2.4　非臨床試験の概括評価

PT003

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 4
2.4.1 非臨床試験計画概略 6
2.4.2 薬理試験 10
2.4.2.1 効力を裏付ける試験 10
2.4.2.1.1 ホルモテロール 10
2.4.2.1.2 グリコピロニウム 10
2.4.2.1.2.1 *In vitro* 活性及びムスカリン受容体サブタイプに対する選択性 10
2.4.2.1.2.2 メサコリン誘発細胞内カルシウム流入に対する作用 11
2.4.2.1.2.3 モルモット摘出気管のメサコリン誘発気管収縮に対する作用 11
2.4.2.1.2.4 気管内投与時の *in vivo* 活性及び効果持続時間 11
2.4.2.2 副次的薬理試験 11
2.4.2.2.1 ホルモテロール 11
2.4.2.2.2 グリコピロニウム 11
2.4.2.3 安全性薬理試験 12
2.4.2.3.1 FF MDI、GP MDI 及び GFF MDI の中枢神経系に対する作用 12
2.4.2.3.2 FF MDI、GP MDI 及び GFF MDI の心血管系に対する作用 12
2.4.2.3.3 FF MDI、GP MDI 及び GFF MDI の呼吸器系に対する作用 12
2.4.3 薬物動態試験 12
2.4.3.1 分析法 13
2.4.3.2 吸収 13
2.4.3.3 分布 13
2.4.3.4 代謝 14
2.4.3.4.1 代謝物組成 14
2.4.3.4.2 代謝酵素 14
2.4.3.5 排泄 15
2.4.3.6 薬物動態学的薬物相互作用 15
2.4.3.6.1 CYP が関与する薬物相互作用 15
2.4.3.6.2 トランスポーターが関与する薬物相互作用 15
2.4.4 毒性試験 16
2.4.4.1 単回吸入投与毒性試験 17
2.4.4.1.1 FF MDI 17
2.4.4.1.2 GP MDI 17
2.4.4.1.3 GFF MDI 17
2.4.4.2 反復吸入投与毒性試験 18

2.4.4.2.1　14 日間反復吸入投与毒性試験 18
2.4.4.2.1.1　FF MDI 18
2.4.4.2.1.2　GP MDI 19
2.4.4.2.1.3　GFF MDI 19
2.4.4.2.2　イヌを用いた FF MDI、GP MDI、及び GFF MDI の 3 カ月間反復吸入投与毒性試験（FY10-129 試験） 20
2.4.4.2.3　ラットを用いた GP MDI の 6 カ月間反復吸入投与毒性試験（FY10-120 試験） 21
2.4.4.2.4　イヌを用いた GP MDI の 6 カ月間反復吸入投与毒性試験（FY12-073 試験） 21
2.4.4.3　遺伝毒性 22
2.4.4.4　がん原性 22
2.4.4.5　生殖発生毒性 23
2.4.4.6　局所刺激性 24
2.4.4.7　添加剤 24
2.4.4.8　不純物及び分解生成物に関する試験 24
2.4.5　総括及び結論 25
2.4.6　参考文献一覧 26

表目次

表 1　GFF MDI 販売承認をサポートする非臨床試験情報 8

略語及び専門用語一覧表

本概括評価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	投与後 0 時間から無限大時間までの血漿中濃度－時間曲線下面積
BCRP	Breast cancer resistance protein
BID	1 日 2 回投与
$CaCl_2$	塩化カルシウム
CHO 細胞	チャイニーズ・ハムスター卵巣細胞
C_{max}	最高血漿中濃度
COPD	慢性閉塞性肺疾患
CYP	シトクロム P450
DSPC	1,2-ジステアロイル-*sn*-グリセロ-3-ホスホコリン又はジステアロイルホスファチジルコリン
F_0	母動物世代
F_1	第一世代
F_2	第二世代
FF	ホルモテロールフマル酸塩水和物
FF MDI	ホルモテロールフマル酸塩水和物定量噴霧式吸入剤
GFF MDI	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定量噴霧式吸入剤
GLP	医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準
GP	グリコピロニウム臭化物
GP MDI	グリコピロニウム臭化物定量噴霧式吸入剤
HFA	ハイドロフルオロアルカン
HR	心拍数
ICH	日米 EU 医薬品規制調和国際会議
LABA	長時間作用性 β_2 刺激薬
LAMA	長時間作用性抗コリン薬
MATE	Multidrug and toxin extrusion protein
MDI	定量噴霧式吸入剤
MTD	最大耐量
NOAEL	無毒性量
OAT	Organic anion transporter
OATP	Organic anion transporting polypeptide
OCT	Organic cation transporter
pA_2	メサコリンの濃度反応曲線を高濃度側に 2 倍移動させる拮抗薬濃度の負の対数
P-gp	P-糖蛋白質
QWBA	定量的全身オートラジオグラフィー
Seg I	受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験

略語及び専門用語	用語の説明
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
$t_{½}$	消失半減期
TK	トキシコキネティクス

2.4.1　非臨床試験計画概略

PT003（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定量噴霧式吸入剤：GFF MDI）は、慢性閉塞性肺疾患（COPD）治療剤であり、長時間作用性 β_2 刺激薬（LABA）であるホルモテロールフマル酸塩水和物（以下「ホルモテロール」又は「FF」）と、長時間作用性抗コリン薬（LAMA）であるグリコピロニウム臭化物（以下「グリコピロニウム」又は「GP」）を有効成分とする定量噴霧式吸入剤（MDI）である。

PT003 の有効成分の効力を裏付ける試験及び副次的薬理試験のデータは、ホルモテロールに関してはシムビコート®タービュヘイラー®の承認申請時に提出済みであり、グリコピロニウムに関しては社内試験で得られた成績及び査読付き学術論文を基に記載した。ホルモテロールとグリコピロニウムは作用機序が異なることが知られており、薬力学的薬物相互作用が生じないと考えられる。このため、ホルモテロール／グリコピロニウム併用時の効力を裏付ける試験及び副次的薬理試験は実施していない。また、独立した安全性薬理試験を実施していないが、安全性薬理に関連した項目について、GLP 条件下でラット又はイヌを用いたホルモテロール定量噴霧式吸入剤（FF MDI）、グリコピロニウム定量噴霧式吸入剤（GP MDI）及び GFF MDI の 14 日間、3 カ月間及び 6 カ月間（GP MDI のみ）の反復吸入投与毒性試験において評価した。

ホルモテロールに関する非臨床薬物動態試験成績はシムビコート®タービュヘイラー ®の承認申請時に提出している。グリコピロニウムの非臨床薬物動態試験として、分布、代謝及び薬物相互作用に関する検討を実施し、グリコピロニウムの吸収はトキシコキネティクス（TK）の結果より評価した。グリコピロニウム／ホルモテロール併用吸入投与時と各薬物単独吸入投与時の TK の結果に明らかな違いは認められず、グリコピロニウム／ホルモテロール併用の非臨床薬物動態試験は実施していない。

配合剤である GFF MDI の吸入毒性試験を実施するとともに、並行して個々の成分である GP MDI 及び FF MDI の吸入毒性試験を実施し、これらを合わせて、GFF MDI の承認を裏付けるための非臨床安全性情報を収集した。

ラット及びイヌを用いた FF MDI、GP MDI 及び GFF MDI の単回吸入投与毒性試験を実施した。ラット、イヌ及びマウス（GP MDI のみ）を用いた FF MDI、GP MDI 及び GFF MDI の 14 日間反復吸入投与毒性試験を実施し、回復性、TK、安全性薬理に関連した項目などを含む一連の安全性評価を行った。また、イヌを用いて 3 用量の FF MDI、高用量のみの GP MDI、3 用量の GFF MDI、溶媒対照及び空気対照（空気のみの吸入投与）の各投与群について検討した 3 カ月間反復吸入投与毒性試験も実施した。加えて、ラット及びイヌを用いた GP の 6 カ月間反復吸入投与毒性試験（GP MDI）、遺伝毒性試験（*in vitro* 及び *in vivo*）、マウス及びラットを用いた 104 週間吸入投与毒性試験（がん原性試験、GP MDI）、並びにラット及びウサギを用いた生殖発生毒性試験（Seg I、II 及び III）も実施した。

FF MDI、GP MDI 及び GFF MDI は、多孔性粒子の技術を用いて製剤化されている。[redacted] により製造した多孔性粒子はジステアロイルホスファチジルコリン（DSPC）及び塩化カルシウム（$CaCl_2$）で構成されている。本邦において、DSPC は新規添加物であることから、DSPC の安全性を評価した。DSPC の毒性は FF MDI、GP MDI 及び GFF MDI を用いた上記の全ての吸入投与毒性試験（6 カ月間までの反復吸入投与試験、マウス及びラットを用いた吸入投与によるがん原性試験）で、溶媒対照として空気対照（空気のみの吸入投与）との比較により評価した。更に、

多孔性粒子（DSPC+$CaCl_2$）の 14 日間反復吸入投与毒性試験、DSPC のみの遺伝毒性試験及び生殖発生毒性試験を実施した。

単回吸入投与毒性試験以外の全ての毒性試験は OECD 加盟国にて OECD テストガイドライン及び GLP に準拠して実施した。

本邦においてホルモテロールは、シムビコート®タービュヘイラー®（吸入粉末剤、アストラゼネカ社）の一成分として 2009 年に、オーキシス®タービュヘイラー®（吸入粉末剤、アストラゼネカ社）として 2012 年に承認取得している。ホルモテロールの非臨床プログラムはシムビコート®タービュヘイラー®承認申請時に提出されている。

GFF MDI の販売承認をサポートする非臨床試験情報を表 1に示す。

表 1　　GFF MDI 販売承認をサポートする非臨床試験情報

非臨床プログラム	ホルモテロール	グリコピロニウム	ホルモテロールとグリコピロニウムの配合
非臨床薬理			
効力を裏付ける試験	既提出（シムビコート®タービュヘイラー®）	公表文献及び以下の社内試験 ・ヒト $M_{1\sim5}$ 受容体阻害活性 ・モルモット M_3 受容体阻害活性 ・ヒト M_2 受容体機能アッセイ ・ヒト M_3 受容体機能アッセイ ・モルモット摘出気管収縮抑制作用	該当なし[1]
副次的薬理試験	既提出（シムビコート®タービュヘイラー®）	公表文献	該当なし[1]
安全性薬理試験	・ラット及びイヌ 14 日間反復吸入投与毒性試験 ・イヌ 3 カ月間反復吸入投与毒性試験	・ラット及びイヌ 14 日間反復吸入投与毒性試験 ・イヌ 3 カ月間反復吸入投与毒性試験 ・ラット及びイヌ 6 カ月間反復吸入投与毒性試験	・ラット及びイヌ 14 日間反復吸入投与毒性試験 ・イヌ 3 カ月間反復吸入投与毒性試験
非臨床薬物動態			
吸収	既提出（シムビコート®タービュヘイラー®）	該当なし（TK 評価で代用）	該当なし[1]
分布	既提出（シムビコート®タービュヘイラー®）	血漿蛋白結合試験 定量的全身オートラジオグラフィー（QWBA）試験	該当なし[1]
代謝	既提出（シムビコート®タービュヘイラー®）	*In vitro* 及び *in vivo* 代謝試験	該当なし[1]
排泄	既提出（シムビコート®タービュヘイラー®）	QWBA 試験の中で尿中排泄のみ評価	該当なし[1]
相互作用	既提出（シムビコート®タービュヘイラー®）	*In vitro* CYP 試験（阻害／誘導） *In vitro* トランスポーター試験（阻害／基質）	該当なし[1]

非臨床プログラム	ホルモテロール	グリコピロニウム	ホルモテロールとグリコピロニウムの配合
毒性			
吸入投与毒性	・ラット及びイヌ単回吸入投与毒性試験 ・ラット及びイヌ 14 日間反復吸入投与毒性試験 ・イヌ 3 カ月間反復吸入投与毒性試験	・ラット及びイヌ単回吸入投与毒性試験 ・マウス、ラット及びイヌ 14 日間反復吸入投与毒性試験 ・イヌ 3 カ月間反復吸入投与毒性試験 ・ラット及びイヌ 6 カ月間反復吸入投与毒性試験	・ラット及びイヌ単回吸入投与毒性試験 ・ラット及びイヌ 14 日間反復吸入投与毒性試験 ・イヌ 3 カ月間反復吸入投与毒性試験
遺伝毒性	既提出（シムビコート®タービュヘイラー®)	・細菌復帰突然変異試験 ・*In vitro* 培養細胞小核試験 ・*In vivo* ラット小核試験	該当なし[1]
生殖発生毒性	既提出（シムビコート®タービュヘイラー®)	・ラット及びウサギを用いた皮下投与による生殖発生毒性プログラム（Seg I、II 及び III）	該当なし[1]
がん原性	既提出（シムビコート®タービュヘイラー®)	・マウス及びラットを用いた 104 週間吸入投与毒性試験	該当せず[1]
DSPC 毒性評価	反復吸入投与毒性試験における溶媒としての評価、14 日間反復吸入投与毒性試験（DSPC+$CaCl_2$）、DSPC のみの遺伝毒性試験及び生殖発生毒性試験		

DSPC = 1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン（ジステアロイルホスファチジルコリンと略す）、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ならびに母体の機能に関する試験
[1] 個々の成分を用いた試験が現在の標準的な試験方法で実施されている場合には、配合剤を用いた試験の実施は必要とされない。

2.4.2　薬理試験

効力を裏付ける試験及び副次的薬理試験のデータは、ホルモテロールに関してはシムビコート®タービュヘイラー®の承認申請時に提出済みであり、申請資料に基づいた概略を記載した。グリコピロニウムに関しては、社内試験で得られた成績及び査読付き学術論文を基に記載した。ホルモテロールとグリコピロニウムは作用機序が異なることが知られており、薬力学的薬物相互作用が生じないと考えられる。このため、ホルモテロール／グリコピロニウム併用時の効力を裏付ける試験及び副次的薬理試験は実施していない。安全性薬理に関連した項目について、GLP 条件下で実施した、FF MDI、GP MDI 及び GFF MDI のラット又はイヌを用いた 14 日間、3 カ月間及び 6 カ月間（GP MDI のみ）の反復吸入投与毒性試験の中で評価した。

2.4.2.1 効力を裏付ける試験

2.4.2.1.1　　ホルモテロール

ホルモテロールは、強力な選択的かつ有効な LABA であり、吸入投与すると作用発現が速やかにみられ、作用の持続時間が長い。ホルモテロールは、β_2 受容体においてほぼフルアゴニスト作用を示し、細胞内 cAMP 濃度を増加させ、これが平滑筋弛緩及び気管支拡張につながる。ホルモテロールの主要な薬理作用は、気道平滑筋の弛緩である。ホルモテロールはβ_2 選択性が高いことから、心血管作用よりも気管支拡張作用の方が強い。摘出気管及び気管支において、ホルモテロールは、気管支収縮剤の刺激により誘発された気管支収縮に対し、サルブタモール及びサルメテロールと比較して強力な弛緩作用を示す。ホルモテロールは、作用発現がサルメテロールも速やかにみられ、気管支拡張に関連したこれらの作用の持続時間がサルブタモールよりも長い。また、ホルモテロールは、*in vivo* でサルブタモール及びサルメテロールよりも効果が高く、効果持続時間がサルブタモールよりも長い。喘息の動物モデルにおいて、ホルモテロールを吸入投与すると、経口投与よりも低用量で気管支拡張作用がみられる。一部の喘息モデルにおいて、ホルモテロールは、投与経路を問わず、サルブタモールより強力な気管支拡張作用を示し、その持続時間もサルブタモールより長かった。

2.4.2.1.2　　グリコピロニウム

2.4.2.1.2.1　*In vitro* 活性及びムスカリン受容体サブタイプに対する選択性

肺に対する生理作用を示すヒト M_1、M_2 及び M_3 受容体に対する選択性に関して、グリコピロニウムは、ムスカリン受容体を発現させたチャイニーズ・ハムスター卵巣（CHO）細胞における競合結合データから、他のムスカリン受容体サブタイプに比較して M_2 受容体に対する選択性がわずかに低いことが示唆されている（試験 SR-[redacted]、SR-[redacted] 及び SR-[redacted]、並びにSykes et al 2012）。一方、アトロピンは M_3 受容体よりも M_2 受容体に対する選択性がわずかに高く（試験 SR-[redacted]、SR-[redacted] 及び [redacted]）、チオトロピウムはこの 3 種類の受容体サブタイプ間で差はみられないことが示唆されている（Sykes et al 2012）。

グリコピロニウムの M_3 受容体に対する平衡結合及び動的選択性が M_2 受容体と比較して高いことが裏付けられ、M_3 受容体と比較した M_2 受容体からの解離速度はチオトロピウムよりも速く、

より望ましい安全域（治療係数）が得られるものと期待される（Sykes et al 2012）。グリコピロニウムの解離速度定数がチオトロピウムと比べて高いことが、M_3 受容体において親和性が相対的に低いことを決定する重要な因子であると考えられる（Sykes et al 2012）。両リガンドは 8 時間未満で M_3 受容体から完全に解離する（Sykes et al 2012）。作用発現までの時間は、M_3 受容体ではチオトロピウムがグリコピロニウムに比べて 4～5 倍長くなることが確認された（Sykes et al 2012）。以上の結果から、単に受容体への滞留時間だけでは LAMA の臨床的作用持続時間を説明できないことが示唆された（Sykes et al 2012）。

2.4.2.1.2.2 メサコリン誘発細胞内カルシウム流入に対する作用

ヒト M_3 受容体発現 CHO-K1 細胞で、グリコピロニウムのメサコリン誘発細胞内カルシウム流入に対する抑制作用はアトロピンより約 10 倍強力であった（試験 SR-[redacted]）。

2.4.2.1.2.3 モルモット摘出気管のメサコリン誘発気管収縮に対する作用

モルモット摘出気管のメサコリン誘発収縮に対する作用の評価で、グリコピロニウムの pA_2 値は 10.2±0.1（平均値±標準誤差、n=4）であった（pA_2：メサコリンの濃度反応曲線を高濃度側に 2 倍移動させる拮抗薬濃度の負の対数）（試験 SR-[redacted]）。

2.4.2.1.2.4 気管内投与時の *in vivo* 活性及び効果持続時間

麻酔下の Brown Norway ラットに対するムスカリン作動薬であるメサコリンの静脈内投与により気管支収縮を誘発した。グリコピロニウム及びチオトロピウムはいずれも気管内投与により、メサコリン誘発気管支収縮を用量依存的に抑制した（Trifilieff et al 2015）。

2.4.2.2 副次的薬理試験

2.4.2.2.1 ホルモテロール

ホルモテロールは 1986 年以来、臨床使用されており、既に広範な非臨床の副次的薬理試験が実施されている。これらの試験の結果から、ホルモテロールは、他の既存の β_2 刺激薬と共通の副次的薬理プロファイルを有することが示されている。

2.4.2.2.2 グリコピロニウム

ムスカリン性アセチルコリン受容体 M_2（ムスカリン M_2 受容体）は、心臓における主たるムスカリン受容体サブタイプであり、ペースメーカー活性及び心房収縮能の調節を介して心血管機能の生理的制御に極めて重要な役割を果たす（Abrams et al 2006）。このため、ラットを用いて、メサコリン 30 μg/kg 静脈内投与の 1 時間前又は 6 時間前にグリコピロニウム及びチオトロピウムを麻酔下で気管内投与して血圧低下及び徐脈に対する影響を検討した。気道抵抗及び心血管機能の変化を記録し、メサコリン誘発気管支収縮抑制の 50%有効量（ED_{50}）値に対し治療係数を算出した。グリコピロニウム及びチオトロピウムはいずれもメサコリン誘発徐脈を抑制した。検討した両時点で、血圧低下及び徐脈に対する治療係数は、グリコピロニウム（1 時間の時点：19.5 倍及び 28.5 倍、6 時間の時点：いずれも 250 倍超）の方がチオトロピウム（1 時間の時点：1.5 倍及び 4.2 倍、6 時間の時点：16.0 倍及び 19.1 倍）よりも高かった（Trifilieff et al 2015）。

2.4.2.3 安全性薬理試験

2.4.2.3.1　　FF MDI、GP MDI 及び GFF MDI の中枢神経系に対する作用

中枢神経系安全性評価は、ラット又はイヌを用いた FF MDI、GP MDI 及び GFF MDI に関する 14 日間及び 3 カ月間、並びに GP MDI に関する 6 カ月間の反復吸入投与毒性試験において一般状態の観察により評価した。いずれの試験においても中枢神経系の変化を示す所見は認められなかった。

2.4.2.3.2　　FF MDI、GP MDI 及び GFF MDI の心血管系に対する作用

心血管系安全性薬理の評価は、イヌを用いた GP MDI、FF MDI 及び GFF MDI に関する 14 日間及び 3 カ月間の反復吸入投与毒性試験の一部として実施した。心電図は、全てのイヌについて初回曝露の前後、投与 45 日目（3 カ月間吸入投与試験のみ）及び最終曝露後に評価した。イヌを用いた 6 カ月間吸入投与試験も行い、GP MDI、空気のみ及び溶媒対照を用いて実施した。心血管系の評価は、試験開始前、投与 1 日目及び試験終了時（投与 180 日目）に実施した。I、II、III、aVR、aVL 及び aVF 誘導の心電図を心臓専門獣医が心臓リズム、心電図波形及び明らかな機能の変化について評価した。

心拍数の増加など、ホルモテロール投与に伴う周知の心血管系の安全性薬理所見が FF MDI 及び GFF MDI の投与により認められた。GP MDI 投与による心血管系の安全性薬理パラメータに対する有意な作用は認められなかった。FF MDI、GP MDI 及び GFF MDI に関するイヌを用いた 14 日間、3 カ月間及び 6 カ月間（GP MDI のみ）の反復吸入投与毒性試験において、心血管系に対する新たな作用及び異常な作用は認められなかった。

2.4.2.3.3　　FF MDI、GP MDI 及び GFF MDI の呼吸器系に対する作用

呼吸器系安全性薬理の評価は、イヌを用いた GP MDI、FF MDI 及び GFF MDI に関する 14 日間及び 3 カ月間の反復吸入投与毒性試験の一部として実施した。全てのイヌから自発呼吸測定値を、初回曝露前、初回曝露後、投与 45 日目（3 カ月間吸入投与試験のみ）及び最終曝露後に収集した。分時換気量、一回換気量及び呼吸数を測定した。イヌを用いた 6 カ月間吸入投与試験も行い、GP MDI 単剤、空気のみ及び溶媒対照を用いて実施した。呼吸器系の評価は、試験開始前、投与 1 日目及び試験終了時（投与 180 日目）に実施した。

呼吸数の増加など、ホルモテロール投与に伴う周知の呼吸器系の安全性薬理所見が、FF MDI 及び GFF MDI の投与により認められた。GP MDI 投与による呼吸器系の安全性薬理パラメータに対する有意な作用は認められなかった。

FF MDI、GP MDI 及び GFF MDI に関するイヌを用いた 14 日間、3 カ月間及び 6 カ月間（GP MDI のみ）の反復吸入投与毒性試験において、呼吸器系に対する新たな作用及び異常な作用は認められなかった。

2.4.3　薬物動態試験

ホルモテロールフマル酸塩水和物（本項ではフリー体と区別なくホルモテロールと記載）に関する非臨床薬物動態試験成績はシムビコート®タービュヘイラー®の承認申請時に提出している。

グリコピロニウム臭化物（本項ではフリー体と区別なくグリコピロニウムと記載）の非臨床薬物動態試験として、分布、代謝及び薬物相互作用に関する検討を実施し、グリコピロニウムの吸収は TK の結果より評価した。グリコピロニウム／ホルモテロール併用吸入投与時と各薬物単独吸入投与時の TK の結果に違いは認められず、グリコピロニウム／ホルモテロール併用の非臨床薬物動態試験は実施していない。

2.4.3.1 分析法

ラット及びイヌ血漿中のホルモテロール及びグリコピロニウムの定量法の開発及びバリデーションは [redacted] 社（米国）で実施した。グリコピロニウムのみの定量では高速液体クロマトグラフィー／タンデム型質量分析法を用い、ホルモテロール／グリコピロニウムの同時定量では超高速液体クロマトグラフィー／タンデム型質量分析法を用いた。

2.4.3.2 吸収

ホルモテロール

ラット及びイヌにホルモテロールを吸入投与したとき、速やかに最高血漿中濃度（C_{max}）に達し、C_{max} 及び時間 0 から無限大時間までの血漿中濃度－時間曲線下面積（AUC）は投与量の増加に伴って増大した。反復投与しても、蓄積傾向はみられなかった。血漿中濃度推移に顕著な性差は認められなかった。

グリコピロニウム

TK の結果、ラット、イヌ共にグリコピロニウムの血漿中濃度は、吸入投与後、最初の測定時点で C_{max} を示した。ラットでは血漿中濃度を評価可能であった時点が十分でなく、AUC を評価できなかった。イヌでは AUC は概ね用量に依存して増加した。イヌに 6 カ月間反復吸入投与後、AUC に性差は認められず、消失半減期（$t_{½}$）は 6.10～12.5 時間であった。

グリコピロニウム／ホルモテロール併用

イヌにグリコピロニウム単独、ホルモテロール単独及びグリコピロニウム／ホルモテロール併用投与後の定常状態におけるグリコピロニウム及びホルモテロールの TK パラメータにそれぞれ単独及び併用投与間で顕著な違いは認められなかった。

2.4.3.3 分布

ホルモテロール

ホルモテロールの血漿蛋白結合率は、検討した動物種及びヒトにおいて約 50%と低く、種差は認められなかった。ラットに[^{3}H]-ホルモテロールを気管内投与したとき、投与部位である気管及び肺に高い放射能分布が認められた。また、放射能は体内に広く認められたが、中枢神経系では低かった。有色ラットを用いた QWBA 試験では、顕著な残留性を示す組織は認められなかったが、メラニン含有組織及び副腎髄質への残留傾向が認められた。しかしながら、毒性試験ではこれらの組織で組織学的変化及び機能障害は認められていない。

グリコピロニウム

グリコピロニウムの血漿蛋白結合率は、マウス、ラット、ウサギ及びイヌで約 20～40%、ヒトで約 50%であった。有色ラットに[^{14}C]-グリコピロニウムを静脈内投与した QWBA 試験において、放射能は大部分の組織で投与後 4 時間まで検出可能であり、投与後 168 時間以内にブドウ膜、褐色脂肪及び肝臓を除く全組織で定量下限未満又は検出不能となった。大部分の組織は投与後 0.25 時間に最高放射能濃度を示し、肝臓、腎臓、小腸の順に高かった。ブドウ膜、肝臓及び有色皮膚で長い半減期を示した。眼球の放射能濃度は有色ラットの方が白色ラットより高く、限定的ではあるが、メラニン含有組織への放射能の結合が示された。

2.4.3.4 代謝

2.4.3.4.1　　代謝物組成

ホルモテロール

マウス、ラット及びイヌにおける尿中の主代謝物はホルモテロールのフェノール基へのグルクロン酸抱合体（FG）であり、FG はヒトでも主代謝物であった。検討した動物種における代謝物組成はヒトと類似しており、主代謝経路はホルモテロールのグルクロン酸抱合化及び *O*-脱メチル化であった。

グリコピロニウム

ヒト、ラット、イヌ、マウス及びウサギの肝細胞、並びにヒト、ラット及びイヌの肺ミクロソームと[^{14}C]-グリコピロニウムをインキュベーションし、グリコピロニウムの代謝物組成について検討した。肝細胞と[^{14}C]-グリコピロニウムのインキュベーション 240 分後、未変化体分画はヒト 94.3%、イヌ 94.6%、ラット 6.1%、マウス 49.8%及びウサギ 9.7%であった。多くの動物種でグリコピロニウムの主代謝物は一水酸化体及び二水酸化体、並びに不飽和化を伴う一水酸化体であった。主代謝部位は芳香環及びシクロペンタン環であった。ヒト、ラット及びイヌの肺ミクロソームで[^{14}C]-グリコピロニウムは代謝されなかった。ラットに[^{14}C]-グリコピロニウムを単回経口及び静脈内投与し、血漿中及び尿中の代謝物について検討した。経口投与後の血漿中放射能は M15（グリコピロニウムの加水分解で生じたカルボン酸体）が主であり、尿中放射能は M21 及び M22（いずれも M15 のグルクロン酸抱合体）が主であった。静脈内投与後の血漿中及び尿中放射能は主に未変化体であった。

2.4.3.4.2　　代謝酵素

ホルモテロール

ホルモテロールは主にグルクロン酸抱合化、及び *O*-脱メチル化により代謝される。ヒト肝では、ホルモテロールの *O*-脱メチル体の生成にはシトクロム P450（CYP）2D6 及び CYP2C 分子種が関与すると考えられた。

グリコピロニウム

グリコピロニウムの代謝に関与する CYP 分子種についてヒト CYP 発現系を用いて検討した。グリコピロニウムは主に CYP2D6 で代謝され、僅かに CYP2A6、2C9、2E1、3A4 及び 3A5 による代謝も認められた。CYP1A2、2B6、2C8 及び 2C19 によるグリコピロニウムの代謝は認められなかった。

2.4.3.5 排泄

ホルモテロール

ラット及びイヌに[^{3}H]-ホルモテロールを静脈内投与したとき、投与後 72 時間までに投与放射能の約 30～40%が尿中に、50～60%が糞中に排泄された。ラットに[^{3}H]-ホルモテロールを経口投与したとき、投与量の 65%が胆汁中に排泄され、糞中へは主に胆汁を介して排泄されると考えられた。経口投与後の未変化体の尿中排泄量は少なかった。

グリコピロニウム

ラットに[^{14}C]-グリコピロニウムを静脈内及び経口投与し、尿中放射能排泄率を投与後 48 時間まで測定した。静脈内及び経口投与後の尿中放射能排泄率はそれぞれ投与放射能の約 60%及び約 7.5%であった。尿中排泄は速やかであり、大部分が投与後 24 時間以内に排泄された。なお、ヒトに[^{3}H]-グリコピロニウムを静脈内投与したとき、投与後 48 時間までに投与放射能の平均 85%が尿中に排泄されたとの報告がある（Kaltiala et al 1974）。

2.4.3.6 薬物動態学的薬物相互作用

In vitro 試験でホルモテロールは濃度 100 μmol/L で CYP2D6 による代謝を 40%阻害したが、他の CYP（CYP1A2、CYP2A6、CYP2E1 及び CYP3A）に対する阻害率は 25%未満と小さかった。しかしながら、ホルモテロールの臨床用量での血漿中濃度は低いことから、他剤との薬物相互作用が生じる可能性は低いと考えられる。

以下にはグリコピロニウムについて実施した CYP 阻害、CYP 誘導、トランスポーター阻害及びトランスポーター基質に関する *in vitro* 相互作用試験の結果を記載する。

2.4.3.6.1 CYP が関与する薬物相互作用

グリコピロニウムによる CYP の可逆的及び時間依存的阻害作用についてヒト肝ミクロソームを用いて検討した。ヒト主要 CYP（CYP1A2、2A6、2B6、2C8、2C9、2C19、2D6、2E1 及び 3A4/5）に対する可逆的阻害作用は認められなかった（検討濃度範囲：0.1～30 μmon/L）。また、CYP1A2、2C9、2C19、2D6 及び 3A4/5 に対する時間依存的阻害作用も認められなかった（検討濃度：0.1 及び 1 μmon/L）。

グリコピロニウムによる CYP1A2、2B6 及び 3A4 誘導作用についてヒト肝細胞を用いて検討した。CYP1A2、2B6 及び 3A4 の mRNA 発現量並びに酵素活性に誘導作用は認められなかった（検討濃度範囲：0.206～50 μmon/L）。

したがって、臨床においてグリコピロニウムの CYP 阻害又は誘導により相互作用が生じる可能性は低いと考えられた。

2.4.3.6.2 トランスポーターが関与する薬物相互作用

各種トランスポーター発現細胞を用い、グリコピロニウムのトランスポーター阻害作用及び基質である可能性を検討した。グリコピロニウムは OCT1、OCT2、OATP1B1、MATE1 及び MATE2-K を阻害したが、これらトランスポーターに対する 50%阻害濃度（IC_{50}）と臨床用量における血漿中濃度の比較から、相互作用が生じる可能性は低いと考えられた。グリコピロニウムの P-gp、BCRP、OAT1、OAT3 及び OATP1B3 に対する阻害作用は認められなかった。また、グ

リコピロニウムは OCT1、OCT2、MATE1、MATE2-K、OATP1B1 及び OATP1B3 の基質であったが、OAT1、OAT3、P-gp 及び BCRP の基質ではなかった。

2.4.4　毒性試験

ラット及びイヌを用いて、FF MDI、GP MDI、及び GFF MDI の単回吸入投与毒性試験（非 GLP 試験）を実施した。GLP 条件下において上記の各動物種における FF MDI、GP MDI、及び GFF MDI の 14 日間反復吸入投与毒性試験を実施し、回復性、TK、及び安全性薬理に関連した項目などを含めた一連の安全性評価を行った。GP MDI については、マウスがん原性試験の用量設定のために、マウス 14 日間反復吸入投与毒性試験も実施した。イヌを用いた 3 カ月間反復吸入投与毒性試験が完了しており、この試験では 3 用量の FF MDI、高用量のみの GP MDI、3 用量の GFF MDI、溶媒対照、及び空気対照（空気のみの吸入投与）を各群に投与した。更に、ラット及びイヌを用いた 6 カ月間反復吸入投与毒性試験において、3 用量の GP MDI、溶媒対照、及び空気対照を各群に投与した。全体として、ラット及びイヌを用いた吸入投与毒性試験の結果から、オーキシス®タービュヘイラー®（TBH）やシムビコート®TBH などのホルモテロールを含有する既承認薬で報告されている心臓への影響以外、GFF MDI は重篤な毒性を引き起こさないことが確認された。イヌの 14 日間反復吸入投与毒性試験（GFF MDI、FF MDI）で認められた心臓所見は、3 カ月間反復吸入投与毒性試験では GFF MDI と FF MDI のいずれの投与でも認められなかったことから、これらの心臓所見は一時的な順応によるものであり、長期曝露中に減弱したことが示唆された。GP MDI 試験では毒性学的に意義のある所見は認められず、FF MDI 試験では GFF MDI 試験及びその他のホルモテロール含有既承認薬と同様のプロファイルであった。GFF MDI（3 用量）、FF MDI（3 用量）及び GP MDI（高用量のみ）のイヌ 3 カ月間反復吸入投与毒性試験では、高用量の GFF MDI 群及び FF MDI 群で軽微な肺胞マクロファージ凝集の発現率上昇が認められた。GP MDI 群では異常所見は認められなかった。本試験における無毒性量は、GFF MDI 群及び FF MDI 群では中用量、GP MDI 群では高用量であった。ラットを用いた GP MDI の 6 カ月間反復吸入投与毒性試験では、用量依存的な喉頭扁平上皮化生の発現率上昇が認められたが、その程度は軽微であり、げっ歯類の吸入試験でよくみられる適応反応と判断された。本試験における無毒性量は、高用量と考えられた。これらの試験において、腫瘍性病変又は前癌病変は認められず、更に、新たな毒性や通常みられない毒性は認められなかった。イヌを用いた GP MDI の 6 カ月間反復吸入投与毒性試験において、グリコピロニウムの先行試験と異なる新たな毒性や通常みられない毒性は認められなかった。本試験における無毒性量は、雄雌とも高用量であった。

毒性プログラムのすべての内容については、2.6.6 毒性試験の概要文において更に詳細に述べる。

FF MDI、GP MDI、及び GFF MDI の毒性概要表を 2.6.7 毒性試験の概要表に示す。

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はみられなかった。マウス及びラットを用いた 2 年間のがん原性試験において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。また、皮下投与によるグリコピロニウムの受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験、胚・胎児発生に関する試験及び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のいずれの生殖発生毒性試験においても有意な毒性はみられなかった。

本邦においてホルモテロールフマル酸塩は、シムビコート®タービュヘイラー®（吸入粉末剤、アストラゼネカ社）の一成分として 2009 年に、オーキシス®タービュヘイラー®（吸入粉末剤、

アストラゼネカ社）として 2012 年に承認取得している。ホルモテロールの毒性プログラムはシムビコート®タービュヘイラー®承認申請時に提出されており、その概略は以下のようであった。

ホルモテロールの毒性プロファイルは、単回及び反復毒性試験においては、β_2 刺激薬投与により一般的にみられる変化以外に重大な影響はみられなかった。ホルモテロールに遺伝毒性は認められない。マウス及びラットを用いたがん原性試験において、マウスでは子宮平滑筋腫、ラットでは卵巣間膜平滑筋腫を誘発したが、これらの腫瘍はげっ歯類に高用量 β 刺激薬を投与したときに認められるクラスエフェクトであり、ヒトへの影響はみられていない。生殖発生毒性試験においては、ホルモテロールの高用量投与（15 mg/kg/日、経口）により、雄ラットの受胎能の低下、母動物の着床数の減少及び着床胚死亡数、出生児体重の減少並びに出生児の出生後早期生存率減少がみられた（第 1 部 13 項シムビコート®タービュヘイラー®毒性試験の概要文）。

結論として、以上の毒性プログラムによって、グリコピロニウム臭化物 18 μg（グリコピロニウムとして 14.4 μg）とホルモテロールフマル酸塩 9.6 μg（ホルモテロールフマル酸塩二水和物として 10.0 μg）の 1 日 2 回投与［1 日総量グリコピロニウム臭化物 36 μg（グリコピロニウムとして 28.8 μg）、ホルモテロールフマル酸塩 19.2 μg（ホルモテロールフマル酸塩二水和物として 20.0 μg）］の製造販売承認及び長期使用が裏付けられる。

2.4.4.1 単回吸入投与毒性試験

FF MDI、GP MDI、及び GFF MDI の単回吸入投与毒性試験の概要を 2.6.6.2 項 単回吸入投与毒性試験に示す。

2.4.4.1.1　FF MDI

FF MDI のヒトへの投与を裏付けるための非臨床プログラムは、げっ歯類 1 種（ラット）及び非げっ歯類 1 種（イヌ）を用いる従来の手法による独立したプログラムとしてデザインされた。忍容性を評価するため、ラット及びイヌを用いて単回投与吸入毒性試験（いずれも非 GLP 試験）を実施した。ラット（FY08-042B 試験）及びイヌ（FY08-041B 試験）を用いた単回投与試験の結果から、オーキシス®やシムビコート®などのホルモテロールを含有する既承認薬での報告から予測される心臓への影響以外には、FF MDI 投与に関連した有意な毒性はみられなかった。

2.4.4.1.2　GP MDI

GP MDI のヒトへの投与を裏付けるための非臨床プログラムは、げっ歯類 1 種（ラット）及び非げっ歯類 1 種（イヌ）を用いる従来の手法による独立したプログラムとしてデザインされた。忍容性を評価するため、ラット及びイヌを用いて単回投与吸入毒性試験（いずれも非 GLP 試験）を実施した。ラット（FY08-042A 試験）及びイヌ（FY08-041A 試験）を用いた単回投与試験の結果から、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有意な毒性はみられなかった。

2.4.4.1.3　GFF MDI

GFF MDI のヒトへの投与を裏付けるための非臨床プログラムは、げっ歯類 1 種（ラット）及び非げっ歯類 1 種（イヌ）を用いる従来の手法による独立したプログラムとしてデザインされた。忍容性を評価するため、ラット及びイヌを用いて単回投与吸入毒性試験（いずれも非 GLP 試験）を実施した。ラット（FY08-042D 試験）及びイヌ（FY08-041D 試験）を用いた単回投与試験

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報告から予測される心臓への影響以外には、GFF MDI 投与に関連した有意な毒性はみられなかった。

2.4.4.2 反復吸入投与毒性試験

FF MDI、GP MDI、及び GFF MDI の反復吸入投与毒性試験の概要を 2.6.6.3 項 反復吸入投与毒性試験に示す。

2.4.4.2.1　14 日間反復吸入投与毒性試験

2.4.4.2.1.1　FF MDI

GLP 条件下において各動物種における 14 日間反復吸入投与毒性試験を実施し、回復性、TK（トキシコキネティクス）、及び安全性薬理に関連した項目などを含む一連の安全性評価を行った。

ラット 14 日間反復吸入投与毒性試験（FY09-039 試験）では、FF MDI 吸入に伴い、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 日間の回復期間内に概ねベースラインまで回復した。相関する病理組織学的所見や他の様々な生化学的検査値の変化が認められなかったため、これらの変化は毒性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。本試験における無毒性量は高用量と考えられ、雄では 153 μg/kg/日、雌では 163 μg/kg/日であった。

イヌ 14 日間反復吸入投与毒性試験（FY09-038 試験）では、心臓パラメータ及び一般状態の変化が認められ、これらはホルモテロールで報告されてい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。同様の所見（グレードは軽微）が、高用量を投与したイヌの回復群においても認められた。この部位に認められたコラーゲン増加は、心拍数の持続的増加とその後の虚血の結果として、心筋細胞が破壊されたことによるものと考えられた。予想されたとおり、すべての用量群で、肝細胞の空胞化が観察された。これらの変化の発現率と重症度は、いずれの用量群でもほぼ同等であった。心拍数（HR）増加と肝代謝化活性亢進は、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敵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、こうした変動には生物学的意味はほとんどないと考えられた。低用量群の 1 頭において心臓所見に影響が認められたため、本試験では明確な無毒性量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 $t_{1/2}$ 時間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、本試験における無毒性量は低用量の 9.2μg/kg/日（雄：9.02 μg/kg/日、雌：9.38 μg/kg/日）と考えるのが妥当と思われる。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 日間吸入投与毒性試験によって、提案するヒト臨床用量が妥当かつ安全であることが確認された。

2.4.4.2.1.2　GP MDI

GLP 条件下において各動物種における 14 日間反復吸入投与毒性試験を実施し、回復性、TK、及び安全性薬理に関連した項目などを含む一連の安全性評価を行った。

マウス 14 日間反復吸入投与毒性試験（FY14-111 試験）で投与した最高用量は、平均で 1380 µg/kg/日であった（沈着率 100%の想定に基づく；雄雌の平均）。本試験における無毒性量は高用量と考えられ、雄では 1340 µg/kg/日、雌では 1420 µg/kg/日であった。

ラット 14 日間反復吸入投与毒性試験（FY08-076 試験）で投与した最高用量は、平均で 535 µg/kg/日であった（沈着率 100%の想定に基づく；雄雌の平均）。本試験における無毒性量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。

イヌ 14 日間反復吸入投与毒性試験（FY08-077 試験）で投与した最高用量は、平均で 80 µg/kg/日であった（沈着率 100%の想定に基づく；雄雌の平均）。本試験おける無毒性量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。

2.4.4.2.1.3　GFF MDI

GLP 条件下において各動物種における 14 日間反復吸入投与毒性試験を実施し、回復性、TK、及び安全性薬理に関連した項目などを含む一連の安全性評価を行った。

ラット 14 日間反復吸入投与毒性試験（FY09-086 試験）では、GFF MDI の吸入によって、一部の血液学的検査及び血液生化学的検査パラメータの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まで回復した。ただし、いずれの値も概ね正常範囲内であった。相関する病理組織学所見や、他の様々な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ため、これらの変化は毒性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。溶媒対照群又は空気対照群（空気のみの吸入投与）では測定可能な被験物質が検出されなかった一方で、GFF MDI を投与したすべての動物の血漿中に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。本試験における GFF MDI の無毒性量は高用量群（投与可能な最大用量）と考えられ、雄では 368/69 µg/kg/日（グリコピロニウム/ホルモテロール）、雌では 394/73 µg/kg/日であった。

イヌ 14 日間反復吸入投与毒性試験（FY09-087 試験）では、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曝露は、投与したすべての動物の血漿中でそれぞれが検出されたことにより確認された。一方、溶媒対照群又は空気対照群では測定可能な被験物質が検出されなかった。ホルモテロールで予測されたとおり、イヌでは心臓パラメータ、呼吸機能パラメータ、及び一般状態の変化が認められ、これらはホルモテロールのような β_2 刺激薬で報告されている症状及び徴候と一致していた。また、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、及び細胞質の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重要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。本試験では、肝臓の病理組織学的所見により無毒性量を明確にできなかったが、肝酵素値変化などの肝毒性の徴候は認められなかった。従って、肝細胞質の腫脹が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ことを考慮すると、低用量を無毒性量とみなすのが妥当と考えられる。グリコピロニウム/ホルモテロールの無毒性量は、雄雌とも低用量の 17/3 µg/kg/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で、有意な群間差は認められなかった。

2.4.4.2.2　　イヌを用いた FF MDI、GP MDI、及び GFF MDI の 3 カ月間反復吸入投与毒性試験（FY10-129 試験）

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単剤、ホルモテロール単剤、及びグリコピロニウム/ホルモテロール配合剤のそれぞれの 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 回の吸入曝露を 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、グリコピロニウム/ホルモテロール配合剤 MDI 投与群のホルモテロール用量に近似することを目指した。同様に、グリコピロニウム単剤の用量が、高用量グリコピロニウム/ホルモテロール配合剤 MDI 投与群のグリコピロニウム用量に近似することを目指した。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 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、血液学的検査及び血液生化学的検査所見、眼科学的検査所見、器官重量、呼吸生理学的所見、心血管生理学的所見、及び病理組織学的所見であった。

被験物質を投与したすべての動物の血漿中でグリコピロニウム及び/又はホルモテロールが検出されたことにより、グリコピロニウム単剤、ホルモテロール単剤、又は配合剤 MDI を吸入投与したときの曝露が確認された。グリコピロニウムは概して投与直後あるいは投与 0.5 時間後に C_{max} に達し、平均 $t_{1/2}$ 値は 6.34～11.7 時間の範囲であった。ホルモテロールは概して数例の例外はあるが、投与直後あるいは投与 1 時間以内に C_{max} に達し、平均 $t_{1/2}$ 値は 4.85～11.5 時間の範囲であった。配合による両化合物の薬物相互作用はみられなかった。

ホルモテロール（単独あるいはグリコピロニウムとの配合）は予測されたとおり、イヌでは心臓パラメータ及び呼吸機能パラメータの変化が認められ、これらは裏付けとなるホルモテロールのような β_2 刺激薬で報告されている症状及び徴候と一致していた。また、肝臓における病理組織学的所見は、細胞質の腫脹を特徴とする肝臓の適応的な代謝活動の結果と考えられた。本試験投与期間中（90 日間）に、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重要ではない変化がみられた。この肝臓における病理組織学的変化のため、本試験では無毒性量を明確にできなかったが、肝酵素変化や細胞壊死など肝毒性を裏付ける徴候は認められなかった。従って、肝細胞質の腫脹を毒性反応ではなく代謝増加を示す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無毒性量は中用量（ホルモテロール単剤：10.32 g/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））と考えられた。この無毒性量は、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及び配合剤高用量群において、残りの曝露群及び両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曝露群の無毒性量は高用量（87 μg/kg/日、雄雌の平均値）であった。本試験のいずれの投与群でも、薬剤に関連した前癌病変又は腫瘍性病変は認められなかった。空気対照群と溶媒対照群間で、有意な群間差は認められなかった。

2.4.4.2.3　　ラットを用いた GP MDI の 6 カ月間反復吸入投与毒性試験（FY10-120 試験）

本試験は、空気対照群（空気のみの吸入投与）、溶媒対照群、及び 3 用量の GP MDI 群で実施した。グリコピロニウムの用量は低用量、中用量及び高用量で、それぞれ、68、275、548 µg/kg/日（雄雌の平均値）であった。

ラットを用いた本 GP MDI の 6 カ月間反復吸入毒性試験では、最終投与日の投与 30 分後の血漿中濃度分析により、グリコピロニウムを投与した各動物における曝露を確認した。雌雄とも血漿中グリコピロニウム濃度に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。

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。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よくみられる所見であり、げっ歯類の喉頭部位において、微粒子の種類にかかわらず微粒子嵌入に対して認められる可逆性の適応反応と考えられた。溶媒対照群における発現率と重症度は低用量群と同程度であった。空気対照群を含むすべての投与群で、微粒子嵌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。その発現率は、溶媒対照群に比べて高用量群において高かった。この所見も、軽微なものであり、げっ歯類の吸入試験でよくみられる適応反応とみなされた。軽微な肺胞マクロファージ凝集が、空気及び溶媒対照群を含むすべての投与群で認められたが、被験物質曝露群において重症度又は発現率の有意な上昇はみられなかった。

いずれの呼吸器以外の組織でも、被験物質関連の有意な肉眼的所見又は病理組織学的所見はみられなかった。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。いずれの用量の被験物質投与群でも有害所見はみられなかったことから、本試験における GP MDI の無毒性量は高用量（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。

2.4.4.2.4　　イヌを用いた GP MDI の 6 カ月間反復吸入投与毒性試験（FY12-073 試験）

イヌに 1 日 1 回の吸入投与を 180 日間実施し、空気対照群（空気のみの吸入投与）と溶媒対照群には 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 分間曝露を行った。被験物質曝露システム及び溶媒対照 MDI の総エアロゾール（薬剤＋溶媒）の規定目標加圧室濃度は 0.08 ± 0.04 mg/L であった。グリコピロニウムの用量は低用量、中用量及び高用量でそれぞれ、19、58、75 µg/kg/日（雄雌の平均値）であった。試験の評価項目は、一般状態の観察、体重、血液学的検査及び血液生化学的検査所見、眼科学的検査所見、心電図検査所見、呼吸生理学的所見、トキシコキネティクス解析、器官重量、尿検査所見、及び病理組織学的所見であった。

グリコピロニウムの吸入曝露は、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群と差がなかったため、生物学的意義はないと判定された。180 日間の投与期間中に、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重要なものではなかった。空気対照群と溶媒対照群の間で、有意な群間差は認められな

かった。本試験における無毒性量は雌雄とも高用量とみなされた（雄では 76.50 µg/kg/日、雌では 72.77 µg/kg/日）。

2.4.4.3 遺伝毒性

ホルモテロールとグリコピロニウムの個々の活性成分について遺伝毒性が検討されているため、これら 2 剤の配合剤を用いた遺伝毒性試験は実施していない。

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はみられていない。グリコピロニウムは、細菌復帰突然変異試験、TK6 細胞を用いた *in vitro* 小核試験、又はラットを用いた *in vivo* 小核試験（経口投与）において遺伝毒性を示さなかった。従って、グリコピロニウム/ホルモテロール配合剤にも遺伝毒性は認められないと考える（毒性試験の概要文 2.6.6.4 項 遺伝毒性試験を参照）。

2.4.4.4 がん原性

ホルモテロールとグリコピロニウムの個々の活性成分について検討が行われているため、これら 2 剤の配合剤を用いたがん原性試験は実施していない。ホルモテロール及びグリコピロニウムのがん原性試験の概要を毒性試験の概要文 2.6.6.5 項 がん原性試験に示す。

マウス及びラットを用いたホルモテロールのがん原性試験において、ホルモテロールは子宮平滑筋腫（マウス）及び卵巣間膜平滑筋腫（ラット）を誘発したが、これはげっ歯類における高用量 β 刺激薬のクラスエフェクトとして認識されており、臨床的に問題となるものではない。その他には、化合物に関連した発がん性は検出されなかった（第 1 部 13 項シムビコート® タービュヘイラー® 毒性試験の概要文）。

GP MDI の吸入投与によるマウスがん原性試験（FY14-128 試験）を実施し、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。被験物質の投与に関連した臨床所見はみられなかったが、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、鼻部において限定的な非腫瘍性変化が認められた。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、鼻部における影響は、吸入による非特異的な影響であり、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り生じた物理的作用によるものと考えられた。

GP MDI の吸入投与によるラットがん原性試験（FY12-072 試験）を実施し、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。被験物質の投与に関連した臨床所見はみられなかったが、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、喉頭内及び鼻部において限定的な非腫瘍性変化が認められた。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影響は、吸入による非特異的な影響であり、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り生じた物理的作用によるものと考えられた。

2.4.4.5 生殖発生毒性

ホルモテロールとグリコピロニウム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 2 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。ホルモテロール及びグリコピロニウムの生殖毒性試験の概要を 2.6.6.6 項 生殖発生毒性試験に示す。

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にみられた。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（第 1 部 13 項シムビコート® タービュヘイラー® 毒性試験の概要文）。

グリコピロニウムについては、皮下投与による生殖発生毒性試験を実施した。

受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験では、雄ラットには交配前 4 週間、交配期間、及びその後剖検まで、雌ラットには交配前 2 週間以上、交配期間、及びその後妊娠 6 日（すなわち、着床）まで皮下注射による投与を行った。雄における投与期間は 52 日間であった。生殖器系への影響として、卵巣、精巣上体及び精巣の絶対及び／又は相対器官重量の変化がみられたが、これらの変化は著しい体重減少に起因するものと考えられた。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無毒性量（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。

ラットの胚・胎児発生に関する試験では、妊娠 6～17 日の器官形成期に皮下投与した結果、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/日群であった。

ウサギの胚・胎児発生に関する試験では、妊娠 6～18 日の器官形成期にウサギに皮下投与した。最高用量の 10 mg/kg/日群で胎児体重のわずかな減少がみられたが、胚・胎児の生存又は発生に対する影響は認められなかった。1 mg/kg/日群では、胚・胎児発育への影響は認められなかった。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。

ラットの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、F_0 ラットに、妊娠 6 日（着床）から分娩後 21 日目（離乳）まで皮下投与を行った。一部の F_1 出生児を選択し、離乳後から性成熟期まで、交配試験及び離乳までの F_2 出生児の哺育を含めて、評価を行った。1 及び 10 mg/kg/日群の F_1 世代における新生児では、離乳前の期間に体重減少がみられたが、これら新生児に身体的、機能的及び行動の発達に影響は認められなかった。F_0 世代の全身毒性に対する NOAEL は、高用量で、摂餌量、体重及び体重増加の減少が認められたことから、0.1 mg/kg/日であった。F_0 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。F_1 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、F_1 世代

の出生児の生後発達に対する NOAEL は、10 mg/kg/日で一貫した出生児の体重減少（F_1 世代の離乳前体重）が認められたため、1 mg/kg/日であった。

2.4.4.6 局所刺激性

FF MDI、GP MDI 及び GFF MDI を用いた 14 日間及び 3 カ月間反復吸入投与毒性試験（GP MDI は 6 カ月間反復吸入投与毒性試験及び吸入投与によるがん原性試験も実施）を実施したが、臨床使用に影響を与えるような気道への局所刺激を示唆する刺激性及び病理組織学的所見は認められなかった。

2.4.4.7 添加剤

FF MDI、GP MDI、及び GFF MDI は、多孔質粒子の技術を用いて製剤化されている。MDI 技術は、吸入可能な空気動力学的粒子径の[redacted]多孔質粒子を基盤としている。[redacted]多孔質粒子は、ジステアロイルホスファチジルコリン（DSPC）及び塩化カルシウム（$CaCl_2$）で構成されている。本邦において、DSPC は新規添加物であることから、DSPC の安全性を評価した。

DSPC/$CaCl_2$ を溶媒対照とした FF MDI、GP MDI 及び GFF MDI の反復吸入毒性試験をマウス（GP MDI のみ）、ラット及びイヌを用いて実施したが、いずれの試験でも溶媒対照群と空気対照群（空気のみの吸入投与）の間に臨床的に意味のある差は認められなかった。FF MDI、GP MDI、及び GFF MDI を用いた、イヌ 3 カ月間反復吸入投与毒性試験、並びに GP MDI の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、そして GP MDI のマウス及びラットを用いたがん原性試験において、溶媒対照群と空気対照群では影響に差が認められなかったことから、GFF MDI 中の添加剤は安全性に問題がないことが示された。更に、DSPC+$CaCl_2$ の 14 日間反復吸入毒性試験並びに DSPC 単独の遺伝毒性試験及び生殖発生毒性試験を実施した結果、GFF MDI の添加物としての DSPC の使用は安全であることが確認された。

2.4.4.8 不純物及び分解生成物に関する試験

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（第 1 部 13 項シムビコート® タービュヘイラー® 毒性試験の概要文）。

GFF MDI 製剤の安定性試験において、グリコピロニウムの分解を示す所見は得られなかった。原薬規格にはグリコピロニウムの個別規格設定不純物が 4 類含まれているが、これら不純物は原薬規格で管理されている。グリコピロニウムの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。

グリコピロニウム/ホルモテロール配合剤に含まれる不純物/分解物の規格値はそれぞれの原薬に由来し、これまでにそれぞれ記載したとおりである。グリコピロニウム/ホルモテロール配合剤に新たな不純物/分解物は認められない。

2.4.5　総括及び結論

PT003（GFF MDI）は、COPD 治療剤であり、ホルモテロールとグリコピロニウムを有効成分とする固定用量配合剤である。ホルモテロールは、強力で選択的な LABA であり、摘出気管支収縮に対して迅速かつ持続的な弛緩作用を示した。また、喘息モデルへの吸入投与によって経口投与よりも低用量で気管支拡張作用を示し、その作用はサルブタモールより強力であった。グリコピロニウムは、気管及び気管支内の平滑筋細胞に存在するムスカリン受容体に作用して気管支拡張作用を示す LAMA である。ムスカリン受容体を発現させた CHO 細胞における競合結合データから、グリコピロニウムは、他のムスカリン受容体サブタイプに比較して M_2 受容体に対する選択性がわずかに低いことが示唆された。M_3 受容体発現 CHO 細胞で、グリコピロニウムのメサコリン誘発細胞内カルシウム流入に対する抑制作用はアトロピンより約 10 倍強力であった。モルモット摘出気管のメサコリン誘発収縮に対する作用の評価では、グリコピロニウムの pA_2 値は 10.2±0.1（平均値±標準誤差、n=4）であった。また、ラットへの気管内投与によりメサコリン誘発気管支収縮を抑制した。

ホルモテロールとグリコピロニウムは作用機序が異なるため薬力学的薬物相互作用は生じないと考えられることから、併用時の効力を裏付ける試験及び副次的薬理試験は実施していないが、作用機序が異なるこれら 2 剤の気管支拡張薬を配合することにより、各成分を単独で使用した場合と比較して、肺機能に対して相加的な有効性が得られる可能性があると考えられた（Cazzola et al 2010）。安全性薬理に関連した項目について FF MDI、GP MDI 及び GFF MDI の反復吸入投与毒性試験で評価した結果、中枢神経系、心血管系及び呼吸器系に対する新たな作用及び異常な作用は認められなかった。

吸入投与毒性試験の TK 結果からホルモテロール及びグリコピロニウムの薬物動態を評価した。ホルモテロール及びグリコピロニウムの TK パラメータにそれぞれ単独及び併用投与間で顕著な違いは認められなかった。また、ホルモテロール及びグリコピロニウムの代謝・排泄経路は同一でなかった。したがって、ホルモテロール及びグリコピロニウムの薬物動態は併用投与による影響を受けないと考えられる。

ホルモテロール及びグリコピロニウムの臨床製剤（あるいはほぼ同等の製剤）を用いてマウス、ラット及びイヌにおいて吸入投与毒性試験を実施した結果、イヌでは、オーキシス® タービュヘイラー®やシムビコート® タービュヘイラー®などの既承認薬で以前に報告されている予期された用量依存的な β_2 刺激薬の心臓への影響のみが認められた。このことから、イヌをホルモテロールとグリコピロニウムの配合剤の 3 カ月間反復吸入毒性試験のために、より敏感な動物種として選んだ。グリコピロニウム投与に起因する毒性はみられなかった。GFF MDI 中の両化合物あるいは溶媒（DSPC+$CaCl_2$）投与に起因する呼吸器系への刺激性及び形態学的変化は認められなかった。配合剤の片方のムスカリン受容体（M_3）拮抗薬が β_2 刺激薬の毒性を増強したり、またその逆の β_2 刺激薬が M_3 拮抗薬の毒性を増強することもなかった。ホルモテロール及びグリコピロニウムのいずれにおいても遺伝毒性は認められず、発がん性も認められなかった。更に、ホルモテロール及びグリコピロニウムのいずれにおいてもヒト臨床用量では、受胎能、胚・胎児発生及び出生前/出生後の発生に影響はみられなかった。溶媒及び MDI 製剤全体として忍容性は非常に高かった。

全体として、ホルモテロールフマル酸塩水和物とグリコピロニウム臭化物の配合剤（GFF MDI）は、推奨臨床用量で COPD 患者へ安全に使用することが可能であると考えられた。

2.4.6　参考文献一覧

Abrams et al 2006

Abrams P, Andersson K.E., Buccafusco J.J, Chapple C, de Groat W.C., Fryer A.D., et al.　Muscarinic receptors: their distribution and function in body systems, and the implications for treating overactive bladder. Br. J. Pharmacol. 2006; 148: 565-578.

Cazzola et al 2010

Cazzola M, Molimard M.　The scientific rationale for combining long-acting beta2-agonists and muscarinic antagonists in COPD. Pulm Pharmacol Ther. 2010 Aug;23(4):257-267.

Kaltiala et al 1974

Kaltiala E, Penttilä A, Vapaatalo H, Larmi T.　The fate of intravenous [^{3}H] glycopyrrolate in man.　J. Pharm. Pharmac. 1974 May; 26(5): 352-4.

Sykes et al 2012

Sykes DA, Dowling MR, Leighton-Davies J, Kent TC, Fawcett L, Renard E, et al.　The influence of receptor kinetics on the onset and duration of action and the therapeutic index of NVA237 and tiotropium. The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics 2012; 343: 520-528.

Trifilieff et al 2015

Trifilieff A, Ethell BT, Sykes DA, Watson KJ, Collingwood S, Charlton SJ, et al. Comparing the cardiovascular therapeutic indices of glycopyrronium and tiotropium in an integrated rat pharmacokinetic, pharmacodynamic and safety model. Toxicol Appl Pharmacol. 2015 Aug 15;287(1):9-16.