2.6.6　毒性試験の概要文

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	5
2.6.6.1	まとめ	6
2.6.6.2	単回吸入投与毒性試験	14
2.6.6.2.1	FF MDI（試験番号 FY08-042B[4.2.3.1.1]、FY08-041B[4.2.3.1.2]）	14
2.6.6.2.2	GP MDI（試験番号 FY08-042A[4.2.3.1.3]、FY08-041A[4.2.3.1.4]）	14
2.6.6.2.3	GFF MDI（試験番号 FY08-042D[4.2.3.1.5]、FY08-041D[4.2.3.1.6]）	14
2.6.6.3	反復吸入投与毒性試験	15
2.6.6.3.1	14 日間反復吸入投与毒性試験	15
2.6.6.3.1.1	FF MDI（試験番号 FY09-039[4.2.3.2.1]、FY09-038[4.2.3.2.2]）	15
2.6.6.3.1.2	GP MDI（試験番号 FY14-111[4.2.3.2.3]、FY08-076[4.2.3.2.4]、FY08-077[4.2.3.2.5]）	16
2.6.6.3.1.3	GFF MDI（試験番号 FY09-086[4.2.3.2.6]、FY09-087[4.2.3.2.7]）	16
2.6.6.3.2	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[4.2.3.2.8]）	17
2.6.6.3.3	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[4.2.3.2.9]）	20
2.6.6.3.4	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[4.2.3.10]）	21
2.6.6.3.5	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	23
2.6.6.4	遺伝毒性試験	24
2.6.6.4.1	ホルモテロール	24
2.6.6.4.2	グリコピロニウム	24
2.6.6.4.2.1	*In vitro*	24
2.6.6.4.2.1.1	細菌復帰突然変異試験（試験番号 AD91RW.502ICH.BTL[4.2.3.3.1.1]）	24
2.6.6.4.2.1.2	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]）	25
2.6.6.4.2.2	*In vivo*	25
2.6.6.4.2.2.1	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]）	25
2.6.6.4.3	グリコピロニウム/ホルモテロール	26
2.6.6.5	がん原性試験	26
2.6.6.5.1	ホルモテロール	26

2.6.6.5.2 グリコピロニウム 27
2.6.6.5.2.1 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]） 27
2.6.6.5.2.2 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]） 29
2.6.6.5.3 グリコピロニウム/ホルモテロール 32
2.6.6.6 生殖発生毒性試験 32
2.6.6.6.1 ホルモテロール 32
2.6.6.6.2 グリコピロニウム 33
2.6.6.6.2.1 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]） 33
2.6.6.6.2.2 胚・胎児発生に関する試験 34
2.6.6.6.2.2.1 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]） 34
2.6.6.6.2.2.2 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]） 35
2.6.6.6.2.3 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]） 36
2.6.6.6.3 グリコピロニウム/ホルモテロール 38
2.6.6.7 局所刺激性試験 38
2.6.6.7.1 ホルモテロール 38
2.6.6.7.2 グリコピロニウム 38
2.6.6.7.3 グリコピロニウム/ホルモテロール 38
2.6.6.8 その他の毒性試験 38
2.6.6.8.1 不純物及び分解生成物に関する試験 38
2.6.6.8.1.1 ホルモテロール 38
2.6.6.8.1.2 グリコピロニウム 39
2.6.6.8.1.3 グリコピロニウム/ホルモテロール 39
2.6.6.9 考察及び結論 39
2.6.6.9.1 FF MDI 39
2.6.6.9.2 GP MDI 42
2.6.6.9.3 GFF MDI 44
2.6.6.10 参考文献 47

表目次

表 1　FF MDI、GP MDI 及び GFF MDI の毒性試験一覧 8
表 2　FF MDI、GP MDI 及び GFF MDI の吸入投与毒性試験概略 9
表 3　FF MDI の吸入量の種間比較と安全係数 41
表 4　GP MDI の吸入量の種間比較と安全係数 43
表 5　GFF MDI の吸入量の種間比較と安全係数 46

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漿中濃度－時間曲線下面積
AUC_{0-t}	Area under plasma concentration-time curve from zero to time t：投与後 0 時間から t 時間までの血漿中濃度－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 時間までの血漿中濃度－時間曲線下面積
$CaCl_2$	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：ホルモテロールフマル酸塩水和物
GFF	Glycopyrrolate/Formoterol Fumarate：グリコピロニウム臭化物/ホルモテロールフマル酸塩水和物
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 Developmeny：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

ラット及びイヌを用いたホルモテロールフマル酸塩水和物（FF） MDI、グリコピロニウム臭化物（GP） MDI 及び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（GFF） MDI の単回吸入投与毒性試験を実施した。上記各動物種における 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、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。また、イヌを用いた 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完了した。更に、ラット及びイヌを用いた 3 用量の GP MDI、溶媒対照及び空気対照の各投与群について検討した 6 カ月間反復吸入投与毒性試験もそれぞれ実施した。加えて、GP については、マウスを用いた 14 日間反復吸入投与毒性試験（GP MDI）、遺伝毒性試験、マウス及びラットを用いたがん原性試験（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も実施し、その毒性を評価した。

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（FF）をホルモテロール、グリコピロニウム臭化物（GP）をグリコピロニウムと略して表記している。尚、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。

単回吸入投与毒性試験以外の全ての主要毒性試験は 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。

全体的にラット及びイヌを用いた吸入投与毒性試験結果から、オーキシス®タービュヘイラー®あるいはシムビコート®タービュヘイラー®などのホルモテロールを含有する既承認薬で既に報告されている心臓に対する影響以外、GFF MDI 投与に起因する重大な毒性はみられなかった。14 日間イヌ試験（FF MDI、GFF MDI）で認められた心臓所見（心室乳頭筋線維化）は、3 カ月間イヌ試験の FF MDI 及び GFF MDI のいずれの投与群でも認められなかったことから、これらの心臓所見は、長期の投与期間中に減弱する一時的な順応によるものであることが示唆された。GP MDI 投与では有害な所見は認められず、FF MDI 投与では GFF MDI 投与及びその他のホルモテロールを含有する既承認薬と同程度のプロファイルであった。FF MDI 及び GFF MDI の 3 カ月間イヌ試験では、高用量の FF MDI 群及び GFF MDI 群で軽微な肺胞マクロファージ凝集とその関連病変の発現率上昇がみられた。本試験の無毒性量（NOAEL）は、FF MDI 群と GFF MDI 群では中用量、GP MDI 群では高用量と考えられた。GP MDI の 6 カ月間ラット試験では、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、この所見の程度は軽微なものであり、げっ歯類の吸入試験でよくみられる適応反応と判断され、本試験の NOAEL は高用量と考えられた。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、新たな毒性や通常では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も、GP の先行試験と異なる新たな毒性や通常みられないような毒性は認められず、本試験における NOAEL は雄雌とも高用量と考えられた。

FF MDI、GP MDI 及び GFF MDI の実施毒性試験を表 1に示し、これら試験のより詳細を表 2 に示した。FF MDI、GP MDI 及び GFF MDI の単回吸入投与毒性試験並びに 14 日間反復吸入毒性試験結果をそれぞれ、2.6.6.2項及び2.6.6.3.1項に記載し、FF MDI、GP MDI（高用量のみ）及び

GFF MDI のイヌ 3 カ月間反復吸入投与毒性試験を2.6.6.3.2項に、GP MDI のラット及びイヌ 6 カ月間反復吸入投与毒性試験結果を2.6.6.3.3項及び2.6.6.3.4項にそれぞれ記載した。

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としては、単回及び反復吸入投与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筋腫を誘発したが、これら腫瘍はげっ歯類に高用量の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の減少がみられた（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）。

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（2.6.6.4.2項）。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：2.6.6.5.2項）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（2.6.6.6.2項）。

結論として、以上の毒性試験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 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水和物 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 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水和物 20.0 μg）］の販売承認及び長期使用が裏付けられる。

表 1　　FF MDI、GP MDI 及び GFF 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	FF MDI	FY08-042B / FY08-041B	非 GLP
			GP MDI	FY08-042A / FY08-041A	非 GLP
			GFF MDI	FY08-042D / FY08-041D	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）	FF MDI	FY09-039 / FY09-038	GLP
			GP MDI	FY08-076/ FY08-077、FY14-111（マウス）	GLP
			GFF MDI	FY09-086 / FY09-087	GLP
3 カ月間	吸入	イヌ	FF MDI GP MDI GFF MDI	FY10-129	GLP
6 カ月間	吸入	ラット及びイヌ	GP MDI	FY10-120 / FY12-073	GLP
遺伝毒性					
復帰突然変異試験	*In Vitro*		GP	AD91RW.502ICH.BTL	GLP
In vitro 小核試験	*In Vitro*		GP	AD91RW.361ICH.BTL	GLP
In vivo 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	皮下	ラット	GP	14-764	GLP
Seg II, DRF		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

FF = ホルモテロール; GP = グリコピロニウム; MDI = metered dose inhaler.　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
全ての吸入投与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（$CaCl_2$）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。

表 2　　FF MDI、GP MDI 及び GFF MDI の吸入投与毒性試験概略

吸入試験の種類	投与方法 （溶媒/製剤）	投与量[7]	無毒性量又は最大非致死量[1]	注目すべき所見
FF MDI 試験				
単回投与ラット （試験番号 FY08-042B）	FF MDI、 経鼻吸入のみ	低用量、雄：20 µg/kg 中用量 1、雄：16 µg/kg 中用量 2、雄：25 µg/kg 高用量、雄：50 µg/kg 低用量、雌：22 µg/kg 中用量 1、雌：17 µg/kg 中用量 2、雌：27 µg/kg 高用量、雌：53 µg/kg	高用量：52 µg/kg[1] （雄雌の平均値）	中用量 2 群及び高用量群で、剖検時に軽度～中等度の血管うっ血、及び肺の赤色又は白色化を認める。
単回投与イヌ （試験番号 FY08-041B）	FF MDI、 フェイスマスク吸入	低用量、雄：5 µg/kg 中用量、雄：9 µg/kg 高用量、雄：14 µg/kg 低用量、雌：5 µg/kg 中用量、雌：含まれていない 高用量、雌：14 µg/kg	高用量：14 µg/kg[1] （雄雌の平均値）	高用量群で体温上昇（103.0 F＝約 39°C）、呼吸数増加（ベースラインの 2 倍）、及び HR 増加（ベースラインの約 2 倍）を認める。
14 日間ラット （試験番号 FY09-039）	FF MDI、 経鼻吸入のみ （GLP 適用）	低用量、雄：35.37 µg/kg/日 中用量、雄：87.91 µg/kg/日 高用量、雄：153.19 µg/kg/日 低用量、雌：37.59 µg/kg/日 中用量、雌：94.24 µg/kg/日 高用量、雌：163.40 µg/kg/日	無毒性量：高用量 （雄：153 µg/kg/日、 雌：163 µg/kg/日、 雄雌の平均値：158 µg/kg/日）	特になし

次頁へ続く

吸入試験の種類	投与方法 （溶媒/製剤）	投与量[7]	無毒性量又は最大非致死量[1]	注目すべき所見
14 日間イヌ （試験番号 FY09-038）	FF MDI、 フェイスマスク吸入（GLP 適用）	低用量、雄：9.02 µg/kg/日 中用量、雄：12.89 µg/kg/日 高用量、雄：26.58 µg/kg/日 低用量、雌：9.38 µg/kg/日 中用量、雌：13.26 µg/kg/日 高用量、雌：20.50 µg/kg/日	無毒性量：低用量 （雄：9.02 µg/kg/日、 雌：9.38µg/kg/日、 雄雌の平均値：9.2 µg/kg/日）[4]	肝細胞の変化、乳頭筋の紡錘状細胞[5]、乳頭筋線維化
3 カ月間イヌ （試験番号 FY10-129）	FF MDI、 フェイスマスク吸入（GLP 適用）	低用量、雄：4.36 µg/kg/日 中用量、雄：10.18 µg/kg/日 高用量、雄：14.05 µg/kg/日 低用量、雌：4.53 µg/kg/日 中用量、雌：10.46 µg/kg/日 高用量、雌：14.51 µg/kg/日	無毒性量：中用量 （雄：10.18 µg/kg/日、 雌：10.46 µg/kg/日、 雄雌の平均値：10.32 µg/kg/日）[6]	HR 増加、軽微な肺マクロファージの発現率上昇 肝細胞質の腫脹[6]
GP MDI 試験				
単回投与ラット （試験番号 FY08-042A）	GP MDI、 経鼻吸入のみ	低用量：0.48 mg/kg 高用量：1.01 mg/kg	高用量：1.01 mg/kg[1] （雄雌の平均値）	薬剤関連の重要な所見なし
単回投与イヌ （試験番号 FY08-041A）	GP MDI、 フェイスマスク吸入	雄：0.155 mg/kg 雌：0.161 mg/kg	0.16 mg/kg[1] （雄雌の平均値）	薬剤関連の重要な所見なし
14 日間マウス （試験番号 FY14-111）	GP MDI、 経鼻吸入のみ （GLP 適用）	低用量、雄：　320 µg/kg/日 中用量、雄：　620 µg/kg/日 高用量、雄：　1340 µg/kg/日 低用量、雌：　340 µg/kg/日 中用量、雌：　660 µg/kg/日 高用量、雌：　1420 µg/kg/日	無毒性量：高用量 （雄：1340 µg/kg/日、 雌：1420 µg/kg/日、 雄雌の平均値：1380 µg/kg/日）	薬剤関連の重要な所見なし

次頁へ続く

吸入試験の種類	投与方法 （溶媒/製剤）	投与量[7]	無毒性量又は最大非致死量[1]	注目すべき所見
14 日間ラット （試験番号 FY08-076）	GP MDI、 経鼻吸入のみ （GLP 適用）	低用量、雄：46 µg/kg/日 中用量、雄：254 µg/kg/日 高用量、雄：514 µg/kg/日 低用量、雌：49 µg/kg/日 中用量、雌：279 µg/kg/日 高用量、雌：555 µg/kg/日	無毒性量：高用量（投与可能最大量） （雄：514 µg/kg/日、 雌：555 µg/kg/日、 雄雌の平均値：535 µg/kg/日）	特になし
14 日間イヌ （試験番号 FY08-077）	GP MDI、 フェイスマスク吸入（GLP 適用）	低用量、雄：16 µg/kg/日 中用量、雄：29 µg/kg/日 高用量、雄：77 µg/kg/日 低用量、雌：17 µg/kg/日 中用量、雌：31 µg/kg/日 高用量、雌：83 µg/kg/日	無毒性量：高用量（投与可能最大量） （雄：77 µg/kg/日、 雌：83 µg/kg/日、 雄雌の平均値：80 µg/kg/日）	特になし
3 カ月間イヌ （試験番号 FY10-129）	GP MDI、 フェイスマスク 吸入（GLP 適用）	雄：85.10 µg/kg/日 雌：89.23 µg/kg/日 （高用量のみ）	無毒性量：高用量 87 µg/kg/日 （雄雌の平均値）	特になし
6 カ月間ラット （試験番号 FY10-120）	GP MDI、 経鼻吸入のみ （GLP 適用）	低用量、雄：65 µg/kg/日 中用量、雄：264 µg/kg/日 高用量、雄：523 µg/kg/日 低用量、雌：70 µg/kg/日 中用量、雌：286 µg/kg/日 高用量、雌：572 µg/kg/日	無毒性量：高用量 （雄：523 µg/kg/日、 雌：572 µg/kg/日、 雄雌の平均値：548 µg/kg/日）	適応的な喉頭扁平上皮化生 （軽微）
6 カ月間イヌ （試験番号 FY12-073）	GP MDI、 フェイスマスク 吸入（GLP 適用）	低用量、雄：17.72 µg/kg/日 中用量、雄：59.05 µg/kg/日 高用量、雄：76.50 µg/kg/日 低用量、雌：19.44 µg/kg/日 中用量、雌：57.41 µg/kg/日 高用量、雌：72.77 µg/kg/日	無毒性量：高用量 （雄：76.50 µg/kg/日、 雌：72.77 µg/kg/日、 雄雌の平均値：75 µg/kg/日）	特になし

次頁へ続く

吸入試験の種類	投与方法 （溶媒/製剤）	投与量[7]	無毒性量又は最大非致死量[1]	注目すべき所見
がん原性試験 マウス（試験番号 FY14-128）	GP MDI、 経鼻吸入のみ （GLP 適用）	低用量、雄： 347 µg/kg/日 中用量、雄： 705 µg/kg/日 高用量、雄： 1460 µg/kg/日 低用量、雌： 335 µg/kg/日 中用量、雌： 700 µg/kg/日 高用量、雌： 1420 µg/kg/日	該当せず	がん原性変化はいずれの用量でも認められなかった。
がん原性試験 ラット（試験番号 FY12-072）	GP MDI、 経鼻吸入のみ （GLP 適用）	低用量、雄：151.70 µg/kg/日 中用量、雄：302.92 µg/kg/日 高用量、雄：620.45 µg/kg/日 低用量、雌：165.93 µg/kg/日 中用量、雌：330.66 µg/kg/日 高用量、雌：684.14 µg/kg/日	該当せず	がん原性変化はいずれの用量でも認められなかった。
GFF MDI 試験				
単回投与ラット （試験番号 FY08-042D）	GFF MDI、 経鼻吸入のみ	低用量、雄：120/24 µg/kg 中用量、雄：195/39 µg/kg 高用量、雄：327/66 µg/kg 低用量、雌：132/26 µg/kg 中用量、雌：214/42 µg/kg 高用量、雌：354/72 µg/kg	高用量：341/69 µg/kg[1] （雄雌の平均値）	高用量群で努力性呼吸（雄 1 匹）、及び剖検時肉眼検査で肺の変色（雄雌各 1 匹）を認める。
単回投与イヌ （試験番号 FY08-041D）	GFF MDI、 フェイスマスク吸入	低用量、雄：13.9/2.6 µg/kg 高用量、雄：78.0/15.2 µg/kg 低用量、雌：14.4/2.7 µg/kg 高用量、雌：79.2/15.4 µg/kg 高用量、雌 (再投与)[2]：128.5/16.5 µg/kg	高用量：78.6/15.3 µg/kg[1] （雄雌の平均値）	高用量群で呼吸数増加（ベースラインの約 2 倍まで）、HR 増加（ベースラインの約 2 倍）、及び紅斑を認める。

次頁へ続く

吸入試験の種類	投与方法 （溶媒/製剤）	投与量[7]	無毒性量又は最大非致死量[1]	注目すべき所見
14 日間ラット （試験番号 FY09-086）	GFF MDI、 経鼻吸入のみ （GLP 適用）	低用量、雄：72/14 µg/kg/日 中用量、雄：226/42 µg/kg/日 高用量、雄：368/69 µg/kg/日 低用量、雌：77/15 µg/kg/日 中用量、雌：241/45 µg/kg/日 高用量、雌：394/73 µg/kg/日	無毒性量：高用量 （雄：368/69 µg/kg/日、 雌：394/73 µg/kg/日、 雄雌の平均値：381/71 µg/kg/日）	特になし
14 日間イヌ （試験番号 FY09-087）	GFF MDI、 フェイスマスク吸入 （GLP 適用）	低用量、雄：17.0/3.3 µg/kg/日 中用量、雄：51.3/8.8 µg/kg/日 高用量、雄：73.8/12.5 µg/kg/日 低用量、雌：17.3/3.4 µg/kg/日 中用量、雌：52.3/9.0 µg/kg/日 高用量、雌：75.4/12.8 µg/kg/日	無毒性量：低用量 （雄：17.0/3.3 µg/kg/日、 雌：17.3/3.4 µg/kg/日、 雄雌の平均値： 17/3 µg/kg/日）[3]	一般状態の変化、肝臓/心臓病変、紅斑（胸部/耳介/鼠径部の発赤）、 肝細胞質の腫脹、 乳頭筋線維化
3 カ月間イヌ （試験番号 FY10-129）[7]	GFF MDI、 フェイスマスク 吸入（GLP 適用）	低用量、雄：17.26/4.36 µg/kg/日 中用量、雄：42.69/10.14 µg/kg/日 高用量、雄：59.38/14.03 µg/kg/日 低用量、雌：18.01/4.54 µg/kg/日 中用量、雌：44.08/10.78 µg/kg/日 高用量、雌：62.11/14.67 µg/kg/日	無毒性量：中用量 （雄：42.69/10.14 µg/kg/日、 雌：44.08/10.78 µg/kg/日、 雄雌の平均値：43/11 µg/kg/日）[6]	HR 増加、軽微な肺マクロファージの発現率上昇、 肝細胞質の腫脹[6]

1　投与可能最大吸入量の数値。致死は認められなかった。
2　最大非致死量の算出に雌の再投与データは含まず。
3　高用量群で認められた肝細胞質の腫脹を有害所見とみなさないので、低用量を無毒性量とみなすのが妥当。
4　異常値の動物を関連性があるとみなさない場合は、低用量を無毒性量とみなすのが妥当。
5　この雌の値は、ホルモテロールの代謝能障害による代謝異常値であることが判明。
6　肝細胞質の腫脹は適応反応であり有害反応ではないと考え、中用量を無毒性量とみなした。
7　GFF MDI と GP MDI の非臨床試験では、GFF MDI と GP MDI の力価/用量はグリコピロニウム臭化物の質量に基づいたものであり、これは活性物質の臭化物塩であることことに留意。

2.6.6.2 単回吸入投与毒性試験

2.6.6.2.1 FF MDI（試験番号 FY08-042B[4.2.3.1.1]、FY08-041B[4.2.3.1.2]）

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 ℃）、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。

2.6.6.2.2 GP MDI（試験番号 FY08-042A[4.2.3.1.3]、FY08-041A[4.2.3.1.4]）

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。

2.6.6.2.3 GFF MDI（試験番号 FY08-042D[4.2.3.1.5]、FY08-041D[4.2.3.1.6]）

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（非 GLP）を実施した。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 μg/kg 及び 78.6/15.3 μg/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。

2.6.6.3 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 FF MDI（試験番号 FY09-039[4.2.3.2.1]、FY09-038[4.2.3.2.2]）

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 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。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 μg/kg/日、雌では 163 μg/kg/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 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。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 は観察されなかった。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。

2.6.6.3.1.2 GP MDI（試験番号 FY14-111[4.2.3.2.3]、FY08-076[4.2.3.2.4]、FY08-077[4.2.3.2.5]）

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 GLP 条件下で実施した。

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。

2.6.6.3.1.3 GFF MDI（試験番号 FY09-086[4.2.3.2.6]、FY09-087[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：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 µg/kg/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、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 µg/kg/日、雌では 394/73 µg/kg/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 µg/kg/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 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に有意な群間差は認められなかった。

2.6.6.3.2 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[4.2.3.2.8]）

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。

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、$CaCl_2$ 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。空気動力学的中央粒子径（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）

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、痩衰、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、限局性の肺胞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胞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 ヵ所、多くて 2 ヵ所の小さな病巣）、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 ヵ所生じていた）。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。

2.6.6.3.3 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[4.2.3.2.9]）

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。

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嵌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。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。

2.6.6.3.4 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[4.2.3.10]）

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、$CaCl_2$、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質量濃度は、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。空気動力学的中央粒子径（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。雄雌とも、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有意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的みられた。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み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鉱物巣、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胞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。

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 は雄雌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）。

2.6.6.3.5 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 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。

2.6.6.4.2 グリコピロニウム

2.6.6.4.2.1 *In vitro*

2.6.6.4.2.1.1 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 *uvr*A 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。

2.6.6.4.2.1.2 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:ビンブラスチン、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。

2.6.6.4.2.2 *In vivo*

2.6.6.4.2.2.1 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、ラット骨髄細胞中の多染性赤血球（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。

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。

2.6.6.4.3 グリコピロニウム/ホルモテロール

グリコピロニウムと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 2 剤の配合剤を用いた遺伝毒性試験は実施していない。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、ホルモテロール/グリコピロニウム/ホルモテロール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 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。

2.6.6.5.2 グリコピロニウム

2.6.6.5.2.1 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。

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。

曝露エアロゾールは、エアロゾー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ールの空気動力学的中央粒子径（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。エアロゾール質量濃度は、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ールでは、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。各郡の生存率は 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。腫瘤が主に雄では 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、一貫した統計的敵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 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。

病理組織学的検査所見のピアレビューは、[redacted]の[redacted]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。

2.6.6.5.2.2 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。エアロゾール質量濃度は、動物ポートの呼吸領域からエアロゾールを 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ー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ールでは、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、エアロゾー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 群あたり雄雌各 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雄雌とも 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 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、雄雌とも、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/腫瘤であった。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/腫瘤は、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瘤（特に皮下乳房腫瘤）、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変化である（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 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）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）では統計学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、[redacted]の[redacted]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、被験物質投与により、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。

2.6.6.5.3 グリコピロニウム/ホルモテロール

グリコピロニウムと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 2 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、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、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 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。

2.6.6.6.2 グリコピロニウム

2.6.6.6.2.1 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]）

雄雌の 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/日の用量で皮下投与した。1 群雄雌各 25 匹とし、ほかに雄雌各 3 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/日以上の用量で、雌では 1 mg/kg/日以上の用量で認められた。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、約 10.01～11.38×10^8 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／精嚢の萎縮）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。

2.6.6.6.2.2 胚・胎児発生に関する試験

2.6.6.6.2.2.1 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/日以上の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/日の用量で皮下投与した。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/日以上の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、これらの減少は母体への毒性を示すものである。

2 匹の例外（対照群の 1 匹及び 1 mg/kg/日群の 1 匹）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/日であった。

2.6.6.6.2.2.2 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/日の用量で皮下投与した。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検査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曝露は、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の減少は、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は認められなかった。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。

2.6.6.6.2.3 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達（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（F_0、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/日の用量で皮下投与した。母動物（F_0）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。F_2 世代の親動物として選択された F_1 ラットには、グリコピロニウムの意図的な曝露は行わなかった。F_0 及び F_1 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（F_1 世代の膣開口及び包皮分離）を評価した。また、F_2 世代の親動物として選択された F_1 新生児において、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）。

F_0 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/日群では妊娠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（F_0）、母動物（F_0）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 F_1 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、F_1 世代における新生児の体重の軽微減少（約 6-8%）が、時に 1mg/kg/日（出生後 0 日及び 14 日）群でも認められた。

発達指標（F_1 及び F_2 世代の開眼及び背地走性、F_1 世代の包皮分離及び膣開口）には投与による影響は認められなかったが、F_1 世代の性成熟期（包皮分離開始時）の雄において、1 及び 10 mg/kg/日群で有意な体重減少が認められた。F_1 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。

F_1 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。F_2 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 F_0 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 F_1 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 F_1 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見られた。

全パラメータの総合的な検査に基づくと、F_0 世代の全身毒性に対する NOAEL は、高用量で摂餌量、体重及び体重増加量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。

2.6.6.6.3 グリコピロニウム/ホルモテロール

グリコピロニウムと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 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。

2.6.6.7 局所刺激性試験

2.6.6.7.1 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 ヵ月間）、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、気道に組織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)。

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。

2.6.6.7.2 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。

2.6.6.7.3 グリコピロニウム/ホルモテロール

グリコピロニウムとホルモテロールの配合剤（GFF MDI）のラット及びイヌ 14 日間（ラット：試験番号 FY09-086、イヌ：試験番号 FY09-087）並びにイヌ 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。

2.6.6.8 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 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）。

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 4 Toxicology: Drug Substance (Formoterol Fumarate；inhalation aerosol) に示す。

2.6.6.8.1.2 グリコピロニウム

GFF MDI 製剤の安定性試験において、3.2.P.5.5 項 Characterisation 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 5 Toxicology: Drug Substance (Glycopyrrolate；inhalation aerosol) 及び表 6 Toxicology: Drug Substance (Glycopyrrolate；micronized powder) に示す。

2.6.6.8.1.3 グリコピロニウム/ホルモテロール

グリコピロニウムとホルモテロール配合剤の原薬は、グリコピロニウムとホルモテロールであり、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。グリコピロニウム及びホルモテロールの不純物/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。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。

2.6.6.9 考察及び結論

2.6.6.9.1 FF MDI

FF MDI 毒性プログラムでこれまでに得られた安全係数を表 3で概説する。

＊新薬承認情報提供時に置換えた

ラット及びイヌを用いた単回吸入投与毒性試験の結果は、シムビコート®のようなホルモテロールを含有する既承認薬で以前に報告されている心臓への影響を除くと、FF MDI が有害な毒性を引き起こさないとの想定を裏付けている。

14 日間ラット試験で投与した最高用量（NOAEL）は、雄雌の平均で 158 μg/kg/日であった。予定臨床用量は 19.2 μg/日であり、これは 0.38 μg/kg/日に相当する（ヒトの体重を 50 kg、沈着率を 100%と想定）。したがって、14 日間ラット試験の最高用量は、予定臨床用量の 416 倍であった（ラットにおける肺組織への沈着率を 10%とすると約 42 倍）（表 3）。この用量をラットに投与した際に有意な有害作用はみられなかった。

14 日間イヌ試験における NOAEL は、雄雌の平均で 9.2 μg/kg/日であった。イヌに投与したホルモテロールの本用量は、予定臨床用量の約 24 倍であった（イヌにおける肺組織への沈着率を 25%とすると約 6 倍）。14 日間吸入試験終了時（投与 14 日）の低用量群（NOAEL）におけるイヌ血漿中濃度の PK 解析では、$AUC_{0\text{-}t}$ は雄雌の平均で 1228 pg·h/mL であった。したがって、低用量群におけるイヌ血漿中濃度平均値は、FF MDI 9.6 μg の 1 日 2 回 12 週間投与後のヒトの 1 日平均 AUC（152 pg·h/mL）と比べて、全身曝露量が約 8 倍高かった（表 3）。

3 カ月間イヌ試験におけるホルモテロールの NOAEL は、雄雌の平均で 10.32 μg/kg/日であった。イヌに投与したホルモテロールの本用量は、FF MDI の予定臨床用量の約 27 倍であった（イヌにおける肺組織への沈着率を 25%とすると約 7 倍）。3 カ月間吸入試験終了時（投与 90 日）の中用量群（NOAEL）におけるイヌ血漿中濃度の PK 解析では、投与 90 日のホルモテロールの $AUC_{0\text{-}t}$ は、雄雌の平均で 2995 pg·h/mL であった。したがって、中用量群におけるイヌ血漿中濃度平均値は、ヒト 1 日平均 AUC（FF MDI 9.6 μg の 1 日 2 回、12 週間投与後で 152 pg·h/mL）と比べて、全身曝露量が約 20 倍高くなった（表 3）。

FF MDI 投与で認められた有意な病変は、14 日間イヌ試験の中用量及び高用量における左心室の乳頭筋線維化であった。これは、ホルモテロールの各投与直後の一過性の大幅な心拍数増加（ホルモテロールのような β_2 刺激薬の薬理作用として知られる）の結果と考えられた。FF MDI の 3 カ月間試験では、いずれの用量群でも心臓病変は認められなかった。したがって、FF MDI の 14 日間イヌ試験で認められた心臓病変は、投与継続中に回復性が認められる適応反応であると考えられた。

FF MDI の 3 カ月間試験で認められた有意な所見は、FF MDI の高用量群における軽微な肺胞マクロファージ凝集と関連病変の発現率が、溶媒対照群と比べて高くなったことであった。FF MDI 群の NOAEL は中用量と考えられた。

14 日間イヌ試験における臨床的にモニタリング可能な心拍数増加の心臓所見と、ラット及びイヌ試験における広範な複合的安全性に基づき、非臨床吸入毒性試験によって、FF MDI の臨床用量が妥当かつ安全であることが再確認された。

表 3　　FF MDI の吸入量の種間比較と安全係数

動物種	試験の種類（試験番号）	FF MDI 吸入量（μg/kg/日；いずれの生物種も沈着率は 100%）	動物/ヒト安全係数	FF MDI 吸入量（μg/kg/日；沈着率はヒト 100%、ラット 10%、イヌ 25%）	動物/ヒト安全係数	ホルモテロール曝露量 AUC（pg·h/mL）	動物/ヒト安全係数
ヒト	第 III 相臨床試験	0.38 μg/kg/日 [1]	1	0.38 μg/kg/日 [1]	1	152[4]	1
ラット	14 日間吸入試験（試験番号 FY09-039）	158 μg/kg/日 [2]	416	15.8 μg/kg/日 [3]	41.6	-[6]	-
イヌ	14 日間吸入試験（試験番号 FY09-038）	9.2 μg/kg/日 [2]	24	2.3 μg/kg/日 [3]	6.1	1228[5]	8
イヌ	3 カ月間吸入試験（試験番号 FY10-129）	10.32 μg/kg/日 [2]	27	2.6 μg/kg/日 [3]	6.8	2995[5]	20

1　第 III 相試験の臨床用量は、1 日あたりのアクチュエーターからの噴霧量として、ホルモテロールが約 19.2 μg である（9.6 μg を 1 日 2 回投与）。患者の体重を 50 kg と想定。
2　無毒性量（雄雌の平均値）、肺組織への沈着率を 100%と想定。
3　無毒性量（雄雌の平均値）、肺組織への沈着率をラットでは 10%、イヌでは 25%と想定。
4　第Ⅲ相臨床試験（PT003006）中等度から最重症の COPD 患者にホルモテロールを 1 日 2 回、12 週間投与後の平均 $AUC_{0\text{-}12}$ は 76 pg·h/mL。したがって、24h AUC は 152 pg·h/mL。
5　無毒性量投与時の試験終了時 $AUC_{0\text{-}t}$（雄雌の平均）。
6　AUC 算出のための時点データが不足。
FF = ホルモテロール

2.6.6.9.2　GP MDI

GP MDI 毒性プログラムでこれまでに得られた安全係数を表 4で概説する。

吸入投与したグリコピロニウムのいずれの用量でも、有意な有害作用は認められなかった。

ラット 6 カ月間試験で投与したグリコピロニウムの高用量は雄雌の平均で 548 µg/kg/日、イヌ 3 カ月試験で投与したグリコピロニウムの高用量は雄雌の平均で 87 µg/kg/日、イヌ 6 カ月試験で投与したグリコピロニウムの高用量は雄雌の平均で 75 µg/kg/日、マウス及びラットがん原性試験で投与したグリコピロニウムの高用量は雄雌の平均でそれぞれ、1440 及び 652 µg/kg/日であった。グリコピロニウムの臨床用量は 36 µg/日であり、これは 0.72 µg/kg/日に相当する（ヒトの体重を 50 kg、沈着率を 100%と想定）。したがって、ラット及びイヌに投与したグリコピロニウムの NOAEL（最高用量）は、GP MDI の予定臨床用量のそれぞれ約 761 及び約 121 倍であった（ラット及びイヌへの肺組織への沈着率をそれぞれ 10%及び 25%とすると、ラットで約 76 倍及びイヌで約 31 倍）。イヌ 6 カ月間吸入試験終了時（投与 180 日）の高用量群（NOAEL）における血漿中濃度の PK 解析では、$AUC_{0\text{-}t}$ は、雄雌の平均で 26070 pg·h/mL であった。したがって、イヌ血漿中濃度平均値は、ヒトの 1 日平均 AUC（GP MDI 18 µg の 1 日 2 回、12 週間投与後に 178 pg·h/mL）と比べて、全身曝露量が約 146 倍高くなった（表 4）。

GP MDI の臨床用量は妥当かつ安全であることが非臨床吸入毒性試験によって再確認された。

表 4　　GP MDI の吸入量の種間比較と安全係数

動物種	試験の種類（試験番号）	GP MDI 吸入量（μg/kg/日；いずれの生物種も沈着率は 100%）	動物/ヒト安全係数	GP MDI 吸入量（μg/kg/日；沈着率はヒト 100%、齧歯類 10%、イヌ 25%）	動物/ヒト安全係数	グリコピロニウム曝露量 AUC (pg·h/mL)	動物/ヒト安全係数
ヒト	第 III 相臨床試験	0.72 μg/kg/日 [1]	1	0.72 μg/kg/日 [1]	1	178 [4]	1
マウス	14 日間吸入試験（試験番号 FY14-111）	1380 μg/kg/日 [2]	1917	138 μg/kg/日 [3]	192	-[6]	-
ラット	14 日間吸入試験（試験番号 FY08-076）	535 μg/kg/日 [2]	743	53.5 μg/kg/日 [3]	74	-[6]	-
イヌ	14 日間吸入試験（試験番号 FY08-077）	80 μg/kg/日 [2]	111	20 μg/kg/日 [3]	28	2500 [5]	14
イヌ	3 カ月間吸入試験（試験番号 FY10-129）	87 μg/kg/日 [2]	121	22 μg/kg/日 [3]	31	11400[5]	64
ラット	6 カ月間吸入試験（試験番号 FY10-120）	548 μg/kg/日 [2]	761	54.8 μg/kg/日 [3]	76	-[6]	-
イヌ	6 カ月間吸入試験（試験番号 FY12-073）	75 μg/kg/日 [2]	104	19 μg/kg/日 [3]	26	26070[5]	146
マウス	2 年間がん原性試験（試験番号 FY14-128）	1440 μg/kg/日 [2]	2000	144 μg/kg/日 [3]	200	-[6]	-
ラット	2 年間がん原性試験（試験番号 FY12-072）	652 μg/kg/日 [2]	906	65.2 μg/kg/日 [3]	91	Not conducted	-

1　第 III 相試験の臨床用量は、グリコピロニウムが 36 μg である（18 μg を 1 日 2 回投与）。患者の体重を 50 kg と想定。
2　無毒性量（雄雌の平均値）、肺組織への沈着率を 100%と想定。
3　無毒性量（雄雌の平均値）、肺組織への沈着率をラットでは 10%、イヌでは 25%と想定。
4　第Ⅲ相臨床試験（PT003006）中等度から最重症の COPD 患者にグリコピロニウムを 1 日 2 回、12 週間投与後の平均 AUC0-12 は 89 pg·h/mL。従って、24h AUC は 178 pg·h/mL。
5　無毒性量投与時の試験終了時 AUC（雄雌の平均）。
6　AUC 算出のための時点データが不足。
GP = グルコピロニウム

2.6.6.9.3 GFF MDI

GFF MDI 毒性プログラムでこれまでに得られた安全係数を表 5で概説する。

ラットとイヌを用いた単回吸入投与毒性試験の結果は、ホルモテロールを含有するオーキシス®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心臓への影響を除くと、GFF MDI は有意な毒性を引き起こさないとの推定を裏付けるものである。

14 日間ラット試験で投与したグリコピロニウム/ホルモテロールの最高用量は、雄雌の平均で 381/71 µg/kg/日であった。グリコピロニウム臭化物/ホルモテロールの予定臨床用量は 36/19.2 µg/日（18/9.6 µg として 1 日 2 回投与）となり、これは 0.72/0.38 µg/kg/日に相当する（ヒトの体重を最低 50 kg、沈着率を 100%と想定）。したがって、ラットに投与したグリコピロニウム及びホルモテロールの最高用量は、予定臨床用量の約 529/187 倍であった（ラットにける肺組織への沈着率を 10%とすると約 53/18 倍）。この用量のグリコピロニウムとホルモテロールをラットに投与した際に、意味のある有害作用は認められなかった。

14 日間イヌ試験で投与したグリコピロニウム/ホルモテロールの NOAEL は、雄雌の平均で 17/3 µg/kg/日であった。イヌに投与したグリコピロニウム/ホルモテロールの本用量は、GFF MDI の予定臨床用量（0.72/0.38 µg/kg/日）の約 24/8 倍であった（イヌにける肺組織への沈着率を 25%と推定すると約 6/2 倍）。14 日間吸入試験終了時の低用量群（NOAEL）におけるイヌ血漿中濃度の PK 解析では、投与 14 日のグリコピロニウム/ホルモテロールの $AUC_{0\text{-}t}$ は、雄雌の平均で 2550/1108 pg·h/mL であった。したがって、低用量群におけるイヌ血漿中 AUC 平均値は、予定臨床用量のヒトの 1 日平均 AUC（GFF MDI 18/9.6 µg の 1 日 2 回投与時 186/154 pg·h/mL）と比べて、14/7 倍高くなった（表 5）。

3 カ月間イヌ試験で投与したグリコピロニウム/ホルモテロールの NOAEL は、雄雌の平均で 43.4/10.5 µg/kg/日であった。イヌに投与したグリコピロニウム/ホルモテロールの本用量は、GFF MDI の予定臨床用量の約 60/28 倍であった（イヌにける肺組織への沈着率を 25%と推定すると約 15/6.8 倍）。3 カ月間吸入試験終了時の中用量群（NOAEL）におけるイヌ血漿中濃度の PK 解析では、投与 90 日のグリコピロニウム/ホルモテロールの $AUC_{0\text{-}t}$ は、雄雌の平均で 10815/3055 pg·h/mL であった。したがって、中用量群におけるイヌ血漿中 AUC 平均値は、予定臨床用量のヒトの 1 日平均 AUC（GFF MDI 18/9.6 µg 投与時 186/154 pg·h/mL）と比べて約 58/20 倍高くなった（表 5）。

GFF MDI のラット及びイヌ 14 日間試験で認められた意味のある病変は、14 日間イヌ試験の中用量及び高用量群における左心室の乳頭筋線維化であった。低用量群は乳頭筋線維化を認めなかったことから、低用量が GFF MDI の 14 日間イヌ試験の NOAEL と考えられた。乳頭筋線維化は、ホルモテロールの各投与直後の大幅な心拍数増加（ホルモテロールのようなβ_2 刺激薬の薬理作用として知られる）の結果と考えられた。一方、GFF MDI の 3 カ月間イヌ試験ではいずれの用量においても心臓病変は認められなかった。したがって、14 日間イヌ試験で認められた心臓病変は、曝露継続中に回復性が認められる適応反応であると考えられた。

GFF MDI の 3 カ月間試験で認められた唯一の意味のある所見は、高用量群における軽微な肺胞マクロファージ凝集と関連病変の発現率が、両対照群と比べて高くなったことであった。本試験における NOAEL は中用量（43.4/10.5 µg/kg/日）と考えられた。

14 日間イヌ試験における臨床的にモニタリング可能な心拍数増加の心臓所見と、ラット及びイヌ試験における広範な複合的安全性に基づき、非臨床吸入毒性試験によって、GFF MDI の臨床用量が妥当かつ安全であることが再確認された。

表 5　　GFF MDI の吸入量の種間比較と安全係数

動物種	試験の種類（試験番号）	GFF(GP/FF)吸入量（μg/kg/日；沈着率は 100%）	動物/ヒト安全係数	GFF(GP/FF)吸入量（μg/kg/日；沈着率はヒト 100%、ラット 10%、イヌ 25%）	動物/ヒト安全係数	グリコピロニウム/ホルモテロール曝露量（pg·h/mL）	動物/ヒト安全係数
ヒト	第 III 相臨床試験	0.72/0.38 μg/kg/日 [1]	1/1	0.72/0.38 μg/kg/日 [1]	1/1	186/154[4]	1/1
ラット	14 日間吸入試験（試験番号 FY09-086）	381/71 μg/kg/日 [2]	529/187	38/7 μg/kg/日 [3]	53/18	-[6]	-
イヌ	14 日間吸入試験（試験番号 FY09-087）	17/3 μg/kg/日 [2]	24/8	4.3/0.8 μg/kg/日 [3]	6/2	2550/1108[5]	14/7
イヌ	3 カ月間吸入試験（試験番号 FY10-129）	43.4/10.5 μg/kg/日 [2]	60/28	10.9/2.6 μg/kg/日 [3]	15/6.8	10815/3055[5]	58/20

1　第 III 相試験の臨床用量は、グリコピロニウムが 36 μg（18 μg を 1 日 2 回投与）、ホルモテロールが 19.2 μg（9.6 μg を 1 日 2 回投与）患者の体重を 50 kg と想定。
2　無毒性量（雄雌の平均値）、肺組織への沈着率を 100%と想定。
3　無毒性量（雄雌の平均値）、肺組織への沈着率をラットでは 10%、イヌでは 25%と想定。
4　第Ⅲ相臨床試験（PT003006）中等度から最重症の COPD 患者にグリコピロニウム/ホルモテロールを 1 日 2 回、12 週間投与後の平均 $AUC_{0\text{-}12}$ は 93/77 pg·h/mL。従って、24h AUC は 186/154 pg·h/mL。
5　無毒性量投与時の試験終了時 AUC（雄雌の平均）
6　AUC 算出のための時点データが不足。
GFF = グリコピロニウム/ホルモテロール、GP = グルコピロニウム、FF = ホルモテロール

2.6.6.10 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: Mclnnes EF (ed), Background lesions in laboratory animals. A color atras. Elsevier, London, p37-44.

2.6.7　毒性試験概要表

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
2.6.7.1　毒性試験：一覧表 4
2.6.7.2　トキシコキネティクス：トキシコキネティクス試験の一覧表 12
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 14
2.6.7.4　毒性試験：被験物質（バッチ毎）一覧 18
2.6.7.5　単回投与毒性試験 24
2.6.7.6　反復投与毒性試験：重要な試験以外の試験 27
2.6.7.7　反復投与毒性試験：重要な試験 28
2.6.7.7.1　ホルモテロール 28
2.6.7.7.2　グリコピロニウム 36
2.6.7.7.3　グリコピロニウム/ホルモテロール 51
2.6.7.8　*In Vitro* 遺伝毒性試験 60
2.6.7.9　*In Vivo* 遺伝毒性試験 64
2.6.7.10　がん原性試験 66
2.6.7.11　生殖発生毒性試験：重要な試験以外の試験 78
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 80
2.6.7.13　生殖発生毒性試験：胚・胎児発生に関する試験 84
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 90
2.6.7.15　新生児を用いた試験 95
2.6.7.16　局所刺激性試験 96
2.6.7.17　その他の毒性試験 97

表目次

表 1　Overview of Toxicology Studies with FF MDI....4
表 2　Overview of Toxicology Studies with GP MDI or Glycopyrronium bromide (Glycopyrrolate)....6
表 3　Overview of Toxicology Studies with GFF MDI....10
表 4　Toxicology: Drug Substance (Formoterol Fumarate; inhalation aerosol)....18
表 5　Toxicology: Drug Substance (Glycopyrrolate; inhalation aerosol)....21
表 6　Toxicology: Drug Substance (Glycopyrrolate : micronized powder)....23
表 7　Single Dose Toxicity Studies with FF MDI[4.2.3.1.1、4.2.3.1.2]....24
表 8　Single Dose Toxicity Studies with GP MDI[4.2.3.1.3、4.2.3.1.4]....25
表 9　Single Dose Toxicity Studies with GFF MDI[4.2.3.1.5、4.2.3.1.6]....26
表 10　14-Day Inhalation Toxicity Study in Rats with FF MDI[4.2.3.2.1]....28
表 11　14-Day Inhalation Toxicity Study in Dogs with FF MDI[4.2.3.2.2]....30
表 12　3-Month Inhalation Toxicity Study in Dogs with FF MDI[4.2.3.2.8]....33
表 13　14-Day Inhalation Toxicity Study in Mice with GP MDI[4.2.3.2.3]....36
表 14　14-Day Inhalation Toxicity Study in Rats with GP MDI[4.2.3.2.4]....40
表 15　14-Day Inhalation Toxicity Study in Dogs with GP MDI[4.2.3.2.5]....42
表 16　3-Month Inhalation Toxicity Study in Dogs with GP MDI[4.2.3.2.8]....44
表 17　6-Month Inhalation Toxicity Study in Rats with GP MDI[4.2.3.2.9]....46
表 18　6-Month Inhalation Toxicity Study in Dogs with GP MDI[4.2.3.10]....48
表 19　14-Day Inhalation Toxicity Study in Rats with GFF MDI[4.2.3.2.6]....51
表 20　14-Day Inhalation Toxicity Study in Dogs with GFF MDI[4.2.3.2.7]....53
表 21　3-Month Inhalation Toxicity Study in Dogs with GFF MDI[4.2.3.2.8]....56
表 22　Bacterial Reverse Mutation Assay with Glycopyrronium Bromide (Glycopyrrolate)[4.2.3.3.1.1]....60
表 23　*In Vitro* Mammalian Cell Micronucleus Assay in TK6 Cells with Glycopyrronium Bromide (Glycopyrrolate)[4.2.3.3.1.2]....62
表 24　*In Vivo* Micronucleus Assay in Rats with Glycopyrronium Bromide (Glycopyrrolate)[4.2.3.3.2.1]....64
表 25　104-Week Inhalation Toxicity Study in Mice with GP MDI[4.2.3.4.1.1]....66
表 26　104-Week Inhalation Toxicity Study in Rats with GP MDI[4.2.3.4.1.2]....71
表 27　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]....78
表 28　Fertility and early embryonic development to implantation study of Glycopyrronium Bromide (Glycopyrrolate) in rats[4.2.3.5.1.1]....80
表 29　Embryo-fetal development toxicity study of Glycopyrronium Bromide (Glycopyrrolate) in rats[4.2.3.5.2.2]....84
表 30　Embryo-fetal development toxicity study of Glycopyrronium Bromide (Glycopyrrolate) in rabbits[4.2.3.5.2.4]....87
表 31　Pre- and post-natal development including maternal function of Glycopyrronium Bromide (Glycopyrrolate) in rats[4.2.3.5.3.1]....90

2.6.7.1 毒性試験：一覧表

表 1　　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 Mid 1 Male Mid 2 Male High Male Low Female Mid 1 Female Mid 2 Female High Female	20 16 25 **50**[2] 22 17 27 **53**	No	[redacted][3]	FY08-042B	4.2.3.1.1
Dogs / Beagle	Inhalation	Single dose	Low Male Mid Male High Male Low Female Mid Female High Female	5 9 **14** 5 Not included **14**	No	[redacted]	FY08-041B	4.2.3.1.2
Repeat Dose Toxicity								
Rats / Sprague-Dawley	Inhalation	14 days	Low Male Mid Male High Male Low Female Mid Female High female	35.37 87.91 **153.19** 37.59 94.24 **163.40**	Yes	[redacted]	FY09-039	4.2.3.2.1

次頁へ続く

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	14 days	Low Male	**9.02**	Yes	[redacted][3]	FY09-038	4.2.3.2.2
			Mid Male	12.89				
			High Male	26.58				
			Low Female	**9.38**				
			Mid Female	13.26				
			High Female	20.50				
Dogs / Beagle	Inhalation	3 months	Low Male	4.36	Yes	[redacted]	FY10-129	4.2.3.2.8
			Mid Male	**10.18**				
			High Male	14.05				
			Low Female	4.53				
			Mid Female	**10.46**				
			High Female	14.51				

1　Indicates study has a GLP compliance statement
2　The maximum nonlethal dose or the NOAEL is bold-underlined.
3　[redacted] ([redacted])

表 2　Overview of Toxicology Studies with GP MDI or Glycopyrronium bromide (Glycopyrrolate)

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 0.48 mg/kg High **1.01 mg/kg**[2]	No	[redacted][3]	FY08-042A	4.2.3.1.3
Dogs / Beagle	Inhalation	Single dose	Male **0.155 mg/kg** Female **0.161 mg/kg**	No	[redacted]	FY08-041A	4.2.3.1.4
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	[redacted]	FY14-111	4.2.3.2.3
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	[redacted]	FY08-076	4.2.3.2.4
Dogs / Beagle	Inhalation	14 days	Low Male 16 Mid Male 29 High Male **77** Low Female 17 Mid Female 31 High Female **83**	Yes	[redacted]	FY08-077	4.2.3.2.5
Dogs / Beagle	Inhalation	3 months	High Male **85.10** High Female **89.23**	Yes	[redacted]	FY10-129	4.2.3.2.8

次頁へ続く

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 **523** Low Female 70 Mid Female 286 High Female **572**	Yes	[redacted]	FY10-120	4.2.3.2.9
Dogs / Beagle	Inhalation	6 months	Low Male 17.72 Mid Male 59.05 High Male **76.50** Low Female 19.44 Mid Female 57.41 High Female **72.77**	Yes	[redacted]	FY12-073	4.2.3.10
Genotoxicity							
Bacterial reverse mutation (*S. typhimurium, E.coli*)	*In vitro*	48 - 72 hours	6.7 - 5000 μg/plate	Yes	[redacted]	AD91RW.502ICH.BTL	4.2.3.3.1.1
In vitro cytogenetics (TK6 cells)	*In vitro*	4/27 hours	50 - 398 μg/mL	Yes	[redacted]	AD91RW.361ICH.BTL	4.2.3.3.1.2
Micronucleus (Hsd: SD rats)	Oral	Single	500 - 2000 mg/kg	Yes	[redacted]	AD91RW.125M012ICH.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	[redacted]	FY14-128	4.2.3.4.1.1

次頁へ続く

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 High Female 684.14	Yes	[redacted]	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	[redacted]	14-764	4.2.3.5.1.1
Embryo-fetal development (DRF) Rats / Sprague-Dawley	Subcutaneous injction	12 days (Gestation Day 6-17)	0.2, 1, 5 10 mg/kg/day	Yes	[redacted]	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	[redacted]	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	[redacted]	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	[redacted]	14-763	4.2.3.5.2.4

次頁へ続く

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	[redacted]	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 [redacted] ([redacted])
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 changed to lower doses of 0.2, 1, 5 and 10 mg/kg/day over Gestation Days 8 or 9-18.
DRF = dose range finding

表 3　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 **327/66**[2] Low Female 132/26 Mid Female 214/42 High Female **354/72**	No	[redacted][3]	FY08-042D	4.2.3.1.5
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 (repeat)[4] 128.5/16.5	No	[redacted]	FY08-041D	4.2.3.1.6
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	[redacted]	FY09-086	4.2.3.2.6
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	[redacted]	FY09-087	4.2.3.2.7

次頁へ続く

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	[redacted]	FY10-129	4.2.3.2.8
Genotoxicity	No studies were conducted with GFF MDI.						
Carcinogenicity							
Reproduction Toxicity							
Local Tolerance							
Other Toxicity Studies							
Antigenicity							
Impurities							

1　Study has a GLP compliance statement
2　The maximum nonlethal dose or the NOAEL is bold-underlined.
3　[redacted] ([redacted])
4　The female repeat data was not included in the maximum nonlethal dose calculation.

2.6.7.2 トキシコキネティクス：トキシコキネティクス試験の一覧表

Type of Study	Test System	Method of Administration	Dose GP/FF (µg/kg) (male + female combined)	GLP Compliance	Testing Facility	Study Number
FF MDI						
Single dose[1]	Rat	Inhalation	21, 17, 26, 52	No	[redacted]	FY08-042B
Single dose	Dog	Inhalation	5, 9, 14	No	[redacted]	FY08-041B
14-Day repeat dose[1]	Rat	Inhalation	36, 91, 158	Yes	[redacted]	FY09-039
14-Day repeat dose	Dog	Inhalation	9, 13, 24	Yes	[redacted]	FY09-038
3-Month repeat dose	Dog	Inhalation	4, 10, 14	Yes	[redacted]	FY10-129
GP MDI						
Single dose[1]	Rat	Inhalation	480, 1010	No	[redacted]	FY08-042A
Single dose	Dog	Inhalation	160	No	[redacted]	FY08-041A
14-Day repeat dose	Mouse	Inhalation	330、640、1380	Yes	[redacted]	FY14-111
14-Day repeat dose[1]	Rat	Inhalation	48, 267, 535	Yes	[redacted]	FY08-076
14-Day repeat dose	Dog	Inhalation	17, 30, 80	Yes	[redacted]	FY08-077
3-Month repeat dose	Dog	Inhalation	87	Yes	[redacted]	FY10-129
6-Month repeat dose[1]	Rat	Inhalation	68, 275, 548	Yes	[redacted]	FY10-120
6-Month repeat dose	Dog	Inhalation	19, 58, 75	Yes	[redacted]	FY12-073
GP						
Seg I[1]	Rat	Subcutaneous	0.1, 1, 10 (mg/kg/day)	Yes	[redacted]	14-764
Seg II[1]	Rat	Subcutaneous	0.1, 1, 10 (mg/kg/day)	Yes	[redacted]	14-762
	Rabbit	Subcutaneous	0.1, 1, 10 (mg/kg/day)	Yes	[redacted]	14-763
Seg III[1]	Rats	Subcutaneous	0.1, 1, 10 (mg/kg/day)	Yes	[redacted]	14-765

次頁へ続く

Type of Study	Test System	Method of Administration	Dose 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	[redacted]	FY08-042D
Single dose	Dog	Inhalation	14/3, 79/15, 129/17	No	[redacted]	FY08-041D
14-Day repeat dose[1]	Rat	Inhalation	75/15, 234/44, 381/71	Yes	[redacted]	FY09-086
14-Day repeat dose	Dog	Inhalation	17/3, 52/9, 75/13	Yes	[redacted]	FY09-087
3-Month repeat dose	Dog	Inhalation	18/4, 43/10, 61/14	Yes	[redacted]	FY10-129

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

[1] Limited sampling time points, insufficient to calculate AUC

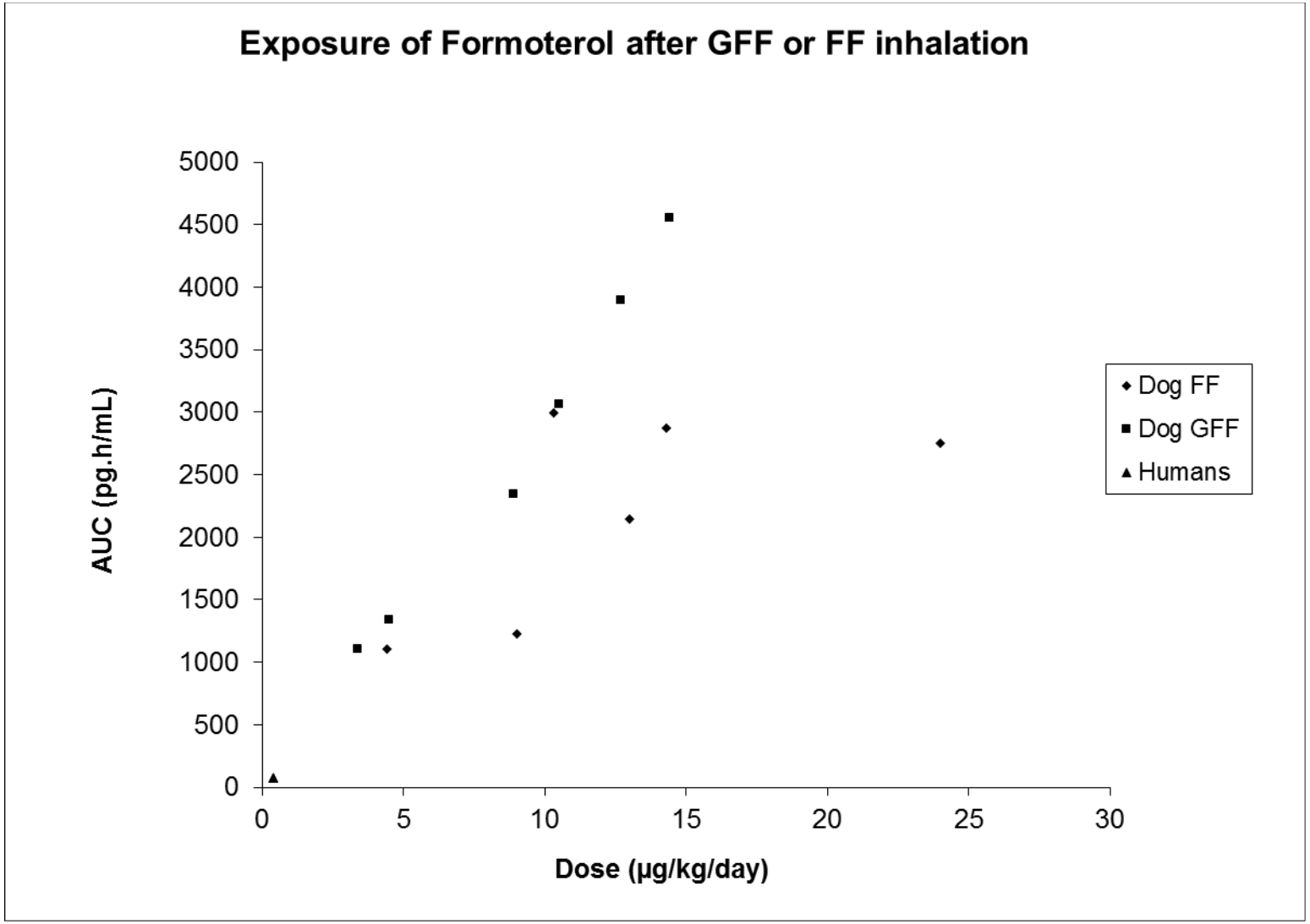
2.6.7.3 トキシコキネティクス：トキシコキネティクス試験成績の一覧

Steady State AUC (pg·h/mL) for Formoterol			Steady State AUC (pg·h/mL) for Glycopyrronium		
Daily Dose (µg/kg/day)	**Dog**	**Humans[a]**	**Daily Dose (µg/kg/day)**	**Dog**	**Humans[a]**
FF MDI					
0.38		152			
4.4	1105				
9	1228				
10.3	2995				
13	2148				
14.3	2870				
24	2754				
			GP MDI		
			0.72		178
			17	225	
			19	2237	
			30	460	
			58	9490	
			75	26067	
			80	2517	
			87	11400	

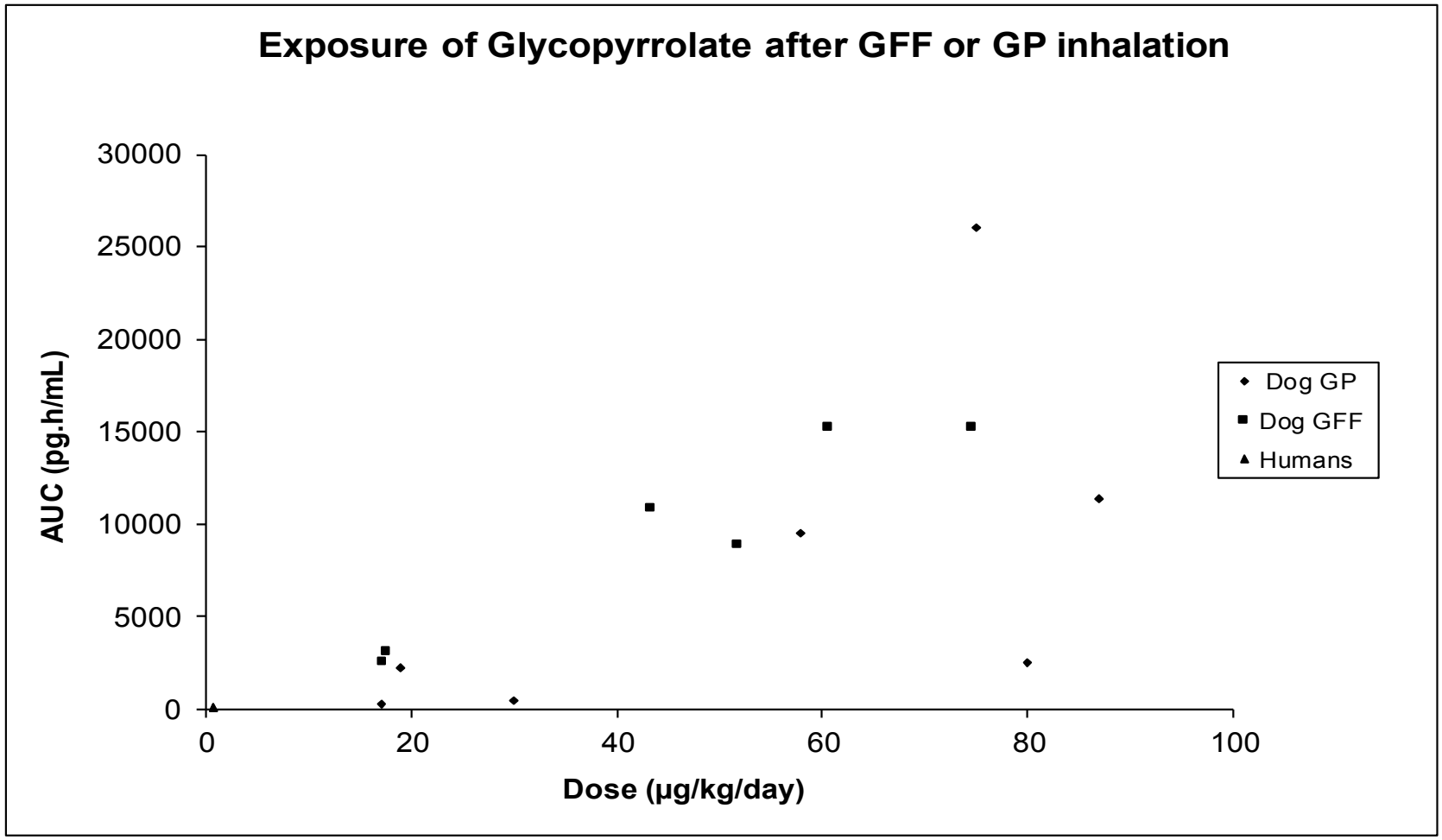
次頁へ続く

Steady State AUC (pg·h/mL) for Formoterol			Steady State AUC (pg·h/mL) for Glycopyrronium		
Daily Dose (µg/kg/day)	**Dog M+F**	**Humans[a]**	**Daily Dose (µg/kg/day)**	**Dog M+F**	**Humans[a]**
GFF MDI					
0.38		154	0.72		186
3.4	1108		17.2	2550	
4.5	1335		17.6	3060	
8.9	2344		43.4	10815	
10.5	3055		51.8	8845	
12.7	3894		60.7	15250	
14.4	4550		74.6	15242	

[a] Assumed 24h AUC values from 12 week Phase III clinical study PT003006. Doses of 36 µg of glycopyrrolate and 19.2 µg of formoterol alone or in combination, ex-actuator per day (18/9.6 µg BID) given to COPD patients. Assumes a patient body weight of 50 kg.



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



Steady state exposure (AUC) of glycopyrronium after repeated inhalation in human and dogs.

2.6.7.4 毒性試験：被験物質（バッチ毎）一覧

表 4　　Toxicology: Drug Substance (Formoterol Fumarate; inhalation aerosol)

Drug Product Batch No.	Assay (mg/canister)	Related Substances					Study Number	Type of Study
		Compound A[1]	Compound F[2]	Compound G[3]	Compound I[4]	Impurity 5[5]		
Proposed Specification	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]		
[redacted]	1.40	NT	NT	NT	NT	NT	FY08-042B	Rat single dose inhalation
							FY08-041B	Dog single dose inhalation
[redacted]	1.21	NT	NT	NT	NT	NT	FY08-042D	Rat single dose inhalation
[redacted]	1.3	NT	NT	NT	NT	NT	FY08-041D	Dog single dose inhalation
[redacted]	1.33	0.3% 0.3% 0.3%	ND	ND	NT	ND	FY09-039	14-Day in Rat for FF MDI
[redacted]	1.33	0.3% 0.4% 0.4%	ND	ND	NT	ND	FY09-039	14-Day in Rat for FF MDI
[redacted]	1.37	0.2% 0.1% 0.1%	ND	ND	NT	ND	FY09-039	14-Day in Rat for FF MDI
[redacted]	1.40	0.1% 0.1% 0.1%	ND	ND	NT	ND	FY09-039	14-Day in Rat for FF MDI

次頁へ続く

Drug Product Batch No.	Assay (mg/canister)	Related Substances					Study Number	Type of Study
		Compound A[1]	Compound F[2]	Compound G[3]	Compound I[4]	Impurity 5[5]		
Proposed Specification	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]		
[redacted]	1.24	0.25% 0.26% 0.28%	ND	0.05% 0.05% 0.05%	NT	ND	FY09-086	14-Day in Rat for GFF MDI
[redacted]	1.18	0.25% 0.23% 0.26%	ND	0.05% 0.05% <0.05%	NT	ND	FY09-086	14-Day in Rat for GFF MDI
[redacted]	1.40	0.1% 0.1% 0.1%	ND	ND	NT	ND	FY09-038	14-Day in Dog for FF MDI
[redacted]	1.36	0.2% 0.2% 0.2%	ND	ND	NT	ND	FY09-038	14-Day in Dog for FF MDI
[redacted]	1.40	0.2% 0.2% 0.2%	ND	ND	NT	ND	FY09-038	14-Day in Dog for FF MDI
[redacted]	1.32	0.2% 0.2% 0.2%	ND	ND	NT	ND	FY09-038	14-Day in Dog for FF MDI
[redacted]	1.18	0.25% 0.23% 0.26%	ND	0.05% 0.05% <0.05%	NT	ND	FY09-087	14-Day in Dog for GFF MDI
[redacted]	1.21	0.19% 0.22% 0.20%	0.15 0.13 0.15	0.06% 0.06% 0.07%	NT	ND	FY09-087	14-Day in Dog for GFF MDI

次頁へ続く

Drug Product Batch No.	Assay (mg/canister)	Related Substances					Study Number	Type of Study
		Compound A[1]	Compound F[2]	Compound G[3]	Compound I[4]	Impurity 5[5]		
Proposed Specification	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]		
[redacted]	1.66	0.07% 0.08% 0.08%	0.19% 0.20% 0.20%	ND	NT	ND	FY10-129	3-Month in Dog for FF MDI
[redacted]	1.62	0.09% 0.09% 0.08%	0.23% 0.19% 0.17%	ND	NT	ND	FY10-129	3-Month in Dog for FF MDI
[redacted]	1.62	0.09% 0.09% 0.10%	0.14% 0.15% 0.14%	0.07% 0.07% 0.07%	NT	ND	FY10-129	3-Month in Dog for FF MDI
[redacted]	1.61	0.09% 0.09% 0.10%	0.18% 0.18% 0.18%	0.07% 0.07% 0.08%	NT	ND	FY10-129	3-Month in Dog for GFF MDI
[redacted]	1.64	0.12% 0.12% 0.12%	0.18% 0.16% 0.17%	0.09% 0.08% 0.08%	NT	ND	FY10-129	3-Month in Dog for GFF MDI
[redacted]	1.70	0.10% 0.10% 0.11%	0.17% 0.19% 0.18%	0.07% 0.08% 0.08%	NT	ND	FY10-129	3-Month in Dog for GFF MDI

ND = not detected; NMT = not more than; NT = not tested; RRT = relative retention time.

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

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

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

4 Compound I is (RS,SR)-(±)-N-[2-hydroxy-5-[1-hydroxy-2-[[2-(4-methoxyphenyl)-1-methylethyl]amino]ethyl]phenyl formamide, fumarate, dihydrate.

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

6 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.

表 5　　Toxicology: Drug Substance (Glycopyrrolate; inhalation aerosol)

Drug Product Batch No.	**Assay (mg/canister)**	**Related Substances**	**Study Number**	**Type of Study**
		Impurity J[1]		
Proposed Specification:	[redacted]	[redacted]		
[redacted]	0.064	NT	FY08-042A	Rat single dose inhalation
[redacted]	8.25	NT	FY08-042D	Rat single dose inhalation
[redacted] ([redacted])	3.25	NT	FY08-041A	Dog single dose inhalation
[redacted]	8.7	NT	FY08-041D	Dog single dose inhalation
[redacted]	6.64	ND	FY14-111	14-Day in Mouse for GP MDI
[redacted] ([redacted])	3.24	<0.05%	FY08-076	14-Day in Rat for GP MDI
[redacted] ([redacted])	3.25	<0.05%	FY08-076	14-Day in Rat for GP MDI
[redacted] ([redacted])	3.22	<0.05%	FY08-076	14-Day in Rat for GP MDI
[redacted] ([redacted])	4.79	ND	FY08-076	14-Day in Rat for GP MDI
[redacted] ([redacted])	4.61	ND	FY08-076	14-Day in Rat for GP MDI
[redacted]	8.53	ND	FY09-086	14-Day in Rat for GFF MDI
[redacted]	7.94	ND	FY09-086	14-Day in Rat for GFF MDI
[redacted] ([redacted])	4.96	ND	FY08-077	14-Day in Dog for GP MDI
[redacted] ([redacted])	4.91	ND	FY08-077	14-Day in Dog for GP MDI
[redacted] ([redacted])	4.85	ND	FY08-077	14-Day in Dog for GP MDI
[redacted]	7.94	ND	FY09-087	14-Day in Dog for GFF MDI
[redacted]	8.25	ND	FY09-087	14-Day in Dog for GFF MDI
[redacted]	8.37	ND	FY10-129	3-Month in Dog for GP MDI
[redacted]	8.21	ND	FY10-129	3-Month in Dog for GFF MDI
[redacted]	8.19	ND	FY10-129	3-Month in Dog for GFF MDI
[redacted]	8.23	ND	FY10-129	3-Month in Dog for GFF MDI
[redacted]	6.0	ND	FY10-120	6-Month in Rat for GP MDI
[redacted]	5.97	ND	FY10-120	6-Month in Rat for GP MDI
[redacted]	5.92	ND	FY10-120	6-Month in Rat for GP MDI

次頁へ続く

Drug Product Batch No.	Assay (mg/canister)	Related Substances	Study Number	Type of Study
		Impurity J[1]		
Proposed Specification:	[redacted]	[redacted]		
[redacted]	6.03	ND	FY10-120	6-Month in Rat for GP MDI
[redacted]	8.32	ND	FY12-073	6-Month in Dog for GP MDI
[redacted]	8.45	ND	FY12-073	6-Month in Dog for GP MDI
[redacted] (250 act.)	6.64	ND	FY14-128	104-Weeks in Mouse for GP MDI
[redacted] (250 act.)	6.55	ND	FY14-128	104-Weeks in Mouse for GP MDI
[redacted] (160 act.)	4.56	ND	FY14-128	104-Weeks in Mouse for GP MDI
[redacted] (250 act.)	8.40	ND	FY14-128	104-Weeks in Mouse for GP MDI
[redacted] (250 act.)	7.29	NT	FY14-128	104-Weeks in Mouse for GP MDI
[redacted] (250 act.)	7.38	NT	FY14-128	104-Weeks in Mouse for GP MDI
[redacted] (250 act.)	6.70	NT	FY14-128	104-Weeks in Mouse for GP MDI
[redacted] (250 act.)	8.58	ND	FY12-072	104-Weeks in Rat for GP MDI
[redacted] (160 act.)	5.78	ND	FY12-072	104-Weeks in Rat for GP MDI
[redacted] (160 act.)	4.56	ND	FY12-072	104-Weeks in Rat for GP MDI
[redacted] (250 act.)	6.55	ND	FY12-072	104-Weeks in Rat for GP MDI
[redacted] (250 act.)	8.45	ND	FY12-072	104-Weeks in Rat for GP MDI

NA = not applicable; NT = not tested; ND = not detected; NMT = not more than.

[1] Impurity J is Cyclopentylmandelic acid. Impurity J is controlled by the Ph. Eur. limit for unspecified impurities.

[2] 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.

表 6　　Toxicology: Drug Substance (Glycopyrrolate : micronized powder)

Drug Product Batch No.	Assay	Impurities					Study number	Type of study
		O[a]	G[b]	J[c]	Others	Total		
Proposed specification	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]		
[redacted]	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
[redacted]	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.
NMT = not more than;　ND = not detected;　DRF = dose range finding.

2.6.7.5 単回投与毒性試験

表 7　　Single Dose Toxicity Studies with FF 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 Mid 1 Male Mid 2 Male High Male Low Female Mid 1 Female Mid 2 Female High Female	20 16 25 **50**[2] 22 17 27 **53**	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 Mid Male High Male Low Female Mid Female High Female	5 9 **14** 5 Not included **14**	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.

表 8　Single Dose Toxicity Studies with GP MDI[4.2.3.1.3、4.2.3.1.4]

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 **1.01**[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 **0.155** Female **0.161**	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 FY08-042A and FY08-041A do not claim GLP compliance.

表 9　Single Dose Toxicity Studies with GFF MDI[4.2.3.1.5、4.2.3.1.6]

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 **327/66**[3] Low Female 132/26 Mid Female 214/42 High Female **354/72**	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 **78.0/15.2** Low Female 14.4/2.7 High Female **79.2/15.4** High Female (repeat)[2] 128.5/16.5	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.

2.6.7.6 反復投与毒性試験：重要な試験以外の試験

該当なし

2.6.7.7 反復投与毒性試験：重要な試験

2.6.7.7.1 ホルモテロール

表 10 14-Day Inhalation Toxicity Study in Rats with FF MDI[4.2.3.2.1]

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)		
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. 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.		

次頁へ続く

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)**	
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**
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
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 significant
2　ND: not determined
3　Some parameters were statistically changed compared with controls but all values were within historical limits

表 11 14-Day Inhalation Toxicity Study in Dogs with FF MDI[4.2.3.2.2]

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: [redacted] 20[redacted]	**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)		
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 vehicle 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.		

次頁へ続く

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** **Recovery**	**M: 4** **M: 3**	**F: 4** **F: 3**	**M: 4** **M: 3**	**F: 4** **F: 3**	**M: 4** **M: 0**	**F: 4** **F: 0**	**M: 4** **M: 0**	**F: 4** **F: 0**	**M: 4** **M: 3**	**F: 4** **F: 3**
Time Period: Min/day	45	45	45	45	15	15	30	30	45	45
TK at Day 14 **C_{max} (pg/mL)** **AUC_{last} (pg·h/mL)**	ND	ND	ND	ND	468.03 1648.71	468.83 807.27	798.78 2290.54	1212.94 2005.51	1184.69 3063.12	1168.66 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

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
Electrocardiograms	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

表 12 3-Month Inhalation Toxicity Study in Dogs with FF MDI[4.2.3.2.8]

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: [redacted] 20[redacted]	**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)		
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.		

次頁へ続く

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)**	
Number of Animals	**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

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)**	
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 Significant
[2] ND= Not Determined
[3] 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

2.6.7.7.2 グリコピロニウム

表 13 14-Day Inhalation Toxicity Study in Mice with GP MDI[4.2.3.2.3]

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)		
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).		

次頁へ続く

Daily Dose (µg/kg/day)	**Air Control**		**Vehicle Control**		**Low Dose** **320**	**340**	**Mid Dose** **620**	**660**	**High Dose** **1340**	**1420**
Number of Animals **Main** **Recovery**	**M: 20** **M: 10**	**F: 20** **F: 10**	**M: 20** **M: 10**	**F: 20** **F: 10**	**M: 20** **M: 10**	**F: 20** **F: 10**	**M: 20** **M: 10**	**F: 20** **F: 10**	**M: 20** **M: 10**	**F: 20** **F: 10**
Toxicokinetics:	Not conducted [a]									
<u>Noteworthy Findings</u>										
Died or Sacrificed Moribund [b]	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0
Body Weight Gain (g)										
Days -1-6 Days -1-13	-0.7 +0.6	-0.4 +0.8	-0.9 -1.1	-0.4 -0.5	-0.5 +0.7	-0.6 +0.7*	-1.6 -1.6	-0.5 -0.4	-4.2** -0.4	-1.8 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 Mild	 0 0	 0 0	 0 0	 0 0	 0 0	 0 0	 0 0	 0 0	 0 0	 1 1
Nose/Turbinate 2 Degeneration, hyaline: Respiratory epithelium Minimal Mild	 0 0	 0 0	 1 0	 0 0	 0 0	 0 1	 0 0	 0 1	 1 1	 2 2

次頁へ続く

Daily Dose (µg/kg/day)	**Air Control**		**Vehicle Control**		**Low Dose** **320**	**340**	**Mid Dose** **620**	**660**	**High Dose** **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:										
Olefactory 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:										
Noteworthy findings										
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/Turbinate 1										
Degeneration, hyaline:										
Respiratory epithelium										
Minimal	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Nose/Turbinate 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
Nose/Turbinate 1										
Degeneration, hyaline:										
Olefactory 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.

表 14　14-Day Inhalation Toxicity Study in Rats with GP MDI[4.2.3.2.4]

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: [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 (Maximum Feasible Dose) of 535 µg/kg/day (M 514 µg/kg/day, F 555 µg/kg/day)		
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. 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.		

次頁へ続く

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**	
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.

表 15 14-Day Inhalation Toxicity Study in Dogs with GP MDI[4.2.3.2.5]

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: [redacted] 20[redacted]	**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)		
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. 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.		

次頁へ続く

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)**	
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: 0**	**F: 0**	**M: 0**	**F: 0**	**M: 2**	**F: 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 measurments	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

表 16　3-Month Inhalation Toxicity Study in Dogs with GP MDI[4.2.3.2.8]

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: [redacted] 20[redacted]	**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

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 **C_{max} (pg/mL)** **AUC_{last} (pg·h/mL)**	ND		ND		5030 11500	7950 11300
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 Electrocardiograms	NS NS	NS NS	NS NS	NS NS	NS Heart rate↑	NS Heart rate↑

1 NS= Nothing Significant
2 ND= Not Determined
3 Some parameters were significantly changed compared with controls but all values were within historical values.

表 17　6-Month Inhalation Toxicity Study in Rats with GP MDI[4.2.3.2.9]

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)		

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.

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 I 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.

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.

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.

次頁へ続く

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)**	
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 Significant
[2] ND= Not Determined
[3] 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.

表 18　6-Month Inhalation Toxicity Study in Dogs with GP MDI[4.2.3.10]

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: [redacted] 20[redacted]	**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

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)**	
Number of Animals	**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

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)**	
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 Significant
[2] ND= Not Determined
[3] Some parameters were significantly changed compared with controls but all values were within historical values.
*: p-value ≤ 0.05 vs Vehicle Control

2.6.7.7.3 グリコピロニウム/ホルモテロール

表 19 14-Day Inhalation Toxicity Study in Rats with GFF MDI[4.2.3.2.6]

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: [redacted] 20[redacted]	**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)		
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. 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.		

次頁へ続く

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)**	
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**
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 Significant
2 ND= Not Determined
3 Some parameters were significantly changed compared with controls but all values were within historical values.

表 20 14-Day Inhalation Toxicity Study in Dogs with GFF MDI[4.2.3.2.7]

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)		
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 vehicle 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.		

次頁へ続く

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)**	
Number of Animals: Main : Recovery	**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**
Time Period: Min/day	30	30	30	30	10	10	20	20	30	30
TK (formoterol) at Day14	ND		ND							
C_{max} (pg/mL)					214.84	143.73	645.58	708.21	1037.46	1141.04
AUC_{last} (pg·h/mL)					1434.36	781.77	2211.71	2476.50	3633.39	4155.01
TK(glycopyrronium) at Day14	ND		ND							
C_{max} (pg/mL)					1120.88	634.21	4034.71	5851.91	11552.75	11082.58
AUC_{last} (pg·h/mL)					3377.44	1723.34	9025.38	8664.14	17046.45	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

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 Significant
[2] ND= Not Determined
[3] 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

表 21 3-Month Inhalation Toxicity Study in Dogs with GFF MDI[4.2.3.2.8]

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: [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: 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)		
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.		

次頁へ続く

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)**	
Number of Animals	**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 (formoterol) at Day90										
C_{max} (pg/mL)	ND		ND		434	253	765	1130	747	2000
AUC_{last} (pg·h/mL)					1650	1020	3440	2670	4610	4490
TK (glycopyrronium) at Day90										
C_{max} (pg/mL)	ND		ND		1910	1080	4020	11000	3670	8330
AUC_{last} (pg·h/mL)					3780	2340	12200	9430	10300	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

次頁へ続く

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)**	
Number of Animals	**M: 4**	**F: 4**	**M: 4**	**F: 4**	**M: 4**	**F: 4**	**M: 4**	**F: 4**	**M: 4**	**F: 4**
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										
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

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)**	
Number of Animals	**M: 4**	**F: 4**	**M: 4**	**F: 4**	**M: 4**	**F: 4**	**M: 4**	**F: 4**	**M: 4**	**F: 4**
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

2.6.7.8 *In Vitro* 遺伝毒性試験

表 22 Bacterial Reverse Mutation Assay with Glycopyrronium Bromide (Glycopyrrolate)[4.2.3.3.1.1]

<table>
<tr><td colspan="2">Report Title: Bacterial Reverse Mutation Assay</td><td>Study No. AD91RW.502ICH.BTL</td></tr>
<tr><td colspan="2">Strain: S. typhimurium TA98, TA100, TA1535, TA1537, and E. coli WP2 uvrA</td><td></td></tr>
<tr><td colspan="2">Metabolizing System: Aroclor induced rat liver S9</td><td>GLP Compliance: Yes</td></tr>
<tr><td>Vehicle: Sterile Water</td><td>For Test Article: Sterile Water</td><td>For Positive Controls: 2-aminoanthracene, 2-nitrofluorene, sodium azide, 9-aminoacridine, methyl methanesulfonate</td></tr>
<tr><td colspan="3">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</td></tr>
<tr><td colspan="3">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.</td></tr>
<tr><td colspan="3">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.</td></tr>
</table>

次頁へ続く

Metabolic activation	Test article	Dose level (µg/plate)	Mutagenicity Assay Revertant colony counts (Mean ± SD)				
			TA98	TA100	TA1535	TA1537	WP2*uvrA*
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				
	SA	1.0		561 ± 68	138 ± 25		
	9AAD	75				459 ± 185	
	MMS	1000					263 ± 45
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		78 ± 11		
	2AA	2.0		712 ± 96		50 ± 3	
	2AA	15					318 ± 17

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.

表 23　*In Vitro* Mammalian Cell Micronucleus Assay in TK6 Cells with Glycopyrronium Bromide (Glycopyrrolate)[4.2.3.3.1.2]

<table>
<tr><td colspan="3">Report Title: In Vitro Mammalian Cell Micronucleus Assay in TK6 Cells</td><td>Study No. AD91RW.361ICH.BTL</td></tr>
<tr><td colspan="4">Strain: TK6 cells</td></tr>
<tr><td colspan="3">Metabolizing System: Aroclor induced rat liver S9</td><td>GLP Compliance: Yes</td></tr>
<tr><td>Vehicle: Sterile Water</td><td>For Test Article: Sterile Water</td><td colspan="2">For Positive Control: mitomycin C, vinblastine, cyclophosphamide</td></tr>
<tr><td colspan="4">Treatment: Preliminary Toxicity Assay: 0.0398 to 398 µg/mL (1 mM)
Micronucleus assay: 50 to 398 µg/mL</td></tr>
<tr><td colspan="4">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.
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 in vitro mammalian cell micronucleus test using TK6 cells.</td></tr>
</table>

次頁へ続く

Metabolic activation	**Test article**	**Dose**	**PD[a]**	**Cytotoxicity[b] (% of control)**	**Percentage of MNMN[c] cells per total mononucleated cells counted**
27hr continuous treatment	Water	NA	1.7	0	0.55
	Glycopyrronium bromide	100 µg/mL	1.6	4	0.60
Without activation	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	Water	NA	1.8	0	0.50
	Glycopyrronium bromide	100 µg/mL	1.8	1	0.45
Without activation	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	Water	NA	1.7	0	0.45
	Glycopyrronium bromide	100 µg/mL	1.7	-2	0.50
With activation	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

2.6.7.9 *In Vivo* 遺伝毒性試験

表 24　　*In Vivo* Micronucleus Assay in Rats with Glycopyrronium Bromide (Glycopyrrolate)[4.2.3.3.2.1]

Report Title: *In Vivo* 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

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≤0.05 (Kastenbaum-Bowman Tables. Binominal distribution)
PCE: polychromatic erythrocyte; MnPCE: micronucleated polychromatic erythrocytes

2.6.7.10 がん原性試験

表 25 104-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 Mice		**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: [redacted] 20[redacted]	**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

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									
Noteworthy Findings										
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

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

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

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).

表 26　　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	**Duration of dosing:** 104 Weeks	**GLP compliance:** Yes
Initial age: 9-10 weeks	**Method of administration:** Inhalation nose-only	
Date of first dose: [redacted] 20[redacted]	**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

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

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**
Noteworthy findings:										
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

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

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										
Adenorma, 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

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

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).

2.6.7.11 生殖発生毒性試験：重要な試験以外の試験

表 27 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.	[redacted], USA	14-760

次頁へ続く

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 doses 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.	[redacted], 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/day on Gestation Day 6 and only the dose of 10 mg/kg/day was administered between Gestation Days 8-18.

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 28 Fertility and early embryonic development to implantation study of Glycopyrronium Bromide (Glycopyrrolate) in rats[4.2.3.5.1.1]

<table>
<tr><td colspan="2">Report Title: Subcutaneous Reproductive Toxicity Study (Segment I) of Glycopyrrolate in Rats</td><td>Study No. 14-764</td></tr>
<tr><td>Species / Strain: Rats / Sprague-Dawley</td><td>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).</td><td>Special Features: None</td></tr>
<tr><td>Initial Age: Males approx. 9 weeks, Female approx. 9 weeks</td><td>Day of mating: Gestation Day 0
Day of C-section: Gestation Day 13</td><td>GLP Compliance: Yes</td></tr>
<tr><td>Date of First Dose: [redacted] 20[redacted]</td><td colspan="2">Method of Administration: Subcutaneous injection</td></tr>
<tr><td colspan="3">Vehicle / Formulation: Sterile saline (0.9%) / Solution</td></tr>
<tr><td colspan="3">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</td></tr>
<tr><td colspan="3">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.</td></tr>
</table>

次頁へ続く

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)			
Day 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 x10^8)	11.38	11.34	10.40	10.01
% Normal morphology	95	Not assessed	Not assessed	90

次頁へ続く

Daily dose (mg/kg/day)	0 (Vehicle)	0.1	1	10
Females				
Toxicokinetics: 3 rats/group				
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)			
Day 0-14	30	-23.3	-53.3*	-66.7*
Gestation body weight gain (%) [c]	(g)			
Gestation Day 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)			
Gestation 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

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).

2.6.7.13 生殖発生毒性試験：胚・胎児発生に関する試験

表 29 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: [redacted] 20[redacted]	**Method of Administration:** Subcutaneous injection	
Vehicle / Formulation: Sterile saline / solution		
No Observed Adverse Effect Level: F_0 Females: 1 mg/kg/day, Fetuses: 1 mg/kg/day		
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. 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. 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.		

次頁へ続く

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** **Day 17**	 BQL BQL	 19.0 20.3	 211 220	 1190 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] Day 6-18	(g) 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] Day 13-15	(g/animal) 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

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).

表 30 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: [redacted] 20[redacted]	**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		
Conclusion: Maternal toxicity, as evidenced by reduced food consumption corollary reductions in body weight/body weight gain and scant feces 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		

次頁へ続く

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)			
Day 6-12	75	-21.3	-127	-381*
Day 6-18	187	0	-63.6	-152*
Day 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

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).

2.6.7.14 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 31 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: [redacted] 20[redacted]	**Method of Administration:** Subcutaneous injection	**Litter culled/not culled**: Culled
Vehicle / Formulation: Sterile saline/ 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)		
Conclusion: Overt maternal toxicity was seen in F_0 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 F_1-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 F_1 generation. Mating performance and fertility of the F_1-generation were similar for the offspring from the treated and control groups. Pre-weaning body weights and developmental landmarks for the F_2-generation were similar across groups and unaffected by treatment. Based on a comprehensive examination of all parameters, the no-observed-adverse effect level (NOAEL) for systemic exposure of the F_0 generation was 0.1 mg/kg/day based on reductions in food consumption, body weight and body weight gain seen at the higher doses. The NOAEL for reproductive toxicity of the F_0 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 F_1 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 F_1-generation) at 10 mg/kg/day.		

次頁へ続く

Daily dose (mg/kg/day)	**0 (Vehicle)**	**0.1**	**1**	**10**
F_0 females:	24	24	24	24
Toxicokinetics: (3 dams/group)				
C_{max} (ng/mL)　Post-natal Day 4		11.3	158	1610
Plasma levels in pups (ng/mL)		2.5	12.1	96.0
Number pregnant	24	22	24	24
Number died or sacrificed	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]	(g)			
Gestation Day 6-20	124	-0.8	-15.3*	-29.0*
Lactation body weight gain (%) [c]	(g)			
Post natal Day 0-21	22	+13.6	+63.6*	+95.5*
Gestation food consumption (%) [c]	(g/animal)			
Gestation Day 7	21	-9.5	-38.1*	-71.4*
Gestation Day 20	54	+3.7	-9.3*	-16.7*
Lactation food consumption (%) [c]	(g/animal)			
Post natal Day 21	530	+2.3	-2.8	-9.2*
Mean duration of gestation (days)	22	22	22	22
Abnormal parturition	-	-	-	-

次頁へ続く

Daily dose (mg/kg/day)	**0 (Vehicle)**	**0.1**	**1**	**10**
F_1 litters (pre-weaning):				
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 Day 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 Day 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	-	-	-	-
F_1 males (post-weaning):				
Number evaluated post-weaning	24	22	24	22
Number died or sacrificed moribund	0	0	0	0
Clinical observations	-	-	-	-
Necropsy observations	-	-	-	-
Body weight gain (g)				
Post natal Day 0-42	355	355	335	345
Food consumption (%) [c]	(g/animal)			
Post natal Day 7-14	221	+0.9	-5.4*	-1.4
Posta natal Day 28-35	252	+2.4	-2.4	-1.2

次頁へ続く

Daily dose (mg/kg/day)	0 (Vehicle)	0.1	1	10
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
F_1 female (post-weaning):				
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)				
Gestation Day 0-20	141	163*	149	157*
Pre-mating food consumption (%) [c]	(g/animal)			
Day 7-14	152	+1.3	+3.3	+1.3
Day 21-28	159	+3.8	+4.4	0
Gestation food consumption (%) [c]	(g/animal)			
Gestation Day 6-7	22	+13.6*	+4.5	+18.2*
Gestation 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

次頁へ続く

Daily dose (mg/kg/day)	0 (Vehicle)	0.1	1	10
Number of pregnant females	22	22	22	22
Mean duration of gestation (days)	22.0	21.9	22.0	22.0
Abnormal parturition	-	-	-	-
F_2 litters:				
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 % 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 F_0 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).

2.6.7.15　　新生児を用いた試験

該当せず

2.6.7.16　局所刺激性試験

該当せず

2.6.7.17　　その他の毒性試験

該当せず