一般名：ブデソニド/グリコピロニウム臭化物/ホルモテロール fumarate 水和物

2.6.7.7.4 ブデソニド/ホルモテロール

表 31 14-Day Inhalation Toxicity Study in Rats with BFF MDI^{4.2.3.2.8}

Report Title: Budesonide/Formoterol Fumarate pMDI: 14-Day Nose-Only Inhalation Exposure Study with Recovery in Rats		Study No. FY14-034
Species / Strain: Rats / Sprague-Dawley	Duration of Dosing: 14 days	GLP Compliance: Yes
Initial Age: 8-9 weeks	Duration of Post-dose: 14 days	Special Features: MDI
Date of First Dose: [REDACTED] 20[REDACTED]	Method of Administration: Inhalation Nose Only	
Vehicle / Formulation: budesonide, formoterol fumarate, propellant HFA-134a, DSPC, calcium chloride in an MDI		
No Observed Adverse Effect Level: Not determined		
<p>Conclusion: Exposure to inhaled budesonide/formoterol fumarate (BFF) in male and female SD rats via nose-only inhalation for two weeks lead to histopathological changes in larynx, lung, adrenal glands, liver, stomach and lymphoid tissues (including the thymus, spleen, lymph nodes and bone marrow). The non-respiratory responses were characteristic of the effects of corticosteroids. Corroborative changes were present in organ weights, as well as in haematology and serum chemistry parameters. Changes within the respiratory tract were minimal and considered non-specific effects. Body weight reduction occurred in a dose responsive fashion. Early removal occurred in the Low dose (1F) and High dose (1M, 3F) groups, most probably due to systemic bacterial infection resulting from the immunosuppressive effects of budesonide. Evidence of recovery was present in all affected parameters, though some animals in all dose groups had not fully recovered to Air and Vehicle control values. Reductions in adrenal and thymus weights tended to persist (particularly in females). Decreases in total white blood cell count and circulating lymphocytes also persisted in recovery animals at all dose levels. Histologic evidence of recovery was present in affected tissues in most animals. Except for a single female, tissues from Low dose group animals were within normal limits histologically. Stomach ulceration was observed in both males and females of the Mid and High dose groups from the main study animals, but one female from the Vehicle group only in the recovery phase. Changes in tissues and clinical pathology in this study were characteristic of the well-described effects of corticosteroids, and were likely in response to the budesonide component present in the BFF combination test article. A clear No Observed Adverse Effect Level (NOAEL) was not observed in the study.</p>		

次頁へ続く

2.6.7 毒性試験概要表

一般名：ブデソニド／グリコピロニウム臭化物／ホルモテロール fumarate 水和物

Daily Dose ($\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$) (budesonide / formoterol fumarate)	Air Control		Vehicle Control		450 / 13.19	480 / 14.00	1500 / 43.79	1580 / 46.35	3060 / 89.83	3260 / 95.47
Number of Animals										
Main Recovery	M: 10 M: 5	F: 10 F: 5	M: 10 M: 5	F: 10 F: 5	M: 10 M: 5	F: 10 F: 5	M: 10 M: 5	F: 10 F: 5	M: 10 M: 5	F: 10 F: 5
Toxicokinetics ^a:										
Budesonide C_{max} (ng/mL)					59.6	26.4	75.3	54.9	215	395
Formoterol fumarate C_{max} (ng/mL)					0.263	0.176	1.89	2.80	1.95	2.34
Noteworthy Findings										
Died or Sacrificed Moribund	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Body Weight Gain (%) ^b	(g)		(g)							
Days 0-8	48.7	18.0	59.3	18.6	-53.4	-158**	-97.7**	-173**	-112**	-230**
Days 8-15	14.1	1.1	7.9	1.7	-152**	-1240**	-295**	-1330**	-312**	-1190**
Clinical Observations ^c	-	-	-	-	-	++	++	+++	+	+++
Haematology										
Eosinophils ($10^3/\mu\text{L}$)	0.07	0.09	0.06	0.07	0.06	0.02	0.04	0.02	0.01	0.00
Lymphocytes ($10^3/\mu\text{L}$)	6.13	5.32	6.09	5.39	2.69	1.48	1.51	0.82	0.93	0.43
Monocytes ($10^3/\mu\text{L}$)	0.15	0.16	0.12	0.17	0.24	0.44	0.44	0.46	0.40	0.47
Neutrophils ($10^3/\mu\text{L}$)	0.78	0.66	0.66	0.49	1.23	4.05	3.45	3.14	4.37	5.56

次頁へ続く

2.6.7 毒性試験概要表

一般名：ブデソニド／グリコピロニウム臭化物／ホルモテロール fumarate 酸塩水和物

Daily Dose ($\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$) (budesonide / formoterol fumarate)	Air Control		Vehicle Control		450 / 13.19	480 / 14.00	1500 / 43.79	1580 / 46.35	3060 / 89.83	3260 / 95.47
Number of Animals										
Main Recovery	M: 10 M: 5	F: 10 F: 5	M: 10 M: 5	F: 10 F: 5	M: 10 M: 5	F: 10 F: 5	M: 10 M: 5	F: 10 F: 5	M: 10 M: 5	F: 10 F: 5
Serum Chemistry										
Albumin (g/dL)	4.2	4.8	4.2	4.5	4.7	4.9	4.7	5.2	4.8	5.2
ALT (IU/L)	52	43	46	48	51	80	61	100	69	89
AST (IU/L)	125	122	138	111	120	170	130	214	221	159
Cholesterol (mg/dL)	62	69	62	74	64	77	87	78	77	120
Total bilirubin (mg/dL)	0.1	0.2	0.1	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.3	0.2
Total protein (g/dL)	6.0	6.5	5.9	6.1	6.7	6.9	6.5	6.8	6.3	6.8
Triglycerides (mg/dL)	42	53	42	47	69	83	111	244	121	98
Organ Weights (%)^{b, d}	(g)		(g)							
Adrenals	0.054	0.053	0.046	0.051	-23.4	-39.6	-53.8	-49.4	-61.5	-54.5
Spleen	0.659	0.491	0.657	0.474	-28.8	-44.4	-46.7	-43.4	-79.3	-69.1
Thymus	0.489	0.424	0.459	0.409	-70.0	-80.0	-74.0	-69.4	-73.4	-72.3
Histopathology										
Number examined (unless indicated otherwise)	10	10	10	10	10	10	10	10	10	9
Adrenal glands Atrophy, cortical (zona fasciculata/reticularis)										
Minimal	0	0	0	0	1	2	0	3	0	0
Mild	0	0	0	0	7	8	0	6	0	1
Moderate	0	0	0	0	2	0	10	1	10	8

次頁へ続く

2.6.7 毒性試験概要表

一般名：ブデソニド／グリコピロニウム臭化物／ホルモテロール fumarate 水和物

Daily Dose ($\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$) (budesonide / formoterol fumarate)	Air Control		Vehicle Control		450 / 13.19	480 / 14.00	1500 / 43.79	1580 / 46.35	3060 / 89.83	3260 / 95.47
Number of Animals										
Main Recovery	M: 10 M: 5	F: 10 F:5	M: 10 M: 5	F: 10 F:5	M: 10 M: 5	F: 10 F:5	M: 10 M: 5	F: 10 F:5	M: 10 M: 5	F: 10 F:5
Bone, femur w. marrow					(0)	(0)	(0)	(0)		
Decreased cellularity										
Mild	0	0	0	0					7	9
Moderate	0	0	0	0					3	0
Bone, sternum w. marrow					(0)	(0)	(0)	(0)		
Cellularity, decreased										
Minimal	0	0	0	0					1	0
Mild	0	0	0	0					7	9
Moderate	0	0	0	0					1	0
Larynx										
Metaplasia, squamous										
Minimal	0	0	2	0	1	0	0	0	3	4
Liver										
Alteration, hepatocellular (periportal)										
Minimal	0	0	0	0	0	0	1	0	3	0
Mild	0	0	0	2	0	0	2	1	5	0
Moderate	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Lipidosis										
Minimal	0	0	0	0	0	1	3	1	4	0
Mild	0	0	0	0	0	5	1	2	0	3
Moderate	0	0	0	0	0	1	0	5	1	4
Severe	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0

次頁へ続く

2.6.7 毒性試験概要表

一般名：ブデソニド／グリコピロニウム臭化物／ホルモテロール fumarate 水和物

Daily Dose ($\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$) (budesonide / formoterol fumarate)	Air Control		Vehicle Control		450 / 13.19	480 / 14.00	1500 / 43.79	1580 / 46.35	3060 / 89.83	3260 / 95.47
Number of Animals										
Main Recovery	M: 10 M: 5	F: 10 F: 5	M: 10 M: 5	F: 10 F: 5	M: 10 M: 5	F: 10 F: 5	M: 10 M: 5	F: 10 F: 5	M: 10 M: 5	F: 10 F: 5
Lungs Aggregates, alveolar macrophage Minimal	1	2	2	1	0	3	2	4	4	6
Lymph nodes, mandibular Decrease, lymphocyte (cortex) Minimal Mild Moderate Severe	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	(0)	(0)	(0)	(0)	1 6 1 1	0 7 1 0
Lymph nodes, mesenteric Decrease, lymphocyte (cortex) Minimal Mild Moderate	0 0 0	0 0 0	0 0 0	0 0 0	(0)	(0)	(0)	(0)	2 6 1	1 6 2
Lymph nodes, tracheobronchial Decrease, lymphocyte (cortex) Minimal Mild Moderate Severe	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	(9)	(7)	0 4 0 0	5 2 0 0	0 5 1 0	0 0 4 3

次頁へ続く

2.6.7 毒性試験概要表

一般名：ブデソニド／グリコピロニウム臭化物／ホルモテロール fumarate 水和物

Daily Dose (µg/kg/day) (budesonide / formoterol fumarate)	Air Control		Vehicle Control		450 / 13.19	480 / 14.00	1500 / 43.79	1580 / 46.35	3060 / 89.83	3260 / 95.47
Number of Animals										
Main Recovery	M: 10 M: 5	F: 10 F:5	M: 10 M: 5	F: 10 F:5	M: 10 M: 5	F: 10 F:5	M: 10 M: 5	F: 10 F:5	M: 10 M: 5	F: 10 F:5
Spleen Decrease, lymphocyte (PALS, follicles)										
Minimal	0	0	0	0	0	2	0	0	3	0
Mild	0	0	0	0	0	0	0	0	5	7
Moderate	0	0	0	0	0	0	1	1	2	2
Stomach Degeneration, epithelial (with erosion) / Ulceration					(0)	(2)	(2)	(3)		
Minimal	0	0	0	0		0	0	0	1	3
Mild	0	0	0	0		0	2	2	1	3
Moderate	0	0	0	0		0	0	1	1	0
Thymus Decrease, lymphocyte (cortex)							(9)	(9)		
Minimal	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0
Mild	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0
Moderate	0	0	0	0	2	5	0	0	0	0
Severe	0	0	0	0	0	5	9	9	10	9

次頁へ続く

2.6.7 毒性試験概要表

一般名：ブデソニド／グリコピロニウム臭化物／ホルモテロール fumarate 酸塩水和物

Daily Dose ($\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$) (budesonide / formoterol fumarate)	Air Control		Vehicle Control		450 / 13.19	480 / 14.00	1500 / 43.79	1580 / 46.35	3060 / 89.83	3260 / 95.47
Number of Animals										
Main Recovery	M: 10 M: 5	F: 10 F: 5	M: 10 M: 5	F: 10 F: 5	M: 10 M: 5	F: 10 F: 5	M: 10 M: 5	F: 10 F: 5	M: 10 M: 5	F: 10 F: 5
Post-dose Evaluation: Noteworthy findings										
Died or Sacrificed Moribund	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Body Weight Gain (%)^b	(g)		(g)							
Days 0-15	77.0	39.5	86.3	28.7	-96.5**	-152*	-110**	-161**	-126**	-249**
Days 15-29	46.1	7.1	42.6	2.0	+35.9	+1240**	+59.2**	+1605**	+71.8**	+975**
Haematology										
Lymphocytes ($10^3/\mu\text{L}$)	7.84	5.02	8.28	5.65	4.01	2.75	4.14	2.28	2.81	2.04
Organ Weights (%)^{b, d}	(g)		(g)							
Adrenals	0.050	0.051	0.056	0.062	-14.5	-11.6	-33.0	-29.4	-30.1	-37.1
Thymus	0.494	0.333	0.455	0.441	-14.8	-30.3	-27.9	-57.7	-46.8	-71.8
Histopathology										
Number examined (unless indicated otherwise)	5	5	5	5	5	5	5	5	5	4
Adrenal glands Atrophy, cortical (zona fasciculata/reticularis) Minimal	0	0	0	0	0	1	(4) 1	0	0	0

次頁へ続く

2.6.7 毒性試験概要表

一般名：ブデソニド／グリコピロニウム臭化物／ホルモテロール fumarate 水和物

Daily Dose (µg/kg/day) (budesonide / formoterol fumarate)	Air Control		Vehicle Control		450 / 13.19	480 / 14.00	1500 / 43.79	1580 / 46.35	3060 / 89.83	3260 / 95.47
Number of Animals										
Main Recovery	M: 10 M: 5	F: 10 F:5	M: 10 M: 5	F: 10 F:5	M: 10 M: 5	F: 10 F:5	M: 10 M: 5	F: 10 F:5	M: 10 M: 5	F: 10 F:5
Bone, femur w. marrow Decreased cellularity Mild	0	0	0	0	(0)	(0)	(0)	(0)	0	1
Bone, sternum w. marrow Cellularity, decreased Minimal	0	0	0	0	(0)	(0)	(0)	(0)	0	1
Liver Lipidosis										
Minimal	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3
Mild	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
Moderate	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
Lungs Aggregates, alveolar macrophage										
Minimal	0	1	0	0	1	3	2	0	0	1
Mild	0	0	0	0	0	0	1	0	1	3
Lymph nodes, mandibular Decrease, lymphocyte (cortex) Minimal	0	0	0	0	(0)	(0)	(0)	(0)	0	1
Lymph nodes, mesenteric Decrease, lymphocyte (cortex) Minimal	0	0	0	0	(0)	(0)	(0)	(0)	0	2

次頁へ続く

2.6.7 毒性試験概要表

一般名：ブデソニド／グリコピロニウム臭化物／ホルモテロール fumarate 水和物

Daily Dose ($\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$) (budesonide / formoterol fumarate)	Air Control		Vehicle Control		450 / 13.19	480 / 14.00	1500 / 43.79	1580 / 46.35	3060 / 89.83	3260 / 95.47
Number of Animals										
Main Recovery	M: 10 M: 5	F: 10 F:5	M: 10 M: 5	F: 10 F:5	M: 10 M: 5	F: 10 F:5	M: 10 M: 5	F: 10 F:5	M: 10 M: 5	F: 10 F:5
Lymph nodes, tracheobronchial			(4)							(3)
Decrease, lymphocyte (cortex)										
Minimal	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Severe	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Thymus							(4)			
Decrease, lymphocyte (cortex)										
Mild	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
Moderate	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
Severe	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0

M = male, F = female.

- No noteworthy findings; + Mild; ++ Moderate; +++ Marked.

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$. Body weight data analysed using Dunnett's Test.

^a Day 14 mean data shown: limited number of sampling times precluded calculation of AUC values. Additional (satellite) animals were used for the toxicokinetic assessment.

^b For controls, group means are shown, for treated groups, percent differences from placebo controls are shown. Statistical significance is based on actual data (not on the percent differences).

^c Key adverse clinical observations were thin appearance and skin lesions, with some instances of hair loss.

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

2.6.7 毒性試験概要表

一般名：ブデソニド／グリコピロニウム臭化物／ホルモテロール fumarate 水和物

表 32 14-Day Inhalation Toxicity Study in Dogs with BFF MDI^{4.2.3.2.9}

Report Title: Glycopyrrolate:Formoterol Fumarate:Budesonide pMDI And Budesonide:Formoterol Fumarate pMDI: 14-Day Face Mask Inhalation Exposure Study with Recovery in Male And Female Beagle Dogs		Study No. FY14-036A
Species / Strain: Dogs / Beagle	Duration of Dosing: 14 days	Special Features: MDI
Initial Age: 5-7 months	Duration of Post-dose: 14 days	GLP Compliance: Yes
Date of First Dose: ████████ 20██	Method of Administration: Inhalation Face Mask	
Vehicle / Formulation: budesonide, formoterol fumarate, propellant HFA-134a, DSPC, calcium chloride in an MDI		
Presumed No Observed Adverse Effect Level: Not determined		
<p>Conclusion: Exposure to inhaled budesonide/formoterol fumarate (BFF) in dogs for 14 days resulted in corroborative changes in clinical pathology, organ weights, and histopathology that were characteristic responses to corticosteroids, e.g. budesonide in the formulation. The ‘stress’ leukogram, e.g. increased neutrophils and decreased lymphocytes in the circulation was a typical finding following exposure to budesonide. Changes in white blood cell types with lower cell numbers, such as monocytes and eosinophils, showed higher variability probably due to limited group size or lower sensitivity of canine to budesonide as a testing species in general. Organ weight changes were mainly reflected in decrease of adrenal glands and thymus, a suppression resulting from budesonide exposure, as well as increase in liver weight which might be due to increased demand for metabolism of budesonide and/or altered fat/glucose metabolism. Consistent findings were observed from the microscopic examinations, including adrenal cortical atrophy, hepatocellular alteration, as well as hypocellularity in the cortex of thymus and lymph nodes. Reduced number of lymphocytes in both circulation and immune tissues was the result of immunosuppression from budesonide. The presence of Formoterol fumarate in the formulation did not seem to alter the overall pathological response to the exposures. After a 14 day recovery period, some evidence of recovery was present in all affected tissues in most animals. Haematology, serum chemistry and most organ weight (except thymus) parameters had all returned to normal. Microscopically, the liver had returned to normal while adrenal and thymic changes were reduced, but persistent to some degree. Clinical observation mainly revealed liquid or soft stools after repeated exposures. No test article related changes were found in body weights, ophthalmology, ECG, or respiratory parameters.</p> <p>A No Observed Adverse Effect Level (NOAEL) was not defined in this study for BFF MDI.</p>		

次頁へ続く

2.6.7 毒性試験概要表

一般名：ブデソニド／グリコピロニウム臭化物／ホルモテロール fumarate 酸塩水和物

Daily Dose ($\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$) (budesonide / formoterol fumarate)	Air Control		Vehicle Control		88.1 / 3.01	89.2 / 3.05	174 / 6.01	176 / 6.07	304 / 10.2	308 / 10.4
Number of Animals										
Main Recovery	M: 4 M: 2	F: 4 F: 2	M: 3 M: 2	F: 3 F: 2	M: 3 M: 2	F: 3 F: 2	M: 3 M: 2	F: 3 F: 2	M: 4 M: 2	F: 4 F: 2
Toxicokinetics^a:										
Budesonide										
AUC _(last) (ng·h/mL)					12.4	11.7	25.6	29.7	39.7	28.5
C _{max} (ng/mL)					8.28	10.5	23.6	33.1	43.9	33.8
Formoterol fumarate										
AUC _(last) (ng·h/mL)					0.299	0.576	0.867	0.958	1.32	1.65
C _{max} (ng/mL)					0.136	0.228	0.395	0.625	1.10	1.48
Noteworthy Findings										
Died or Sacrificed Moribund	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Clinical Observations^b	-	-	-	-	+	+	++	++	++	++
Haematology										
Eosinophils (10 ³ / μL)	0.16	0.21	0.13	0.25	0.08	0.05*	0.09	0.07*	0.07	0.07*
Large unstained cells (10 ³ / μL)	0.03	0.03	0.02	0.02	0.05	0.08	0.14*	0.08	0.08	0.18**
Monocytes (10 ³ / μL)	0.34	0.69	0.40	0.30	0.54	0.65	0.89*	0.93	0.78	1.59*
Neutrophils (10 ³ / μL)	3.92	6.64	3.91	4.34	4.91	5.67	7.39*	10.45	4.96	10.79
Serum Chemistry										
ALP (IU/L)	114	119	103	129	130	168	136	177	200*	187
Cholesterol (g/dL)	147	153	155	160	137	149	94*	185	154	146
Globulin (g/dL)	1.8	2.0	1.7	1.8	1.9	2.0	1.8	2.2*	2.0*	2.2*
Total protein (g/dL)	5.0	5.3	5.0	5.1	5.6*	5.5	5.0	5.8**	5.6*	5.8**
Triglycerides (mg/dL)	48	51	33	56	65	62	57	80	98**	64

次頁へ続く

2.6.7 毒性試験概要表

一般名：ブデソニド/グリコピロニウム臭化物/ホルモテロール fumarate 酸塩水和物

Daily Dose (µg/kg/day) (budesonide / formoterol fumarate)	Air Control		Vehicle Control		88.1 / 3.01	89.2 / 3.05	174 / 6.01	176 / 6.07	304 / 10.2	308 / 10.4
Number of Animals										
Main Recovery	M: 4 M: 2	F: 4 F: 2	M: 3 M: 2	F: 3 F: 2	M: 3 M: 2	F: 3 F: 2	M: 3 M: 2	F: 3 F: 2	M: 4 M: 2	F: 4 F: 2
Organ Weights (%)^{c, d}	(g)		(g)							
Adrenal	1.077	1.057	0.937	0.942	-35.1	-24.5	-26.1	-0.3	-39.6*	-36.1**
Liver	265.142	235.030	281.134	248.646	+23.9	+6.1	+26.4	+22.1	+37.6**	+36.0*
Lung, Right Cranial	10.968	10.813	11.218	10.372	-18.1*	+12.5	-10.7	-4.8	-11.7	-8.7
Thymus	10.395	7.233	7.199	9.171	-39.9	-69.9**	-42.3	-60.0*	-60.9	-71.3**
Histopathology										
Number examined	4	4	3	3	3	3	3	3	4	4
Adrenals										
Cortical atrophy (Zona Fasciculata/Reticularis)										
Minimal	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
Mild	0	0	0	0	2	2	3	3	3	4
Moderate	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Liver										
Periportal hepatocellular alteration										
Mild	0	0	0	0	3	3	1	2	0	1
Moderate	0	0	0	0	0	0	2	1	4	3
Lung										
Inflammation, chronic (peribronchovascular)										
Minimal	4	4	2	3	3	1	2	1	2	2
Inflammation, mixed (alveolar)										
Minimal	3	4	2	3	0	1	0	1	3	1

次頁へ続く

2.6.7 毒性試験概要表

一般名：ブデソニド／グリコピロニウム臭化物／ホルモテロール fumarate 水和物

Daily Dose (µg/kg/day) (budesonide / formoterol fumarate)	Air Control		Vehicle Control		88.1 / 3.01	89.2 / 3.05	174 / 6.01	176 / 6.07	304 / 10.2	308 / 10.4
Number of Animals										
Main Recovery	M: 4 M: 2	F: 4 F: 2	M: 3 M: 2	F: 3 F: 2	M: 3 M: 2	F: 3 F: 2	M: 3 M: 2	F: 3 F: 2	M: 4 M: 2	F: 4 F: 2
Lymph node, tracheobronchial										
Decreased cortical lymphocytes										
Minimal	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
Mild	0	0	0	0	1	2	3	3	0	0
Thymus										
Decreased cortical lymphocytes										
Moderate	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
Severe	0	0	0	0	3	2	3	3	4	4
Post-dose Evaluation:										
Number Evaluated	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Noteworthy findings										
Haematology										
Mean corpuscular haemoglobin concentration (g/dL)	32.8	32.9	33.2	32.7	33.1	33.3	33.0	33.1	33.5	34.4*
Serum Chemistry										
Phosphorus (mg/dL)	6.5	6.2	6.6	7.1	6.7	6.6	7.3	6.5	8.2*	6.2
Organ Weights (%)^{b, d}	(g)		(g)							
Kidneys	39.199	36.599	52.535	36.236	-4.7	+13.6	-21.3*	+0.8	-11.5	+8.6
Ovaries		0.556		0.395		+54.7*		+12.9		+14.9

次頁へ続く

2.6.7 毒性試験概要表

一般名：ブデソニド／グリコピロニウム臭化物／ホルモテロール fumarate 酸塩水和物

Daily Dose (µg/kg/day) (budesonide / formoterol fumarate)	Air Control		Vehicle Control		88.1 / 3.01	89.2 / 3.05	174 / 6.01	176 / 6.07	304 / 10.2	308 / 10.4
Number of Animals										
Main Recovery	M: 4 M: 2	F: 4 F: 2	M: 3 M: 2	F: 3 F: 2	M: 3 M: 2	F: 3 F: 2	M: 3 M: 2	F: 3 F: 2	M: 4 M: 2	F: 4 F: 2
Histopathology										
Number examined	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Adrenals Cortical atrophy (Zona Fasciculata/Reticularis)										
Minimal	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0
Mild	0	0	0	0	1	2	2	0	2	2
Lung Inflammation, chronic (peribronchovascular)										
Minimal	2	1	2	1	2	1	2	2	2	1
Inflammation, mixed (alveolar)										
Minimal	1	0	0	1	1	1	0	0	2	1
Mild	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
Thymus Decreased cortical lymphocytes										
Minimal	0	0	0	0	2	1	1	1	0	0
Mild	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0
Moderate	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
Severe	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1

M = male, F = female.

- No noteworthy findings; + Mild; ++ Moderate.

* p<0.05; ** p<0.01. Haematology, serum chemistry and organ weight data analysed using ANOVA/Dunnett's Test.

^a Day 14 mean data shown.

^b The most common clinical observations observed throughout the study were related to liquid or soft stool.

^c For controls, group means are shown, for treated groups, percent differences from placebo controls are shown. Statistical significance is based on actual data (not on the percent differences).

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

2.6.7 毒性試験概要表

一般名：ブデソニド／グリコピロニウム臭化物／ホルモテロール fumarate 酸塩水和物

表 33 3-Month Inhalation Toxicity Study in Dogs with BFF MDI^{4.2.3.2.16}

Report Title: Budesonide:Glycopyrronium:Formoterol Fumarate: pMDI and Budesonide:Formoterol Fumarate pMDI: 90-Day Face Mask Inhalation Exposure Study in Male and Female Beagle Dogs		Study No. FY14-148A
Species / Strain: Dogs / Beagle	Duration of Dosing: 90 days	Special Features: MDI
Initial Age: approximately 5-7 months	Duration of Post-dose: None	GLP Compliance: Yes
Date of First Dose: [REDACTED] 20 [REDACTED]	Method of Administration: Inhalation Face Mask	
Vehicle / Formulation: budesonide, formoterol fumarate, propellant HFA-134a, DSPC, calcium chloride in an MDI		
Presumed No Observed Adverse Effect Level: Not determined		
<p>Conclusion: Exposure to inhaled budesonide/formoterol fumarate (BFF) MDI in male or female beagle dogs via face mask inhalation for 90 consecutive days resulted in tissue responses in adrenal glands, liver, and thymus, consistent with the effects of corticosteroids. Such changes were usually corroborative across several different pathology endpoints (e.g. organ weights, clinical pathology and histopathology), though perfect correlations and/or a clear dose response were not always seen in this study. No consistent evidence of gender disparity across pathology endpoints was present. Respiratory tract effects were not seen in any dose group.</p> <p>Specific organ weight changes identified and attributed to exposure included decreased adrenal gland weights, increased liver weights and decreased thymus weights. The weight changes corresponded to histologic findings of adrenal cortical atrophy (zona fasciculata and zona reticularis), hepatocellular alteration consistent with glycogen accumulation and/or increased metabolic activity (an adaptive response), and thymic cortex lymphocyte decreases. Changes in clinical pathology parameters attributed to exposure included minor alterations in serum chemistry (minor increases in the liver enzymes alkaline phosphatase and gamma glutamyl transferase, and minor albumin and triglyceride elevations).</p> <p>A clear No Observed Adverse Effect Level (NOAEL) was not observed in this study. However overall the few possible Low dose effects for BFF were minimal in nature. There was a dose related change associated with the known effects of budesonide and/or formoterol fumarate. At the Low dose level for BFF, there were minimal differences from controls. Adrenal cortical changes seen in higher dose groups were not present, while liver hepatocellular alteration (an adaptive response) was present in a minority (2/8) of animals at minimal severity in the Low dose groups. Thymic cortical lymphocyte decreases persisted in most (6/8) animals at minimal severity in the Low dose groups. Biologically significant elevations in serum chemistry parameters were not present in Low dose animals.</p> <p>The changes in tissues and clinical pathology in this study were characteristic of the well described effects of corticosteroids, and were likely in response to the budesonide component present in BFF.</p>		

次頁へ続く

2.6.7 毒性試験概要表

一般名：ブデソニド／グリコピロニウム臭化物／ホルモテロール fumarate 酸塩水和物

Daily Dose ($\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$) (budesonide / formoterol fumarate)	Air Control		Vehicle Control		3.02 / 0.10	3.16 / 0.11	13.48 / 0.47	14.08 / 0.49	67.73 / 2.28	71.34 / 2.40
Number of Animals	M: 4	F: 4	M: 4	F: 4	M: 4	F: 4	M: 4	F: 4	M: 4	F: 4
Toxicokinetics ^a:										
Budesonide										
AUC _(last) (ng·h /mL)					0.509	0.399	2.88	3.76	7.07	8.98
C _{max} (ng/mL)					0.625	0.732	3.09	4.62	5.19	8.62
Formoterol fumarate										
AUC _(last) (ng·h /mL)					ND	ND	0.0557	0.0529	0.0797	0.103
C _{max} (ng/mL)					ND	ND	0.0381	0.0353	0.0405	0.0457
Noteworthy Findings										
Died or Sacrificed Moribund	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Body Weight Gain (%) ^b	(kg)		(kg)							
Days 0-91	1.5	0.8	0.9	1.5	+33.3	-53.3	-88.9	-73.3*	-11.1	-20.0
Clinical Observations ^c	++	+	++	+	++	+	++	+	++	+
Serum Chemistry										
Albumin (g/dL)	3.4	3.5	3.5	3.5	3.5	3.6	3.8*	3.7	4.0**	3.9**
ALP (IU/L)	89	59	82	92	60	75	67	104	200*	187*
Triglycerides (mg/dL)	41	39	39	42	33	37	48	69*	93	85*
Organ Weights (%) ^{b,d}	(g)		(g)							
Adrenal	1.13	1.14	1.08	1.14	0.79*	0.71	0.49**	0.54**	0.54**	0.49**
Liver	344	286	373	286	342	259	379	278	495*	386*
Thymus	14.5	9.46	8.51	11.7	10.1	4.69**	5.85	4.78**	5.34	5.35**

次頁へ続く

2.6.7 毒性試験概要表

一般名：ブデソニド／グリコピロニウム臭化物／ホルモテロール fumarate 酸塩水和物

Daily Dose (µg/kg/day) (budesonide / formoterol fumarate)	Air Control		Vehicle Control		3.02 / 0.10	3.16 / 0.11	13.48 / 0.47	14.08 / 0.49	67.73 / 2.28	71.34 / 2.40
Number of Animals	M: 4	F: 4	M: 4	F: 4	M: 4	F: 4	M: 4	F: 4	M: 4	F: 4
Histopathology										
Number examined	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
Adrenals										
Cortical atrophy (Zona Fasciculata/Reticularis)										
Mild	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
Moderate	0	0	0	0	0	0	3	1	4	4
Liver										
Periportal hepatocellular alteration										
Minimal	0	0	0	0	0	2	2	1	0	0
Mild	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
Moderate	0	0	0	0	0	0	0	0	4	3
Thymus										
Decreased cortical lymphocytes										
Minimal	0	0	0	0	2	4	0	0	0	0
Mild	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
Moderate	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
Severe	0	0	0	0	0	0	4	2	4	4

M = male, F = female.

- No noteworthy findings; + Mild; ++ Moderate.

* p<0.05; ** p<0.01. Body weight, serum chemistry and organ weight data analysed using Dunnett's Test.

^a Day 90 mean data is shown.

^b For controls, group means are shown, for treated groups, percent differences from placebo controls are shown. Statistical significance is based on actual data (not on the percent differences).

^c Clinical observations primarily consisted of liquid/soft stools.

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

2.6.7 毒性試験概要表

一般名：ブデソニド/グリコピロニウム臭化物/ホルモテロールフマル酸塩水和物

2.6.7.7.5 ブデソニド/グリコピロニウム

表 34 14-Day Inhalation Toxicity Study in Rats with BGP MDI^{4.2.3.2.10}

Report Title: Budesonide:Glycopyrronium pMDI: 14-Day Nose-Only Inhalation Exposure Study with Recovery in Rats		Study No. FY15-040
Species / Strain: Rats / Sprague-Dawley	Duration of Dosing: 14 days	GLP Compliance: Yes
Initial Age: at least 9 weeks	Duration of Post-dose: 14 days	Special Features: MDI
Date of First Dose: [REDACTED] 20 [REDACTED]	Method of Administration: Inhalation Nose Only	
Vehicle / Formulation: budesonide, glycopyrrolate, propellant HFA-134a, DSPC, calcium chloride in an MDI		
No Observed Adverse Effect Level: Not determined		
<p>Conclusion: Exposure of SD rats to a MDI delivering budesonide and glycopyrrolate (BGP) via nose only inhalation for 14 consecutive days resulted in findings that were mainly due to the systemic effects of glucocorticoid (budesonide). Mortality and/or morbidity occurred in the Mid (2 found dead) and High dose groups (1 moribund and 3 found dead), most probably due to bacterial infections resulting from the budesonide related immunosuppression. All treated groups of both genders exhibited decreased body weight in a dose-dependent manner. In the recovery phase, body weight decreases became increasingly smaller relative to control weights. However, all treated groups of both genders still had significantly smaller body weights than both of the control groups at the conclusion of the recovery period on Day 29. Changes in the respiratory tract were minimal, including metaplasia of squamous epithelium in the larynx and accumulation of alveolar macrophages. Both findings show clear evidence of recovery in animals that were allowed 14-day recovery period, however both persisted across all three dose levels. The immunosuppressive effects of Budesonide were demonstrated consistently among multiple evaluation criteria including the typical corticosteroid leukogram in clinical pathology, reduced organ weights of spleen/thymus/adrenal gland, and the corresponding histopathological changes such as atrophy of adrenal gland as well as hypocellularity in the immune system. As expected, withdrawal of BGP exposure did not reverse the immunosuppressive effects instantly although evidence of recovery was clearly observed in all the parameters. Changes in metabolism after exposure were demonstrated by significant increase of TRIG and GLU, as well as decrease of potassium in the circulation. Parameters of liver function, e.g. ALT and AST, were also increased in both genders of the High dose group and females from all dose levels. Consistently, hepatocellular lipidosis was observed in all three dose groups of the main study animals, with 100% recovery in the Low dose group and some recovery in the Mid and High dose animals. In addition, a dose dependent response was observed in stomach ulceration across all three dose groups in the main study animals. In conclusion, a No Observed Adverse Effect Level (NOAEL) was not defined in this study.</p>		

次頁へ続く

2.6.7 毒性試験概要表

一般名：ブデソニド／グリコピロニウム臭化物／ホルモテロールフマル酸塩水和物

Daily Dose ($\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$) (budesonide / glycopyrrolate)	Air Control		Vehicle Control		621 / 33.3	660 / 35.5	2110 / 114	2260 / 122	4350 / 235	4650 / 251
Number of Animals										
Main Recovery	M: 10 M: 5	F: 10 F: 5	M: 10 M: 5	F: 10 F: 5	M: 10 M: 5	F: 10 F: 5	M: 10 M: 5	F: 10 F: 5	M: 10 M: 5	F: 10 F: 5
Toxicokinetics ^a: C_{max} (ng/mL) Budesonide Glycopyrronium					91.3 0.177	92.9 0.431	80.8 1.29	216 1.56	868 3.62	155 1.66
Noteworthy Findings										
Died or Sacrificed Moribund	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1
Body Weight (g) ^b – Day 15	340.2	208.2	353.8	221.2	279.8**	167.2**	257.3**	148.4**	243.2**	156.2**
Body Weight Gain (%) ^c	(g)		(g)							
Days 1-8	24.9	7.1	25.5	9.9	-140	-330	-209	-492	-324	-546
Days 8-15	5.8	1.7	15.6	5.1	-234	-304	-274	-486	-246	-333
Clinical Observations ^d	-	-	-	-	+	+	++	++	++	+++
Ophthalmoscopy ^e	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
Haematology ^b										
Eosinophils ($10^3/\mu\text{L}$)	0.07	0.07	0.05	0.05	0.04	0.04	0.06	0.01**	0.03	0.00**
Haematocrit (%)	49.4	46.3	48.0	46.5	54.8*	50.6*	51.7	45.9	54.6*	47.5
Haemoglobin (g/dL)	16.6	16.0	16.0	16.0	18.4*	17.5	17.4	16.1	18.2*	16.5
Large unstained cells ($10^3/\mu\text{L}$)	0.08	0.10	0.07	0.09	0.06	0.03	0.06	0.07	0.02*	0.07
Lymphocytes ($10^3/\mu\text{L}$)	5.58	6.68	5.04	5.61	2.45	1.33**	1.26**	0.44**	0.85**	0.34**
Monocytes ($10^3/\mu\text{L}$)	0.13	0.13	0.11	0.16	0.27**	0.29**	0.41**	0.48**	0.43**	0.58**
Neutrophils ($10^3/\mu\text{L}$)	0.74	0.51	0.68	0.55	1.91**	1.65**	3.57**	4.95**	4.31**	8.37**
Platelets ($10^3/\mu\text{L}$)	995	1053	907	1107	1015	909*	933	708**	774	739**
Red blood cell count ($10^6/\mu\text{L}$)	8.40	8.15	8.07	8.19	9.35*	8.81	9.02	7.85	9.38*	8.36
Reticulocytes (%)	1.86	1.46	1.97	1.58	0.78	0.66	1.45	1.97	0.32*	0.56
White blood cell count ($10^3/\mu\text{L}$)	6.68	7.59	6.03	6.55	4.80	3.41**	5.44	5.97	5.70	9.42

次頁へ続く

2.6.7 毒性試験概要表

一般名：ブデソニド／グリコピロニウム臭化物／ホルモテロールフマル酸塩水和物

Daily Dose ($\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$) (budesonide / glycopyrrolate)	Air Control		Vehicle Control		621 / 33.3	660 / 35.5	2110 / 114	2260 / 122	4350 / 235	4650 / 251
Number of Animals										
Main Recovery	M: 10 M: 5	F: 10 F: 5	M: 10 M: 5	F: 10 F: 5	M: 10 M: 5	F: 10 F: 5	M: 10 M: 5	F: 10 F: 5	M: 10 M: 5	F: 10 F: 5
Serum Chemistry^b										
Albumin (g/dL)	4.0	4.5	4.0	4.6	4.7**	5.0	4.4**	5.1	5.0**	4.9
A/G ratio	2.1	2.7	2.2	2.8	2.6*	2.7	2.9**	2.7	3.3**	3.4
ALT (IU/L)	54	58	53	44	61	88**	66	136**	109**	213**
AST (IU/L)	132	144	135	113	149	190*	125	163	231*	269**
Bilirubin (total) (mg/dL)	0.15	0.15	0.15	0.16	0.18	0.19	0.20**	0.21	0.18	0.24**
Blood urea nitrogen (mg/dL)	15.2	18.1	19.3	18.8	16.4	13.5**	16.4	13.8**	15.0*	14.4**
Blood urea nitrogen/creatinine ratio	65	69	70	72	58	44*	68	70	72	76
Cholesterol (mg/dL)	57	72	71	67	56	81	70	107**	72	84
Glucose (mg/dL)	174	133	212	135	267	224**	275	194*	241	174
Potassium (mmol/L)	5.6	5.4	5.6	5.4	5.4	5.0	4.8	4.4*	4.5*	4.0**
Total protein (g/dL)	5.85	6.28	5.81	6.21	6.55**	6.93*	6.48**	6.94	6.52**	6.46
Triglycerides (mg/dL)	42	48	62	34	132**	139**	197**	216**	171**	202**
Organ Weights (%)^{c, f}										
	(g)		(g)							
Adrenal glands	0.049	0.052	0.052	0.064	-34.6**	-51.6**	-53.8**	-62.5**	-59.6**	-57.8**
Liver	10.0	6.38	10.6	6.11	-17.0	-5.0	-11.1	+16.3*	+1.9	+26.3**
Spleen	0.71	0.51	0.70	0.53	-41.4**	-52.8**	-50.0**	-58.5**	-57.1**	-62.3**
Thymus	0.45	0.43	0.50	0.45	-74.0**	-73.3**	-68.0**	-82.2**	-80.0**	-73.3**
Uterus		0.40		0.54		-40.7**		-38.9**		-42.6**

次頁へ続く

2.6.7 毒性試験概要表

一般名：ブデソニド／グリコピロニウム臭化物／ホルモテロールフマル酸塩水和物

Daily Dose ($\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$) (budesonide / glycopyrrolate)	Air Control		Vehicle Control		621 / 33.3	660 / 35.5	2110 / 114	2260 / 122	4350 / 235	4650 / 251
Number of Animals										
Main Recovery	M: 10 M: 5	F: 10 F: 5	M: 10 M: 5	F: 10 F: 5	M: 10 M: 5	F: 10 F: 5	M: 10 M: 5	F: 10 F: 5	M: 10 M: 5	F: 10 F: 5
Histopathology										
Number examined (unless indicated otherwise)	10	10	10	10	10	10	10	9	9	9
Adrenal glands Atrophy (zona fasciculata/reticularis)										
Minimal	0	0	0	0	6	0	0	1	0	0
Mild	0	0	0	0	3	10	4	8	1	2
Moderate	0	0	0	0	1	0	6	0	8	7
Bone, sternum with marrow Cellularity, decreased					(0)	(0)	(0)	(0)		
Minimal	0	0	0	0					0	3
Mild	0	0	0	0					5	6
Moderate	0	0	0	0					4	0
Larynx Metaplasia, squamous				(9)						(8)
Minimal	0	0	1	1	0	1	4	6	3	4
Mild	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1
Liver Alteration, hepatocellular (periportal)										
Minimal	0	1	0	0	2	2	0	0	0	1
Mild	0	0	0	0	3	3	4	4	5	3
Moderate	0	0	0	0	0	0	3	3	4	1
Lipidosis										
Minimal	0	0	0	0	3	3	3	3	0	1
Mild	0	0	0	0	0	3	2	5	1	3
Moderate	0	0	0	0	0	0	0	1	0	5

次頁へ続く

2.6.7 毒性試験概要表

一般名：ブデソニド／グリコピロニウム臭化物／ホルモテロールフマル酸塩水和物

Daily Dose (µg/kg/day) (budesonide / glycopyrrolate)	Air Control		Vehicle Control		621 / 33.3	660 / 35.5	2110 / 114	2260 / 122	4350 / 235	4650 / 251
Number of Animals										
Main Recovery	M: 10 M: 5	F: 10 F: 5	M: 10 M: 5	F: 10 F: 5	M: 10 M: 5	F: 10 F: 5	M: 10 M: 5	F: 10 F: 5	M: 10 M: 5	F: 10 F: 5
Lung Aggregates, alveolar macrophage Minimal	0	2	2	4	4	7	7	6	7	3
Lymph node, mesenteric Decrease, lymphocyte (cortex) Minimal Mild Moderate	0 0 0	0 0 0	0 0 0	0 0 0	(0) 	(0) 	(0) 	(0) 	2 2 1	1 3 3
Lymph node, tracheobronchial Decrease, lymphocyte (cortex) Mild Moderate	0 0	0 0	0 0	0 0	1 0	0 0	0 1	4 3	3 5	2 6
Spleen Decrease, lymphocyte (PALS, follicles) Minimal Mild Moderate	0 0 0	0 0 0	0 0 0	0 0 0	2 0 0	1 0 0	1 0 0	6 0 1	3 1 0	0 4 4
Stomach Degeneration, epithelial (with erosion) Minimal Mild Moderate Ulceration Minimal Moderate Severe	0 0 0	1 0 0	0 0 0	0 0 0	(2) 	(3) 	(1) 	(5) 	3 2 0	4 2 1
	0 0 0	0 0 0	0 0 0	0 0 0	0 0 0	0 0 0	1 0 0	0 1 2	0 0 0	0 1 0

次頁へ続く

2.6.7 毒性試験概要表

一般名：ブデソニド／グリコピロニウム臭化物／ホルモテロールフマル酸塩水和物

Daily Dose ($\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$) (budesonide / glycopyrrolate)	Air Control		Vehicle Control		621 / 33.3	660 / 35.5	2110 / 114	2260 / 122	4350 / 235	4650 / 251
Number of Animals										
Main Recovery	M: 10 M: 5	F: 10 F: 5	M: 10 M: 5	F: 10 F: 5	M: 10 M: 5	F: 10 F: 5	M: 10 M: 5	F: 10 F: 5	M: 10 M: 5	F: 10 F: 5
Thymus Decrease, lymphocyte (cortex)						(9)				
Moderate	0	0	0	0	2	1	0	0	0	0
Severe	0	0	0	0	8	8	10	9	9	9
Post-dose Evaluation: Noteworthy findings										
Died or Sacrificed Moribund	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
Number Evaluated	5	5	5	5	5	5	5	5	5	3
Body Weight (g)^b – Day 29	431.5	267.3	417.8	264.5	322.9**	213.1**	317.9**	206.7**	341.0*	207.6**
Body Weight Gain (%)^c	(g)		(g)							
Days 15-29	46.6	21.1	33.8	11.6	+84.3	+243	+79.6	+175	+155	+297
Haematology^b										
Lymphocytes ($10^3/\mu\text{L}$)	7.81	5.47	7.19	6.49	3.51*	2.93**	3.99*	2.39**	2.78**	2.85*
Red blood cell count ($10^6/\mu\text{L}$)	8.23	7.56	8.50	8.14	8.47	7.11**	8.36	7.35**	8.14	7.43*
White blood cell count ($10^3/\mu\text{L}$)	9.19	6.36	8.55	7.52	4.70**	3.54**	5.21*	3.20**	5.24**	4.04*
Organ Weights (%)^{c,f}	(g)		(g)							
Adrenal glands	0.065	0.056	0.057	0.069	-26.3	-31.9*	-28.1	-37.7*	-29.8	-46.4*
Liver	12.6	8.39	11.8	7.54	-21.6*	-16.4*	-14.4	-10.1	-12.7	-3.3
Thymus	0.49	0.45	0.52	0.43	-48.1**	-37.2*	-40.4*	-55.8**	-59.6**	-60.5**
Uterus		0.44		0.59		-16.9		-28.8*		-20.3
Histopathology										
Number examined (unless indicated otherwise)	5	5	5	5	5	5	5	5	5	3
Adrenal glands Atrophy (zona fasciculata/reticularis)										
Minimal	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
Moderate	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0

次頁へ続く

2.6.7 毒性試験概要表

一般名：ブデソニド／グリコピロニウム臭化物／ホルモテロールフマル酸塩水和物

Daily Dose (µg/kg/day) (budesonide / glycopyrrolate)	Air Control		Vehicle Control		621 / 33.3	660 / 35.5	2110 / 114	2260 / 122	4350 / 235	4650 / 251
Number of Animals										
Main Recovery	M: 10 M: 5	F: 10 F: 5	M: 10 M: 5	F: 10 F: 5	M: 10 M: 5	F: 10 F: 5	M: 10 M: 5	F: 10 F: 5	M: 10 M: 5	F: 10 F: 5
Bone, sternum with marrow Cellularity, decreased Minimal	0	0	0	0	(0)	(0)	(0)	(0)	2	2
Larynx Metaplasia, squamous Minimal	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1
Liver Alteration, hepatocellular (periportal) Minimal Lipidosis Minimal Mild Severe	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	1 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 1 0 1	1 1 0 0	0 0 2 0	0 1 0 0
Lung Aggregates, alveolar macrophage Minimal Mild	0 0	0 0	1 0	0 0	3 0	2 0	4 0	3 0	2 2	2 0
Lymph node, mesenteric Decrease, lymphocyte (cortex) Minimal Mild	0 0	0 0	0 0	0 0	(0)	(0)	(0)	(0)	0 0	1 1
Lymph node, tracheobronchial Decrease, lymphocyte (cortex) Minimal Mild	0 0	0 0	0 0	0 0	(4)			(4)	1 0	0 1
Spleen Decrease, lymphocyte (PALS, follicles) Moderate	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0

次頁へ続く

2.6.7 毒性試験概要表

一般名：ブデソニド／グリコピロニウム臭化物／ホルモテロールフマル酸塩水和物

Daily Dose ($\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$) (budesonide / glycopyrrolate)	Air Control		Vehicle Control		621 / 33.3	660 / 35.5	2110 / 114	2260 / 122	4350 / 235	4650 / 251
Number of Animals										
Main Recovery	M: 10 M: 5	F: 10 F: 5	M: 10 M: 5	F: 10 F: 5	M: 10 M: 5	F: 10 F: 5	M: 10 M: 5	F: 10 F: 5	M: 10 M: 5	F: 10 F: 5
Stomach Degeneration, epithelial (with erosion)					(0)	(0)	(0)	(0)		
Minimal	0	0	0	0					1	0
Thymus Decrease, lymphocyte (cortex)										
Minimal	0	0	0	0	1	0	2	3	0	0
Mild	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0
Severe	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0

M = male, F = female.

- No noteworthy findings; + Mild; ++ Moderate; +++ Marked.

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$. Body weight, haematology, serum chemistry and organ weight data analysed using Dunnett's Test.

^a Day 14 mean data shown. Additional (satellite) animals were used for the toxicokinetic assessment: no formal TK analysis was performed due to the limited number of time points and sample sizes, but the data were reviewed for the observational C_{max} and T_{max} and for possible test article accumulation.

^b Statistical significance for treated groups calculated against the placebo controls.

^c For controls, group means are shown, for treated groups, percent differences from placebo controls are shown. Statistical significance is based on actual data (not on the percent differences).

^d Main clinical observations were thin appearance and skin lesions.

^e One mid dose male was found to have a subtle, translucent, posterior cortical cataract in the medial aspect of the right lens, and one high dose male had a corneal ulcer most probably due to injury in the cage.

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

2.6.7 毒性試験概要表

一般名：ブデソニド／グリコピロニウム臭化物／ホルモテロールフマル酸塩水和物

表 35 14-Day Inhalation Toxicity Study in Dogs with BGP MDI^{4.2.3.2.2}

Report Title: Glycopyrronium:Budesonide And Budesonide pMDI: 14-Day Face Mask Inhalation Exposure Study with Recovery In Male and Female Beagle Dogs		Study No. FY14-036B
Species / Strain: Dogs / Beagle	Duration of Dosing: 14 days	Special Features: MDI
Initial Age: approximately 6-8 months	Duration of Post-dose: 14 days	GLP Compliance: Yes
Date of First Dose: ■■■■ 20■■■	Method of Administration: Inhalation Face Mask	
Vehicle / Formulation: budesonide, glycopyrrolate, propellant HFA-134a, DSPC, calcium chloride in an MDI		
Presumed No Observed Adverse Effect Level: Not determined		
<p>Conclusion: Exposure to inhaled budesonide/glycopyrrolate (BGP) MDI in dogs via face mask for 14 days resulted in consistent responses in clinical pathology, organ weights, and histopathology that were characteristic of corticosteroids effects. One BGP High male animal was euthanized moribund on Day 7, with findings (widespread neutrophilic and histiocytic pulmonary inflammation) consistent with opportunistic infection resulting from the immunosuppression effects of budesonide. Changes in haematology demonstrated a typical 'stress' leukogram following exposure to budesonide, including increased number of neutrophils (PMN) and monocytes as well as reduced number of lymphocytes and eosinophils in the circulation. Clinical chemistry analyses primarily revealed increases in ALP, GGT, and TRIG, parameters related with liver function and fat metabolism. Organ weight changes were mainly reflected in the decrease of adrenal glands and thymus weights, as well as increase in the liver weight. Statistical significance was not always achieved across dose groups and ratio measures (relative to body weight or brain weight), and a consistent dose response is not always evident, however they were expected responses to budesonide exposures. Weight differences were often resolved in Recovery animals. Consistent findings were observed from the microscopic examinations, including atrophy of the adrenal cortex (zona fasciculata and zona reticularis) and decreased thymic cortical lymphocytes in all the BGP treated animals, decreases of cortical lymphocytes in the tracheobronchial lymph node to variable degrees among groups, and hepatocellular alteration in periportal regions of the liver. After the 14-day recovery period, some evidence of recovery was present, but no group had completely recovered to normal as seen in the controls. Atrophy of adrenal glands and hypocellularity in the thymus were still observed in all BGP exposed groups but with reduced severity when compared with the main study animals of the same group. Hepatocellular alterations were not observed in most of the recovery animals. Both females showed minimal changes in the liver. Reduced number of lymphocytes in tracheobronchial lymph node, as observed in the main study animals, was not found in any of the recovery groups. No overt test article related changes were found in other study endpoints including body weights, ophthalmology, ECG, or respiratory parameters. Overall, the findings demonstrated in this study were typical responses to corticosteroids, e.g. budesonide in the formulation. Addition of Glycopyrrolate to the formulation did not change the severity of effects compared to that from budesonide exposure alone. No apparent gender difference was observed in this study. A No Observed Adverse Effect Level (NOAEL) was not defined in this study for BGP MDI.</p>		

次頁へ続く

2.6.7 毒性試験概要表

一般名：ブデソニド／グリコピロニウム臭化物／ホルモテロールフマル酸塩水和物

Daily Dose ($\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$) (budesonide / glycopyrrolate)	Air Control		Vehicle Control		166 / 9.14	172 / 9.50	382 / 20.8	396 / 21.6	524 / 28.6	544 / 29.6
Number of Animals										
Main Recovery	M: 4 M:2	F: 4 F:2	M: 3 M:2	F: 3 F:2	M: 3 M:2	F: 3 F:2	M: 3 M:2	F: 3 F:2	M: 4 M:2	F: 4 F:2
Toxicokinetics ^a:										
Budesonide										
AUC _(last) (ng·h/mL)					61.8	36.6	79.6	103	105	139
C _{max} (ng/mL)					36.7	16.9	36.8	65.4	42.0	86.9
Glycopyrronium										
AUC _(last) (ng·h/mL)					3.11	2.22	5.76	6.40	7.75	10.4
C _{max} (ng/mL)					0.694	0.508	2.02	2.31	2.36	3.34
Noteworthy Findings										
Died or Sacrificed Moribund	0	0	0	0	0	0	0	0	1 ^b	0
Clinical Observations ^c	+	+	++	++	++	++	++	++	++	++
Haematology										
Haematocrit (%)	43.5	42.3	42.6	47.6	47.1	44.8	44.3	44.2	40.9	44.2
Mean corpuscular volume (fL)	68.7	69.2	67.8	66.3	68.6	68.1	70.3	69.8*	69.3	67.5
Monocytes (10 ³ / μL)	0.60	0.50	0.46	0.40	0.56	0.51	1.24**	0.93	0.94	0.75
Neutrophils (10 ³ / μL)	6.30	6.17	4.48	4.38	5.86	4.74	8.07	8.39*	9.01	8.74*
Platelets (10 ³ / μL)	359	295	263	343	461*	448	421	498*	422	445
Red blood cell count (10 ⁶ / μL)	6.34	6.12	6.29	7.19	6.89	6.52	6.29	6.32	5.90	6.57
Serum Chemistry										
Albumin (g/dL)	3.4	2.9	3.3	3.5	4.1**	3.9	3.9**	3.8	3.9**	3.9
Albumin/Globulin ratio	1.7	1.7	1.6	2.0	1.8	2.0	1.8	2.0	1.9*	1.9
BUN/Creatinine ratio	31	26	28	28	41	35	46*	37	38	49*
Chloride (mmol/L)	111	113	112	111	108	107	107	108	106*	106**
Creatinine (mg/dL)	0.4	0.5	0.5	0.7	0.4	0.4	0.3*	0.4	0.3	0.3*
GGT (IU/L)	0	0	0	0	3	2	6*	4*	6*	5**
Total Protein (g/dL)	5.5	4.7	5.4	5.2	6.4**	5.9	6.1*	5.8	6.0*	5.9*

次頁へ続く

2.6.7 毒性試験概要表

一般名：ブデソニド／グリコピロニウム臭化物／ホルモテロールフマル酸塩水和物

Daily Dose (µg/kg/day) (budesonide / glycopyrrolate)	Air Control		Vehicle Control		166 / 9.14	172 / 9.50	382 / 20.8	396 / 21.6	524 / 28.6	544 / 29.6
Number of Animals										
Main Recovery	M: 4 M:2	F: 4 F:2	M: 3 M:2	F: 3 F:2	M: 3 M:2	F: 3 F:2	M: 3 M:2	F: 3 F:2	M: 4 M:2	F: 4 F:2
Organ Weights (%) ^{d,e}	(g)		(g)							
Adrenal Glands	0.998	0.843	1.021	0.939	-38.8*	-44.9**	-42.6*	-46.6**	-29.8	-50.8**
Liver	270.417	229.609	311.058	231.693	+31.2*	+28.0	+37.2*	+37.0	+45.2**	+73.9**
Thymus	11.400	8.686	15.304	8.381	-74.3**	-63.0**	-78.4**	-68.9**	-75.7*	-57.8**
Histopathology										
Number examined (unless otherwise indicated)	4	4	3	3	3	3	3	3	4	4
Adrenal Glands Atrophy, cortical (Zona Fasciculata/Reticularis)										
Minimal	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
Mild	0	0	0	0	2	2	2	2	3	4
Moderate	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0
Liver Alteration, hepatocellular (periportal)										
Mild	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
Moderate	0	0	0	0	3	2	3	3	3	3
Severe	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Lung Inflammation (histiocytic and neutrophilic)										
Minimal	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Severe	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Inflammation, chronic (peribronchovascular)										
Minimal	4	3	2	2	1	1	0	2	0	1
Mild	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0

次頁へ続く

2.6.7 毒性試験概要表

一般名：ブデソニド／グリコピロニウム臭化物／ホルモテロールフマル酸塩水和物

Daily Dose ($\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$) (budesonide / glycopyrrolate)	Air Control		Vehicle Control		166 / 9.14	172 / 9.50	382 / 20.8	396 / 21.6	524 / 28.6	544 / 29.6
	Number of Animals									
Main Recovery	M: 4 M:2	F: 4 F:2	M: 3 M:2	F: 3 F:2	M: 3 M:2	F: 3 F:2	M: 3 M:2	F: 3 F:2	M: 4 M:2	F: 4 F:2
Lymph node, tracheobronchial Lymphocyte decrease (cortex) Mild	0	0	0	0	1	1	3	0	2	1
Thymus Lymphocyte decrease (cortex) Mild	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Moderate	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
Severe	0	0	0	0	2	3	3	3	3	4
Post-dose Evaluation: Number Evaluated	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Noteworthy findings										
Haematology										
Basophils ($10^3/\mu\text{L}$)	0.05	0.07	0.06	0.08	0.05	0.04*	0.02	0.06	0.04	0.05
Monocytes ($10^3/\mu\text{L}$)	0.54	0.30	0.73	0.44	0.38*	0.48	0.68	0.42	0.37*	0.47
Serum Chemistry										
Potassium (mmol/L)	4.5	4.4	4.8	4.3	4.5	4.5	5.0	5.2*	4.6	4.6
Total Bilirubin (mg/dL)	0.1	0.1	0.0	0.0	0.0	0.1*	0.1*	0.1	0.0	0.0
Organ Weights (%)^d	(g)		(g)							
Adrenal Glands	1.182	0.806	1.098	0.941	-41.7*	-27.4	-38.4	-32.3	-35.2	-21.8
Liver	307.432	245.585	275.237	215.508	-11.0	-6.4	0	+3.3	-17.7*	+0.7
Lung, Left Caudal	20.012	18.011	17.970	14.133	-7.2	+19.8	+10.9	+41.0*	-4.3	+28.2

次頁へ続く

2.6.7 毒性試験概要表

一般名：ブデソニド／グリコピロニウム臭化物／ホルモテロールフマル酸塩水和物

Daily Dose (µg/kg/day) (budesonide / glycopyrrolate)	Air Control		Vehicle Control		166 / 9.14	172 / 9.50	382 / 20.8	396 / 21.6	524 / 28.6	544 / 29.6
Number of Animals										
Main Recovery	M: 4 M:2	F: 4 F:2	M: 3 M:2	F: 3 F:2	M: 3 M:2	F: 3 F:2	M: 3 M:2	F: 3 F:2	M: 4 M:2	F: 4 F:2
Histopathology										
Number examined	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Adrenal Glands Atrophy, cortical (Zona Fasciculata/Reticularis)										
Minimal	0	0	0	0	2	1	2	0	1	2
Mild	0	0	0	0	0	0	0	2	1	0
Liver Alteration, hepatocellular (periportal)										
Minimal	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
Lung Accumulation, alveolar macrophage										
Minimal	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
Inflammation, chronic (peribronchovascular)										
Minimal	1	0	0	1	1	0	2	2	1	0
Mild	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
Thymus Lymphocyte decrease (cortex)										
Minimal	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
Mild	0	0	0	0	1	0	2	0	1	1
Moderate	0	0	0	0	0	0	0	2	1	0
Severe	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0

M = male, F = female.

- No noteworthy findings; + Mild; ++ Moderate.

* p<0.05; ** p<0.01. Body weight, haematology, serum chemistry and organ weight data analysed using Dunnett's Test.

^a Day 14 mean data shown.

^b Histopathologic examination demonstrated widespread neutrophilic and histiocytic pulmonary inflammation (pneumonia).

^c The most common clinical observations throughout the study were related to liquid or soft stool.

2.6.7 毒性試験概要表

一般名：ブデソニド／グリコピロニウム臭化物／ホルモテロールフマル酸塩水和物

- ^d 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).
- ^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 毒性試験概要表

一般名：ブデソニド／グリコピロニウム臭化物／ホルモテロールフマル酸塩水和物

表 36 3-Month Inhalation Toxicity Study in Dogs with BGP MDI^{4.2.3.2.14}

Report Title: Glycopyrronium:Budesonide pMDI and Budesonide pMDI: 90-Day Face Mask Inhalation Exposure Study with Recovery in Male and Female Beagle Dogs		Study No. FY14-148B
Species / Strain: Dogs / Beagle	Duration of Dosing: 90 days	Special Features: MDI
Initial Age: approximately 5-7 months	Duration of Post-dose: None	GLP Compliance: Yes
Date of First Dose: ████████ 20██	Method of Administration: Inhalation Face Mask	
Vehicle / Formulation: budesonide, glycopyrrolate, propellant HFA-134a, DSPC, calcium chloride in an MDI		
No Observed Adverse Effect Level: Not determined		
<p>Conclusion: Exposure to inhaled budesonide/glycopyrrolate (BGP) pMDI in male or female beagle dogs via face mask inhalation for 90 consecutive days resulted in tissue responses in adrenal glands, liver, and thymus, consistent with the effects of corticosteroids. Corroborative changes were present in organ weights, and to a limited degree in some hematology and serum chemistry parameters. Respiratory tract effects were not seen in any dose group.</p> <p>Specific organ weight changes identified and attributed to exposure included decreased adrenal gland weights, increased liver weights and decreased thymus weights. The weight changes corresponded to histologic findings of adrenal cortical atrophy (zona fasciculata and zona reticularis), hepatocellular alteration consistent with glycogen accumulation and/or increased metabolic activity (an adaptive response), and thymic cortex lymphocyte decreases. Changes in clinical pathology parameters attributed to exposure included minor decreases in eosinophil counts and minor alterations in serum chemistry (minor albumin and triglyceride elevations).</p> <p>A clear No Observed Adverse Effect Level (NOAEL) was not observed in this study. However, overall the few possible Low dose effects for BGP were minimal in nature. There was a dose related change associated with the known effects of budesonide. At the Low dose level for BGP, there were minimal differences from controls. Adrenal cortical changes seen in higher dose groups were not present, while liver hepatocellular alteration (an adaptive response) was present in 1/8 BGP Low animal. Thymic cortical lymphocyte decreases persisted in 4/8 BGP Low animals at minimal to mild severity. Biologically significant changes in hematology or serum chemistry parameters were not present in Low (or any other) dose animals.</p> <p>The changes in tissues and clinical pathology in this study were characteristic of the well-described effects of corticosteroids, and were likely in response to the budesonide component present in both test article formulations.</p>		

次頁へ続く

2.6.7 毒性試験概要表

一般名：ブデソニド／グリコピロニウム臭化物／ホルモテロールフマル酸塩水和物

Daily Dose (µg/kg/day) (budesonide / glycopyrrolate)	Air Control		Vehicle Control		3.55 / 0.21	3.65 / 0.21	30.63 / 1.67	31.22 / 1.70	97.03 / 5.35	99.72 / 5.50
Number of Animals	M: 4	F: 4	M: 4	F: 4	M: 4	F: 4	M: 4	F: 4	M: 4	F: 4
Toxicokinetics ^a:										
Budesonide										
AUC _(last) (ng·h/mL)					1.19	0.435	4.41	4.27	14.5	18.5
C _{max} (ng/mL)					1.03	0.534	3.51	3.94	10.5	21.2
Glycopyrronium										
AUC _(last) (ng·h/mL)					ND	ND	0.0976	0.117	0.710	0.505
C _{max} (ng/mL)					ND	ND	0.0734	0.0606	0.29	0.404
Noteworthy Findings										
Died or Sacrificed Moribund	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Clinical Observations	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Serum Chemistry										
Albumin (g/dL)	3.6	3.5	3.5	3.6	3.5	3.6	3.7	3.9	3.8	3.8
Triglycerides (mg/dL)	30	23	26	27	32	34*	42	44*	114*	68*
Organ Weights (%) ^{b,c}	(g)		(g)							
Adrenal	0.889	1.120	0.959	0.885	-26.3	-11.9	-49.9	-44.0	-48.7	-38.1
Liver	309.796	251.304	302.734	244.292	-1.7	-0.2	+6.3	+15.3	+35.9	+27.9
Thymus	8.034	7.186	6.476	5.092	-53.1	-38.9	-67.8	-60.0	-72.3	-76.0
Histopathology										
Number examined	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
Adrenals										
Atrophy, cortical, zona fasciculata/reticularis	0	0	0	0	0	0	4	4	4	4
Liver										
Alteration, hepatocellular, periportal	0	0	0	0	1	0	4	4	4	4
Thymus										
Lymphocyte decrease, cortex	0	0	0	0	3	1	4	4	4	4

M = male, F = female. - No noteworthy findings.

* p<0.05; ** p<0.01. Serum chemistry data analysed using ANOVA.

^a Day 90 mean data is shown

2.6.7 毒性試験概要表

一般名：ブデソニド／グリコピロニウム臭化物／ホルモテロールフマル酸塩水和物

- ^b For controls, group means are shown, for treated groups, percent differences from placebo controls are shown. Statistical significance is based on actual data (not on the percent differences).
- ^c Both absolute and relative weights differed from controls in the direction indicated. Displayed figures are for the absolute organ weight effects.

2.6.7 毒性試験概要表

一般名：ブデソニド/グリコピロニウム臭化物/ホルモテロール fumarate 水和物

2.6.7.7.6 グリコピロニウム/ホルモテロール

表 37 14-Day Inhalation Toxicity Study in Rats with GFF MDI^{4.2.3.2.11}

Report Title: Glycopyrrolate and Formoterol Fumarate pMDI: 14-Day Nose-Only Inhalation Exposure Study with Recovery in Rats		Study No. FY09-086
Species / Strain: Rats / Sprague-Dawley	Duration of Dosing: 14 days	GLP Compliance: Yes
Initial Age: 7-8 weeks	Duration of Post-dose: 14 days	Special Features: MDI
Date of First Dose: ■■■■ 20■■■	Method of Administration: Inhalation Nose Only	
Vehicle / Formulation: glycopyrrolate, formoterol fumarate, propellant HFA-134a, DSPC, calcium chloride in an MDI		
No Observed Adverse Effect Level: High Dose GP/FF of 381/71 µg/kg/day (M 368/69 µg/kg/day, F 394/73 µg/kg/day)		
<p>Conclusion: Inhalation of Glycopyrrolate/Formoterol fumarate MDI resulted in possible minor changes in some haematology and clinical chemistry parameters associated with the metabolism of the formoterol fumarate that generally returned to baseline with a 2-week recovery period. However, all values were generally within normal historical ranges. These changes are likely not due to toxicity due to the lack of corresponding histopathology findings or changes in various other supporting clinical chemistry parameters. The animals showed no histopathological findings in any dose group. Exposure was confirmed by the presence of glycopyrrolate and formoterol fumarate in all test article-treated animals, with no measurable test article in the vehicle or air control groups.</p> <p>The No Observed Adverse Effect Level (NOAEL) of Glycopyrrolate/Formoterol fumarate MDI was considered to be the high exposure group (ie the maximum feasible dose group) of 368/69 and 394/73 (glycopyrrolate/formoterol fumarate) µg/kg/day for the male and female Sprague-Dawley rats.</p>		

次頁へ続く

2.6.7 毒性試験概要表

一般名：ブデソニド／グリコピロニウム臭化物／ホルモテロールフマル酸塩水和物

Daily Dose:	Air Control		Vehicle Control		Low Dose GP/FF (M 72/14 µg/kg/day) (F 77/15 µg/kg/day)		Mid Dose GP/FF (M 226/42 µg/kg/day) (F 241/45 µg/kg/day)		High Dose GP/FF (M 368/69 µg/kg/day) (F 394/73 µg/kg/day)	
	M: 10 M: 5	F: 10 F: 5	M:10 M: 5	F: 10 F: 5	M: 10 M: 5	F: 10 F: 5	M: 10 M: 5	F: 10 F: 5	M: 10 M: 5	F: 10 F: 5
Time Period: Min/day	90	90	90	90	25	25	60	60	90	90
TK (formoterol) at Day14 C _{max} (pg/mL)	ND		ND		445	375	1625	2433	2437	4507
TK (glycopyrronium) at Day14 C _{max} (pg/mL)	ND		ND		2025	1437	3557	5137	7687	7098
Noteworthy Findings	NS ¹	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Died or sacrificed moribund	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Body Weight (%)	---	---	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Food Consumption (%)	ND ²	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Water Consumption	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Clinical Observations	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Ophthalmoscopy	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Hematology ³	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Serum Chemistry ³	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Urinalysis	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Organ Weights	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Gross Pathology	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Histopathology	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Additional Examinations	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Post-dose Evaluation: 14 day Recovery Group Findings	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS

¹ NS= Nothing Significant² ND= Not Determined³ Some parameters were significantly changed compared with controls but all values were within historical values.

2.6.7 毒性試験概要表

一般名：ブデソニド／グリコピロニウム臭化物／ホルモテロール fumarate 酸塩水和物

表 38 14-Day Inhalation Toxicity Study in Dogs with GFF MDI^{4.2.3.2.12}

Report Title: Glycopyrrolate and Formoterol Fumarate pMDI: 14-Day Face Mask Inhalation Exposure Study with Recovery in Beagle Dogs		Study No. FY09-087
Species / Strain: Dogs / Beagle	Duration of Dosing: 14 days	Special Features: MDI
Initial Age: 6 months	Duration of Post-dose: 14 days	GLP Compliance: Yes
Date of First Dose: [REDACTED] 20[REDACTED]	Method of Administration: Inhalation Face Mask	
Vehicle / Formulation: glycopyrrolate, formoterol fumarate, propellant HFA-134a, DSPC, calcium chloride in an MDI		
Presumed No Observed Adverse Effect Level: Low Dose GP/FF of 17/3 µg/kg/day (M 17.0/3.3 µg/kg/day, F 17.3/3.4 µg/kg/day)		
<p>Conclusion: Exposure to inhaled glycopyrrolate and formoterol fumarate formulated in a combination MDI was confirmed by the presence of glycopyrrolate and formoterol fumarate in the plasma of all treated animals, with no measurable test article in the placebo or air control groups. As expected with formoterol fumarate, the dogs showed changes in cardiac parameters, respiratory parameters, and clinical observations consistent with formoterol symptoms and signs reported in the literature. Additionally, histopathological findings were considered a consequence of the sustained increased heart rate and adaptive metabolic activity in the liver characterised by swollen cytoplasm. Inhalation of glycopyrrolate and formoterol fumarate resulted in transient and biologically insignificant changes in various clinical chemistry and haematology parameters in the 14-day recovery group that returned to baseline during the recovery period. A clear No Observed Adverse Effect Level (NOAEL) was not observed in this study if the liver swollen cytoplasm is considered an adverse finding. There were no signs of liver toxicity present such as liver enzyme changes. However, considering the liver swollen cytoplasm to be an adaptive response to increased drug metabolism and the fact that the liver alterations were a minor and reversible finding in all dose groups, the low dose group (17/3 µg/kg/day glycopyrrolate/formoterol fumarate) might reasonably be considered to be the NOAEL. There were no significant differences between the filtered air controls and the vehicle control group.</p>		

次頁へ続く

2.6.7 毒性試験概要表

一般名：ブデソニド/グリコピロニウム臭化物/ホルモテロールフマル酸塩水和物

Daily Dose:	Air Control		Vehicle Control		Low Dose GP/FF (M 17.0/3.3 µg/kg/day) (F 17.3/3.4 µg/kg/day)		Mid Dose GP/FF (M 51.3/8.8 µg/kg/day) (F 52.3/9.0 µg/kg/day)		High Dose GP/FF (M 73.8/12.5 µg/kg/day) (F 75.4/12.8 µg/kg/day)	
	M: 4 M: 2	F: 4 F: 2	M: 4 M: 2	F: 4 F: 2	M: 4 M: 2	F: 4 F: 2	M: 4 M: 2	F: 4 F: 2	M: 4 F: 2	F: 4 F: 2
Number of Animals: Main : Recovery										
Time Period: Min/day	30	30	30	30	10	10	20	20	30	30
TK (formoterol) at Day14 C _{max} (pg/mL) AUC _{last} (pg·h/mL)	ND		ND		214.84 1434.36	143.73 781.77	645.58 2211.71	708.21 2476.50	1037.46 3633.39	1141.04 4155.01
TK (glycopyrronium) at Day14 C _{max} (pg/mL) AUC _{last} (pg·h/mL)	ND		ND		1120.88 3377.44	634.21 1723.34	4034.71 9025.38	5851.91 8664.14	11552.75 17046.45	11082.58 13437.15
Noteworthy Findings	NS	NS	NS	NS	Altered clinical signs; Liver pathology	Altered clinical signs; Liver pathology	Altered clinical signs; Liver/heart pathology	Altered clinical signs; Liver pathology	Altered clinical signs; Liver/heart pathology	Altered clinical signs; Liver/heart pathology
Died or sacrificed moribund	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Body Weight	---	---	NS ¹	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Food Consumption	ND ²	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Water Consumption	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Clinical Observations	NS	NS	NS	NS	Erythema (redness of chest/ears/inguinal)					
Ophthalmoscopy	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Hematology	NS ³	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Serum Chemistry	NS ³	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS

次頁へ続く

2.6.7 毒性試験概要表

一般名：ブデソニド／グリコピロニウム臭化物／ホルモテロールフマル酸塩水和物

Daily Dose:	Air Control		Vehicle Control		Low Dose GP/FF (M 17.0/3.3 µg/kg/day) (F 17.3/3.4 µg/kg/day)		Mid Dose GP/FF (M 51.3/8.8 µg/kg/day) (F 52.3/9.0 µg/kg/day)		High Dose GP/FF (M 73.8/12.5 µg/kg/day) (F 75.4/12.8 µg/kg/day)	
Urinalysis	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Organ Weights	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Gross Pathology	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Histopathology Number of exam	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
Liver: Swollen cytoplasm	0	0	0	0	4	4	3	4	4	4
Heart: Papillary muscle Fibrosis	0	0	0	0	0	0	3	0	1	1
Additional Examinations: Respiratory physiology measurements Electrocardiograms	NS	NS	NS	NS	↑HR, ↑f, ↑MV, ↑TV	↑HR, ↑MV	↑HR, ↑MV, ↑TV	↑HR, ↑MV	↑HR, ↑MV, ↑TV	↑HR, ↑MV
Post-dose Evaluation: 14 day Recovery Group Findings	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	Papillary muscle fibrosis (2/2)	Papillary muscle fibrosis (1/2)

¹ NS= Nothing Significant² ND= Not Determined³ Some parameters were significantly changed compared with controls but all values were within historical values.

HR = Heart Rate; f = breathing frequency; MV = Minute Volume; TV = Tidal Volume

2.6.7 毒性試験概要表

一般名：ブデソニド／グリコピロニウム臭化物／ホルモテロール fumarate 酸塩水和物

表 39 3-Month Inhalation Toxicity Study in Dogs with GFF MDI^{4.2.3.2.15}

Report Title: Glycopyrrolate and Formoterol Fumarate pMDI: 90-Day Face Mask Inhalation Exposure Study in Beagle Dogs		Study No. FY10-129
Species / Strain: Dogs / Beagle	Duration of Dosing: 90 days	Special Features: MDI
Initial Age: 9 months	Duration of Post-dose: 1 day	GLP Compliance: Yes
Date of First Dose: ■■■■■ 20■■■	Method of Administration: Inhalation Face Mask	
Vehicle / Formulation: glycopyrrolate, formoterol fumarate, propellant HFA-134a, DSPC, calcium chloride in an MDI		
Presumed No Observed Adverse Effect Level: Mid Dose GP/FF of 43.4/10.5 µg/kg/day (M 42.7/10.1 µg/kg/day, F 44.1/10.8 µg/kg/day)		
<p>Conclusion: Exposure to inhaled glycopyrrolate and formoterol fumarate formulated in a combination MDI was confirmed by the presence of glycopyrrolate and formoterol fumarate in the plasma of all treated animals. As expected with formoterol fumarate, the dogs showed changes in cardiac and respiratory parameters consistent with formoterol symptoms and signs reported in the literature. Additionally, the histopathological findings were considered a consequence of adaptive metabolic activity in the liver characterised by swollen cytoplasm. Inhalation of glycopyrrolate and formoterol fumarate resulted in transient and biologically insignificant changes in various clinical chemistry and haematology parameters in the 90-day study. If the liver swollen cytoplasm is considered an adverse finding then a clear No Observed Adverse Effect Level (NOAEL) was not observed in this study. There were no supporting signs of liver toxicity present such as hepatic enzyme changes or cellular necrosis. If the liver swollen cytoplasm was considered to be an adaptive response rather than a toxic response, the NOAEL was the mid dose group. The presumed NOAEL was based on a consideration that the overall incidence of macrophage aggregates and related findings was higher in the high dose group compared to the rest of the exposed groups and controls. There were no drug-related pre-neoplastic or neoplastic lesions observed in any arm of the study. There were no significant differences between the filtered air controls and the vehicle control group.</p>		

次頁へ続く

2.6.7 毒性試験概要表

一般名：ブデソニド／グリコピロニウム臭化物／ホルモテロールフマル酸塩水和物

Daily Dose:	Air Control		Vehicle Control		Low Dose GP/FF (M 17.3/4.4 µg/kg/day) (F 18.0/4.5 µg/kg/day)		Mid Dose GP/FF (M 42.7/10.1 µg/kg/day) (F 44.1/10.8 µg/kg/day)		High Dose GP/FF (M 59.4/14.0 µg/kg/day) (F 62.1/14.7 µg/kg/day)	
	M: 4	F: 4	M: 4	F: 4	M: 4	F: 4	M: 4	F: 4	M: 4	F: 4
Number of Animals	30	30	30	30	10	10	20	20	30	30
Time Period: Min/day	30	30	30	30	10	10	20	20	30	30
TK (formoterol) at Day90 C _{max} (pg/mL) AUC _{last} (pg·h/mL)	ND		ND		434 1650	253 1020	765 3440	1130 2670	747 4610	2000 4490
TK (glycopyrronium) at Day90 C _{max} (pg/mL) AUC _{last} (pg·h/mL)	ND		ND		1910 3780	1080 2340	4020 12200	11000 9430	3670 10300	8330 20200
Noteworthy Findings	NS		NS		Liver swollen cytoplasm		Liver swollen cytoplasm		↑Lung interstitial hypertrophy; Liver swollen cytoplasm	
Died or sacrificed moribund	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Body Weight	NS ¹	NS	NS	NS	NS	NS	NS	↑ over vehicle	NS	NS
Food Consumption	ND ²	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Water Consumption	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Clinical Observations										
Soft/Liquid stool	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
Abrasion/Laceration/Other injury	0	0	2	0	1	0	2	2	0	2
Hair loss	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0
Vomiting	0	0	1	1	0	0	1	2	2	0
Ocular discharge	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Lump/Mass	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
Appetite	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
Ophthalmoscopy	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Hematology	NS ³	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Serum Chemistry	NS ³	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS

次頁へ続く

2.6.7 毒性試験概要表

一般名：ブデソニド／グリコピロニウム臭化物／ホルモテロールフマル酸塩水和物

Daily Dose:	Air Control		Vehicle Control		Low Dose GP/FF (M 17.3/4.4 µg/kg/day) (F 18.0/4.5 µg/kg/day)		Mid Dose GP/FF (M 42.7/10.1 µg/kg/day) (F 44.1/10.8 µg/kg/day)		High Dose GP/FF (M 59.4/14.0 µg/kg/day) (F 62.1/14.7 µg/kg/day)	
	M: 4	F: 4	M: 4	F: 4	M: 4	F: 4	M: 4	F: 4	M: 4	F: 4
Urinalysis	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Organ Weights										
Liver Weight (g)	315.0	244.1	290.5	224.9	340.9	266.4	341.0	288.1*	326.3	316.7**
Liver to Brain Weight Ratio	3.9	3.4	3.9	3.0	4.3	3.9*	4.6	3.9*	4.3	4.6**
Gross Pathology										
Lung										
Discoloration;Gray; Left Cranial (minimal)	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0
Discoloration;Gray; Left Cranial ; Right Cranial (minimal)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Discoloration;Yellow; Left Cranial (minimal)	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
Histopathology Number of exam	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
Liver: Hepatocellular alteration ⁴	0	0	0	0	1	1	0	3	2	4
Lung:										
Accumulation, alveolar, macrophage	0	2	1	0	2	4	2	2	3	0
Aggregate, alveolar macrophage	0	3	1	2	1	0	1	1	4	3
Hypertrophy/hyperplasia, epithelial	1	0	1	0	1	0	2	0	0	0
Hypertrophy/hyperplasia, epithelial with interstitial fibrosis	1	0	0	3	1	1	2	0	1	4

次頁へ続く

2.6.7 毒性試験概要表

一般名：ブデソニド／グリコピロニウム臭化物／ホルモテロールフマル酸塩水和物

Daily Dose:	Air Control		Vehicle Control		Low Dose GP/FF (M 17.3/4.4 µg/kg/day) (F 18.0/4.5 µg/kg/day)		Mid Dose GP/FF (M 42.7/10.1 µg/kg/day) (F 44.1/10.8 µg/kg/day)		High Dose GP/FF (M 59.4/14.0 µg/kg/day) (F 62.1/14.7 µg/kg/day)	
	M: 4	F: 4	M: 4	F: 4	M: 4	F: 4	M: 4	F: 4	M: 4	F: 4
Number of Animals										
Additional Examinations:										
Respiratory physiology measurements	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	↑TV	↑MV	↑TV
Electrocardiograms	NS	NS	NS	NS	↑HR	↑HR	↑HR	↑HR	↑HR	↑HR

1 NS= Nothing Significant

2 ND= Not Determined

3 Some parameters were significantly changed compared with controls but all values were within historical values.

4 This finding, generally swollen cytoplasm, was a hepatocyte response to drug metabolism.

*: p<0.05, **:p<0.01 vs Vehicle Control, HR=Heart Rate, TV=Tidal Volume, MV=Minute Volume

2.6.7 毒性試験概要表

一般名：ブデソニド/グリコピロニウム臭化物/ホルモテロールフマル酸塩水和物

2.6.7.7.7 ブデソニド/グリコピロニウム/ホルモテロール

表 40 14-Day Inhalation Toxicity Study in Rats with BGF MDI^{4.2.3.2.13}

Report Title: Budesonide: Glycopyrronium: Formoterol Fumarate pMDI: 14-Day Nose-Only Inhalation Exposure Study with Recovery in Rats		Study No. FY14-033
Species / Strain: Rats / Sprague-Dawley	Duration of Dosing: 14 days	GLP Compliance: Yes
Initial Age: 8-9 weeks	Duration of Post-dose: 14 days	Special Features: MDI
Date of First Dose: [REDACTED] 20 [REDACTED]	Method of Administration: Inhalation Nose Only	
Vehicle / Formulation: budesonide, glycopyrrolate, formoterol fumarate, propellant HFA-134a, DSPC, calcium chloride in an MDI		
No Observed Adverse Effect Level: Not determined		
<p>Conclusion: Exposure to inhaled budesonide/glycopyrrolate/formoterol fumarate (BGF) in male and female SD rats via nose-only inhalation for 14 days led to histopathological changes in adrenal glands, liver, stomach, and lymphoid tissues including thymus, spleen, lymph nodes, and bone marrow. Corroborative alterations were observed across different endpoints including organ weights and clinical pathology. Changes within the respiratory tract were minimal and considered non-specific effects. Body weight reduction occurred in a dose responsive fashion. Early removal including found dead and moribund euthanasia occurred in all test article treated groups and in a dose dependent manner, most probably due to systemic bacterial infection resulting from the immunosuppressive effects of budesonide. There was evidence of recovery in all dose groups in most clinical pathology parameters, and microscopic appearance of most tissues had returned to essentially within normal limits in Low dose animals. However, decreases in circulating lymphocytes, bone marrow, spleen, lymph nodes, and thymus persisted in some recovery animals. Reduction in adrenal glands and thymus organ weights or organ to brain weight ratios remained statistically significant in High dose males and females at all dose levels. Body weight reduction seemed to recover to some degree; however the terminal body weights remained statistically significantly lower in all recovery groups except the Low dose males. Stomach ulceration was observed in both males and females at all three dose levels of the main study, however none was found in the High dose recovery animals. Changes in tissues and clinical pathology in this study were characteristic of the effects of corticosteroids, and were likely in response to the budesonide component present in the BGF combination formulation. A clear No Observed Adverse Effect Level (NOAEL) was not observed in this study.</p>		

次頁へ続く

2.6.7 毒性試験概要表

一般名：ブデソニド／グリコピロニウム臭化物／ホルモテロール fumarate 水和物

Daily Dose ($\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$) (budesonide / glycopyrrolate / formoterol fumarate)	Air Control		Vehicle Control		1820 / 96.4 / 56.2	1950 / 103 / 63.0	3680 / 197 / 114	3940 / 211 / 122	7660 / 407 / 236	8160 / 434 / 251
Number of Animals										
Main Recovery	M: 10 M: 5	F: 10 F: 5	M: 10 M: 5	F: 10 F: 5	M: 10 M: 5	F: 10 F: 5	M: 10 M: 5	F: 10 F: 5	M: 10 M: 5	F: 10 F: 5
Toxicokinetics ^a:										
Budesonide C_{max} (ng/mL)					19.0	128	114	98.9	128	814
Glycopyrronium C_{max} (ng/mL)					0.295	0.625	1.56	4.83	5.26	3.31
Formoterol fumarate C_{max} (ng/mL)					0.870	0.486	2.63	3.04	3.96	3.70
Noteworthy Findings										
Died or Sacrificed Moribund	0	0	0	0	1	0	0	2	0	4
Body Weight Gain (%) ^b	(g)		(g)							
Days 0-8	53.5	7.6	57.1	14.3	-94.7**	-288**	-113**	-369**	-156**	-417**
Days 8-15	13.3	3.1	9.6	-1.6	-374**	-1340**	-988**	-988**	-384**	-544**
Clinical Observations ^c	-	-	-	-	+	+	+	+++	++	+++
Haematology										
Eosinophils ($10^3/\mu\text{L}$)	0.06	0.07	0.06	0.06	0.03*	0.01**	0.02*	0.003**	0.01**	0.004**
Lymphocytes ($10^3/\mu\text{L}$)	6.60	5.97	7.12	5.31	1.97**	0.73*	0.98**	0.34**	0.37**	0.15**
Monocytes ($10^3/\mu\text{L}$)	0.18	0.12	0.12	0.11	0.31**	0.33**	0.54**	0.52**	0.46**	0.47**
Neutrophils ($10^3/\mu\text{L}$)	1.21	0.78	0.88	0.56	2.02**	4.78**	4.16**	8.54**	7.15**	11.20**
Serum Chemistry										
ALP (IU/L)	168	111	141	92	138	68	115	77	108*	82
ALT (IU/L)	45	39	42	43	56	124**	91**	104**	177**	147**
AST (IU/L)	145	125	128	127	118	200**	184	193*	330**	253**
Total bilirubin (mg/dL)	0.1	0.2	0.1	0.2	0.2**	0.3**	0.2**	0.3**	0.2**	0.2
Triglycerides (mg/dL)	35	48	44	43	98**	123**	145**	148**	125**	199**

次頁へ続く

2.6.7 毒性試験概要表

一般名：ブデソニド／グリコピロニウム臭化物／ホルモテロール fumarate 水和物

Daily Dose (µg/kg/day) (budesonide / glycopyrrolate / formoterol fumarate)	Air Control		Vehicle Control		1820 / 96.4 / 56.2	1950 / 103 / 63.0	3680 / 197 / 114	3940 / 211 / 122	7660 / 407 / 236	8160 / 434 / 251
Number of Animals										
Main Recovery	M: 10 M: 5	F: 10 F: 5	M: 10 M: 5	F: 10 F: 5	M: 10 M: 5	F: 10 F: 5	M: 10 M: 5	F: 10 F: 5	M: 10 M: 5	F: 10 F: 5
Organ Weights (%) ^{b,d}	(g)		(g)							
Adrenals	0.057	0.056	0.049	0.054	+59.1	+51.3	+36.9	+46.9	+30.3	+37.4
Spleen	0.691	0.501	0.803	0.465	-46.5	-51.7	-60.1	-55.2	-66.2	-59.3
Thymus	0.467	0.393	0.510	0.408	-74.5	-80.1	-76.0	-76.4	-70.7	-72.8
Histopathology										
Number examined (unless indicated otherwise)	10	10	10	10	9	10	10	8	10	6
Adrenal glands Atrophy, cortical (zona fasciculata/reticularis)										
Minimal	0	0	0	0	9	0	0	0	0	0
Mild	0	0	0	0	0	10	0	1	1	2
Moderate	0	0	0	0	0	0	10	7	9	4
Bone, femur w. marrow Decreased cellularity					(0)	(0)	(0)	(0)		
Minimal	0	0	0	0					0	1
Mild	0	0	0	0					2	3
Moderate	0	0	0	0					8	0
Bone, sternum w. marrow Cellularity, decreased					(0)	(0)	(0)	(0)		
Minimal	0	0	0	0					0	2
Mild	0	0	0	0					1	3
Moderate	0	0	0	0					9	1

次頁へ続く

2.6.7 毒性試験概要表

一般名：ブデソニド／グリコピロニウム臭化物／ホルモテロール fumarate 水和物

Daily Dose (µg/kg/day) (budesonide / glycopyrrolate / formoterol fumarate)	Air Control		Vehicle Control		1820 / 96.4 / 56.2	1950 / 103 / 63.0	3680 / 197 / 114	3940 / 211 / 122	7660 / 407 / 236	8160 / 434 / 251
Number of Animals										
Main Recovery	M: 10 M: 5	F: 10 F: 5	M: 10 M: 5	F: 10 F: 5	M: 10 M: 5	F: 10 F: 5	M: 10 M: 5	F: 10 F: 5	M: 10 M: 5	F: 10 F: 5
Larynx	(9)								(9)	
Metaplasia, squamous										
Minimal	0	0	1	3	5	4	9	4	7	4
Mild	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Liver										
Alteration, hepatocellular (periportal)										
Minimal	0	0	0	0	0	0	5	1	0	0
Mild	0	2	0	0	0	0	1	0	4	1
Moderate	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0
Severe	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Lipidosis										
Minimal	1	0	0	0	2	7	2	2	0	1
Mild	0	0	0	0	0	1	1	2	0	1
Moderate	0	0	0	0	0	2	0	4	3	4
Lungs										
Aggregates, alveolar macrophage										
Minimal	1	0	1	1	1	4	4	3	3	1
Lymph nodes, mandibular	(9)				(0)		(0)		(8)	
Decrease, lymphocyte (cortex)										
Mild	0	0	0	0					3	2
Moderate	0	0	0	0					5	3
Severe	0	0	0	0					0	1

次頁へ続く

2.6.7 毒性試験概要表

一般名：ブデソニド／グリコピロニウム臭化物／ホルモテロール fumarate 水和物

Daily Dose (µg/kg/day) (budesonide / glycopyrrolate / formoterol fumarate)	Air Control		Vehicle Control		1820 / 96.4 / 56.2	1950 / 103 / 63.0	3680 / 197 / 114	3940 / 211 / 122	7660 / 407 / 236	8160 / 434 / 251
	M: 10 M: 5	F: 10 F: 5	M: 10 M: 5	F: 10 F: 5	M: 10 M: 5	F: 10 F: 5	M: 10 M: 5	F: 10 F: 5	M: 10 M: 5	F: 10 F: 5
Number of Animals										
Main Recovery										
Lymph nodes, mesenteric					(0)	(0)	(0)	(0)		
Decrease, lymphocyte (cortex)										
Mild	0	0	0	0					3	3
Moderate	0	0	0	0					6	3
Severe	0	0	0	0					1	0
Lymph nodes, tracheobronchial					(6)	(8)	(4)	(2)	(6)	(2)
Decrease, lymphocyte (cortex)										
Minimal	0	0	0	0	1	3	1	1	0	0
Mild	0	0	0	0	1	4	0	0	0	0
Moderate	0	0	0	0	0	1	2	1	4	0
Severe	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2
Spleen										
Decrease, lymphocyte (PALS, follicles)										
Minimal	0	0	0	0	0	4	7	5	1	3
Mild	0	0	0	0	0	1	0	3	6	0
Moderate	0	0	0	0	0	1	0	0	3	3
Stomach					(1)	(4)	(3)	(3)		
Degeneration, epithelial (with erosion)										
Minimal	0	0	0	0	1	1	1	2	2	0
Mild	0	0	0	0	0	1	0	0	2	1
Moderate	0	0	0	0	0	0	0	1	3	0

次頁へ続く

2.6.7 毒性試験概要表

一般名：ブデソニド／グリコピロニウム臭化物／ホルモテロール fumarate 水和物

Daily Dose ($\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$) (budesonide / glycopyrrolate / formoterol fumarate)	Air Control		Vehicle Control		1820 / 96.4 / 56.2	1950 / 103 / 63.0	3680 / 197 / 114	3940 / 211 / 122	7660 / 407 / 236	8160 / 434 / 251
Number of Animals										
Main Recovery	M: 10 M: 5	F: 10 F: 5	M: 10 M: 5	F: 10 F: 5	M: 10 M: 5	F: 10 F: 5	M: 10 M: 5	F: 10 F: 5	M: 10 M: 5	F: 10 F: 5
Thymus Decrease, lymphocyte (cortex)					(8)		(9)	(7)		
Moderate	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
Severe	0	0	0	0	7	10	9	7	10	6
Post-dose Evaluation: Noteworthy findings										
Died or Sacrificed Moribund	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
Body Weight Gain (%)^b	(g)		(g)							
Days 0-15	61.4	17.7	92.7	16.1	-106**	-309**	-134**	-354**	-167**	-473**
Days 15-29	39.3	11.9	44.6	14.0	+71.1	+177**	+82.1*	+119**	+90.8**	+164**
Haematology Lymphocytes ($10^3/\mu\text{L}$)	4.35	5.43	8.15	6.51	2.83	2.08	3.21	1.42	2.17	1.26
Organ Weights (%)^{b, d}	(g)		(g)							
Adrenals	0.044	0.060	0.057	0.061	-26.8	-24.5	-28.6	-40.5	-46.4	-24.0
Thymus	0.407	0.356	0.410	0.423	-26.3	-43.8	-40.7	-69.5	-57.7	-80.0
Histopathology Number examined (unless indicated otherwise)	5	5	5	5	5	5	5	5	4	4
Bone, femur w. marrow Decreased cellularity					(0)	(0)	(0)	(1)		
Minimal	0	0	0	0				0	3	1
Mild	0	0	0	0				0	1	0

次頁へ続く

2.6.7 毒性試験概要表

一般名：ブデソニド／グリコピロニウム臭化物／ホルモテロール fumarate 水和物

Daily Dose (µg/kg/day) (budesonide / glycopyrrolate / formoterol fumarate)	Air Control		Vehicle Control		1820 / 96.4 / 56.2	1950 / 103 / 63.0	3680 / 197 / 114	3940 / 211 / 122	7660 / 407 / 236	8160 / 434 / 251
Number of Animals										
Main Recovery	M: 10 M: 5	F: 10 F: 5	M: 10 M: 5	F: 10 F: 5	M: 10 M: 5	F: 10 F: 5	M: 10 M: 5	F: 10 F: 5	M: 10 M: 5	F: 10 F: 5
Bone, sternum w. marrow Cellularity, decreased Minimal	0	0	0	0	(0)	(0)	(0)	(0)	4	1
Lymph nodes, mandibular Decrease, lymphocyte (cortex) Minimal Mild	0 0	0 0	0 0	0 0	(0)	(0)	(0)	(0)	0 0	1 1
Lymph nodes, mesenteric Decrease, lymphocyte (cortex) Minimal Mild	0 0	0 0	1 0	0 0	(0)	(0)	(0)	(0)	3 1	2 2
Lymph nodes, tracheobronchial Decrease, lymphocyte (cortex) Minimal Mild	1 0	(4) 0	0 0	0 0	0 0	0 0	(4) 0	(4) 0	(2) 1	(3) 1
Spleen Decrease, lymphocyte (PALS, follicles) Minimal	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3
Thymus Decrease, lymphocyte (cortex) Minimal Mild Moderate	0 0 0	0 0 0	0 0 0	0 0 0	0 0 0	0 0 0	1 0 0	1 0 0	0 0 1	1 3 0

M = male, F = female.

- No noteworthy findings; + Mild; ++ Moderate; +++ Marked.

* p<0.05; ** p<0.01. Body weight, haematology and serum chemistry data analysed using Dunnett's Test.

2.6.7 毒性試験概要表

一般名：ブデソニド／グリコピロニウム臭化物／ホルモテロールフマル酸塩水和物

- ^a Day 14 mean data shown: limited number of sampling times precluded calculation of AUC values. Additional (satellite) animals were used for the toxicokinetic assessment.
- ^b For controls, group means are shown, for treated groups, percent differences from placebo controls are shown. Statistical significance is based on actual data (not on the percent differences).
- ^c Key adverse clinical observations were wasting and skin lesions, with hair loss in females at the mid and high doses.
- ^d Both absolute and relative weights differed from controls in the direction indicated. Displayed figures are for the absolute organ weight effects.

2.6.7 毒性試験概要表

一般名：ブデソニド/グリコピロニウム臭化物/ホルモテロールフマル酸塩水和物

表 41 14-Day Inhalation Toxicity Study in Dogs with BGF MDI^{4.2.3.2.9}

Report Title: Glycopyrronium:Formoterol Fumarate:Budesonide pMDI And Budesonide:Formoterol Fumarate pMDI: 14-Day Face Mask Inhalation Exposure Study with Recovery In Male And Female Beagle Dogs		Study No. FY14-036A
Species / Strain: Dogs / Beagle	Duration of Dosing: 14 days	Special Features: MDI
Initial Age: 5-7 months	Duration of Post-dose: 14 days	GLP Compliance: Yes
Date of First Dose: [REDACTED] 20[REDACTED]	Method of Administration: Inhalation Face Mask	
Vehicle / Formulation: budesonide, glycopyrrolate, formoterol fumarate, propellant HFA-134a, DSPC, calcium chloride in an MDI		
Presumed No Observed Adverse Effect Level: Not determined		
<p>Conclusion: Exposure to inhaled budesonide/glycopyrrolate/formoterol fumarate (BGF) in dogs for 14 days resulted in corroborative changes in clinical pathology, organ weights, and histopathology that were characteristic responses to corticosteroids, e.g. budesonide in the formulation. The ‘stress’ leukogram, e.g. increased neutrophils and decreased lymphocytes in the circulation was a typical finding following exposure to budesonide. Changes in white blood cell types with lower cell numbers, such as monocytes and eosinophils, showed higher variability probably due to limited group size or lower sensitivity of canine to budesonide as a testing species in general. Organ weight changes were mainly reflected in decrease of adrenal glands and thymus, a suppression resulting from budesonide exposure, as well as increase in liver weight which might be due to increased demand for metabolism of budesonide and/or altered fat/glucose metabolism. Consistent findings were observed from the microscopic examinations, including adrenal cortical atrophy, hepatocellular alteration, as well as hypocellularity in the cortex of thymus and lymph nodes. Reduced number of lymphocytes in both circulation and immune tissues was the result of immunosuppression from budesonide. The presence of Glycopyrronium and/or Formoterol fumarate in the formulation did not seem to alter the overall pathological response to the exposures. After a 14 day recovery period, some evidence of recovery was present in all affected tissues in most animals. Haematology, serum chemistry and most organ weight (except thymus) parameters had all returned to normal. Microscopically, the liver had returned to normal while adrenal and thymic changes were reduced, but persistent to some degree. Clinical observation mainly revealed liquid or soft stools after repeated exposures. No test article related changes were found in body weights, ophthalmology, ECG, or respiratory parameters.</p> <p>A No Observed Adverse Effect Level (NOAEL) was not defined in this study for BGF MDI.</p>		

次頁へ続く

2.6.7 毒性試験概要表

一般名：ブデソニド／グリコピロニウム臭化物／ホルモテロール fumarate 酸塩水和物

Daily Dose ($\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$) (budesonide / glycopyrrolate / formoterol fumarate)	Air Control		Vehicle Control		131 / 6.72 / 4.22	132 / 6.77 / 4.25	257 / 13.3 / 8.40	263 / 13.6 / 8.59	424 / 21.6 / 13.5	431 / 21.9 / 13.7
Number of Animals										
Main	M: 4	F: 4	M: 3	F: 3	M: 3	F: 3	M: 3	F: 3	M: 4	F: 4
Recovery	M: 2	F: 2	M: 2	F: 2	M: 2	F: 2	M: 2	F: 2	M: 2	F: 2
Toxicokinetics^a:										
Budesonide										
AUC _(last) (ng·h/mL)					16.7	18.7	39.6	48.2	81.8	93.8
C _{max} (ng/mL)					10.7	17.6	29.4	46.6	55.1	61.6
Glycopyrronium										
AUC _(last) (ng·h/mL)					0.979	0.839	2.18	3.25	2.91	7.88
C _{max} (ng/mL)					0.513	0.385	1.33	0.937	1.97	4.97
Formoterol fumarate										
AUC _(last) (ng·h/mL)					0.838	0.753	1.73	4.78	3.15	4.14
C _{max} (ng/mL)					0.290	0.329	0.648	0.774	0.985	1.75
Noteworthy Findings										
Died or Sacrificed Moribund	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Clinical Observations^b	-	-	-	-	+	+	++	++	++	++
Haematology										
Basophils (10 ³ / μL)	0.04	0.05	0.03	0.04	0.05	0.06	0.05	0.06	0.08*	0.05
Eosinophils (10 ³ / μL)	0.16	0.21	0.13	0.25	0.16	0.09*	0.12	0.12	0.06	0.08*
Large unstained cells (10 ³ / μL)	0.03	0.03	0.02	0.02	0.05	0.06	0.05	0.09	0.08	0.11*
Lymphocytes (10 ³ / μL)	2.51	3.43	2.82	2.64	2.41	1.77	2.18	2.71	1.77*	2.68
Monocytes (10 ³ / μL)	0.34	0.69	0.40	0.30	0.71	0.80	1.12**	1.10	0.40	1.60*
Neutrophils (10 ³ / μL)	3.92	6.64	3.91	4.34	5.87	6.70	7.71*	14.48*	7.32*	12.76*
Platelets (10 ³ / μL)	313	403	345	310	306	403	375	526*	409	392
White blood cells (10 ³ / μL)	6.99	11.04	7.32	7.58	9.25	9.46	11.22*	18.56*	9.71	17.28*

次頁へ続く

2.6.7 毒性試験概要表

一般名：ブデソニド／グリコピロニウム臭化物／ホルモテロール fumarate 酸塩水和物

Daily Dose ($\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$) (budesonide / glycopyrrolate / formoterol fumarate)	Air Control		Vehicle Control		131 / 6.72 / 4.22	132 / 6.77 / 4.25	257 / 13.3 / 8.40	263 / 13.6 / 8.59	424 / 21.6 / 13.5	431 / 21.9 / 13.7
Number of Animals										
Main	M: 4	F: 4	M: 3	F: 3	M: 3	F: 3	M: 3	F: 3	M: 4	F: 4
Recovery	M: 2	F: 2	M: 2	F: 2	M: 2	F: 2	M: 2	F: 2	M: 2	F: 2
Serum Chemistry										
Albumin (g/dL)	3.3	3.3	3.3	3.3	3.7	3.7*	3.7	3.1	3.6	3.8*
ALP (IU/L)	114	119	103	129	173	210	144	223*	185	258*
Cholesterol (g/dL)	147	153	155	160	156	116	77**	108	113*	152
GGT (IU/L)	3	2	1	1	4	6	5	4	4	9
Globulin (g/dL)	1.8	2.0	1.7	1.8	2.0*	2.0	2.0*	2.0	2.0*	2.0
Total protein (g/dL)	5.0	5.3	5.0	5.1	5.6*	5.8**	5.6*	5.1	5.6*	6.0**
Triglycerides (mg/dL)	48	51	33	56	66*	91	33	54	50	62
Organ Weights (%)^{c,d}	(g)		(g)							
Adrenal	1.077	1.057	0.937	0.942	-25.2	-17.1	-33.8	-31.0*	-19.1	-39.1**
Heart	58.681	55.093	58.267	59.050	-8.0	-14.0	+2.4	-12.0	-5.9	-21.9*
Liver	265.142	235.030	281.134	248.646	+26.3*	+34.4*	+21.8	+34.8*	+29.2*	+33.8*
Lung, Left Caudal	17.076	16.275	15.162	17.550	-9.5	-28.0	-1.5	-19.6	-8.9	-33.7*
Lung, Right Caudal	16.605	15.637	14.865	16.914	-11.9	-27.1*	-4.9	-23.0	-7.1	-24.3
Thymus	10.395	7.233	7.199	9.171	-51.9	-62.1*	-51.2	-56.4	-56.5	-76.2**
Histopathology										
Number examined	4	4	3	3	3	3	3	3	4	4
Adrenals										
Cortical atrophy (Zona Fasciculata/Reticularis)										
Minimal	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0
Mild	0	0	0	0	3	2	2	2	3	3
Moderate	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1

次頁へ続く

2.6.7 毒性試験概要表

一般名：ブデソニド／グリコピロニウム臭化物／ホルモテロール fumarate 水和物

Daily Dose (µg/kg/day) (budesonide / glycopyrrolate / formoterol fumarate)	Air Control		Vehicle Control		131 / 6.72 / 4.22	132 / 6.77 / 4.25	257 / 13.3 / 8.40	263 / 13.6 / 8.59	424 / 21.6 / 13.5	431 / 21.9 / 13.7
	M: 4 M: 2	F: 4 F: 2	M: 3 M: 2	F: 3 F: 2	M: 3 M: 2	F: 3 F: 2	M: 3 M: 2	F: 3 F: 2	M: 4 M: 2	F: 4 F: 2
Liver Periportal hepatocellular alteration										
Mild	0	0	0	0	2	2	2	0	0	0
Moderate	0	0	0	0	1	1	1	3	4	3
Severe	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Lung Accumulation, alveolar macrophage										
Minimal	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Inflammation, chronic (peribronchovascular)										
Minimal	4	4	2	3	2	0	2	0	1	0
Inflammation, mixed (alveolar)										
Minimal	3	4	2	3	1	0	2	0	2	2
Lymph node, tracheobronchial Decreased cortical lymphocytes										
Minimal	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
Mild	0	0	0	0	1	0	1	2	3	2
Thymus Decreased cortical lymphocytes										
Moderate	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
Severe	0	0	0	0	2	3	3	3	4	4

次頁へ続く

2.6.7 毒性試験概要表

一般名：ブデソニド／グリコピロニウム臭化物／ホルモテロール fumarate 水和物

Daily Dose ($\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$) (budesonide / glycopyrrolate / formoterol fumarate)	Air Control		Vehicle Control		131 / 6.72 / 4.22	132 / 6.77 / 4.25	257 / 13.3 / 8.40	263 / 13.6 / 8.59	424 / 21.6 / 13.5	431 / 21.9 / 13.7
Number of Animals										
Main	M: 4	F: 4	M: 3	F: 3	M: 3	F: 3	M: 3	F: 3	M: 4	F: 4
Recovery	M: 2	F: 2	M: 2	F: 2	M: 2	F: 2	M: 2	F: 2	M: 2	F: 2
Post-dose Evaluation:										
Number Evaluated	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Noteworthy findings										
Haematology										
Lymphocytes ($10^3/\mu\text{L}$)	2.24	2.51	2.63	2.93	2.86	2.12	1.97	1.47**	1.85	2.17
Organ Weights (%)^{c, d}	(g)		(g)							
Kidney	39.199	36.599	52.535	36.236	-13.0	+7.9	-10.7	+7.6	-20.9*	+26.8
Thymus	10.403	6.716	6.574	11.142	+29.1	-49.1	-22.1	-67.0*	-57.6	-30.1
Histopathology										
Number examined	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Adrenals										
Cortical atrophy (Zona Fasciculata/Reticularis)										
Minimal	0	0	0	0	1	2	1	1	2	0
Mild	0	0	0	0	1	0	0	1	0	2
Moderate	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
Lung										
Accumulation, alveolar macrophage										
Minimal	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Inflammation, chronic (peribronchovascular)										
Minimal	2	1	2	1	1	1	2	2	1	2
Inflammation, mixed (alveolar)										
Minimal	1	0	0	1	1	1	2	1	2	2

次頁へ続く

2.6.7 毒性試験概要表

一般名：ブデソニド／グリコピロニウム臭化物／ホルモテロール fumarate 酸塩水和物

Daily Dose (µg/kg/day) (budesonide / glycopyrrolate / formoterol fumarate)	Air Control		Vehicle Control		131 / 6.72 / 4.22	132 / 6.77 / 4.25	257 / 13.3 / 8.40	263 / 13.6 / 8.59	424 / 21.6 / 13.5	431 / 21.9 / 13.7
	M: 4 M: 2	F: 4 F: 2	M: 3 M: 2	F: 3 F: 2	M: 3 M: 2	F: 3 F: 2	M: 3 M: 2	F: 3 F: 2	M: 4 M: 2	F: 4 F: 2
Number of Animals										
Main Recovery	M: 4 M: 2	F: 4 F: 2	M: 3 M: 2	F: 3 F: 2	M: 3 M: 2	F: 3 F: 2	M: 3 M: 2	F: 3 F: 2	M: 4 M: 2	F: 4 F: 2
Lymph node, tracheobronchial Decreased cortical lymphocytes Mild	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
Thymus Decreased cortical lymphocytes										
Minimal	0	0	0	0	1	2	0	0	0	0
Mild	0	0	0	0	0	0	2	1	0	1
Moderate	0	0	0	0	0	0	0	0	2	1
Severe	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0

M = male, F = female.

- No noteworthy findings; + Mild; ++ Moderate.

* p<0.05; ** p<0.01. Haematology, serum chemistry and organ weight data analysed using ANOVA/Dunnett's Test.

^a Day 14 mean data shown.

^b The most common clinical observations observed throughout the study were related to liquid or soft stool.

^c For controls, group means are shown, for treated groups, percent differences from placebo controls are shown. Statistical significance is based on actual data (not on the percent differences).

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

2.6.7 毒性試験概要表

一般名：ブデソニド／グリコピロニウム臭化物／ホルモテロール fumarate 酸塩水和物

表 42 3-Month Inhalation Toxicity Study in Dogs with BGF MDI^{4.2.3.2.16}

Report Title: Budesonide:Glycopyrronium:Formoterol Fumarate: pMDI and Budesonide:Formoterol Fumarate pMDI: 90-Day Face Mask Inhalation Exposure Study in Male and Female Beagle Dogs		Study No. FY14-148A
Species / Strain: Dogs / Beagle	Duration of Dosing: 90 days	Special Features: MDI
Initial Age: approximately 5-7 months	Duration of Post-dose: None	GLP Compliance: Yes
Date of First Dose: [REDACTED] 20[REDACTED]	Method of Administration: Inhalation Face Mask	
Vehicle / Formulation: budesonide, glycopyrrolate, formoterol fumarate, propellant HFA-134a, DSPC, calcium chloride in an MDI		
No Observed Adverse Effect Level: Not determined		
<p>Conclusion: Exposure to inhaled budesonide/glycopyrrolate/formoterol fumarate (BGF) MDI in male or female beagle dogs via face mask inhalation for 90 consecutive days resulted in tissue responses in adrenal glands, liver, and thymus, consistent with the effects of corticosteroids. Such changes were usually corroborative across several different pathology endpoints (e.g. organ weights, clinical pathology and histopathology), though perfect correlations and/or a clear dose response were not always seen in this study. No consistent evidence of gender disparity across pathology endpoints was present. Respiratory tract effects were not seen in any dose group.</p> <p>Specific organ weight changes identified and attributed to exposure included decreased adrenal gland weights, increased liver weights and decreased thymus weights. The weight changes corresponded to histologic findings of adrenal cortical atrophy (zona fasciculata and zona reticularis), hepatocellular alteration consistent with glycogen accumulation and/or increased metabolic activity (an adaptive response), and thymic cortex lymphocyte decreases. Changes in clinical pathology parameters attributed to exposure included minor alterations in serum chemistry (minor increases in the liver enzymes alkaline phosphatase and gamma glutamyl transferase, and minor albumin and triglyceride elevations).</p> <p>A clear No Observed Adverse Effect Level (NOAEL) was not observed in this study. However overall the few possible Low dose effects for BGF were minimal in nature. There was a dose related change associated with the known effects of budesonide and/or formoterol fumarate. At the Low dose level for BGF, there were minimal differences from controls. Adrenal cortical changes seen in higher dose groups were not present, while liver hepatocellular alteration (an adaptive response) was present in a minority (3/8) of animals at minimal severity in the Low dose groups. Thymic cortical lymphocyte decreases persisted in most (7/8) animals at minimal severity in the Low dose groups. Biologically significant elevations in serum chemistry parameters were not present in Low dose animals.</p> <p>The changes in tissues and clinical pathology in this study were characteristic of the well described effects of corticosteroids, and were likely in response to the budesonide component present in BGF.</p>		

次頁へ続く

2.6.7 毒性試験概要表

一般名：ブデソニド／グリコピロニウム臭化物／ホルモテロール fumarate 水和物

Daily Dose (µg/kg/day) (budesonide / glycopyrrolate / formoterol fumarate)	Air Control		Vehicle Control		3.16 / 0.20 / 0.10	3.35 / 0.21 / 0.11	16.73 / 1.06 / 0.60	17.55 / 1.11 / 0.63	58.39 / 3.39 / 1.94	61.37 / 3.56 / 2.03
Number of Animals	M: 4	F: 4	M: 4	F: 4	M: 4	F: 4	M: 4	F: 4	M: 4	F: 4
Toxicokinetics^a:										
Budesonide										
AUC _(last) (ng·h/mL)					0.426	0.285	1.96	3.12	13.8	13.1
C _{max} (ng/mL)					0.822	0.446	1.90	4.99	22.9	18.6
Glycopyrronium										
AUC _(last) (ng·h/mL)					ND	ND	0.0388	0.0291	0.634	0.688
C _{max} (ng/mL)					ND	ND	0.0336	0.0514	0.324	0.380
Formoterol fumarate										
AUC _(last) (ng·h/mL)					ND	ND	0.0347	0.0506	0.370	0.324
C _{max} (ng/mL)					ND	ND	0.0298	0.0440	0.346	0.219
Noteworthy Findings										
Died or Sacrificed Moribund	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Body Weight Gain (%)^b	(kg)		(kg)							
Days 0-91	1.5	0.8	0.9	1.5	+77.8	-60.0*	+33.3	-93.3*	+22.2	-80.0*
Clinical Observations^c	++	+	++	+	++	+	++	+	++	+
Serum Chemistry										
Albumin (g/dL)	3.4	3.5	3.5	3.5	3.3	3.7*	3.6*	3.7	3.7*	3.8*
ALP (IU/L)	89	59	82	92	51*	58	68	55	115*	155
Triglycerides (mg/dL)	41	39	39	42	34	30	74*	47	68	76
Organ Weights (%)^{b, d}	(g)		(g)							
Adrenal	1.13	1.14	1.08	1.14	0.74*	0.64*	0.56**	0.47**	0.75**	0.73
Liver	344	286	373	286	348	252	373	318	384	314
Thymus	14.5	9.46	8.51	11.7	10.0	5.62**	7.05	5.07**	6.90	4.39**

次頁へ続く

2.6.7 毒性試験概要表

一般名：ブデソニド／グリコピロニウム臭化物／ホルモテロール fumarate 水和物

Daily Dose (µg/kg/day) (budesonide / glycopyrrolate / formoterol fumarate)	Air Control		Vehicle Control		3.16 / 0.20 / 0.10	3.35 / 0.21 / 0.11	16.73 / 1.06 / 0.60	17.55 / 1.11 / 0.63	58.39 / 3.39 / 1.94	61.37 / 3.56 / 2.03
Number of Animals	M: 4	F: 4	M: 4	F: 4	M: 4	F: 4	M: 4	F: 4	M: 4	F: 4
Histopathology										
Number examined	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
Adrenals										
Cortical atrophy (Zona Fasciculata/Reticularis)										
Minimal	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1
Mild	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0
Moderate	0	0	0	0	0	0	2	2	4	3
Liver										
Periportal hepatocellular alteration										
Minimal	0	0	0	0	1	2	4	1	2	0
Mild	0	0	0	0	0	0	0	2	0	2
Moderate	0	0	0	0	0	0	0	1	2	0
Thymus										
Decreased cortical lymphocytes	0	0	0	0	3	3	1	0	0	0
Minimal	0	0	0	0	1	0	2	1	0	0
Moderate	0	0	0	0	0	0	1	3	4	4
Severe										

M = male, F = female.

- No noteworthy findings; + Mild; ++ Moderate.

* p<0.05; ** p<0.01. Body weight, serum chemistry and organ weight data analysed using Dunnett's Test.

^a Day 90 mean data is shown.^b For controls, group means are shown, for treated groups, percent differences from placebo controls are shown. Statistical significance is based on actual data (not on the percent differences).^c Clinical observations primarily consisted of liquid/soft stools.^d Both absolute and relative weights differed from controls in the direction indicated. Displayed figures are for the absolute organ weight effects.

2.6.7 毒性試験概要表

一般名：ブデソニド／グリコピロニウム臭化物／ホルモテロールフマル酸塩水和物

2.6.7.8 *In Vitro* 遺伝毒性試験

表 43 Bacterial Reverse Mutation Assay with Glycopyrronium Bromide (Glycopyrrolate)^{4.2.3.3.1.1}

Report Title: Bacterial Reverse Mutation Assay		Study No. AD91RW.502ICH.BTL
Strain: <i>S. typhimurium</i> TA98, TA100, TA1535, TA1537, and <i>E. coli</i> WP2 <i>uvrA</i>		
Metabolizing System: Aroclor induced rat liver S9		GLP Compliance: Yes
Vehicle: Sterile Water	For Test Article: Sterile Water	For Positive Controls: 2-aminoanthracene, 2-nitrofluorene, sodium azide, 9-aminoacridine, methyl methanesulfonate
Treatment: Preliminary Toxicity Assay: 6.7, 10, 33, 67, 100, 333, 667, 1000, 3333 and 5000 µg per plate		
Mutagenicity Assay: 100, 333, 1000, 3333 and 5000 µg per plate		
Cytotoxic Effects: The dose levels tested were 6.7, 10, 33, 67, 100, 333, 667, 1000, 3333 and 5000 µg per plate. Neither precipitate nor toxicity was observed.		
Genotoxic Effects: In the mutagenicity assay, no positive mutagenic responses were observed with any of the tester strains in either the presence or absence of S9 activation. Neither precipitate nor background lawn toxicity was observed. Under the conditions of this study, Glycopyrronium Bromide (Glycopyrrolate) was concluded to be negative in the Bacterial Reverse Mutation Assay.		

次頁へ続く

2.6.7 毒性試験概要表

一般名：ブデソニド／グリコピロニウム臭化物／ホルモテロールフマル酸塩水和物

Metabolic activation	Test article	Dose level (µg/plate)	Mutagenicity Assay				
			TA98	TA100	TA1535	TA1537	WP2uvrA
Without activation	Sterile water	100 µL/plate	12 ± 6	96 ± 16	9 ± 2	5 ± 1	16 ± 4
	Glycopyrronium bromide	100	9 ± 1	106 ± 17	8 ± 2	5 ± 1	21 ± 4
		333	15 ± 4	100 ± 10	8 ± 1	7 ± 4	24 ± 7
		1000	19 ± 7	109 ± 7	7 ± 2	5 ± 3	22 ± 4
		3333	19 ± 1	82 ± 9	7 ± 1	5 ± 1	10 ± 3
		5000	19 ± 4	82 ± 12	5 ± 2	6 ± 1	14 ± 5
	2NF	1.0	95 ± 18	561 ± 68	138 ± 25	459 ± 185	263 ± 45
	SA	1.0					
	9AAD	75					
	MMS	1000					
With activation	Sterile water	100 µL/plate	16 ± 6	88 ± 14	13 ± 1	7 ± 1	20 ± 3
	Glycopyrronium bromide	100	10 ± 2	92 ± 13	9 ± 2	7 ± 5	22 ± 3
		333	18 ± 2	91 ± 15	11 ± 1*	9 ± 2	25 ± 7
		1000	16 ± 11	106 ± 3	8 ± 2	5 ± 5	28 ± 2
		3333	23 ± 1	80 ± 11	12 ± 5	7 ± 4	17 ± 4
		5000	16 ± 9	104 ± 15	6 ± 1	9 ± 2	24 ± 2
	2AA	1.0	388 ± 96	712 ± 96	78 ± 11	50 ± 3	318 ± 17
	2AA	2.0					
	2AA	15					

SA Sodium azide
 2AA 2-amino anthracene
 9AAD 9-Aminoacridine
 2NF 2-nitrofluorene
 MMS Methyl methane sulfonate

* One replicate plate was lost due to contamination. Therefore standard deviation was calculated where n=2.

2.6.7 毒性試験概要表

一般名：ブデソニド／グリコピロニウム臭化物／ホルモテロールフマル酸塩水和物

表 44 *In Vitro* Mammalian Cell Micronucleus Assay in TK6 Cells with Glycopyrronium Bromide (Glycopyrrolate)^{4.2.3.3.1.2}

Report Title: <i>In Vitro</i> Mammalian Cell Micronucleus Assay in TK6 Cells		Study No. AD91RW.361ICH.BTL
Strain: TK6 cells		
Metabolizing System: Aroclor induced rat liver S9		GLP Compliance: Yes
Vehicle: Sterile Water	For Test Article: Sterile Water	For Positive Control: mitomycin C, vinblastine, cyclophosphamide
Treatment: Preliminary Toxicity Assay: 0.0398 to 398 µg/mL (1 mM)		
Micronucleus assay: 50 to 398 µg/mL		
<p>Cytotoxic Effects: In the micronucleus assay, substantial cytotoxicity was not observed at any dose level in any of the treatment groups. The highest dose analyzed under each treatment condition was the highest dose tested in the micronucleus assay, which met the dose limit as recommended by testing guidelines for this assay.</p> <p>Based on the findings of this study, Glycopyrronium Bromide (Glycopyrrolate) was conducted to be negative for the induction of micronuclei in both non-activated and S9-activated test systems in the <i>in vitro</i> mammalian cell micronucleus test using TK6 cells.</p>		

次頁へ続く

2.6.7 毒性試験概要表

一般名：ブデソニド／グリコピロニウム臭化物／ホルモテロールフマル酸塩水和物

Metabolic activation	Test article	Dose	PD ^a	Cytotoxicity ^b (% of control)	Percentage of MNMN ^c cells per total mononucleated cells counted
27hr continuous treatment Without activation	Water	NA	1.7	0	0.55
	Glycopyrronium bromide	100 µg/mL	1.6	4	0.60
	Glycopyrronium bromide	200 µg/mL	1.6	6	0.45
	Glycopyrronium bromide	398 µg/mL	1.5	8	0.45
	VB	10 ng/mL	1.2	25	2.05**
4hr treatment with 23hr recovery Without activation	Water	NA	1.8	0	0.50
	Glycopyrronium bromide	100 µg/mL	1.8	1	0.45
	Glycopyrronium bromide	200 µg/mL	1.8	0	0.45
	Glycopyrronium bromide	398 µg/mL	1.9	-6	0.45
	MMC	0.08 µg/mL	1.4	24	1.50**
4hr treatment with 23hr recovery With activation	Water	NA	1.7	0	0.45
	Glycopyrronium bromide	100 µg/mL	1.7	-2	0.50
	Glycopyrronium bromide	200 µg/mL	1.7	-2	0.45
	Glycopyrronium bromide	398 µg/mL	1.7	0	0.55
	CP	3 µg/mL	1.2	26	1.45**

MMC: Mitomycin C; CP: Cyclophosphamide; VB: Vinblastine; NA: Not applicable; Fisher's Exact Test: *p≤0.05; **p≤0.01

^a PD = Population doubling

^b Relative to vehicle control

MNMN = micronucleated mononucleate cells

2.6.7 毒性試験概要表

一般名：ブデソニド／グリコピロニウム臭化物／ホルモテロールフマル酸塩水和物

2.6.7.9 *In Vivo* 遺伝毒性試験

表 45 *In Vivo* Micronucleus Assay in Rats with Glycopyrronium Bromide (Glycopyrrolate)^{4.2.3.3.2.1}

Report Title: <i>In Vivo</i> Micronucleus Assay in Rats		Study No. AD91RW.125M012ICH.BTL
Species/Strain: Sprague-Dawley (Hsd:SD) rats	Sampling Time: 24 and 48 hours	GLP Compliance: Yes
Age: 6-7 weeks	Method of Administration: Oral gavage	No.of Cells Analyzed/Animals: 2000
Cells Micronuclei in Evaluated: Polychromatic erythrocyte (PCE) cells in rat bone marrow	Vehicle/Formulation: Deionized water	
Treatment: Dose Range Finding: 500, 1000 and 2000 mg/kg		
Definitive Assay: 500, 1000 and 2000 mg/kg		
Special Features: This study was conducted in compliance with the testing guidelines of the ICH S2(R1) 2011 and OECD 1997.		
Toxic/Cytotoxic Effects: No mortality occurred at any dose level during the course of the definitive assay. Clinical signs included piloerection and diarrhea observed at 2000 mg/kg. All other rats appeared normal throughout the observation period. No appreciable reductions in the PCEs/EC ratio in the test article groups compared to the vehicle control group was observed indicating the test did not induce cytotoxicity.		
Genotoxic Effects: Under the conditions of this study, the administration of Glycopyrronium Bromide (Glycopyrrolate) at doses up to and including a dose of 2000 mg/kg was concluded to be negative in the Micronucleus assay.		
Evidence of Exposure: Study did not include assessment of systemic exposure.		

次頁へ続く

2.6.7 毒性試験概要表

一般名：ブデソニド／グリコピロニウム臭化物／ホルモテロールフマル酸塩水和物

Sampling time	Control/Test article	Dose (mg/kg)	Sex/No. of animals/group	PCE/total erythrocyte (mean ± SD)	Number MnPCE/PCE scored
24 hrs post dose	Vehicle*	0	Male 5	0.534 ± 0.01	2 / 10000
	Glycopyrronium bromide	500	Male 5	0.528 ± 0.01	1 / 10000
		1000	Male 5	0.529 ± 0.00	1 / 10000
		2000	Male 5	0.534 ± 0.01	1 / 10000
	Cyclophosphamide	40	Male 5	0.565 ± 0.02	**216 / 10000
48 hrs post dose	Vehicle*	0	Male 5	0.524 ± 0.01	1 / 10000
	Glycopyrronium bromide	2000	Male 5	0.524 ± 0.01	4 / 10000

* Deionized water

** Statistically significant increase. $p \leq 0.05$ (Kastenbaum-Bowman Tables. Binominal distribution)

PCE: polychromatic erythrocyte; MnPCE: micronucleated polychromatic erythrocytes

2.6.7 毒性試験概要表

一般名：ブデソニド／グリコピロニウム臭化物／ホルモテロールフマル酸塩水和物

2.6.7.10 がん原性試験

表 46 104-Week Inhalation Toxicity Study in Mice with GP MDI^{4.2.3.4.1.1}

Report Title: Glycopyrrolate pMDI: Up to 104 Week Nose-Only Inhalation Toxicology Study in B6C3F1		Study Number: FY14-128
Species/strain: Mouse/B6C3F1	Duration of dosing: 104 Weeks	GLP compliance: Yes
Initial age: approximately 12 weeks	Method of administration: Inhalation nose-only	
Date of first dose: ████████ 20██	Vehicle/formulation: Calcium Chloride Dihydrate (CaCl ₂) and 1,2-Distearoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholine (DSPC), propellant HFA-134a	Treatment of controls: Inhalation nose-only
Basis for high-dose selection: The high dose was determined by an initial study (14-day nose only inhalation study: FY14-111). This study demonstrated that the high dose would be tolerated and was the maximum technically feasible, based on minimum oxygen requirements.		
Special features: None		
Conclusion: Chronic administration of glycopyrrolate under the conditions of this study was not carcinogenic in mice at any dose level. All dose levels showed statistically significant reduction in body weight gains even though none of the clinical observations seemed to be related with test article treatment. On the histological level, limited non-neoplastic effects were observed and were associated with test article treatment. In conclusion, evidence of toxicity in the nose were considered to be non-specific effects of inhalation, which were likely not related mechanistically to the treatment with glycopyrrolate but rather were simply physical effects resulting from the high loads of inhaled exogenous material.		

次頁へ続く

2.6.7 毒性試験概要表

一般名：ブデソニド／グリコピロニウム臭化物／ホルモテロールフマル酸塩水和物

Daily dose (µg/kg)	Air Control		Vehicle Control		347	335	705	700	1460	1420
Gender	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F
Toxicokinetics:	Not conducted									
<u>Noteworthy Findings</u>										
Number of animals:										
At start	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60
Died/sacrificed moribund	14	19	20	19	15	22	15	17	15	20
Terminal sacrifice	46	41	40	41	45	38	45	43	45	40
Survival (%)	76.7	68.3	66.7	68.3	75.0	63.3	75.0	71.7	75.0	66.7
Body Weight at Week 102 (g)^a	(g)		(g)							
	38.9	38.7	39.2	38.5	-1.0	-5.7	-8.7*	-14.5*	-16.6*	-27.3*
Clinical Observation										
Bruising	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Damaged ear	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0
Damaged hindlimb	0	1	0	1	0	0	1	0	0	2
Hair loss	2	1	0	5	0	3	2	0	0	2
Abrasion	0	0	2	1	1	2	1	0	3	1
Laceration	0	6	0	3	0	2	2	0	3	4
Lesion	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0
Skin-red	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
Skin-swelling	1	0	2	1	3	1	5	0	3	0
Rough hair coat	0	0	0	1	0	0	2	0	1	0
Rash	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
Scar	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
Gasping	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Labored respiration	0	1	2	1	0	0	2	0	1	1
Rapid respiration	0	1	2	0	1	1	3	1	0	0
Lump/Mass	3	2	1	5	2	5	3	3	3	4

次頁へ続く

2.6.7 毒性試験概要表

一般名：ブデソニド／グリコピロニウム臭化物／ホルモテロールフマル酸塩水和物

Daily dose (µg/kg)	Air Control		Vehicle Control		347	335	705	700	1460	1420
Number of Animals Evaluated (unless otherwise indicated)	M: 60	F: 60	M: 60	F: 60	M: 60	F: 60	M: 60	F: 60	M: 60	F: 60
Number of animals with neoplastic lesions:										
Systemic										
Haemangiosarcoma	5	1	1	2	4	0	2	2	2	1
Histiocytic sarcoma	2	3	0	1	2	3	3	0	0	1
Lymphoma	1	19	1	17	7	10	3	17	2	4
Harderian glands										
Adenocarcinoma	0	1	3	1	1	1	2	0	5	2
Adenoma	9	1	4	5	4	3	2	1	1	2
Liver										
Hepatocellular Adenoma	20	4	17	8	11	0	14	1	13	0
Hepatocellular Carcinoma	19	1	18	2	11	1	3	1	10	1
Lung, Left										
Alveolar-bronchiolar Adenoma	2	3	3	2	0	1	1	0	1	2
Alveolar-bronchiolar Carcinoma	2	1	2	1	2	0	2	0	1	1
Carcinoma, metastatic	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
Hepatocellular Carcinoma, metastatic	6	0	2	0	2	0	1	1	4	0
Lung, Right										
Alveolar-bronchiolar Adenoma	6	0	6	0	9	7	4	1	1	6
Alveolar-bronchiolar Carcinoma	2	2	7	1	7	1	2	2	4	2
Carcinoma, metastatic	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
Hepatocellular Carcinoma, metastatic	6	0	2	0	4	0	1	0	4	0
Mammary gland										
Adenocarcinoma	-	0	-	0	-	0	-	0	-	2
Pituitary glands										
Adenoma, Pars Distalis	0	6	1	4	0	4	0	2	1	0

次頁へ続く

2.6.7 毒性試験概要表

一般名：ブデソニド／グリコピロニウム臭化物／ホルモテロールフマル酸塩水和物

Daily dose (µg/kg)	Air Control		Vehicle Control		347	335	705	700	1460	1420
Number of Animals Evaluated (unless otherwise indicated)	M: 60	F: 60	M: 60	F: 60	M: 60	F: 60	M: 60	F: 60	M: 60	F: 60
Skin										
Fibrosarcoma	1	1	0	1	0	5	0	2	0	1
Small Intestine - duodenum										
Adenoma	1	0	0	0	0	3	1	0	2	0
Thyroid glands										
Adenoma, follicular cell	8	12	19	27	11	17	14	14	9	12
Noteworthy findings:										
Histopathology - non-neoplastic lesions										
Skin										
Abscess, Preputial Gland	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Abscess, Subcutis	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
Decreased Hair Follicle	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
Edema, Subcutis	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1
Infiltrate, Mononuclear Cell	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1
Inflammation, Chronic, Dermis	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
Inflammation, Chronic, Subcutis	0	0	2	0	1	0	0	0	0	0
Ulcer, Epidermis	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
Nasal turbinates, level 1										
Inflammation, acute	1	1	0	1	2	3	3	1	5	1
Eosinophilic material, airway	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0
Degeneration, hyaline, respiratory epithelium	0	3	27	36	11	24	8	34	24	26

次頁へ続く

2.6.7 毒性試験概要表

一般名：ブデソニド／グリコピロニウム臭化物／ホルモテロールフマル酸塩水和物

Daily dose (µg/kg)	Air Control		Vehicle Control		347	335	705	700	1460	1420
Number of Animals Evaluated (unless otherwise indicated)	M: 60	F: 60	M: 60	F: 60	M: 60	F: 60	M: 60	F: 60	M: 60	F: 60
Nasal turbinates, level 2										
Inflammation, acute	0	1	0	0	2	1	1	1	1	0
Eosinophilic material, airway	0	0	0	0	0	0	0	2	1	2
Degeneration, hyaline, respiratory epithelium	0	1	47	57	17	51	35	55	47	59
Degeneration, hyaline, olfactory epithelium	0	0	1	2	2	5	10	8	15	31
Nasal turbinates, level 3										
Inflammation, acute	0	1	1	0	0	1	0	1	2	0
Eosinophilic material, airway	0	0	0	1	3	0	2	11	0	9
Degeneration, hyaline, respiratory epithelium	0	0	42	14	13	42	35	41	47	56
Degeneration, hyaline, olfactory epithelium	0	0	38	53	39	17	44	40	52	55
Nasal turbinates, level 4										
Inflammation, acute	0	1	3	1	0	0	0	1	1	7
Eosinophilic material, airway	1	0	9	2	3	0	24	28	13	34
Degeneration, hyaline, respiratory epithelium	0	0	0	0	0	6	0	0	2	1
Degeneration, hyaline, olfactory epithelium	0	0	57	47	47	24	57	59	58	60
Stomach										
Hyperplasia, mucosa, glandular	12	2	24	6	37	17	34	16	30	14
Thyroid										
Hyperplasia, follicular cell	53	55	53	56	58	56	59	55	53	57

M = male, F = female.

- No noteworthy findings

* p<0.05 Body weight data was analysed using Dunnett's Test.

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

2.6.7 毒性試験概要表

一般名：ブデソニド／グリコピロニウム臭化物／ホルモテロールフマル酸塩水和物

表 47 104-Week Inhalation Toxicity Study in Rats with GP MDI^{4.2.3.4.1.2}

Report Title: Glycopyrrolate pMDI: Up to 104 Week Nose-Only Inhalation Toxicology Study in Sprague Dawley Rats		Study Number: FY12-072
Species/strain: Rats / Sprague-Dawley (CD)	Duration of dosing: 104 Weeks	GLP compliance: Yes
Initial age: 9-10 weeks	Method of administration: Inhalation nose-only	
Date of first dose: ■■■■ 20■■■	Vehicle/formulation: Calcium Chloride Dihydrate (CaCl ₂) and 1,2-Distearoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholine (DSPC), propellant HFA-134a	Treatment of controls: Inhalation nose-only
Basis for high-dose selection: The high dose was determined by the initial studies that were conducted (ie 14-day nose-only inhalation study: FY08-076; 180-day nose-only inhalation study: FY10-120). These studies demonstrated that the high dose was the maximum technically feasible dose based on minimum oxygen requirements.		
Special features: Exposures were conducted via a nose-only inhalation system 7 days/week.		
Conclusion: Chronic administration of glycopyrrolate under the conditions of this study was not carcinogenic in rats at any dose level. All doses showed statistically significant reductions in body weight gains even though none of the clinical observations seemed to be related to test article treatment. On the histological level, limited non-neoplastic effects were observed within the larynx and nose and were associated with test article treatment. No treatment-related proliferative (ie hyperplastic, pre-neoplastic or neoplastic) changes were observed. Evidence of toxicity in the nose and larynx were considered to be non-specific effects of inhalation which were likely not related mechanistically to the treatment of glycopyrrolate, but rather were simply physical effects resulting from the high loads of inhaled exogenous material.		

次頁へ続く

2.6.7 毒性試験概要表

一般名：ブデソニド／グリコピロニウム臭化物／ホルモテロールフマル酸塩水和物

Daily Dose (µg/kg/day)	Air Control		Vehicle Control		151.70	165.93	302.92	330.66	620.45	684.14
Gender	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F
Toxicokinetics:	Not conducted.									
Noteworthy Findings										
Number of animals:										
At start	70 ^a	70 ^a	70 ^a	70 ^a	70 ^a	70 ^a	70 ^a	70 ^a	70 ^a	70 ^a
Died/sacrificed moribund	22	38	33	34	25	31	25	35	22	31
At terminal sacrifice	37	22	27	25	35	29	32	22	37	29
Survival (%) Week-51	100.0	88.6	91.4	90.0	90.0	92.9	95.7	92.9	98.6	95.7
Survival (%) Terminal	63.3	36.7	45.0	43.3	58.3	48.3	58.3	41.7	63.3	48.3
Body Weight (%)^b										
Week 81 (g)	764.8	520.5	765.9	459.8	-11.9*	-4.9	-20.0**	-0.3	-20.1**	-13.3*
Clinical Observation										
Skin rash	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Skin lesion including abrasion and laceration	11	7	12	10	9	6	4	6	5	4
Organ Weight (g, mean) at terminal sacrifice										
Heart	1.73	1.34	1.80	1.31	1.72	1.23	1.65	1.34	1.62*	1.20
Kidney	3.36	2.44	3.58	2.29	3.17*	2.27	3.08**	2.38	2.92**	2.14
Liver	16	12	18	14	14*	11**	16	12*	13**	10**
Spleen	1.18	0.79	1.18	0.87	0.98	0.76	1.38	0.76	1.14	0.67**
Thymus	0.57	0.50	0.61	0.44	0.45**	0.36	0.41**	0.45	0.34**	0.30**

次頁へ続く

2.6.7 毒性試験概要表

一般名：ブデソニド／グリコピロニウム臭化物／ホルモテロールフマル酸塩水和物

Daily Dose (µg/kg/day)	Air Control		Vehicle Control		151.70	165.93	302.92	330.66	620.45	684.14
12-month sacrifice (including all available pre-terminal animals Day 1 - 365)										
Number of Animals Evaluated (unless otherwise indicated)	M: 10	F: 18	M: 17	F: 17	M: 17	F: 15	M: 13	F: 15	M: 11	F: 14
<u>Noteworthy findings:</u>										
Histopathology - non-neoplastic lesions										
Larynx							(12)		(10)	
Metaplasia, squamous	0	0	3	4	5	1	5	6	5	9
Lung										
Aggregates, alveolar macrophage	6	14	13	10	8	10	7	12	7	9
Nasal turbinates, level 1										
Degeneration, hyaline: respiratory epithelium	0	0	0	0	2	0	0	2	0	1
Inflammation, neutrophilic	0	0	1	0	3	0	0	0	1	0
Nasal turbinates, level 2										
Degeneration, hyaline: olfactory epithelium	0	0	0	0	4	0	2	4	5	3
Inflammation, neutrophilic	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0
Nasal turbinates, level 3										
Degeneration, hyaline: olfactory epithelium	2	0	5	2	5	2	5	7	7	4
Nasal turbinates, level 4										
Degeneration, hyaline: olfactory epithelium	6	3	10	5	9	5	9	8	11	7

次頁へ続く

2.6.7 毒性試験概要表

一般名：ブデソニド／グリコピロニウム臭化物／ホルモテロールフマル酸塩水和物

Daily Dose (µg/kg/day)	Air Control		Vehicle Control		151.70	165.93	302.92	330.66	620.45	684.14
12-month sacrifice (including all available pre-terminal animals Day 1 - 365)										
Number of Animals Evaluated (unless otherwise indicated)	M: 10	F: 18	M: 17	F: 17	M: 17	F: 15	M: 13	F: 15	M: 11	F: 14
<u>Noteworthy findings:</u> Histopathology - non-neoplastic lesions										
Liver										
Hepatocellular Glycogen Accumulation	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0
Hyperplasia, Biliary with Lymphohistiocytic Infiltrates	5	3	5	3	2	1	5	2	4	4
Skin										
Keratoacanthoma; Benih; Primary	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Lipoma; Benign; Primary	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
Skin (subcutis)										
Fibroma; Benign; Primary	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
Hemangiopericytoma; Benign; Primary	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0

次頁へ続く

2.6.7 毒性試験概要表

一般名：ブデソニド／グリコピロニウム臭化物／ホルモテロールフマル酸塩水和物

Daily Dose (µg/kg/day)	Air Control		Vehicle Control		151.70	165.93	302.92	330.66	620.45	684.14
All study animals										
Number of Animals Evaluated (unless otherwise indicated)	M: 70	F: 70	M: 70	F: 70	M: 70	F: 70	M: 70	F: 70	M: 70	F: 70
Number of animals with neoplastic lesions:										
Adrenal glands										
Adenoma, cortex	0	0	0	1	0	3	0	0	0	0
Carcinoma, cortex	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0
Pheochromocytoma, benign	6	1	7	0	4	1	5	1	8	1
Pheochromocytoma, malignant	2	0	2	0	1	0	2	0	0	0
Mammary glands	(44)	(69)	(44)		(47)		(44)		(44)	
Adenocarcinoma	0	11	0	14	0	9	0	7	0	7
Adenoma	0	0	0	3	0	11	0	1	0	1
Fibroadenoma	0	11	0	14	0	20	0	17	0	14
Pituitary gland	(69)			(69)	(67)					(69)
Adenoma, Pars distalis	29	40	29	41	22	39	21	32	22	39
Adenoma, Pars intermedia	0	2	0	0	0	0	0	0	0	1
Thyroid glands										
Adenoma, C-cell	1	5	3	0	1	2	3	6	0	4
Adenoma, follicular cell	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0
Carcinoma, C-cell	1	0	0	2	0	0	0	0	1	0

次頁へ続く

2.6.7 毒性試験概要表

一般名：ブデソニド／グリコピロニウム臭化物／ホルモテロールフマル酸塩水和物

Daily Dose (µg/kg/day)	Air Control		Vehicle Control		151.70	165.93	302.92	330.66	620.45	684.14
Terminal sacrifice (including all available pre-terminal animals)					Day 366 to Final Sacrifice)					
Number of Animals Evaluated (unless otherwise indicated)	M: 60	F: 52	M: 53	F: 53	M: 53	F: 55	M: 57	F: 55	M: 59	F: 56
Noteworthy findings:										
Histopathology - non-neoplastic lesions										
Larynx	(59)					(54)			(58)	
Metaplasia, squamous	5	2	15	10	22	15	34	32	47	43
Lung						(54)				
Aggregates, alveolar macrophage	47	30	30	31	30	38	41	44	51	44
Nasal turbinates, level 1										
Degeneration, hyaline: respiratory epithelium	1	1	0	1	2	3	2	0	3	2
Inflammation, neutrophilic	1	0	4	2	8	4	12	6	11	7
Nasal turbinates, level 2										
Degeneration, hyaline: olfactory epithelium	2	2	1	3	6	6	7	11	23	21
Inflammation, neutrophilic	0	0	3	1	1	0	2	2	2	5
Nasal turbinates, level 3										
Degeneration, hyaline: olfactory epithelium	12	9	18	11	10	15	18	18	41	36
Nasal turbinates, level 4	(59)									
Degeneration, hyaline: olfactory epithelium	29	15	33	21	24	22	29	25	45	39

次頁へ続く

2.6.7 毒性試験概要表

一般名：ブデソニド／グリコピロニウム臭化物／ホルモテロールフマル酸塩水和物

Daily Dose (µg/kg/day)	Air Control		Vehicle Control		151.70	165.93	302.92	330.66	620.45	684.14
Terminal sacrifice (including all available pre-terminal animals Day 366 to Final Sacrifice)										
Number of Animals Evaluated (unless otherwise indicated)	M: 60	F: 52	M: 53	F: 53	M: 53	F: 55	M: 57	F: 55	M: 59	F: 56
Noteworthy findings:										
Histopathology - non-neoplastic lesions										
Liver										
Hepatocellular Glycogen Accumulation	1	3	6	19	0	1	4	0	1	4
Hyperplasia, Biliary with Lymphohistiocytic Infiltrates	23	11	15	10	15	13	16	10	20	9
Cholangioma; Benign; Primary	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Skin										
Hyperplasia, Squamous Cell	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Fibroma; Benign; Primary	1	0	1	1	1	0	1	0	0	0
Keratoacanthoma, Benign; Primary	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Papilloma; Benign; Primary	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
Lipoma; Benign; Primary	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0
Skin (Subcutis)										
Fibroma; Benign; Primary	2	1	1	0	0	1	1	0	0	0

M = male, F = female.

* p<0.05; ** p<0.01. Body weight data was analysed using ANOVA.

^a 10 animals were scheduled for a 12-month interim kill, 60 for terminal sacrifice.^b For controls, group means are shown, for treated groups, percent differences from vehicle controls are shown. Statistical significance is based on actual data (not on the percent differences).

2.6.7 毒性試験概要表

一般名：ブデソニド／グリコピロニウム臭化物／ホルモテロールフマル酸塩水和物

2.6.7.11 生殖発生毒性試験：重要な試験以外の試験

表 48 Embryo-fetal development toxicity study of Glycopyrronium Bromide (Glycopyrrolate) in rats and rabbits -Dose range finding-
4.2.3.5.2.1、4.2.3.5.2.3

Species / Strain	Method of administration (Vehicle / Formulation)	Dosing period	Doses (mg/kg/day)	Number per group	Noteworthy findings	Testing Facility	Study number
Rat / Sprague Dawley	Subcutaneous injection (Solution in sterile saline)	Gestation Days 6 to 17	0, 0.2, 1, 5, 10	8F	Maternal toxicity of glycopyrrolate was evident in dams receiving 1 mg/kg/day or higher as reflected by the reduced food consumption, body weight, body weight gain, gravid uterus weights and at 10 mg/kg/day only body weight/total body weight gain corrected for uterus weight. No clear pattern of developmental toxicity was seen in litter viability or the gross external development of the fetuses; although litter body weights were slightly lower (3-4%) than controls in groups treated with 5 or 10 mg/kg/day of glycopyrrolate. Based on the results of this study, the no-observed-adverse-effect level for maternal toxicity was 0.2 mg/kg/day and for developmental toxicity was 10 mg/kg/day.	██████████, USA	14-760

次頁へ続く

2.6.7 毒性試験概要表

一般名：ブデソニド／グリコピロニウム臭化物／ホルモテロールフマル酸塩水和物

Species / Strain	Method of administration (Vehicle / Formulation)	Dosing period	Doses (mg/kg/day)	Number per group	Noteworthy findings	Testing Facility	Study number
Rabbit / New Zealand White	Subcutaneous injection (Solution in sterile saline)	Gestation Days 6, 9 to 18 ^a	Gestation Day 6: 0, 10, 50, 100, 300 Gestation Days 9–18: 0, 0.2, 1, 5, 10 ^a	5F	Maternal toxicity, as evidenced by death at 300 mg/kg/day, resulted in the doses being lowered. After the dose were lowered, maternal toxicity was seen at 10 mg/kg/day, as indicated by reduced food consumption and scant faeces. Uterine weights tended to be lower in the treated groups, but were not significantly different from controls. Body weight gain corrected for uterine weights was also lower in the treated groups, suggesting fetal growth was not impacted by treatment but maternal gain during gestation was reduced. No alterations in growth (fetal body weight) or structure (gross external fetal evaluations) were seen in fetuses of does administered up to 10 mg/kg/day; although fetal body weights were slightly lower in groups treated with 1, 5 and 10 mg/kg/day. Alterations seen in fetal weight, uterine weights and corrected body weight gain were likely due to the initial high doses given on Gestation Day 6. Based on findings from this study, the no-observed-adverse-effect level (NOAEL) for maternal toxicity and developmental toxicity was likely 5 mg/kg/day.	██████, USA	14-761

Studies 14-760 and 14-761 contain GLP statements.

F = pregnant female.

Gestation Day 0 = sperm-positive day/plug day

^a = one high dose female did not receive the dose of 300 mg/kg/kg on Gestation Day 6 and only the dose of 10 mg/kg/day was administered between Gestation Days 8-18.

2.6.7 毒性試験概要表

一般名：ブデソニド／グリコピロニウム臭化物／ホルモテロールフマル酸塩水和物

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

表 49 Fertility and early embryonic development to implantation study of Glycopyrronium Bromide (Glycopyrrolate) in rats^{4.2.3.5.1.1}

Report Title: Subcutaneous Reproductive Toxicity Study (Segment I) of Glycopyrrolate in Rats		Study No. 14-764
Species / Strain: Rats / Sprague- Dawley	Duration of Dosing: Males; for 4 weeks prior to and during mating until necropsy (at least 52 daily doses); Females; for 2 weeks prior to mating, during mating and up to Gestation Day 6 (at least 28 daily doses).	Special Features: None
Initial Age: Males approx.. 9 weeks, Female approx. 9 weeks	Day of mating: Gestation Day 0 Day of C-section: Gestation Day 13	GLP Compliance: Yes
Date of First Dose: ██████████ 20██	Method of Administration: Subcutaneous injection	
Vehicle / Formulation: Sterile saline (0.9%) / Solution		
No Observed Adverse Effect Level: F ₀ Males and Females: systemic toxicity : <1 mg/kg/day, F ₀ Males and Females: reproductive function: 10 mg/kg/day		
Conclusion: Subcutaneous administration of glycopyrrolate to rats at doses of 0, 0.1, 1 and 10 mg/kg/day for 4 weeks prior to mating (2 weeks for females), during mating and through Gestation Days 0 to 6 (females) resulted in parental toxicity characterized by reductions in body weights and body weight gains at 1 and 10 mg/kg/day and reductions in reproductive organ weights (ie ovaries, testes and epididymides) at 10 mg/kg/day. Overall mating performance (percent sperm positive, successful mating outcome, oestrus cyclicity, sperm motility and morphology) was unaffected by treatment. The alteration in absolute and relative organ weights was most likely due to the significant reduction in body weight. Systemic exposure was evident in the plasma levels of the treated male and female TK rats. The plasma results indicated a t _{max} was typically observed at 0.5 hr post dose administration. A clear dose response was noted in the observational C _{max} at all time points. No definitive sex differences were noted on Day 1. Proof of absorption across all treated groups for both sexes with dose proportionality was demonstrated by the concentrations observed in the plasma. Based on the results of this study, the no-observed-adverse-effect level (NOAEL) of glycopyrrolate on reproductive function is 10 mg/kg/day for males and females since reproductive performance was unaffected by treatment while the NOAEL for systemic toxicity was less than 1 mg/kg/day based on alterations seen in body weight and body weight gain during the treatment phase of the study.		

次頁へ続く

2.6.7 毒性試験概要表

一般名：ブデソニド／グリコピロニウム臭化物／ホルモテロールフマル酸塩水和物

Daily dose (mg/kg/day)	0 (Vehicle)	0.1	1	10
Males				
Toxicokinetics: 3 rats/group				
C _{max} (ng/mL) Day 1	BLQ	16.7	196	1050
Day 28	1.94 [#]	14.0	292	1880
Number evaluated	25	25	25	25
Number died or sacrificed moribund	0	0	0	0 ^a
Clinical observations^b	-	-	+	+++
Necropsy observations	-	-	-	-
Organ Weights (%)^c	(g)			
Epididymis	1.50	-8.0	-2.0	-12.0
Terminal body weight (%)^c	(g)			
	536	-4.7	-6.3*	-17.7*
Organ to Body weight ratio (%)^c				
Testis	0.677	+5.0	+8.9	+20.7*
Body weight gain before pairing (%)^c	(g)			
Days 0-28	177	-9.6	-14.7	-39.0*
Food consumption (%)^c	(g/animal)			
Day 22-28	249	-1.2	-1.2	+14.5
Mean number of days prior to mating	2.8	2.6	2.4	2.4
Number of males that mated	25	25	25	25
Number of fertile males	25	25	24	23
Sperm analysis (number of animals assessed)	(11)	(11)	(11)	(11)
% Motile (total)	87.3	86.1	85.1	77.3
% Progressive	25.7	23.5	23.9	21.2
Count (sperm/g x 10 ⁸)	11.38	11.34	10.4	10.01
% Normal morphology	95	Not assessed	Not assessed	90

次頁へ続く

2.6.7 毒性試験概要表

一般名：ブデソニド／グリコピロニウム臭化物／ホルモテロールフマル酸塩水和物

Daily dose (mg/kg/day)	0 (Vehicle)	0.1	1	10
Females				
Toxicokinetics:				
C _{max} (ng/mL)				
Day 1	2.31 [#]	24.6	250	1920
Day 14	0.904 [#]	8.25	235	1560
Number evaluated	25	25	25	25
Number died or sacrificed moribund	0	0	0	0
Clinical observations^b	-	-	-	++
Necropsy observations	-	-	-	-
Organ Weights (%)^c	(g)			
Ovary	0.142	-2.1	-9.2	-11.3
Terminal body weights (%)^c	(g)			
Pre-Mating Day 14	246	-2.0	-4.9*	-6.1*
Gestation Day 12	291	-1.4	-2.4	-7.2*
Pre-mating body weight gain (%)^c	(g)			
Days 0-14	30	-23.3	-53.3*	-66.7*
Gestation body weight gain (%)^c	(g)			
Days 0-12	46	+2.2	+17.4	+8.7
Pre-mating food consumption (%)^c	(g/animal)			
Day 8-14	148	+5.4	+2.7	+24.3*
Gestation food consumption (%)^c	(g/animal)			
Day 10-12	68	+4.4	+5.9	+2.9
Estrus frequency (days)	3.2	3.1	2.9	3.1
Mean number of days prior to mating	2.8	2.6	2.4	2.4
Number of females sperm positive	25	25	25	25
Number of pregnant females	25	25	24	23

次頁へ続く

2.6.7 毒性試験概要表

一般名：ブデソニド／グリコピロニウム臭化物／ホルモテロールフマル酸塩水和物

Daily dose (mg/kg/day)	0 (Vehicle)	0.1	1	10
Number aborted or with total resorption of litter	0	0	0	0
Mean number of corpora lutea	15	14	14	13
Mean number of implantations	14	14	14	13
Mean % pre-implantation loss	1.4	1.5	1.6	1.0
Mean number of resorptions	0.7	0.6	0.7	0.6
Mean % post-implantation loss	4.6	4.4	5.1	4.2

- No noteworthy findings; + Mild; ++ Moderate; +++ Marked. BQL=Below the Lower Quantitation Limit.

* $p < 0.05$. Body weight and food consumption data analysed using Dunnett's Test.

Trace levels were noted in the control sample (excluding day 1 males), these were considered contamination of unknown origin and do not represent true exposure since the levels were approximately 8-10 times lower than levels observed in the low dose treated rats.

^a One male died on first day of dosing, and was replaced. This death was not considered related to treatment and was more likely accidental, possibly due to manual restraint.

^b Signs of irritation (*e.g.*, alopecia, scab, sore) at the injection site and a few scabs/sores associated with the alopecia.

^c 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 毒性試験概要表

一般名：ブデソニド／グリコピロニウム臭化物／ホルモテロールフマル酸塩水和物

2.6.7.13 生殖発生毒性試験：胚・胎児発生に関する試験

表 50 Embryo-fetal development toxicity study of Glycopyrronium Bromide (Glycopyrrolate) in rats^{4.2.3.5.2.2}

Report Title: Definitive Subcutaneous Developmental Toxicity Study (Seg II) of Glycopyrrolate in Rats		Study No. 14-762
Species / Strain: Rats / Sprague-Dawley	Duration of Dosing: 12 days (Day 6 to 17)	Special Features: None
Initial Age: at least 8 weeks (at Day 5 of gestation)	Day of mating: Day 0 Day of C-section: Day 21	GLP Compliance: Yes
Date of First Dose: 20	Method of Administration: Subcutaneous injection	
Vehicle / Formulation: Sterile saline / solution		
No Observed Adverse Effect Level: F ₀ Females: 1 mg/kg/day, F ₁ Litters: 10 mg/kg/day		
<p>Conclusion: Plasma levels on gestation day 6 or 17 demonstrated dose-proportional exposure in the glycopyrrolate treated dams. Maternal toxicity (reduced food consumption with corollary reductions in body weight and/or body weight gain) was observed for all three treated groups, this condition persisted throughout the study in the 10 mg/kg/day treated dams, but was limited to the first couple of days of treatment for dams receiving 0.1 or 1 mg/kg/day glycopyrrolate.</p> <p>Litter viability (live, non-live, total implants, pre- and post implantation loss) were unaffected by subcutaneous treatment with glycopyrrolate at doses up to 10 mg/kg/day. Litters size was slightly larger in the 10 mg/kg/day group but not significantly so. Fetal body weights were significantly lower in the 10 mg/kg/day dose group this was considered to be related in part to the slightly larger litter size and in part due to maternal toxicity. Fetal examinations (gross external, skeletal, visceral and cephalic) failed to reveal any pattern of frank teratogenicity.</p> <p>Based on findings from this study, the no-observed-adverse-effect level (NOAEL) for maternal and developmental toxicity of glycopyrrolate was 1 mg/kg/day, since body weight effects were noted in both the dam and fetus at 10 mg/kg/day.</p>		

次頁へ続く

2.6.7 毒性試験概要表

一般名：ブデソニド／グリコピロニウム臭化物／ホルモテロールフマル酸塩水和物

Daily dose (mg/kg/day)	0 (Vehicle)	0.1	1	10
Dams/does:	23	23	23	23
Toxicokinetics: (3 dams/group)				
C _{max} (ng/mL) Day 6	BQL	19.0	211	1190
Day 17	BQL	20.3	220	2050
Number pregnant	23	23	23	23
Number died or sacrificed moribund	0	0	0	0
Number aborted or with total resorption of litter	0	0	0	0
Clinical observations	-	-	-	-
Necropsy observations	-	-	-	-
Gestation body weight gain (%) ^a	(g)			
Days 6-18	86	-4.7	-14.0	-32.6*
Gravid uterine weight (%) ^a	(g)			
	91.3	6.0	-2.0	4.3
Body weight gain, adjusted for uterine weight (%) ^a	(g)			
	43	-16.3	-14.0	-62.8*
Gestation food consumption (%) ^a	(g/animal)			
Day 13-15	71	-5.6	-12.7*	-23.9*
Number of females sperm positive	23	23	23	23
Mean number of corpora lutea	13.0	13.1	12.7	13.5
Mean number of implantations	12.4	12.9	11.9	13.1
Mean % pre-implantation loss	4.1	1.4	6.2	2.7

次頁へ続く

2.6.7 毒性試験概要表

一般名：ブデソニド／グリコピロニウム臭化物／ホルモテロールフマル酸塩水和物

Daily dose (mg/kg/day)	0 (Vehicle)	0.1	1	10
Litters:				
Number of litters evaluated	23	23	23	23
Number of live fetuses	264	287	265	281
Mean number of live fetuses	11.5	12.5	11.5	12.2
Mean number of resorptions	0.9	0.4	0.3	0.9
Number of litters with dead fetuses	0	1	0	0
Mean % post-implantation loss	7.3	3.6	2.9	6.9
Mean fetal body weight (g)	6.04	5.95	5.86	5.46*
Fetal sex ratios (% Males)	51.1	53.7	48.3	50.9
Fetal anomalies:	-	-	-	-

- No noteworthy findings. BQL=Below the Lower Quantitation Limit.

* p<0.05. Body weight, food consumption and litter data analysed using Dunnett's Test.

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

2.6.7 毒性試験概要表

一般名：ブデソニド／グリコピロニウム臭化物／ホルモテロールフマル酸塩水和物

表 51 Embryo-fetal development toxicity study of Glycopyrronium Bromide (Glycopyrrolate) in rabbits^{4.2.3.5.2.4}

Report Title: Definitive Subcutaneous Developmental Toxicity Study (Seg II) of Glycopyrrolate in Rabbits		Study No. 14-763
Species / Strain: Rabbits / New Zealand White	Duration of Dosing: 13 days (Day 6 to 18)	Special Features: None
Initial Age: approximately 4 to 5 months (at Day 5 of gestation)	Day of mating: Day 0 Day of C-section: Day 29	GLP Compliance: Yes
Date of First Dose: 20	Method of Administration: Subcutaneous injection	
Vehicle / Formulation: Sterile saline / solution		
No Observed Adverse Effect Level: F ₀ Females: 0.1 mg/kg/day, Fetuses: 1 mg/kg/day		
<p>Conclusion: Maternal toxicity, as evidenced by reduced food consumption corollary reductions in body weight/body weight gain and scant faeces was observed in rabbits receiving 1 and 10 mg/kg/day. Rabbits receiving 0.1 mg/kg/day also had reduced food consumption but no alterations in body weight or body weight gain were seen. Total gain corrected for uterine weight was suggestive of maternal toxicity in the 1 and 10 mg/kg/day treated groups. Fetal weights tended to be lower in the 10 mg/kg/day treated group, significantly so for male offspring; this was likely secondary to maternal toxicity. No difference in fetal weights were seen in the 0.1 or 1 mg/kg/day treated groups. No alterations in structure (gross external, visceral/cephalic or skeletal fetal evaluations) were seen in fetuses of does administered up to 10 mg/kg/day. Systemic exposure was evident in the plasma levels of the treated TK rabbits. A clear dose response was noted in the observational C_{max} on Day 6 and 18. Proof of absorption across all treated groups with dose proportionality was demonstrated by the concentrations observed in the plasma. The no-observed-adverse-effect level (NOAEL) for maternal toxicity was 0.1 mg/kg/day based on the lack of change in maternal body weight/body weight gain. The NOAEL for developmental toxicity was 1 mg/kg/day based on the lower fetal body weights of fetuses in the 10 mg/kg/day treated group.</p>		

次頁へ続く

2.6.7 毒性試験概要表

一般名：ブデソニド／グリコピロニウム臭化物／ホルモテロールフマル酸塩水和物

Daily dose (mg/kg/day)	0 (Vehicle)	0.1	1	10
Dams/does:	23	23	23	23
Toxicokinetics: (3 dams/group)				
C _{max} (ng/mL) Day 6	#	43.9	500	5680
Day 18	#	45.2	484	6940
Number pregnant	20	21	21	21
Number died or sacrificed moribund	0	0	0	0
Number aborted or with total resorption of litter	3	0	2	5
Clinical observations^a	-	+	++	++
Necropsy observations	-	-	-	-
Gestation body weight gain (%)^b	(g)			
Days 6-12	75	-21.3	-127	-381*
Days 6-18	187	0	-63.6	-152*
Days 6-29	352	+16.8	-14.5	-54.0
Gravid uterine weight (%)^b	(g)			
	526	-17.5*	-13.1*	-20.9*
Body weight gain adjusted for gravid uterine weight (g)	-48	-23	-97	-139*
Gestation food consumption (%)^b	(g/animal)			
Day 6-7	191	-37.2*	-71.2*	-90.6*
Day 16-18	530	-6.6	-25.8*	-52.5*
Day 28-29	297	+13.1	+16.2	+29.3*
Mean number of corpora lutea	10.4	8.9	9.7	8.9
Mean number of implantations	10.0	8.0	8.9	8.6
Mean % pre-implantation loss	3.2	9.8	9.2	4.0

次頁へ続く

2.6.7 毒性試験概要表

一般名：ブデソニド／グリコピロニウム臭化物／ホルモテロールフマル酸塩水和物

Daily dose (mg/kg/day)	0 (Vehicle)	0.1	1	10
Litters:				
Number of litters evaluated	17	21	19	16
Number of live fetuses	163	165	155	129
Mean number of live fetuses/litter	9.6	7.9*	8.2*	8.1*
Mean number of resorptions	0.3	0.2	0.6	0.4
Number of litters with dead fetuses	2	0	2	2
Mean % post-implantation loss	3.6	1.7*	7.9	5.2
Mean fetal body weight (male/female, g)	39.19 (39.92/37.51)	39.78 (40.17/39.49)	40.37 (40.53/40.08)	36.06 (35.84*/35.69)
Fetal sex ratios (% Males)	55.8	47.9	46.5	46.5
Fetal anomalies:	-	-	-	-

- No noteworthy findings; + Mild; ++ Moderate.

* p<0.05. Body weight, food consumption and litter data analysed using Dunnett's Test.

Trace levels were noted in the control samples (2 samples on Day 6 and 1 sample on Day 18), these were noted in the considered contamination of unknown origin and do not represent true exposure levels since the levels are approximately 8-10 times lower than maximum levels observed in the low dose treated rabbits.

^a Main clinical sign was scant faeces.

^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 毒性試験概要表

一般名：ブデソニド／グリコピロニウム臭化物／ホルモテロールフマル酸塩水和物

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

表 52 Effects on pre- and post-natal development including maternal function of Glycopyrronium Bromide (Glycopyrrolate) in rats^{4.2.3.5.3.1}

Report Title: Segment III Reproductive/Developmental toxicity study of glycopyrrolate in rats		Study No. 14-765
Species / Strain: Rats / Sprague Dawley	Duration of Dosing: From Gestation Day (GD) 6 to Post-natal Day (PND) 21	Special Features: None
Initial Age: at least 8 weeks (upon receipt on or before GD 6)	Day of mating: Gestation Day 0 Day of C-section: Not applicable	GLP Compliance: Yes
Date of First Dose: ████████ 20██	Method of Administration: Subcutaneous injection	Litter culled/not culled: Culled
Vehicle / Formulation: Deionised water/ solution		
No Observed Adverse Effect Level: F ₀ Females: 0.1 mg/kg/day (systemic toxicity), 10 mg/kg/day (reproductive toxicity) F ₁ Males and F ₁ Females: 10 mg/kg (reproductive toxicity), 1 mg/kg (developmental toxicity)		
<p>Conclusion: Overt maternal toxicity was seen in F₀ dams treated with 1 and 10 mg/kg/day and was characterized by significant reductions in food consumption, body weight and body weight gain (including total gain); these reductions may have partially contributed to the slight reduction in offspring body weight in the F₁-generation (~6-8%) and may also have contributed to the slight reduction, but somewhat equivocal change seen in survival on PND 4 in the 10 mg/kg/day group. Systemic exposure was achieved across all dose levels and was also dose-proportional for the dam and offspring. Offspring exposure to glycopyrrolate was detected in a dose-related manner but was limited in comparison to the levels noted in the dam. Achievement of developmental milestones and onset of sexual maturity were unaffected in the F₁ generation. Mating performance and fertility of the F₁-generation were similar for the offspring from the treated and control groups. Pre-weaning body weights and developmental landmarks for the F₂-generation were similar across groups and unaffected by treatment.</p> <p>Based on a comprehensive examination of all parameters, the no-observed-adverse effect level (NOAEL) for systemic exposure of the F₀ generation was 0.1 mg/kg based on reductions in food consumption, body weight and body weight gain seen at the higher doses. The NOAEL for reproductive toxicity of the F₀ generation was 10 mg/kg/day based on the lack of adverse effects seen in fertility, parturition and maternal behavior. The reproductive NOAEL was also 10 mg/kg/day for male and females of the F₁ generation also based on the lack of adverse effects seen in mating, fertility and maternal behavior. While for developmental toxicity, the NOAEL was 1 mg/kg/day based on the minimal, but consistent reduction seen in offspring body weight (preweaning F₁-generation) at 10 mg/kg/day.</p>		

次頁へ続く

2.6.7 毒性試験概要表

一般名：ブデソニド／グリコピロニウム臭化物／ホルモテロールフマル酸塩水和物

Daily dose (mg/kg/day)	0 (Vehicle)	0.1	1	10
<u>F₀ females:</u>	24	24	24	24
Toxicokinetics: (3 dams/group) C _{max} (ng/mL) Post-natal Day 4 Plasma levels in pups (ng/mL)	-	11.3 2.5	158 12.1	1610 96.0
Number pregnant	24	22	24	24
Number died or sacrificed moribund	0	0	0	2 ^a
Number aborted or with total resorption of litter	0	0	0	0
Clinical observations ^b	-	-	+	+
Necropsy observations	-	-	-	-
Gestation body weight gain (%) ^v Days 6-20	(g) 124	-0.8	-15.3*	-29.0*
Lactation body weight gain (%) ^c Days 0-21	(g) 22	+13.6	+63.6*	+95.5*
Gestation food consumption (%) ^c Gestation Day 7 Gestation Day 20	(g/animal/day) 21 54	-9.5 +3.7	-38.1* -9.3*	-71.4* -16.7*
Lactation food consumption (%) ^c Post natal Day 21	(g/animal/day) 530	+2.3	-2.8	-9.2*
Mean duration of gestation (days)	22	22	22	22
Abnormal parturition	-	-	-	-

次頁へ続く

2.6.7 毒性試験概要表

一般名：ブデソニド／グリコピロニウム臭化物／ホルモテロールフマル酸塩水和物

Daily dose (mg/kg/day)	0 (Vehicle)	0.1	1	10
<u>F₁ litters (pre-weaning):</u>				
Number litters evaluated	24	22	24	22
Mean number of implantations	12.1	12.0	12.3	12.0
Mean number pups /litter	11.8	11.7	11.5	11.1
Mean number liveborn pups /litter	11.8	11.6	11.4	11.1
Post-natal survival to PND 4 (%)	100	100	98.9	97.1*
Post-natal survival post-culling to weaning (%)	98.9	100	100	100
Number of total litter losses	0	0	0	0
Change in pup body weights Post Natal Days 0 to 21 (g)	47.1	51.2	48.2	43.7
Average pup body weights Post Natal Day 0 (g)	6.89	6.94	6.60	6.48*
Post Natal Day 4 (g)	11.06	11.58	11.06	10.18*
Post Natal Day 7 (g)	17.2	18.0	16.7	15.6*
Post Natal Day 14 (g)	33.6	35.1	32.2	29.4*
Post Natal Day 21 (g)	54.0	58.1*	54.8	50.2*
Pup sex ratios (% males) Post natal Day 0	48.9	50.0	46.0	41.2
Pup clinical signs	-	-	-	-
<u>F₁ males (post-weaning):</u>				
Number evaluated post-weaning	24	22	24	22
Number died or sacrificed moribund	0	0	0	0
Clinical observations	-	-	-	-
Necropsy observations	-	-	-	-

次頁へ続く

2.6.7 毒性試験概要表

一般名：ブデソニド／グリコピロニウム臭化物／ホルモテロールフマル酸塩水和物

Daily dose (mg/kg/day)	0 (Vehicle)	0.1	1	10
Body weight gain (g) Post natal Days 0-42	355	355	335	345
Food consumption (%) ^c Post natal Day 7-14 Post natal Day 28-35	(g/animal/day) 221 252	+0.9 +2.4	-5.4* -2.4	-1.4 -1.2
Age at preputial separation (days)	44	43	43	43
Sensory function	-	-	-	-
Motor activity	-	-	-	-
Learning and memory	-	-	-	-
Mean number of days prior to mating	2.7	3.5	3.5	3.5
Number of males that mated	24	22	24	22
Number of fertile males	22	22	22	22
<u>F₁ female (post-weaning):</u> Number evaluated	24	22	24	22
Number died or sacrificed moribund	0	0	0	0
Clinical observations	-	-	-	-
Necropsy observations	-	-	-	-
Pre-mating body weight change (g) Days 0-35	155	153	160	158
Gestation body weight change (g) Days 0-20	141	163*	149	157*
Pre-mating food consumption (%) ^c Day 7-14 Day 21-28	(g/animal/day) 152 159	+1.3 +3.8	+3.3 +4.4	+1.3 0

次頁へ続く

2.6.7 毒性試験概要表

一般名：ブデソニド／グリコピロニウム臭化物／ホルモテロールフマル酸塩水和物

Daily dose (mg/kg/day)	0 (Vehicle)	0.1	1	10
Gestation food consumption (%) ^c	(g/animal/day)			
Day 6-7	22	+13.6*	+4.5	+18.2*
Day 18-20	62	+12.9	-3.2	-1.6
Age at vaginal opening (days)	34	32	34	35
Sensory function	-	-	-	-
Motor activity	-	-	-	-
Learning and memory	-	-	-	-
Mean number days prior to mating	2.7	3.5	3.5	3.5
Number of females sperm positive	24	22	24	22
Number of pregnant females	22	22	22	22
Mean duration of gestation (days)	22.0	21.9	22.0	22.0
Abnormal parturition	-	-	-	-
<u>F₂ litters:</u>				
Number litters evaluated	22	22	22	22
Mean number implantations	14.7	16.4	15.3	14.9
Mean number pups / litter	13.4	15.4	14.3	14.8
Mean number liveborn pups / litter	12.8	15.1*	14.1	14.6
Mean % post-implantation loss	11.25	6.28	7.17	3.30
Post-natal survival to PND 4 (%)	99	99	95*	99
Post-natal survival post-culling to weaning (%)	100	100	100	100

- No noteworthy findings; + Mild.

* p<0.05. Body weight, food consumption and litter data analysed using Dunnett's Test.

^a Reason for sacrifice not detailed in report; the report does, however, state "no treatment-related deaths occurred in the F₀ adult animals".

^b Transient clinical signs consisted of laboured breathing on the first few days of treatment (on GD 6 and/or 7).

^c 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 毒性試験概要表

一般名：ブデソニド／グリコピロニウム臭化物／ホルモテロールフマル酸塩水和物

2.6.7.15 新生児を用いた試験

該当せず

2.6.7 毒性試験概要表

一般名：ブデソニド／グリコピロニウム臭化物／ホルモテロールフマル酸塩水和物

2.6.7.16 局所刺激性試験

該当せず

2.6.7 毒性試験概要表

一般名：ブデソニド／グリコピロニウム臭化物／ホルモテロールフマル酸塩水和物

2.6.7.17 その他の毒性試験

該当せず