バクスミー点鼻粉末剤 3mg

2.6.6　毒性試験の概要文

日本イーライリリー株式会社

目次

2.6.6　毒性試験の概要文 1
2.6.6.1　まとめ 1
2.6.6.2　単回投与毒性試験 4
2.6.6.2.1　点鼻グルカゴン 4
2.6.6.2.2　β-CD 4
2.6.6.2.3　DPC 4
2.6.6.3　反復投与毒性試験 4
2.6.6.3.1　点鼻グルカゴン 5
2.6.6.3.1.1　点鼻グルカゴンのラット 28 日間経鼻投与毒性及び 14 日間休薬性試験 5
2.6.6.3.1.2　イヌを用いた DPC の 5 日間反復経鼻投与毒性及び点鼻グルカゴンを単回投与後の粉末拡散試験 7
2.6.6.3.1.3　点鼻グルカゴンのイヌを用いた 28 日間経鼻投与毒性及び 14 日間回復性試験 8
2.6.6.3.2　β-CD 11
2.6.6.3.3　DPC 11
2.6.6.4　遺伝毒性試験 11
2.6.6.4.1　点鼻グルカゴン 11
2.6.6.4.2　β-CD 11
2.6.6.4.3　DPC 12
2.6.6.4.3.1　DPC の細菌を用いる復帰突然変異試験 12
2.6.6.4.3.2　DPC のほ乳類細胞を用いる染色体異常試験 12
2.6.6.4.3.3　DPC のラットを用いる小核試験 13
2.6.6.5　がん原性試験 14
2.6.6.5.1　点鼻グルカゴン 14
2.6.6.5.2　β-CD 14
2.6.6.5.3　DPC 14
2.6.6.6　生殖発生毒性試験 14
2.6.6.6.1　点鼻グルカゴン 14
2.6.6.6.2　β-CD 15
2.6.6.6.3　DPC 15
2.6.6.6.3.1　DPC の雌雄ラットを用いた受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験 15
2.6.6.6.3.2　DPC のラットを用いた胚・胎児発生に関する試験 16
2.6.6.6.3.3　DPC のウサギを用いた胚・胎児発生に関する試験 17
2.6.6.6.3.4　DPC のラットを用いた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 18
2.6.6.7　局所刺激性試験 19
2.6.6.7.1　点鼻グルカゴン 19
2.6.6.7.2　β-CD 20
2.6.6.7.3　DPC 20
2.6.6.8　その他の毒性試験 20
2.6.6.8.1　点鼻グルカゴン 20
2.6.6.8.1.1　点鼻グルカゴンの不純物の評価 20
2.6.6.8.1.1.1　非変異原性不純物：点鼻グルカゴン（強制劣化品）のラットを用いた 2 週間の不純物安全性確認試験 20
2.6.6.8.1.1.2　変異原性不純物 22
2.6.6.8.1.2　点鼻グルカゴンのウサギにおける眼刺激性試験 22
2.6.6.8.1.3　点鼻グルカゴンのラットにおける単回気管内噴霧投与試験 23
2.6.6.8.1.4　点鼻グルカゴンの光毒性 24
2.6.6.8.2　DPC 24

2.6.6.8.2.1 DPC の光毒性 24
2.6.6.9 考察及び結論 24
2.6.6.9.1 点鼻グルカゴン 24
2.6.6.9.2 β-CD 26
2.6.6.9.3 DPC 27
2.6.6.9.4 結論 28
2.6.6.10 図表 29
2.6.6.11 参考文献 29

2.6.6　毒性試験の概要文

点鼻グルカゴン（別称：LY900018 又は AMG504-1）は、低血糖時の救急処置を目的とした新規のグルカゴン製剤である。有効成分はヒトグルカゴンと配列が同一の合成グルカゴンで、3 mg の合成グルカゴンに加え、ドデシルホスホコリン（dodecylphosphocholine：DPC）及びβ-シクロデキストリン（beta-cyclodextrin：β-CD）を[redacted](w/w/w）の比率で含有する粉末を点鼻容器に充填した経鼻投与用の製剤で、投与時にそのまま使用できる単回使用、使い捨ての製剤である。点鼻グルカゴンの有効成分である合成グルカゴンは、既承認医薬品であるグルカゴン注射用 1 単位「イトウ」の有効成分と同等と考えられることから、今回、新投与経路医薬品として承認申請を行う。また、β-CD 及び DPC は日本において新規の添加物に該当する。

2.6.6.1　まとめ

点鼻グルカゴンは、糖尿病患者における低血糖時の救急処置を目的として単回使用される新規のグルカゴン製剤である。これを踏まえ、新投与経路（経鼻投与）としての点鼻グルカゴン、並びに新添加剤（β-CD 及び DPC）について、一連の非臨床評価を実施した。

点鼻グルカゴンを用いた毒性試験として、ラット及びイヌの 28 日間反復経鼻投与試験を実施した。点鼻グルカゴンは臨床で単回使用される薬剤であることから、さらなる長期の反復投与毒性試験並びにがん原性試験は実施しなかった［ICH M3 (R2)、ICH S1A］。グルカゴンはペプチドであるため、遺伝毒性試験は実施しなかった［ICH S6 (R1)］。生殖発生毒性試験については、合成グルカゴンのアミノ酸配列が、遺伝子組換えグルカゴン及びヒト、ウシ、ブタ、ラット及びイヌの膵グルカゴンと同一であり、これらのグルカゴンについて静脈内投与による生殖発生毒性試験成績が公表されていること、点鼻グルカゴンを経鼻投与した時の曝露量が、同じ用量のグルカゴンを静脈内投与した時の曝露量を超えないと考えられることから、点鼻グルカゴンの生殖発生毒性試験は実施しなかった。点鼻グルカゴンを用いたその他の試験として、イヌに単回経鼻投与後の粉末拡散試験、ラットを用いた 2 週間の不純物安全性確認試験、ウサギを用いた眼刺激性試験及びラット単回気管内噴霧試験を実施した。

β-CD は、長年にわたり食品添加物及び医薬品添加剤として世界的に広く使用されている（Stella and He 2008）。日本では経口製剤の医薬品添加剤として使用前例があるほか、食品添加物公定書の既存添加物リストに収載されており、経口投与での全身毒性の評価は十分になされている。また、特定の製剤や特定の条件下においてのみ使用が認められた添加物の事例として、パッチテストパネル（投与経路：その他の外用）の添加剤として使用が認められているものの、点鼻剤としての使用前例はない。β-CD を経鼻投与した時の影響については、ラット及びイヌを用いた 28 日間経鼻投与毒性試験におけるプラセボ対照の構成成分のひとつとして、また、安全性薬理試験（呼吸系及び中枢神経系）の対照群として評価した。さらに、β-CD の公表情報からも安全性を考察した。

DPC は[redacted]剤／[redacted]剤である（Liu et al. 1999）。DPC を経鼻投与した時の影響については、ラット及びイヌを用いた 28 日間経鼻投与毒性試験におけるプラセボ対照の構成成分のひとつとして評価した。また、イヌに DPC を 5 日間反復経鼻投与したときの安全性を評価した。さらに、一連の安全性薬理試験（CTD 第 2.6.2.4 項）、遺伝毒性試験及び生殖発生毒性試験を実施した。

主な毒性試験及び TK 試験は、医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準（Good Laboratory Practice：GLP）規制に従い実施した。なお、ラット及びイヌ 28 日間反復投与毒性試験の一部（血清中薬物濃度測定及び TK 解析）は、規制当局による GLP 査察経験のない施設で実施されたが、試験責任者の陳述書及び及び信頼性保証部門による信頼性保証陳述書が作成されている。したがって、試験の信頼性や安全性の評価に影響はないと判断した。

点鼻グルカゴン及び DPC の主な毒性試験一覧を表 2.6.6-1 に示す。

表 2.6.6-1 主な毒性試験一覧

試験の種類	投与経路	投与化合物
反復投与毒性試験		
ラット 28 日間反復投与毒性試験 [a]	経鼻	点鼻グルカゴン、 プラセボ（DPC＋β-CD）
イヌ 5 日間反復投与（DPC）、 単回投与粉末拡散試験（点鼻グルカゴン）[b]	経鼻	点鼻グルカゴン（色素含有）、 DPC
イヌ 28 日間反復投与毒性試験 [a]	経鼻	点鼻グルカゴン、 プラセボ（DPC＋β-CD）
遺伝毒性試験		
細菌を用いる復帰突然変異試験	In Vitro	DPC
ヒト末梢血リンパ球染色体異常試験	In Vitro	DPC
ラット小核試験	静脈内	DPC
生殖発生毒性試験		
ラット受胎能及び着床までの初期胚発生試験	静脈内	DPC
ラット胚・胎児発生試験	静脈内	DPC
ウサギ 胚・胎児発生試験	静脈内	DPC
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	静脈内	DPC
その他の毒性試験		
ラット 2 週間不純物安全性確認試験	経鼻	点鼻グルカゴン（強制劣化品）、 プラセボ（DPC＋β-CD）
ウサギ単回眼刺激性試験	点眼	点鼻グルカゴン
ラット単回気管内噴霧試験	気管内噴霧	点鼻グルカゴン

略語：β-CD＝β-シクロデキストリン、DPC＝ドデシルホスホコリン、GLP＝医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施基準、ICH＝医薬品規制調和国際会議
注：特に記載しない限り、試験はすべて関連する ICH ガイドライン及び GLP に従い実施した。
[a] 血清中薬物濃度測定及び TK 解析については、規制当局による GLP 査察経験のない施設にて実施
[b] GLP 非適用

主な所見及び結論を以下に示す。

点鼻グルカゴン（グルカゴン＋β-CD＋DPC）

- 点鼻グルカゴンをラット（グルカゴンとして 0.2 mg/匹/日までの用量）及びイヌ（グルカゴンとして 4 mg/匹/日までの用量）に 1 日 1 回、28 日間経鼻投与した後 14 日間の休薬期間を設ける試験を実施した。

- 忍容性は良好であった。
- ラットでは 0.2 mg グルカゴン/匹/日、イヌでは 2 及び 4 mg グルカゴン/匹/日の用量で、鼻腔嗅上皮に可逆的かつ軽度から中等度の局所の組織変化（萎縮／変性等）が生じた。添加剤のみを含むプラセボ対照投与群における局所の組織変化は軽微であったため、この組織変化を主に生じた物質はグルカゴンであることが示唆された。
- 全身性の標的器官毒性は認められず、全身性の標的器官毒性に関する無毒性量（no-observed-adverse-effect level：NOAEL）はラットで 0.2 mg グルカゴン/匹/日、イヌで 4 mg グルカゴン/匹/日であった。このときの血清中濃度－時間曲線下面積（AUC）に基づくグルカゴンの曝露量比は、ヒトに治療用量（3 mg）の点鼻グルカゴンを投与時の AUC のそれぞれ 5.8 倍及び 39 倍であった。β-CD ではヒトの 31 倍（ラット）及び[redacted]倍（イヌ）（鼻腔表面積換算用量での比較：表 2.6.6-22）、DPC ではヒトの 36 倍（ラット）及び 177 倍（イヌ）（AUC での比較：表 2.6.6-23）となる用量を投与したが、全身性の標的器官毒性は生じなかった。

- 青色色素を添加した点鼻グルカゴン（製剤として 20 mg）をイヌに単回経鼻投与した試験において、色素は鼻道、鼻咽頭、胃、食道及び舌に分布拡散したが、喉頭及び気管には見られなかった。したがって、点鼻グルカゴンは肺に分布しなかったことが示唆された。局所の変化として軽微な炎症が見られたが、イヌを用いた 28 日間試験で認められた嗅上皮の萎縮／変性はなかった。
- 点鼻グルカゴン 0.5 mg をラットに単回気管内噴霧したときの忍容性は良好であった。投与翌日及び 14 日間の休薬期間翌日の剖検及び病理組織学的検査において点鼻グルカゴンに関連する異常所見はなかった。
- 点鼻グルカゴン[redacted]mg をウサギに点鼻容器を用いて単回点眼したときの忍容性は良好であり、軽微な眼刺激性として結膜及び瞬膜に限局したごく軽度の発赤及び浮腫が見られたのみであった。

β-CD + DPC

- β-CD 及び DPC を含むプラセボ対照粉末を 1 日 1 回、28 日間経鼻投与したところ、ラット（DPC 0.3 mg + β-CD 1.7 mg/匹/日）の嗅上皮に変化は見られず、イヌ（DPC 6 mg + β-CD 34 mg/匹/日）の嗅上皮には軽微な変化のみが見られた。

DPC

- DPC をイヌに 10 mg/匹/日までの用量で 5 日間連続経鼻投与したときの忍容性は良好であり、一般状態における毒性徴候及び剖検所見はなかった。病理組織学的検査では、鼻腔に軽微な炎症及び好塩基性物質の軽度な蓄積が見られたが、嗅上皮の萎縮／変性は見られなかった。
- DPC は、細菌を用いる復帰突然変異試験（最高用量：5000 μg/plate、代謝活性化系存在下／非存在下）、哺乳類細胞を用いる染色体異常試験（最高用量：3515 μg/mL、代謝活性化系存在下／非存在下）及びラット小核試験（最高用量：40 mg/kg/日）において遺伝毒性を示さなかった。
- ラットを用いた DPC の受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験において、DPC を 3 mg/kg/日までの用量で交配前から交配期間を経て着床まで 1 日 1 回静脈内投与しても、雌雄の生殖能及び初期胚発生に毒性変化はなかった。

- ラット及びウサギを用いた DPC の胚・胎児発生に関する試験で、DPC をそれぞれ 2.5 及び 1 mg/kg/日までの用量で器官形成期にわたり 1 日 1 回静脈内投与しても、母動物及び胚・胎児に毒性変化はなかった。
- ラットを用いた DPC の出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験で、DPC を 1 mg/kg/日までの用量で雌ラットに妊娠 6 日から分娩後 20 日まで 1 日 1 回静脈内投与しても、母動物（F_0）の一般毒性及び生殖並びに出生児（F_1）の成長、行動及び生殖に対する毒性作用はなかった。
- DPC は、その光化学的特性に基づくと光毒性を示さないと考えられた。

2.6.6.2　単回投与毒性試験

2.6.6.2.1　点鼻グルカゴン

点鼻グルカゴンを用いた単回投与毒性試験は実施していない。

ラット及びイヌを用いた 28 日間反復経鼻投与毒性試験の初回投与時の成績に基づくと、点鼻グルカゴンを経鼻投与時のグルカゴンとしての概略の致死量は、ラットで>0.2 mg/匹、イヌで>4 mg/匹であった［CTD 第 2.6.6.3.1.1 項、報告書 75263-AMG015G Amendment 01 (4.2.3.2.1)；CTD 第 2.6.6.3.1.3 項、報告書 65125-AMG014G Amendment 01 (4.2.3.2.3)］。

2.6.6.2.2　β-CD

β-CD の単回投与毒性試験は実施していない。

ラット及びイヌを用いた 28 日間反復経鼻投与毒性試験の初回投与時の成績に基づくと、点鼻グルカゴンを経鼻投与時のβ-CD としての概略の致死量は、ラットで>1.7 mg/匹、イヌで>34 mg/匹であった［CTD 第 2.6.6.3.1.1 項、報告書 75263-AMG015G Amendment 01 (4.2.3.2.1)；CTD 第 2.6.6.3.1.3 項、報告書 65125-AMG014G Amendment 01 (4.2.3.2.3)］。

2.6.6.2.3　DPC

DPC の単回投与毒性試験は実施していない。

ラットを用いた静脈内投与受胎能試験の初回投与時の成績に基づくと、ラットに DPC を静脈内投与したときの概略の致死量は>3 mg/kg であった［報告書 1013-0531-AMG022-DPC (4.2.3.5.1.1)、CTD 第 2.6.6.3.1 項］ウサギを用いた胚・胎児発生に関する静脈内投与試験の初回投与時の成績に基づくと、ウサギに DPC を静脈内投与したときの概略の致死量は>1 mg/kg であった［報告書 1013-0574-AMG026G-DPC (4.2.3.5.2.8)、CTD 第 2.6.6.6.3.3 項］。イヌを用いた DPC の 5 日間経鼻投与毒性及び点鼻グルカゴンの単回投与分布試験の初回投与時の成績に基づくと、イヌに DPC を経鼻投与したときの概略の致死量は>5 mg/匹であった［報告書 65114-AMG011 (4.2.3.2.2)、CTD 第 2.6.6.3.1.2 項］。

2.6.6.3　反復投与毒性試験

点鼻グルカゴンについて、ラット及びイヌを用いた 28 日間反復経鼻投与毒性試験を実施した。また、イヌに DPC を 5 日間経鼻投与及び青色トレーサー含有点鼻グルカゴンを単回経鼻投与する試験を実施した。なお、臨床用の点鼻容器はラットには大きすぎて使用できないこと、また、

点鼻グルカゴンは鼻道及び鼻咽頭への送達を意図した製剤であるため、吸入などの代替経路を用いる毒性試験は適切ではないことから、ラットの試験では、点鼻グルカゴンを 100 mM 酢酸に溶解し、液体としてマイクロピペットを用いて経鼻投与した。イヌの試験では、点鼻容器を用いて経鼻投与した。

2.6.6.3.1　点鼻グルカゴン

2.6.6.3.1.1　点鼻グルカゴンのラット 28 日間経鼻投与毒性及び 14 日間休薬性試験

報告書 75263-AMG015G Amendment 01 (4.2.3.2.1)、概要表 2.6.7.7A

Sprague Dawley ラットに点鼻グルカゴン溶液（点鼻グルカゴンを 100 mM 酢酸に溶解：グルカゴン及び添加剤として DPC 及びβ-CD を含有）を 1 日 1 回、28 日間経鼻投与したときの毒性及びトキシコキネティクス、並びに 14 日間の休薬期間後における回復性を評価した（GLP 適用）。対照群として、プラセボ対照（点鼻グルカゴンの高用量群と同程度の用量の DPC 及びβ-CD を含む）及びリン酸緩衝生理食塩液を投与する群を設定した。生死、一般状態観察、体重、摂餌量、眼科学的検査、血液学的検査、血液生化学的検査、尿検査、器官重量、剖検及び病理組織学的検査のデータに基づき毒性を評価した。

試験デザインを表 2.6.6-2 に示す。

表 2.6.6-2　点鼻グルカゴンのラット 28 日間経鼻投与試験のデザイン
（75263-AMG015G Amendment 01 試験）

群番号	投与群	グルカゴンとしての投与量 (mg/匹/日)	主試験		回復性試験		TK	
			雄	雌	雄	雌	雄	雌
1	プラセボ対照 [a]	0	10	10	5	5	6	6
2	リン酸緩衝生理食塩液 [b]	0	10	10	–	–	3	3
3	点鼻グルカゴン [c]	0.1	10	10	–	–	6	6
4	点鼻グルカゴン [d]	0.2	10	10	5	5	6	6

略語：- = 該当なし、β-CD = β-シクロデキストリン、DPC = ドデシルホスホコリン、TK = トキシコキネティクス

[a] プラセボ対照粉末［DPC 0.3 mg + β-CD 1.7 mg/匹/日（15% DPC + 85% β-CD）］を 100 mM 酢酸に溶解し、16 µL/鼻腔/日（32 µL/匹/日）の液量で両鼻腔に投与した。

[b] リン酸緩衝生理食塩液を 16 µL/鼻腔/日（32 µL/匹/日）の液量で両鼻腔に投与した。

[c] グルカゴン 0.1 mg + DPC[redacted]mg + β-CD[redacted]mg /匹/日を 100 mM 酢酸に溶解し、8 µL/鼻腔/日（16 µL/匹/日）の液量で両鼻腔に投与した。

[d] グルカゴン 0.2 mg + DPC[redacted]mg + β-CD[redacted]mg /匹/日を 100 mM 酢酸に溶解し、16 µL/鼻腔/日（32 µL/匹/日）の液量で両鼻腔に投与した。

グルカゴンの投与量は、ヒトで想定される曝露量を十分上回る用量を設定した。治療用量と比較したラットの用量比は、体重換算用量に基づくと 16～448 倍（表 2.6.6-3）、鼻腔表面積換算用量に基づくと 1～29 倍（表 2.6.6-4）であった。さらに、0.2 mg グルカゴン/匹/日は、鼻に投与可能な量及び溶解性を考慮すると、投与可能な最大量であった。

表 2.6.6-3　グルカゴンの安全域：点鼻グルカゴンのラット 28 日間経鼻投与毒性試験と治療用量の比較（体重換算用量）

種 グルカゴン投与量	グルカゴンの投与量 (mg/kg)	投与回数	グルカゴンの用量比 [a]	
			単回投与	28 回投与
ヒト				
3 mg[b]	0.05	1	–	
ラット 28 日間試験				
0.2 mg/匹/日 [c]	0.8	28	16 倍	448 倍
0.1 mg/匹/日 [c]	0.4	28	8 倍	224 倍

[a] 用量比 = 動物へのグルカゴン投与量（mg/kg）/ヒトへのグルカゴン投与量（mg/kg）
[b] ヒト体重を 60 kg とする。
[c] ラット体重を 0.25 kg とする。

表 2.6.6-4　グルカゴンの安全域：点鼻グルカゴンのラット 28 日間経鼻投与毒性試験と治療用量の比較（鼻腔表面積換算用量に基づく）

種 グルカゴン投与量	グルカゴンの投与量 (mg/cm^2)	投与回数	グルカゴンの用量比 [a]	
			単回投与	28 回投与
ヒト				
3 mg[b]	0.0138	1	–	
ラット 28 日間試験				
0.2 mg/匹/日 [c]	0.0143	28	1.03 倍	28.9 倍
0.1 mg/匹/日 [c]	0.0071	28	0.517 倍	14.5 倍

[a] 用量比 = 動物のグルカゴン投与量（鼻腔表面積換算用量）÷ヒトのグルカゴン投与量（鼻腔表面積換算用量）
[b] ヒトの鼻腔表面積を 209 cm^2 と仮定［Ménache らが提唱する計算式（Ménache et al. 1997）に基づき、体重 60 kg として算出］
[c] 体重 0.25 kg の Sprague Dawley ラットの鼻腔表面積 = 14 cm^2（Ménache et al. 1997）

トキシコキネティクスデータは CTD 第 2.6.4.3.2.1.1 項に示す。ヒトに治療用量を投与時のグルカゴン曝露量（AUC）と比較したラットの曝露量比は、4.2～5.8 倍であった（表 2.6.6-21）。

忍容性は良好であった。点鼻グルカゴン、DPC またはβ-CD 投与に関連すると考えられる死亡はなかった。プラセボ対照群で試験期間中に 2 匹が死亡した（13 日目及び 15 日目の投与後にそれぞれ死亡を発見）。1 例は死亡前に一般状態所見が認められず、剖検において身体外傷に起因する死亡の可能性が高いことが明らかとなったことから、プラセボ対照液の投与に関連しない可能性が高いと判断した。別の 1 例については剖検所見が見られず、TK 用動物であったため病理組織学的検査は実施しなかったが、この死亡例を含むいずれの動物にも一般状態に毒性所見がなかったことから、本死亡はプラセボ対照液の投与とは関連しないと考えられた。一般状態観察、体重、摂餌量、眼科学的検査及び臨床検査において、点鼻グルカゴン、DPC 及びβ-CD による毒性所見は見られなかった。

いずれの群においても全身性の標的器官毒性は見られなかった。鼻腔局所における組織変化が高用量（0.2 mg グルカゴン/匹/日、表 2.6.6-5）で見られた。この群では、雄 2/10 匹及び雌 3/10 匹

で片側又は両側の嗅上皮に軽度から中等度のびらん／潰瘍が発現し、しばしば背側鼻甲介の粘膜固有層に軽微または軽度の急性から亜急性炎症を伴っていた。鼻腔の所見は 14 日間の休薬期間後には消失した。プラセボ対照、リン酸緩衝生理食塩液対照及び 0.1 mg グルカゴン/匹/日群では鼻腔に組織変化は認められなかった。全身性の標的器官毒性に関する NOAEL は 0.2 mg グルカゴン/匹/日（ヒトにグルカゴン 3 mg を経鼻投与したときの AUC の 5.8 倍、表 2.6.6-21）と判断した。

表 2.6.6-5　点鼻グルカゴンのラット 28 日間経鼻投与試験における鼻腔（背側鼻甲介）で見られた病理組織学的所見（投与期間終了時）

性別		雄				雌			
グルカゴンの投与量（mg/匹/日）		0[a]	0[b]	0.1[c]	0.2[d]	0[a]	0[b]	0.1[c]	0.2[d]
評価動物数		9	10	10	10	10	10	10	10
所見	重症度								
びらん／潰瘍–嗅上皮	計	0	0	0	2	0	0	0	3
	軽度	0	0	0	1	0	0	0	1
	中等度	0	0	0	1	0	0	0	2
炎症–粘膜固有層–背側鼻甲介の嗅上皮	計	0	0	0	2	0	0	0	2
	軽微	0	0	0	1	0	0	0	0
	軽度	0	0	0	1	0	0	0	2

略語：β-CD＝β-シクロデキストリン、DPC＝ドデシルホスホコリン
a　プラセボ対照粉末［DPC 0.3 mg＋β-CD 1.7 mg/匹/日（15% DPC＋85% β-CD）］を 100 mM 酢酸に溶解。
b　リン酸緩衝生理食塩液
c　グルカゴン 0.1 mg＋DPC[redacted]mg＋β-CD[redacted]mg/匹/日
d　グルカゴン 0.2 mg＋DPC[redacted]mg＋β-CD[redacted]mg/匹/日

以上、ラットに 0.2 mg グルカゴン/匹/日（点鼻グルカゴンを 100 mM 酢酸に溶解）を点鼻投与したところ、鼻腔内の局所に軽微から軽度の組織変化が見られた。プラセボ対照液［プラセボ対照粉末（15% DPC + 85% β-CD）を 100 mM 酢酸に溶解］、リン酸緩衝生理食塩液及び 0.1 mg グルカゴン/匹/日（点鼻グルカゴンを 100 mM 酢酸に溶解）の投与群では、同様の所見は認められなかった。したがって、点鼻グルカゴン中の主な鼻刺激性物質はグルカゴンと考えられた。いずれの群においても全身性の標的器官毒性は認められなかった。

2.6.6.3.1.2　イヌを用いた DPC の 5 日間反復経鼻投与毒性及び点鼻グルカゴンを単回投与後の粉末拡散試験

報告書 65114-AMG011 (4.2.3.2.2)、概要表 2.6.7.7B

雄ビーグル犬（2 匹）に DPC を 5 日間反復経鼻投与したときの安全性、及び、点鼻グルカゴンを単回経鼻投与後のイヌ呼吸器及び消化器における粉末の拡散を評価した。1 匹には DPC 粉末を 4 mg の用量で、別の 1 匹には DPC 粉末を 10 mg の用量で、左鼻腔に 1 日 1 回、5 日間経鼻投与した。5 日目、DPC 最終投与から 2 時間以上後に、青色色素含有点鼻グルカゴンを、右鼻腔に単回経鼻投与した。1 匹は投与 1 分後に、もう 1 匹は 5 分後に安楽死させ、青色色素の分布を確認した。

試験デザインを表 2.6.6-6 に示す。

表 2.6.6-6　イヌを用いた DPC の 5 日間反復経鼻投与毒性及び点鼻グルカゴンの単回投与試験のデザイン（65114-AMG011 試験）

動物番号	1～5 日目		5 日目	
	被験物質	DPC の投与量 (mg/匹/日)	被験物質	点鼻グルカゴンの投与量 [a] (mg/匹)
1001 [b]	DPC 粉末	4	青色色素含有点鼻グルカゴン	20
1002 [b]		10		

略語：β-CD = β-シクロデキストリン、DPC = ドデシルホスホコリン
[a] グルカゴン 2 mg + DPC[redacted]mg + β-CD[redacted]mg/匹/日
[b] 動物番号 1001 及び 1002 は、それぞれ 5 日目の投与後 1 分及び 5 分に安楽死させた。

生死、一般状態観察、剖検及び病理組織学的検査［鼻道、鼻咽頭、食道（1 例については舌根頭も実施）］を実施した。

イヌに DPC を 5 日間反復経鼻投与及び 5 日目に点鼻グルカゴンを単回投与したときの忍容性は良好であり、一般状態において毒性徴候は見られず、剖検時にも変化は見られなかった。病理組織学的検査では、両個体の鼻腔に軽微な炎症及び好塩基性物質の軽度な蓄積が見られたが、イヌを用いた 28 日間経鼻投与毒性試験［報告書 65125-AMG014G Amendment 01 (4.2.3.2.3)、CTD 第 2.6.6.3.1.3 項］で認められたような嗅上皮の萎縮／変性は、本試験では見られなかった。左鼻腔（DPC を 5 日間投与）と右鼻腔（青色色素含有点鼻グルカゴンを単回投与）で所見に差はなかった。これらは偶発的な所見の可能性が考えられたが、対照群を設けなかったことから DPC との関連性の有無を明確に結論づけることができなかった。

呼吸器及び胃腸管における青色色素の拡散に関しては、2 匹のいずれにおいても鼻道、鼻咽頭及び胃に色素が見られ、うち一例では食道及び舌にも見られたが、喉頭及び気管に色素は見られなかった。したがって、点鼻グルカゴンは肺に拡散しないことが示された。

2.6.6.3.1.3　点鼻グルカゴンのイヌを用いた 28 日間経鼻投与毒性及び 14 日間回復性試験

報告書 65125-AMG014G Amendment 01 (4.2.3.2.3)、概要表 2.6.7.7C

ビーグル犬に点鼻グルカゴン（グルカゴン及び添加剤として DPC 及びβ-CD を含有）を 1 日 1 回、28 日間経鼻投与したときの毒性及びトキシコキネティクス、並びに 14 日間の休薬期間後における回復性を評価した（GLP 適用）。

試験デザインを表 2.6.6-7 に示す。

表 2.6.6-7　点鼻グルカゴンのイヌを用いた 28 日間経鼻投与毒性試験のデザイン
（65125-AMG014G Amendment 01 試験）

群番号	投与群	グルカゴン投与量 (mg/匹/日)	投与量/日	毒性試験			
				主試験		回復性試験	
				雄	雌	雄	雌
1	プラセボ対照（粉末）[a]	0	40 mg[e]	3	3	2	2
2	生理食塩液[b]	0	20 µL	3	3	–	–
3	点鼻グルカゴン[c]	2	20 mg	3	3	–	–
4	点鼻グルカゴン[d]	4	40 mg[e]	3	3	2	2

略語：β-CD＝β-シクロデキストリン、DPC＝ドデシルホスホコリン
[a] DPC 6 mg + β-CD 34 mg/匹/日（15% DPC + 85% β-CD）
[b] 生理食塩液
[c] グルカゴン 2 mg + DPC[redacted]mg + β-CD[redacted]mg/匹/日
[d] グルカゴン 4 mg + DPC 4 mg + β-CD 32 mg/匹/日
[e] 20 mg の点鼻グルカゴン又はプラセボ対照（DPC + β-CD）が充てんされた容器を、片鼻腔に 1 個ずつ（計 2 個、40 mg）を用いて、1 日 1 回投与した。

対照群として、プラセボ対照（点鼻グルカゴンの高用量群と同程度の用量の DPC 及びβ-CD を含む粉末）及び生理食塩液を投与する群を設定した。プラセボ対照及び点鼻グルカゴンの投与には点鼻容器を用いた。生死、一般状態観察、体重、体重変化量、摂餌量、心電図（ECG）、眼科学的検査、血液学的検査、血液生化学的検査、尿検査、器官重量、剖検及び病理組織学的検査のデータに基づき毒性を評価した。

グルカゴンは、ヒトで予想される曝露量を十分上回る用量を設定した。点鼻容器には 20 mg の点鼻グルカゴンが充てんされており、両鼻腔にそれぞれ 1 回投与を想定した場合、個体あたりの投与可能な最高用量は 40 mg/匹（計 2 個の点鼻容器を使用）となる。治療用量と比較したイヌの用量比は、体重換算用量に基づくと 8～224 倍（表 2.6.6-8）、鼻腔表面積換算用量に基づくと 1～25 倍であった（表 2.6.6-9）。

表 2.6.6-8　グルカゴンの安全域：点鼻グルカゴンのイヌ 28 日間反復経鼻投与毒性試験と治療用量の比較（体重換算用量）

種 グルカゴン投与量	グルカゴン投与量 (mg/kg)	投与回数	グルカゴンの用量比[a]	
			単回投与	28 回投与
ヒト				
3 mg[b]	0.05	1	–	
イヌ 28 日間試験				
4 mg/匹/日[c]	0.4	28	8 倍	224 倍
2 mg/匹/日[c]	0.2	28	4 倍	112 倍

[a] 用量比＝動物へのグルカゴン投与量（mg/kg）÷ヒトへのグルカゴン投与量（mg/kg）
[b] ヒト体重を 60 kg とする。
[c] イヌ体重を 10 kg とする。

表 2.6.6-9　グルカゴンの安全域：点鼻グルカゴンのイヌ 28 日間反復経鼻投与毒性試験と治療用量の比較（鼻腔表面積換算用量に基づく）

種 グルカゴン投与量	グルカゴン投与量 (mg/cm²)	投与回数	グルカゴンの用量比 [a]	
			単回投与	28 回投与
ヒト				
3 mg[b]	0.0138	1	–	
イヌ 28 日間試験				
4 mg/日 [c]	0.0122	28	0.879 倍	24.6 倍
2 mg/日 [c]	0.0061	28	0.440 倍	12.3 倍

a　用量比＝動物へのグルカゴン投与量（mg/cm²）÷ヒトへのグルカゴン投与量（mg/cm²）
b　ヒトの鼻腔表面積を 209 cm² と仮定［Ménache らが提唱する計算式（Ménache et al. 1997、Table5）に基づき、体重 60 kg として算出］。
c　体重 10 kg のビーグル犬の鼻腔表面積 = 329 cm²（Ménache et al. 1997）

トキシコキネティクスデータは CTD 第 2.6.4.3.2.1.2 項に示す。ヒトに治療用量を投与時のグルカゴン曝露量（AUC）と比較したイヌの曝露量比は、28～39 倍であった（表 2.6.6-21）。

一般状態において投与に関連する毒性徴候はなかった。経鼻投与直後に多くのイヌで一過性の流涎及びくしゃみが発現したが、イヌの全体的な健康状態に影響はなかったため毒性ではないと判断した。生死、体重、摂餌量、眼科学的検査、臨床検査及び心電図データにおいて、点鼻グルカゴン、DPC 及びβ-CD による影響は見られなかった。

ラットと同様、所見は鼻腔への局所作用のみであり（表 2.6.6-10）、全身性の標的器官毒性は見られなかった。鼻腔の所見として、軽微から中等度の嗅上皮萎縮／変性が認められ、一部の個体では亜急性の炎症を伴っていたが、プラセボ対照群、生理食塩液群、2 mg グルカゴン/匹/日群及び 4 mg グルカゴン/匹/日群でそれぞれ 2/6 匹、0/6 匹、6/6 匹及び 6/6 匹に発現した。プラセボ対照群の鼻腔における局所の組織変化は軽微で発現頻度は低く、グルカゴンの投与及び用量増加に伴い鼻腔局所の変化の発現頻度及び重症度が増加した。鼻腔の所見は 14 日間の休薬期間後には消失した。全身性の標的器官毒性に関する NOAEL は 4 mg グルカゴン/匹/日（ヒトにグルカゴンとして 3 mg の用量で経鼻投与したときの AUC の 39 倍、表 2.6.6-21）と判断した。

表 2.6.6-10　点鼻グルカゴンのイヌ 28 日間反復経鼻投与毒性試験における鼻腔で見られた病理組織学的所見（投与期間終了時）

性別		**雄**				**雌**			
グルカゴンの投与量（mg/匹/日）		**0[a]**	**0[b]**	**2[c]**	**4[d]**	**0[a]**	**0[b]**	**2[c]**	**4[d]**
評価動物数		**3**	**3**	**3**	**3**	**3**	**3**	**3**	**3**
所見	**重症度**								
萎縮／変性–嗅上皮	**計**	**1**	**0**	**3**	**3**	**1**	**0**	**3**	**3**
	軽微	1	0	2	3	1	0	3	1
	軽度	0	0	1	0	0	0	0	0
	中等度	0	0	0	0	0	0	0	2

略語：β-CD＝β-シクロデキストリン、DPC＝ドデシルホスホコリン
a　プラセボ対照（粉末）［DPC 6 mg + β-CD 34 mg/匹/日（15% DPC + 85% β-CD）］
b　生理食塩液
c　グルカゴン 2 mg + DPC[redacted]mg + β-CD[redacted]mg/匹/日
d　グルカゴン 4 mg + DPC 4 mg + β-CD 32 mg/匹/日

以上、イヌに点鼻グルカゴンを経鼻投与したところ、鼻に局所の組織変化が生じた。プラセボ対照が鼻腔局所の軽微な組織変化を生じた可能性も除外できないものの、点鼻グルカゴン投与群ではプラセボ対照群よりも高い発現率及び重症度で変化が生じていたことから、点鼻グルカゴン製剤中の主な鼻刺激性物質はグルカゴンと考えられた。いずれの群においても全身性の標的器官毒性は認められなかった。

2.6.6.3.2　β-CD

28 日間を超える期間にわたりβ-CD を経鼻投与した時の安全性に関する情報は得られていない（CTD 第 2.6.6.9.2 項参照）。

2.6.6.3.3　DPC

28 日間を超える期間にわたり DPC を経鼻投与した時の安全性に関する情報は得られていない。DPC のラットを用いた受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験で、雄ラットに DPC を 1 mg/kg/日の用量まで最長 56～57 日間反復静脈内投与しても一般状態、体重、摂餌量及び剖検に毒性所見は認められなかった。

2.6.6.4　遺伝毒性試験

2.6.6.4.1　点鼻グルカゴン

グルカゴンはペプチドであるため、遺伝毒性試験は実施しなかった［ICH S6 (R1)］。

2.6.6.4.2　β-CD

一連の遺伝毒性試験において、β-CD の遺伝毒性及び変異原性は陰性であることが報告されている（Stella and He 2008；表 2.6.6-11）。

表 2.6.6-11　β-CD の遺伝毒性試験のまとめ

試験	試験系	投与量	結果
宿主経由試験	ラット 大腸菌 WP2*uvrA* trp-、 ネズミチフス菌 TA1538	0、100、1000 mg/kg	陰性
染色体異常試験	Long Evans ラット骨髄	0、200、400、600 mg/kg	陰性 [a]
小核試験	マウス骨髄	100 mg/kg	陰性
伴性劣性致死突然変異試験	キイロショウジョウバエ	1.6、8、16 mM	陰性
Ames 試験 [b]	ネズミチフス菌 TA98、TA100、 TA1535、TA1537、TA1538	0、0.1、0.5、1、2、4 mg/plate	陰性
HPRT 変異試験（6-チオ-グアニン耐性）[b]	V79 チャイニーズハムスター細胞	10、30、100、300、 1000 µg/mL	陰性
In vitro 染色体異常試験 [b]	ヒトリンパ球	100、300、1000 µg/mL	陰性

注：国際連合食糧農業機関／世界保健機関（Food and Agriculture Organization/World Health Organization：FAO/WHO）合同食品添加物専門家会議（Joint Food and Agriculture Organization/World Health Organization's Expert Committee on Food Additives：JECFA）による評価
（http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v32je13.htm. Accessesd Dec 12, 2018）、Table 2 より引用。
略語：β-CD = β-シクロデキストリン、HPRT = ヒポキサンチン・グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ
[a]　評価細胞数はガイドラインの推奨値よりも少なかった。
[b]　代謝活性化系存在下／非存在下（ラット肝 S9 mix）

2.6.6.4.3　DPC

DPC について、細菌を用いる復帰突然変異試験、哺乳類細胞を用いる染色体異常試験及びラット小核試験を実施した。

2.6.6.4.3.1　DPC の細菌を用いる復帰突然変異試験

報告書 963846-AMG016C (4.2.3.3.1.1)、概要表 2.6.7.8A

細菌を用いる復帰突然変異試験（プレート法及びプレインキュベーション法）において DPC の遺伝毒性を評価した。代謝活性化系（S9 mix）の存在下及び非存在下で、ネズミチフス菌株（TA1535、TA1537、TA98、TA100）及び大腸菌 WP2 *uvrA* 株を、DPC（5000 µg/plate までの濃度範囲）で処理した。標準的な陽性対照物質を用いて、試験系の感度及び S9 mix の活性を確認した。

いずれの DPC 処理群においても復帰突然変異コロニー数の明らかな増加はなかった。

なお、プレインキュベーション法では、手技上の過失により陰性対照（生理食塩液）の処理を行わなかったため、倍率算出及び比較にはプレート法の陰性対照を用いた。プレート法の陰性対照と比較したとき、いずれの用量及び試験菌株においても DPC 処理群で復帰突然変異コロニー数の明確な増加はなかった。また、陰性対照の背景データとの比較においても、DPC 処理群の復帰突然変異コロニー数に明らかな増加はなく、すべて背景データの範囲内にあった。陽性対照はすべて許容基準内にあった。したがって、本アッセイにおける評価は妥当であったと判断した。

以上、細菌を用いる復帰突然変異試験において、DPC は遺伝毒性を示さなかった。

2.6.6.4.3.2　DPC のほ乳類細胞を用いる染色体異常試験

報告書 963847-AMG017C (4.2.3.3.1.2)、概要表 2.6.7.8B

ヒト末梢血リンパ球を用いる染色体異常試験を実施し、DPC の遺伝毒性を評価した。DPC は 6.25～3515 µg/mL の濃度[1]で 4 時間（代謝活性化系の存在下及び非存在下）または 21 時間（代謝活性化系の非存在下）処理を行った後、分裂中期細胞の染色体異常の有無を評価した。適切な媒体対照及び陽性対照を設けた。

細胞毒性を指標に選択した 3 用量（高用量は、4 時間処理及び 21 時間処理でそれぞれ 400 及び 200 µg/mL）について染色体異常の有無を評価した結果、染色体構造異常を有する細胞の発現率に統計学的有意な増加はなかった。陽性対照では染色体構造異常を有する細胞の割合が顕著に増加したことから、本試験系の妥当性が確認された。媒体対照群及び被験物質投与群の染色体構造異常を有する細胞の発現率は試験実施施設における陰性対照の背景データの範囲内にあり、陽性対照は試験実施施設における陽性対照の背景データの範囲内にあった。

染色分体にギャップを有する細胞の発現率が、すべての DPC 処理群で媒体対照と比べて増加したが、明らかな用量反応関係がなかったことから遺伝毒性を示すものではないと考えられた。

以上、in vitro 染色体異常誘発試験において、DPC は遺伝毒性を示さなかった。

[1] 高用量は、OECD が推奨する標準的な限度値（0.01 M）に相当。

2.6.6.4.3.3　DPC のラットを用いる小核試験

報告書 963848-AMG019G-DPC (4.2.3.3.2.1)、概要表 2.6.7.9

DPC のラット骨髄小核試験を実施し、遺伝毒性を評価した。

本試験では DPC への十分な全身曝露を得るため静脈内投与を用いた。主試験に先立ち、用量設定試験として、ラット（雌雄各 2 匹/用量）に DPC を 20、50 及び 200 mg/kg の用量で単回静脈内投与実施した。20 mg/kg で一般状態所見は認められなかった。50 mg/kg 投与後、4 匹中 3 匹で腹臥位及び無反応が見られた。さらに、尾の暗色化又は病斑も見られた。200 mg/kg では、雄 1 匹が死亡し、雌 1 匹では投与完了前に急激に状態が悪化（歩行異常、活動性低下、中等度の協調性異常、筋緊張低下、衰弱及び皮膚の蒼白化）した。尾の暗色化又は病斑も見られた。これらの所見に基づき、50 mg/kg は最大耐量を超えていたと判断し、主試験の最高用量には 40 mg/kg を設定した。

試験デザインを表 2.6.6-12 に示す。

表 2.6.6-12　DPC のラット小核試験のデザイン（963848-AMG019G-DPC 試験）

群番号	被験物質	投与量 (mg/kg)	投与容量 (mL/kg)	投与濃度 (mg/mL)	試料採取時点 [b] (時間)	動物数	
						雄	雌
1	媒体対照 [a]	–	10	–	24 48	5 5	5 5
2	DPC	10	10	1	24	5	5
3	DPC	20	10	2	24	5	5
4	DPC	40	10	4	24 48	5 5	5 5
5	CP	20[c]	10	2	24	3	3

略語：CP = シクロホスファミド、DPC = ドデシルホスホコリン

[a] 生理食塩液。

[b] 骨髄採取は所定の安楽殺時点（24 時間又は 48 時間）の前後 30 分以内に実施。

[c] シクロホスファミド一水和物を 20 mg/kg の用量で経口投与した。

主試験では、DPC（10、20 又は 40 mg/kg）又は生理食塩液を尾静脈より単回静脈内投与した。陽性対照であるシクロホスファミド一水和物は経口投与した。試験期間中、生死及び一般状態の観察を実施した。DPC 投与 24 又は 48 時間後に動物を安楽死させ、大腿骨骨髄塗抹標本を作製して、個体あたり計 2000 個の幼若赤血球について、小核の有無を検査した。さらに、骨髄毒性の指標として、各個体の細胞集団全体（幼若赤血球及び成熟赤血球）中の幼若赤血球の割合を評価した。

一般状態所見として、40 mg/kg 群の雌雄で尾の暗色化又は病斑が認められ、この皮膚所見に関連してケージ内に血液と考えられる赤色物質が見られた。この所見は 20 mg/kg 群でもより軽度に認められた。10 mg/kg 群では一般状態所見は見られなかった。

媒体対照群のデータは試験実施施設の背景データの範囲内にあり、陽性対照群では小核を有する幼若赤血球の発現率が明らかに増加したことから、本試験系の妥当性が確認された。

DPC 投与群において小核を有する幼若赤血球の発現率の明らかな増加はなく、骨髄毒性も生じなかった。

以上、ラット小核試験において、最大耐量と考えられる 40 mg/kg までの用量において DPC は遺伝毒性を示さなかった。

2.6.6.5　がん原性試験

2.6.6.5.1　点鼻グルカゴン

点鼻グルカゴンは低血糖時の救急処置を目的として単回使用される製剤であるため、がん原性試験は実施していない（ICH S1A）。

2.6.6.5.2　β-CD

点鼻グルカゴンは低血糖時の救急処置を目的として単回使用される製剤であるため、β-CD を経鼻投与時のがん原性試験は実施していない（ICH S1A）。

β-CD はシクロデキストリン類の一つである。シクロデキストリンは米国、欧州及び日本で長年にわたり食品添加物及び医薬品添加物として広く利用されている。β-CD は遺伝毒性が陰性であることが明らかにされている（CTD 第 2.6.6.4.2 項）。ラット及びマウスにβ-CD を 675 mg/kg/日までの用量で混餌投与したがん原性試験において、投与に関連する腫瘍性病変は発現しなかったと報告されている（Stella and He 2008）。

2.6.6.5.3　DPC

点鼻グルカゴンは低血糖時に対する救急処置を目的として単回使用される製剤であるため、DPC のがん原性試験は実施していない。

2.6.6.6　生殖発生毒性試験

2.6.6.6.1　点鼻グルカゴン

点鼻グルカゴンの生殖発生毒性試験は実施していない。グルカゴン（遺伝子組換え）及び動物由来グルカゴンの生殖発生毒性試験成績が報告されている。ラット及びウサギにグルカゴン（遺伝子組換え）を 0.4、2 及び 10 mg/kg の用量［ヒト投与量[2]の最大 100 倍（ラット）及び 200 倍（ウサギ）］で胎児器官形成期に静脈内投与した試験では、胎児への毒性はみられなかったとされる（GLUCAGEN® Prescribing Information, 2015）。ラットに動物由来グルカゴンを 2 mg/kg（ヒト投与量の最大 40 倍）までの用量で 1 日 2 回静脈内投与した生殖発生毒性試験では、グルカゴンに起因する受胎能障害及び胎児毒性はなかったとされる（GLUCAGON® Prescribing Information, 2017）。合成グルカゴンのアミノ酸配列は遺伝子組換えグルカゴン及びヒト、ウシ、ブタ、ラット及びイヌの膵グルカゴンと同一であることから（Eistrup et al. 1993）、これらの生殖発生毒性試験に基づき合成グルカゴンについての安全性評価も可能と考えられる。また、点鼻グルカゴンを経鼻投与した時の曝露量は、同じ用量のグルカゴンを静脈内投与した時の曝露量を超えないと考えられ、従って点鼻グルカゴンによる生殖系への影響が、これらの静脈内投与で実施された生殖発生試験の報告よりも悪化する可能性は極めて低いと考えられる。さらに、グルカゴンはヒト胎盤を通過しないとされていることから（Moor et al. 1974）、胎児に影響が生じる可能性は低い。

[2] ヒト投与量：1 mg、体表面積換算用量での比較。

2.6.6.6.2　β-CD

β-CD の経鼻投与による生殖発生毒性試験は実施していない。公表情報として、β-CD の混餌投与によるラット一世代受胎能及び出生前／出生後試験並びに強制経口投与による催奇形性試験において（Barrow et al. 1995）、著しい母動物毒性はなかったが、5% β-CD 群で出生児の成長が一過性に遅延し、2.5%群でも同様の変化がごく軽度に認められた。奇形及びその他の発生毒性は見られず、発生毒性に関する NOAEL は食餌中濃度 1.25%であった。催奇形性試験では母動物及び胎児に影響は見られなかった。さらに、追加検討の結果から、出生児の成長遅延は、腹腔内投与では発現せず、授乳期間中の混餌投与に起因すると考えられること、母動物でごく軽度な栄養失調が認められ、これは、β-CD の物理化学的特性により、腸管内で栄養素との相互作用が生じたためと考えられること、一方、乳汁組成にβ-CD による変化はなかったことが報告されている（Barrow et al. 1995）。

2.6.6.6.3　DPC

DPC について、ラットの受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験、ラット及びウサギの胚・胎児発生に関する試験、及び、ラットの出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験を実施した。これらの試験では DPC への十分な全身曝露を得るため静脈内投与を用いた。

2.6.6.6.3.1　DPC の雌雄ラットを用いた受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験

報告書 1013-0531-AMG022-DPC (4.2.3.5.1.1)、概要表 2.6.7.12

Sprague-Dawley ラットに、雄には交配前（約 28 日間）から交配期間を経て剖検まで、雌には交配前（14 日間以上）から交配期間を経て妊娠 7 日目まで、DPC を 1 日 1 回静脈内投与し、生殖及び受胎能並びに初期胚発生に及ぼす影響を調べた。

試験デザインを表 2.6.6-13 に示す。

表 2.6.6-13　DPC の雌雄ラットを用いた受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験のデザイン（1013-0531-AMG022-DPC 試験）

投与群	投与量 (mg/kg/日)	投与濃度 (mg/mL)	投与容量 (mL/kg)	動物数	
				雄	雌
1. 媒体対照 [a]	0	0	0.5 2.0[b]	24	24
2. DPC 低用量	1	2.0	0.5	24	24
		0.5[b]	2.0[b]		
3. DPC 高用量	2.5	5.0	0.5	24	24
	2[c]	4.0[c]	0.5		
	3[b]	1.5[b]	2.0[b]		

略語：DPC = ドデシルホスホコリン

a　生理食塩液

b　投与部位に一般状態所見が見られたため、15 日目から投与容量、投与濃度及び投与量を変更した。

c　投与部位に一般状態所見が見られたため、11 日目から投与量及び投与濃度を変更した。

DPC の投与量は、ラットを用いた予備試験に基づき設定した。予備試験として、雌 Sprague-Dawley ラットに DPC を 0.9 及び 4.5 mg/kg/日の用量で 1 日 1 回、4 日間静脈内投与したときの忍容性は良好であった［報告書 3012-2851-AMG019-DPC (4.2.3.5.2.2)、概要表 2.6.7.11］。したがって、本試験には 0、1 及び 2.5 mg/kg の用量を設定したが、試験開始後に、2.5 mg/kg 群（高用量

群）では投与部位に一般状態所見が見られたため、投与 11 日目に 2 mg/kg に減量し、投与 15 日目以降は投与液濃度及び容量を変更することで 3 mg/kg に増量した。なお、1、2 及び 3 mg/kg の用量は、治療用量の点鼻グルカゴンに含まれる DPC（体重換算用量）[3]のそれぞれ約[redacted]、[redacted]及び[redacted]倍である。

生死及び一般状態、体重及び摂餌量測定並びに性周期観察（投与開始 7 日前、交配期間中及び交配確認まで）を実施した。妊娠 13、14 又は 15 日目に雌を安楽死させ、剖検、卵巣重量測定、黄体数計測及び子宮内の検査を実施した。雄では剖検時に生殖器官重量測定、精巣上体精子の運動性、数及び形態評価並びに右精巣の病理組織学的評価を実施した。

死亡はなかった。高用量群の大半の個体で、尾の投与部位周辺に、DPC の毒性を示す一般状態所見が見られた。剖検では全ての DPC 投与群で投与部位における皮膚の暗色領域／変色、痂皮、創傷、乾燥又は腫脹の発現が増加し、DPC の局所刺激性に関連すると考えられた。病理組織学的検査は実施していないが、暗色領域／変色は出血に関連し、その他の変化（痂皮、創傷、乾燥及び／又は腫脹）は炎症を示す変化であると推察された。

高用量群の雄では摂餌量が対照群と比べて統計学的有意に減少し、体重及び体重増加量も低下した。1 mg/kg/日群の雌では摂餌量及び体重に毒性と考えられる変化は見られなかった。

性周期、交配所要日数、交配成績、精子検査（精子数、精子運動性及び形態）に DPC 投与の影響はみられなかった。黄体数、着床数、生存胚数、死亡胚数、吸収胚数、着床前胚損失率（%）及び着床後胚損失率（%）に群間差はなかった。生殖器官重量に DPC 投与の影響は見られなかった。精巣の病理組織学的検査において DPC 投与に関連する変化はなく、精子形成のステージはいずれも正常範囲内にあった。

以上、DPC を 0、1 及び 3 mg/kg の用量で投与したところ、雌雄の投与部位（尾）に毒性を示す一般状態所見が見られ、また 3 mg/kg/日群の雄で摂餌量、体重及び体重増加量が減少した。雌雄の生殖能（雄生殖器評価を含む）に毒性変化はなかった。したがって、親動物の一般毒性に関する NOAEL は雌雄ともに 1 mg/kg/日、雌雄の生殖能及び初期胚発生に関する NOAEL は 3 mg/kg/日であった。

2.6.6.6.3.2 DPC のラットを用いた胚・胎児発生に関する試験

報告書 1013-0551-AMG024G-DPC (4.2.3.5.2.7)、概要表 2.6.7.13A

Sprague-Dawley ラットに妊娠 6～17 日の間、DPC を 1 日 1 回静脈内投与し、胚・胎児発生毒性を評価した。

投与量はラットを用いた胚・胎児発生に関する予備試験に基づいて選択した。この予備試験では妊娠 6～17 日に DPC を 0、1、2.5 及び 5 mg/kg の用量で静脈内投与した［報告書 2013-0541-AMG023G-DPC (4.2.3.5.2.1)］。5 mg/kg では尾の投与部位に重度の投与部位反応が見られ、最大耐量を超える用量と考えられた。2.5 mg/kg 以上の用量で体重及び摂餌量が減少した。胎児への影響はなかった。したがって、本試験では 0、1 及び 2.5 mg/kg の用量を選択した。1 及び 2.5 mg/kg の用量は、治療用量の点鼻グルカゴンに含まれる DPC（体重換算用量）[4]のそれぞれ約[redacted]及び[redacted]倍である。

[3] ヒト（体重を 60 kg と仮定）に治療用量の点鼻グルカゴン製剤（DPC を[redacted]mg 含有）を単回投与した時と比較。
[4] 同上

試験デザインを表 2.6.6-14 に示す。

表 2.6.6-14　DPC のラット胚・胎児発生試験のデザイン（1013-0551-AMG024G-DPC 試験）

投与群	投与量 (mg/kg/日)	投与濃度 (mg/mL)	投与容量 (mL/kg)	動物数 雌
1. 媒体対照 [a]	0	0	0.5	24
2. DPC 低用量	1	2.0	0.5	24
3. DPC 高用量	2.5	5.0	0.5	24

略語：DPC = ドデシルホスホコリン
[a]　生理食塩液

生死、一般状態観察、体重及び摂餌量測定を実施した。妊娠 21 日に母動物を安楽死させ、剖検、黄体数測定、子宮内の検査、胎児体重測定、胎児の外表検査、内臓検査及び骨格検査を実施した。

死亡はなかった。2.5 mg/kg/日群の大半の個体で、尾の投与部位周辺に、DPC に関連する毒性を示す一般状態所見が見られた。体重及び摂餌量に毒性変化はなかった。妊娠子宮重量、胎児体重、黄体数、着床数、生存胎児数、性比、吸収胚数、着床前胚損失率及び着床後胚損失率において DPC の影響はなかった。胎児の形態（外表、内臓及び骨格）に DPC 投与に関連すると考えられる有害所見の増加はなかった。

以上、ラットに妊娠 6～17 日の間 DPC を 0、1 及び 2.5 mg/kg の用量で 1 日 1 回静脈内投与したところ、1 及び 2.5 mg/kg/日の用量で投与部位（尾）に一般状態所見及び剖検所見が見られた。母動物の体重及び摂餌量に毒性変化はなく、胚致死作用、胎児毒性及び催奇形性は見られなかった。したがって、ラットにおける母動物の毒性、発生毒性及び催奇形性に関する NOAEL はいずれも 2.5 mg/kg/日であった。

2.6.6.6.3.3　DPC のウサギを用いた胚・胎児発生に関する試験

報告書 1013-0574-AMG026G-DPC (4.2.3.5.2.8)、概要表 2.6.7.13B

ニュージーランドホワイトウサギに妊娠 7～19 日の間、DPC を 1 日 1 回静脈内投与し、胚・胎児発生毒性を評価した。

投与量は予備試験に基づき選択した。予備試験として、ニュージーランドホワイトウサギに DPC を 0.5 及び 1 mg/kg の用量で 3 日間投与［報告書 8013-1654-AMG030-DPC (4.2.3.5.2.5)］、及び 0、0.5 及び 1 mg/kg の用量で 13 日間投与した結果［報告書 8013-1774-AMG031-DPC (4.2.3.5.2.6)］、いずれの試験でも、0.5 及び 1 mg/kg の用量で耳の投与部位周辺に一般状態変化が見られた。これをふまえて、ウサギを用いた胚・胎児発生に関する試験では 0、0.5 及び 1 mg/kg の用量を選択した。0.5 及び 1 mg/kg の用量は、治療用量の点鼻グルカゴンに含まれる DPC（体重換算用量）[5]のそれぞれ約[redacted]倍及び[redacted]倍である。

試験デザインを表 2.6.6-15 に示す。

[5] ヒト（体重を 60 kg と仮定）に点鼻グルカゴン製剤[redacted]mg（DPC を[redacted]mg 含有）を単回投与した時と比較。

表 2.6.6-15　DPC のウサギ胚・胎児発生試験のデザイン（1013-0574-AMG026G-DPC 試験）

投与群	投与量 (mg/kg/日)	投与濃度 (mg/mL)	投与容量 (mL/kg)	動物数 雌
1. 媒体対照 [a]	0	0	1	22
2. DPC 低用量	0.5	0.5	1	22
3. DPC 高用量	1.0	1.0	1	22

略語：DPC = ドデシルホスホコリン
[a]　生理食塩液

生死、一般状態、体重及び摂餌量を記録した。妊娠 29 日に母動物を安楽死させ、黄体数測定、子宮内の検査、胎児体重測定、胎児の外表検査、内臓検査及び骨格検査を実施した。

一般状態観察において、1 mg/kg/日群で投与部位周辺の皮膚変色が見られた。全胚吸収を示す個体はなかった。対照群の 1 匹及び 0.5 mg/kg 群の 1 匹が流産した。

妊娠子宮重量、黄体数、着床数、生存胎児数、死亡胎児数、性比、吸収胚数、着床前胚損失率及び着床後胚損失率において DPC に関連する影響はなかった。

胎児重量に明らかな影響はなかった。いずれの胎児にも、胎児の形態（外表、内臓及び骨格）に DPC 投与に関連すると考えられる有害所見の増加はなかった。

以上、ウサギに妊娠 7～19 日の間 DPC を 1 mg/kg/日までの用量で静脈内投与したところ、母動物の体重及び摂餌量に毒性変化はなく、胚致死作用、胎児毒性及び催奇形性は見られなかった。したがって、ウサギの発生毒性及び催奇形性に関する NOAEL は 1 mg/kg/日であった。

2.6.6.6.3.4　DPC のラットを用いた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

報告書 1013-0581-AMG027G-DPC (4.2.3.5.3.1)、概要表 2.6.7.14

Sprague Dawley ラットに妊娠 6 日～分娩後 20 日の間、DPC を 1 日 1 回静脈内投与し、F_0 世代の生殖及び F_1 世代の発達に及ぼす影響を評価した。

DPC の投与量は、ヒトへの曝露量を十分上回る用量として、0.5 及び 1 mg/kg を選択した。0.5 及び 1 mg/kg の用量は、治療用量の点鼻グルカゴンに含まれる DPC（体重換算用量）[6]のそれぞれ約[redacted]倍及び[redacted]倍である。

試験デザインを表 2.6.6-16 に示す。

[6] ヒト（体重を 60 kg と仮定）に点鼻グルカゴン製剤[redacted]mg（DPC を[redacted]mg 含有）を単回投与した時と比較。

表 2.6.6-16　DPC の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のデザイン（1013-0581-AMG027G-DPC 試験）

投与群	投与量 (mg/kg/日)	投与濃度(mg/mL)	投与容量 (mL/kg)	動物数
				F_0 雌
1. 媒体対照 [a]	0	0	1	22
2. DPC 低用量	0.5	0.5	1	22
3. DPC 高用量	1.0	1.0	1	22

略語：DPC = ドデシルホスホコリン
[a]　生理食塩液

母動物について、妊娠期間及び分娩後 21 日までの体重及び摂餌量の測定、一般状態観察及び分娩観察を、F_1 出生児について、生死、摂餌量、体重、一般状態観察、肛門性器間距離、出生後の発達指標、反射行動、感覚機能、自発運動活性、聴覚性驚愕反応及び学習行動（E 型水迷路）について評価した。F_1 世代について、交配させて生殖能を評価し、F_1 雌について妊娠期間及び分娩後の一般状態、体重、摂餌量を評価した。F_1 世代の出生児（F_2）について、出生後 4 日まで一般状態観察、生死、体重及び生存能を評価した。

DPC 投与の忍容性は良好であり、DPC に関連する死亡はなかった。F_0 世代及び F_1 世代の妊娠期間中の体重、摂餌量、一般状態観察及び剖検時の肉眼所見に影響は見られなかった。

F_0 世代の 0.5 及び 1 mg/kg 群の分娩時間が対照群に比べごく軽度であるが統計学的有意に延長した。

F_1 及び F_2 出生児の生存性及び剖検時の肉眼所見に変化はなかった。F_1 世代の一般状態及び体重ならびに F_2 世代の出生後 4 日までの体重に毒性変化はなかった。F_1 世代の発達、行動及び機能評価（学習及び記憶を含む）は DPC 投与の影響を受けなかった。F_1 世代の交配及び生殖パラメータに毒性変化はなかった。

以上、雌ラットに妊娠 6 日～分娩後 20 日まで DPC を 0、0.5 及び 1 mg/kg の用量で投与したときの忍容性は良好であった。0.5 及び 1 mg/kg 群の F_0 世代で分娩時間が延長したが、用量依存性はなく、全ての群で妊娠期間は同じ（22 日）であったこと、分娩異常の増加や出生率の低下はいずれの用量でも見られなかったことから、毒性ではないと判断した。F_0 世代の生殖能、F_1 世代の発達能（感覚、行動及び機能の評価を含む）並びに F_2 世代の出生児に毒性変化はなかった。したがって、母動物の一般毒性、F_1 世代の成長、行動及び生殖に関する NOAEL は 1 mg/kg/日であった。

2.6.6.7　局所刺激性試験

2.6.6.7.1　点鼻グルカゴン

点鼻グルカゴンの鼻腔における局所刺激性について、イヌを用いた DPC の 5 日間反復経鼻投与毒性及び点鼻グルカゴンの粉末拡散試験［報告書 65114-AMG011 (4.2.3.2.2)、CTD 第 2.6.6.3.1.2 項］並びにラット及びイヌを用いた点鼻グルカゴンの 28 日間反復経鼻投与毒性試験［報告書 75263-AMG015G Amendment 01 (4.2.3.2.1)、CTD 第 2.6.6.3.1.1 項及び 65125-AMG014G Amendment 01 (4.2.3.2.3)、CTD 第 2.6.6.3.1.3 項］で評価した。

ウサギに点鼻グルカゴンを単回点眼投与したときの局所刺激性を評価した［報告書 1013-0594-AMG021G (4.2.3.7.7.1)、CTD 第 2.6.6.8.1.2 項］。

2.6.6.7.2　β-CD

β-CD の鼻腔における局所刺激性について、ラット及びイヌの 28 日間反復投与毒性試験のプラセボ対照群で評価した［報告書 75263-AMG015G Amendment 01 (4.2.3.2.1)、 CTD 第 2.6.6.3.1.1 項及び 65125-AMG014G Amendment 01 (4.2.3.2.3)、CTD 第 2.6.6.3.1.3 項］。その結果、ラットでは鼻腔に局所に組織変化は見られず、イヌではごく軽微な組織変化が生じた。

2.6.6.7.3　DPC

DPC の鼻腔における局所刺激性について、ラット及びイヌの 28 日間反復投与毒性試験のプラセボ対照群［報告書 75263-AMG015G Amendment 01 (4.2.3.2.1)、CTD 第 2.6.6.3.1.1 項及び 65125-AMG014G Amendment 01 (4.2.3.2.3)、CTD 第 2.6.6.3.1.3 項］並びにイヌを用いた DPC の 5 日間反復経鼻投与毒性及び点鼻グルカゴンの粉末拡散試験［報告書 65114-AMG011 (4.2.3.2.2、CTD 第 2.6.6.3.1.2 項］で評価した。その結果、ラット 28 日間反復投与毒性試験において鼻腔に組織変化は見られなかった。イヌ 28 日間反復投与毒性試験では局所刺激性を示唆する組織学的変化（炎症を伴う嗅上皮の萎縮／変性）が認められたがごく軽微であった。イヌを用いた 5 日間試験では病理組織学的検査で両個体の鼻腔に軽微な炎症及び好塩基性物質の軽度な蓄積が見られたが、イヌを用いた 28 日間経鼻投与毒性試験の終了時に認められた、嗅上皮の萎縮／変性は見られなかった［報告書 65125-AMG014G Amendment 01 (4.2.3.2.3)、CTD 第 2.6.6.3.1.3 項］。

2.6.6.8　その他の毒性試験

2.6.6.8.1　点鼻グルカゴン

2.6.6.8.1.1　点鼻グルカゴンの不純物の評価

2.6.6.8.1.1.1　非変異原性不純物：点鼻グルカゴン（強制劣化品）のラットを用いた 2 週間の不純物安全性確認試験

報告書 7300547 (4.2.3.7.6.1)、概要表 2.6.7.17

Sprague Dawley ラットに点鼻グルカゴン（不純物を高濃度で含む強制劣化品、ロット番号：RA8-H81439-037）を 1 日 1 回、14 日間経鼻投与し、総不純物量及び個別規格設定分解生成物［ *** 不純物A**　、 *** 不純物B**　、 *** 不純物C**　、 *** 不純物D**　及び *** 不純物E**　］の安全性を評価した。

試験デザインを表 2.6.6-17 に示す。

表 2.6.6-17　点鼻グルカゴン（強制劣化品）のラット 2 週間投与不純物安全性確認試験のデザイン（7300547 試験）

群番号	被験物質	グルカゴンとしての投与量 (mg/匹/日)[a]	グルカゴン濃度 (mg/mL)[a]	動物数	
				雄	雌
1	生理食塩液対照 [bc]	0	0	10	10
2	プラセボ対照 [bd]	0	0	10	10
3	点鼻グルカゴン [b]	0.1	3.61	10	10

略語：β-CD＝β-シクロデキストリン、DPC＝ドデシルホスホコリン
a　実際の含量に基づく。
b　14 μL/鼻腔/日（28 μL/日）の液量で両鼻腔に投与した。
c　生理食塩液
d　プラセボ対照粉末（88.9% β-CD + 11.1% DPC）を 100 mM 酢酸に溶解。

ラットを用いた 28 日間反復経鼻投与毒性試験［報告書 75263-AMG015G Amendment 01 (4.2.3.2.1)、CTD 第 2.6.6.3.1.1 項、概要表 2.6.7.7A］で 0.2 mg/日群の嗅上皮に可逆的で軽度から中等度のびらん／潰瘍が発現し、しばしば背側鼻甲介の粘膜固有層に軽微から軽度な急性から亜急性の炎症を伴っていたことから、本試験の投与量は 0.1 mg/日を選択した。

本試験では、一般状態観察、体重・摂餌量測定、眼科学的検査、臨床検査（血液学的検査、血液凝固系検査、血液生化学的検査、尿検査）、剖検、器官重量測定及び病理組織学的検査を実施した。

試験期間中、死亡はなく、一般状態、体重、摂餌量、臨床検査パラメータ、剖検、器官重量及び病理組織学的検査において、点鼻グルカゴン（強制劣化品）投与に関連する所見は見られなかった。

以上、ラットに点鼻グルカゴンを 1 日 1 回、14 日間点鼻投与したところ、0.1 mg/日の用量で忍容性は良好であり、被験物質に関連する所見は見られなかった。

総不純物量及び個別規格設定分解不純物［ **＊不純物A** 、 **＊不純物B** 、 **＊不純物C** 、 **＊不純物D** 及び **＊不純物E** ］について、本試験におけるラットの NOAEL（14 日間の積算量）とヒトにおける推定最大摂取量[7]の比を、鼻腔表面積換算用量に基づき算出した（表 2.6.6-18）。なお、これらの関連物質は点鼻グルカゴンを投与時のグルカゴンと類似の体内動態を示すと仮定した。その結果、 **＊不純物C** を除く個別規格設定分解不純物及び総不純物量については 4 倍以上、また、 **＊不純物C** についてもヒトと同程度（0.914 倍）の量をラットに投与しても問題となるような所見はなかった。一方、1 回あたりの投与量で比較すると、ラットにおける投与量はヒトの投与量よりも低かった。しかしながら、点鼻グルカゴンによって生じる鼻腔の所見は、単回投与よりも反復投与後により強く生じることが、点鼻グルカゴンのイヌを用いた 28 日間反復投与試験とイヌ単回投与試験の結果から示唆されている（CTD 第 2.6.6.3.1.2 項及び CTD 第 2.6.6.3.1.3 項）。したがって、臨床で単回使

[7] 原薬に設定された規格の限度値に基づく。

用される本剤中の不純物が安全性の懸念となる可能性は低く、設定した規格は妥当なものと考える。

表 2.6.6-18　不純物の安全域：ラットを用いた点鼻グルカゴン（強制劣化品）安全性確認試験での NOAEL と、規格の限度値における臨床投与量の比較
（鼻腔表面積換算用量に基づく）

グルカゴン投与量	**グルカゴン投与量 [a] (mg/cm²)**	**投与回数**	
ヒトの治療用量（3 mg/日）[b]	0.0143	1	
ラット 14 日間試験における NOAEL（0.1 mg/日）	0.0071	14	
	規格	**ロット RA8-H81439-037 に含まれる量**	**不純物の安全域 [b]**
総不純物	[redacted]%以下	[redacted]%	9.25 倍
* **不純物**A	[redacted]%以下	[redacted]%	7.54 倍
* **不純物**B	[redacted]%以下	[redacted]%	7.02 倍
* **不純物**C	[redacted]%以下	[redacted]%	0.914 倍
* **不純物**D	[redacted]%以下	[redacted]%	8.25 倍
* **不純物**E	[redacted]%以下	[redacted]%	4.18 倍

略語： NOAEL = 無毒性量
[a] 鼻腔表面積は、ヒトでは 209 cm² （Ménache らが提唱する計算式に基づき、体重 60 kg として算出）、ラットでは 14 cm² とした（Ménache et al. 1997）。
[b] 安全域＝［ラット NOAEL で投与された不純物量（鼻腔表面積換算用量）×14 回投与］÷（治療用量で規格に設定された限度値のレベルでの不純物量）。

2.6.6.8.1.1.2　変異原性不純物

グルカゴンはペプチドであることから不純物の変異原性評価は必要とされない［ICH M7 (R1)］。

2.6.6.8.1.2　点鼻グルカゴンのウサギにおける眼刺激性試験

報告書 1013-0594-AMG021G (4.2.3.7.7.1)、概要表 2.6.7.17

点鼻グルカゴンは、ヒトに点鼻容器を用いて投与する際に、眼に対する予想外の曝露が生じる可能性があることから、雄ニュージーランドホワイトウサギを用いて点鼻グルカゴンの眼刺激性を評価した。点鼻グルカゴンは、点鼻容器を用いて単回点眼投与した。

用量は、点鼻容器に充てんされる点鼻グルカゴン[redacted]mg（グルカゴン 3 mg + DPC[redacted]mg + β-CD [redacted]mg）が、1 回の投与でヒトの眼に曝露されうる最高用量であることから、[redacted]mg を選択した。

試験デザインを表 2.6.6-19 に示す。

表 2.6.6-19　点鼻グルカゴンのウサギ眼刺激性試験のデザイン（1013-0594-AMG021G 試験）

投与群	点鼻グルカゴン投与量 (mg/匹)	動物数 （雄）
点鼻グルカゴン [a]	[redacted] [b]	3

略語：β-CD＝β-シクロデキストリン、DPC＝ドデシルホスホコリン
[a] 左眼のみに投与。
[b] グルカゴン 3 mg + DPC[redacted]mg +β-CD[redacted]mg

全例の投与眼及び非投与眼について、眼刺激性評価（フルオレセイン溶液の点眼前後）を投与前 24 時間以内、投与直前並びに投与 1、24、48 及び 72 時間後に実施した。投与 72 時間後に、持続性の角膜病変や刺激性を示す所見がなかったため観察を終了した。試験 4 日目に動物を安楽死させ、眼及び眼瞼について外観の肉眼観察を実施した。

一般状態所見として、点鼻グルカゴン投与眼（左眼）又はその周囲に、透明分泌物、結膜の赤色化、部分閉眼あるいは眼窩周囲の硬化性腫脹が発現した。

投与後の眼の観察時点（1、24、48 及び 72 時間後）すべてにおいて、全例で点鼻グルカゴン投与眼にごく軽度な所見（結膜及び瞬膜の赤色化及び浮腫）が発現した。上記の病変は、眼に固形粉末が存在する状態で眼瞼が動くことによる物理的な刺激性に起因すると考えられた。

剖検では、眼及び眼瞼において点鼻グルカゴンに関連する肉眼変化はなかった。

以上、点鼻グルカゴン[redacted]mg をウサギに単回点眼投与したときの忍容性は良好であり、軽微な眼刺激性として結膜及び瞬膜に局所的かつごく軽度の赤色化及び浮腫が見られたのみであった。

2.6.6.8.1.3　点鼻グルカゴンのラットにおける単回気管内噴霧投与試験

報告書 75310-AMG013G (4.2.3.7.7.2)、概要表 2.6.7.17

Sprague Dawley ラットに点鼻グルカゴンを単回気管内噴霧投与したときの毒性及び 14 日間の回復性を評価した。

点鼻グルカゴンの予定臨床投与経路は経鼻であるが、経鼻投与後に製剤中に含まれる少量の小粒子が肺に送達される可能性がある。したがって、本試験では気管内噴霧投与により製剤が肺に送達されたときの毒性を評価した。

試験デザインを表 2.6.6-20 に示す。

表 2.6.6-20　点鼻グルカゴンのラット単回気管内噴霧投与試験のデザイン
（75310-AMG013G 試験）

群番号	投与群	点鼻グルカゴン投与量 (mg)	動物数/性	
			主試験	回復性試験
1	空気対照	0	5	3
2	点鼻グルカゴン	0.5[a]	5	3

略語：β-CD＝β-シクロデキストリン、DPC＝ドデシルホスホコリン
[a] グルカゴン 0.05 mg + DPC[redacted]mg + β-CD[redacted]mg
投与には、Penn-Century®社製の Intratracheal Dry Powder Insufflator（Model DP-4）を用いた。

麻酔ラットに気管内粉末噴霧器（Penn-Century®社製）を用いて、空気（プラセボ）又は点鼻グルカゴン（点鼻グルカゴン製剤として 0.5 mg；グルカゴンとして 0.05 mg）を単回気管内噴霧投与した。治療用量と比較したラットの用量比は、体重換算用量[8]に基づくと 4 倍であった。

生死、一般状態、体重及び摂餌量を評価した。主試験群は投与翌日に、回復群は投与 14 日後に安楽死させ、器官重量測定及び全例の呼吸器組織について病理組織学的検査を実施した。

麻酔から回復後の一般状態並びに体重、摂餌量及び器官重量に、投与に関連する影響はなかった。剖検及び病理組織学的検査において、点鼻グルカゴン投与に関連する所見はなかった。手技に関連する所見又は背景所見として、剖検及び病理組織学的において、対照群及び点鼻グルカゴン投与群のいずれにも肺に暗色領域並びに軽微な組織球症及び肺胞出血が見られた。

以上、ラットに点鼻グルカゴンを単回気管内噴霧投与したときの忍容性は良好であった。

2.6.6.8.1.4　点鼻グルカゴンの光毒性

点鼻グルカゴンの有効成分であるグルカゴンはペプチドであるため、光毒性試験は実施していない（ICH S10）。

2.6.6.8.2　DPC

2.6.6.8.2.1　DPC の光毒性

報告書 PRD-04639-TR (4.2.3.7.7.3)

DPC の光化学的特性に基づき、光毒性評価を実施した。DPC の紫外可視領域の波長（290 から 700 nm）におけるモル吸光係数は 1000 L mol^{-1} cm^{-1} を上回らなかったことから、直接的光毒性を引き起こすほどの光反応性は無いと考えられた（ICH S10）。

2.6.6.9　考察及び結論

点鼻グルカゴン［新投与経路（経鼻投与）］の承認申請をサポートするための非臨床安全性評価を実施した。点鼻グルカゴンは、合成グルカゴン（有効成分）に加え、新添加物としてβ-CD 及び DPC を含有する。

2.6.6.9.1　点鼻グルカゴン

点鼻グルカゴンの 28 日間反復経鼻投与毒性試験を、ラット及びイヌを用いて実施し、毒性を評価した。ラットにはマイクロピペットを用いて点鼻グルカゴン溶液（100 mM 酢酸に溶解）を 0.1 及び 0.2 mg グルカゴン/日の用量で投与し、イヌには点鼻容器を用いて乾燥粉末製剤を 2 及び 4 mg グルカゴン/日の用量で投与した。

ラット及びイヌともに、生存期間中の観察では毒性作用は見られず、いずれの用量においても全身性の標的器官毒性は生じなかった。ラットでは高用量群（0.2 mg グルカゴン/匹/日）で片側又は両側の嗅上皮に軽度から中等度のびらん／潰瘍が発現し、しばしば鼻腔の背側鼻甲介の粘膜固有層に急性から亜急性の炎症を伴っていた。プラセボ対照（DPC + β-CD）による鼻腔の毒性変化は見られなかった。イヌでは、点鼻グルカゴン投与群（2 及び 4 mg グルカゴン/匹/日）の全

[8] ヒト体重を 60 kg とする。

例で軽微から中等度の鼻腔嗅上皮の萎縮／変性が見られた。同じ所見がプラセボ対照群（β-CD + DPC）でも 2/6 例で軽微に認められたが、グルカゴンの投与及び用量増加に伴い鼻刺激性の発現頻度及び重症度が増加したことから、点鼻グルカゴン製剤中の主な鼻刺激性物質は、ラット及びイヌともにグルカゴンと考えられた。この所見は、ラット及びイヌともに 14 日間の休薬期間終了時に消失したことから、可逆的であることが示された。

ラット及びイヌを用いた 28 日間試験における全身性の標的器官毒性に関する NOAEL はそれぞれ 0.2 mg/匹/日及び 4 mg/匹/日であり、このときの血清中曝露量をヒトと比較した曝露量比は、それぞれ 5.8 倍及び 39 倍であった（表 2.6.6-21）。

表 2.6.6-21　グルカゴンの安全域：28 日間反復投与毒性試験での曝露量と治療用量を投与時のヒトの曝露量の比較

	投与量 (mg/日)	AUC (pg•min/mL)	曝露量比	
			単回投与 [a]	28 回投与 [b]
ヒト [c]	3	289800	–	–
ラット [d]	0.1	43036	0.1 倍	4.2 倍
	0.2 [e]	60073	0.2 倍	5.8 倍
イヌ [f]	2	286445	1.0 倍	28 倍
	4 [e]	398925	1.4 倍	39 倍

略語：AUC = 血清中濃度－時間曲線下面積、NOAEL = 無毒性量

a　曝露量比 = 動物の AUC÷ヒトの AUC

b　曝露量比 =（動物の AUC÷ヒトの AUC）× 28 回投与

c　インスリンで低血糖を誘発した日本人 1 型糖尿病患者及び 2 型糖尿病患者に予定治療用量を投与したときの $AUC_{0\text{-tlast}}$（IGBJ 試験）

d　ラットを用いた 1 ヵ月間反復投与毒性試験の 28 日目に測定した $AUC_{0\text{-}90\ min}$［報告書 75263-AMG015G Amendment 01 (4.2.3.2.1)］。

e　全身性の標的器官毒性に関する NOAEL

f　イヌを用いた 1 ヵ月間反復投与毒性試験の 28 日目に測定した $AUC_{0\text{-}90\ min}$［報告書 65125-AMG014G Amendment 01 (4.2.3.2.3)］。

上述のラット及びイヌを用いた点鼻グルカゴンの 28 日間毒性試験では、イヌ及びラットで呼吸器又は鼻腔の移行上皮に変化は見られず、嗅上皮のみに変性が見られた。このように、非臨床試験で鼻腔局所の組織変化が見られたが、ヒトにおいて臨床的に重要な影響として発現する可能性は、以下の理由により低いと考えられた。

- 動物における鼻腔局所の組織変化は 28 日間の反復投与後に見られたが、臨床では低血糖時の救急処置を目的として糖尿病患者に単回投与される。
- 動物で生じた鼻腔局所の組織変化は軽度で一般状態所見を伴わず、休薬により完全に回復した。
- 鼻腔の解剖学的構造には、動物（ラット及びイヌ）とヒトで差異がある。ヒトの鼻は比較的単純な構造をしているが、ラット、イヌ及び多くのほかの哺乳類は鼻甲介が非常に複雑な構造をしている。鼻甲介の構造の違いは、経鼻投与された物質の沈着に差を生じると考えられる。また、鼻の主な機能は、ヒトでは呼吸であるが、ラット、イヌ及び多くのほかの哺乳類では嗅覚である。ラット及びイヌではヒトに比べ鼻腔において嗅上皮の占める割合が高い（ラット及びイヌでは最大 50%、ヒトでは 3%）（Harkema et al. 2006）。このような種差があることから、ラット及びイヌで見られた鼻腔局所の組織変化の臨床的意義は低いと思われ

る。

このほか、点鼻グルカゴンについては、ウサギを用いた眼刺激性試験、ラットを用いた気管内噴霧投与試験及びイヌに点鼻グルカゴンを経鼻投与後の粉末拡散試験を実施した。ウサギの眼に点鼻グルカゴンを[redacted]mg の用量で点眼したところ、軽微な眼刺激性、すなわち結膜及び瞬膜に局所的かつ軽度の赤色化及び浮腫が見られた。これは、眼に固形粉末が存在する状態で眼瞼が動くことによる物理的な刺激性に起因した可能性が高いと考えられた。イヌに青色色素含有点鼻グルカゴンを経鼻投与後の粉末拡散試験では、色素が鼻道、鼻咽頭、胃、食道及び舌に拡散したが、喉頭及び気管には見られなかったことから、粉末は肺に拡散しないことが示された。ラットに点鼻グルカゴンを 0.5 mg の用量で単回気管内噴霧投与し肺に製剤を送達させたところ、一般状態観察において毒性所見はなく、投与翌日の剖検及び病理組織学的検査において投与に関連する異常所見はなかった。以上より、点鼻グルカゴンを経鼻投与しても肺に送達される可能性は低いと考えられ、また肺及び眼に曝露した場合においても忍容性は良好であることが示された。

2.6.6.9.2　β-CD

β-CD に関しては、ラット及びイヌを用いた急性及び慢性毒性試験、遺伝毒性試験、マウス及びラットを用いたがん原性試験、ラット一世代受胎能及び出生前／出生後試験並びに催奇形性試験を含め、多くの公表データが得られている。β-CD のイヌを用いた 1 年間混餌投与毒性試験の NOEL（1.25% β-CD/餌；470 mg/kg/日に相当）[9]に基づき、一日摂取許容量は最大 5 mg/kg/日[10]（体重 60 kg のヒトで 300 mg/ヒト/日に相当）とされている。さらに、β-CD は GRAS に分類されている（FDA 2001）。

経鼻投与に関しては、主にβ-CD よりも水への溶解性が良好な他のシクロデキストリン（CD）である、ランダムメチル化β-CD、ジメチルβ-CD、ヒドロキシプロピルβ-CD 及びα-CD に関するデータが多く得られている（Merkus et al. 1999）。CD を点鼻投与した時の鼻腔粘膜組織に対する局所作用は、吸収促進剤として知られる胆汁塩や点鼻剤中の保存剤として汎用されている 0.01% 塩化ベンザルコニウムよりも概して軽微であったとされる（Merkus et al. 1999）。また、in vitro の評価系において、CD 処理時の線毛運動周波数は生理食塩液と概ね同程度であり、細胞毒性プロファイルも良好であった（Merkus et al. 1999）。ラットにヒドロキシプロピルβ-CD（5%及び 20%）又はβ-CD（1.5%）[11]を 5 分間曝露したところ、鼻粘膜組織に損傷は見られなかった（Asai et al. 2002）。

点鼻グルカゴンの 28 日間反復投与毒性試験におけるプラセボ対照群において、β-CD を含有するプラセボ対照液（ラット）あるいはプラセボ対照粉末（イヌ）の毒性が評価されている（CTD 第 2.6.6.3.1 項）。ラットでは、β-CD（ヒトへの投与量の 31 倍までの用量）を含むプラセボ対照粉末を 100 mM 酢酸に溶解し、点鼻投与した（表 2.6.6-22）ところ、鼻腔における局所刺激性及び全身性の標的器官毒性は見られなかった。イヌではヒトへの投与量の[redacted]倍（表 2.6.6-22）の用

[9] 国際連合食糧農業機関／世界保健機関（Food and Agriculture Organization/World Health Organization：FAO/WHO）合同食品添加物専門家会議（Joint Food and Agriculture Organization/World Health Organization's Expert Committee on Food Additives：JECFA）による評価（http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v35je12.htm. Accessesd Dec 12, 2018）。

[10] NOEL に安全係数（100 倍）を乗じて算出。

[11] β-CD は水への溶解性が極めて低いため、これより高い濃度で検討することはできなかった。

量のβ-CD を含むプラセボ対照粉末を投与したところ、嗅上皮局所に萎縮／変性が低頻度で見られたが、可逆的かつ軽微な変化であり、全身性の標的器官毒性は見られなかった。このように、β-CD の動物における毒性プロファイルは良好であった。β-CD を 28 日間を超える期間にわたり経鼻投与した時の安全性に関する情報は得られていないものの、点鼻グルカゴンは糖尿病患者に対する救急処置薬として単回投与される薬剤であること、また、これまでに得られた臨床試験において安全性に問題はなかったことから、β-CD を点鼻グルカゴンの添加剤として使用する際の安全性上の懸念は低いと考える。

表 2.6.6-22　β-CD の安全域：28 日間反復投与毒性試験と治療用量の比較
（鼻腔表面積換算用量）

種 **有効濃度（β-CD の投与量）**	**β-CD の投与量 (mg/cm²)**	**投与回数**	**β-CD の用量比**	
			単回投与 [a]	**28 回投与 [b]**
ヒト				
[redacted]mg/ヒト/日 [c]	[redacted]	1	–	
ラット 28 日間試験				
[redacted]mg/匹/日 [d]	[redacted]	28	1.10 倍	30.7 倍
イヌ 28 日間試験				
34 mg/匹/日 [e]	0.103	28	[redacted]倍	[redacted]倍

略語：β-CD = β-シクロデキストリン
[a] 用量比 = 動物へのβ-CD 投与量 (cm²) ÷ ヒトへのβ-CD 投与量 (cm²)
[b] 用量比 =［動物へのβ-CD 投与量 (cm²) ÷ ヒトへのβ-CD 投与量 (cm²)］× 28 回投与
[c] ヒトの鼻腔表面積を 209 cm² と仮定［Ménache らが提唱する計算式（Ménache et al. 1997）に基づき、体重 60 kg として算出］（Ménache et al. 1997）。
[d] 体重 0.25 kg の Sprague Dawley ラットの鼻腔表面積 = 14 cm²（Ménache et al. 1997）
[e] 体重 10 kg のビーグル犬の鼻腔表面積 = 329 cm²（Ménache et al. 1997）

2.6.6.9.3　DPC

ラット及びイヌを用いた 28 日間経鼻投与毒性試験におけるプラセボ対照粉末の構成成分のひとつとして、DPC を投与時の影響を評価した（表 2.6.6-23）。また、イヌに DPC を 5 日間反復経鼻投与したときの安全性を評価した。さらに、一連の遺伝毒性試験及び生殖発生毒性試験を実施した。

ラット 28 日間反復投与毒性試験において、0.3 mg DPC/匹/日（ヒトに治療用量投与時の AUC の 36 倍）を含むプラセボ対照粉末を 100 mM 酢酸に溶解し投与したところ、鼻腔における局所刺激性及び全身性の標的器官毒性は見られなかった。イヌ 28 日間反復投与毒性試験において、6 mg DPC/匹/日（ヒトに治療用量投与時の AUC の 177 倍）を含むプラセボ対照粉末を投与したところ、鼻刺激性が低頻度で見られたが、可逆的かつ軽微な変化であり、全身性の標的器官毒性は見られなかった。

イヌに DPC（4 及び 10 mg）を片方の鼻腔に 5 日間反復経鼻投与したときの忍容性は良好であり、一般状態において毒性徴候は見られず、剖検時にも変化はなかった。左鼻腔（DPC を 4 又は 10 mg の用量で 5 日間投与）と右鼻腔（DPC を[redacted]mg 含む点鼻グルカゴンを単回投与）ともに軽微な炎症及び好塩基性物質の軽度な蓄積が見られた。

DPC の遺伝毒性試験（細菌を用いる復帰突然変異試験、哺乳類細胞を用いる in vitro 染色体異常試験及び哺乳類を用いる小核試験）を実施した結果、DPC は遺伝毒性活性を示さなかった。

ラットを用いた受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験では、DPC を 3 mg/kg/日までの用量で静脈内投与しても影響は見られなかった（NOAEL：3 mg/kg/日）。胚・胎児発生に関する試験では、ラットに 2.5 mg/kg/日まで、ウサギに 1 mg/kg/日までの用量で静脈内投与しても胎児への毒性作用は見られず、DPC に催奇形性はないと判断した。ラットを用いた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、DPC を 1 mg/kg/日までの用量で投与しても F_1 世代のラットの成長、行動及び生殖に影響しないことが示された。

なお、28 日間を超える期間にわたり DPC を経鼻投与時の安全性に関する情報は得られていないが、ラットを用いた受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験で、雄ラットに DPC を 1 mg/kg/日の用量まで最長 56～57 日間反復静脈内投与しても一般状態、体重、摂餌量及び剖検に毒性所見は認められていない。以上より、点鼻グルカゴンで予定されている用量及び投与経路で、DPC は臨床的に重大な有害作用を発現しないと考えられた。

表 2.6.6-23　DPC の安全域：28 日間反復投与毒性試験での曝露量と治療用量を投与時のヒトの曝露量の比較

	DPC 投与量 (mg)	$AUC_{0-\infty}$ (ng•hr/mL)	曝露量比	
			単回投与 [a]	28 回投与 [b]
ヒト [c]	[redacted]	1940	–	–
ラット [d]	[redacted]	1674	0.9 倍	24 倍
	0.3 [e]	2512	1.3 倍	36 倍
イヌ [f]	4	8185	4.2 倍	118 倍
	6 [g]	12277	6.3 倍	177 倍

略語：AUC = 血漿中濃度－時間曲線下面積、NOAEL = 無毒性量

a　曝露量比 = 動物の AUC÷ヒトの AUC

b　曝露量比 = (動物の AUC÷ヒトの AUC) × 28 回投与

c　インスリンで低血糖を誘発した成人 1 型糖尿病患者を対象とした試験（I8R-MC-IGBI 試験）

d　ラットにプラセボ対照［DPC として 0.43 mg/kg（0.129 mg/匹）の用量］を単回点鼻投与後の AUC は 1080 ng•hr/mL であった［報告書 6901466 (4.2.2.2.1)、体重 = 0.3 kg］この数値に基づき、ラットを用いた 28 日間投与毒性試験における推定 AUC を算出した。

e　ラットを用いた 28 日間投与毒性試験［報告書 75263-AMG015G Amendment 01 (4.2.3.2.1)］において、[redacted]mg（点鼻グルカゴン中の DPC 量）及び 0.3 mg（プラセボ対照中の DPC 量）の用量まで全身性の標的器官毒性は見られなかった。これらの用量における推定 AUC は、0.129 mg の用量での AUC（1080 ng•hr/mL）を 0.129 で除した後、[redacted]または 0.3 を乗じて算出した。

f　イヌにプラセボ対照（粉末）［DPC として 0.65 mg/kg（6.5 mg/匹）の用量］を単回経鼻投与後の AUC は 13300 ng•hr/mL であった［報告書 6901467 (4.2.2.2.2)、体重 = 10 kg］この数値に基づき、イヌを用いた 28 日間投与毒性試験における推定 AUC を算出した。

g　イヌを用いた 28 日間投与毒性試験［報告書 65125-AMG014G Amendment 01 (4.2.3.2.3)］において、4 mg（点鼻グルカゴン中の DPC 量）及び 6 mg［プラセボ対照（粉末）中の DPC 量］の用量まで全身性の標的器官毒性は見られなかった。これらの用量における推定 AUC は、6.5 mg の用量での AUC（13300 ng•hr/mL）を 6.5 で除した後、4 または 6 を乗じて算出した。

2.6.6.9.4　結論

点鼻グルカゴンのラット及びイヌを用いた 28 日間反復投与毒性試験を実施した。これらの試験では、AUC に基づくグルカゴンの曝露量比が、ヒトにおける AUC のそれぞれ 5.8 倍（ラット）及び 39 倍（イヌ）となる用量（表 2.6.6-21）まで投与したが、投与期間中の観察項目に毒性所見は見られず、全身性の標的器官毒性も特定されなかった。これらの 28 日間反復投与毒性試験に

おいて、β-CD ではヒトの 31 倍（ラット）及び[redacted]倍（イヌ）、（鼻腔表面積換算用量での比較：表 2.6.6-22）、DPC ではヒトの 36 倍（ラット）及び 177 倍（イヌ）（AUC での比較：表 2.6.6-23）となる用量を投与したが、全身性の標的器官毒性は生じなかった。点鼻グルカゴンの投与により、ラットでは嗅上皮の粘膜固有層に可逆的な炎症及び嗅上皮のびらん／潰瘍が、イヌでは嗅上皮の萎縮／変性が見られ、これらは主にグルカゴンに起因すると考えられた。ラット及びイヌでは嗅上皮が鼻腔の大部分を占めるが、ヒトでは鼻腔における嗅上皮の割合がはるかに小さいことから（Harkema et al. 2006）、ヒトで同様の刺激性が生じる可能性は低いと考える。イヌに点鼻グルカゴンを 20 mg（28 日反復投与毒性試験で嗅上皮の萎縮／変性が生じた用量）を単回投与後の鼻腔局所の変化は軽微な炎症のみであり、嗅上皮の萎縮／変性は見られなかった。DPC 及びβ-CD による鼻腔局所への刺激性はほとんどないと考えられた。

以上、動物において、点鼻グルカゴン、β-CD 及び DPC に関連する全身性の毒性所見は発現しなかった。投与部位である鼻腔局所に組織変化が見られたが、軽度から中等度の変化であった。なお、臨床試験での経鼻投与に関連する有害事象の重症度は、ほとんどが軽度又は中等度であり、発現後 1 日以内に消失した（CTD 第 2.5.6 項）。これらの非臨床試験成績に基づき、ヒトにおける安全性に関して懸念される知見はみられなかった。

2.6.6.10 図表

図表は本文中の適切な場所に記載した。

2.6.6.11 参考文献

Asai K, Morishita M, Katsuta H, Hosoda S, Shinomiya K, Noro M, et al. The effects of water-soluble cyclodextrins on the histological integrity of the rat nasal mucosa. *Int J Pharm*. 2002;246(1-2):25-35.

Barrow PC, Olivier P, Marzin D. The reproductive and developmental toxicity profile of beta- cyclodextrin in rodents. *Reprod Toxicol*. 1995;9(4):389-398.

Eistrup C, Hjortkjaer RK, Pickersgill N, Virgo DM, Woolley AP. Glucagon produced by recombinant DNA technology: repeated dose toxicity studies, intravenous administration to CD rats and beagle dogs for four weeks. *Pharmacol Toxicol*. 1993;73(2)103-108.

[FDA] Food and Drug Administration. Agency Response Letter GRAS Notice No. 74. 2001. Available at: https://www.accessdata.fda.gov/scripts/fdcc/?set=GRASNotices&id=74. Accessed 05 December 2017.

GLUCAGEN® [glucagon (rDNA origin) for injection] [prescribing information]. Bagsvaerd, Denmark: Novo Nordisk A/S; 2015.

GLUCAGON® [glucagon for injection (rDNA origin)] [prescribing information]. Indianapolis, IN: Eli Lilly and Company; 2017.

Harkema JR, Carey SA, Wagner JG. The nose revisited: a brief review of the comparative structure, function, and toxicologic pathology of the nasal epithelium. *Toxicol Pathol*. 2006;34(3):252-269.

Liu DZ, Lecluyse EL, Thakker DR. Dodecylphosphocholine-mediated enhancement of paracellular permeability and cytotoxicity in Caco-2 cell monolayers. *J Pharm Sci.* 1999;88(11):1161-1168.

Ménache MG, Hanna LM, Gross EA, Lou SR, Zinreich SJ, Leopold DA, et al. Upper respiratory tract surface areas and volumes of laboratory animals and humans: considerations for dosimetry models. *J Toxicol Environ Health*. 1997;50(5):475-506.

Merkus FW, Verhoef JC, Marttin E, Romeijn SG, van der Kuy PH, Hermens WA, et al. Cyclodextrins in nasal drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev*. 1999;36(1):41-57.

Moore WMO, Ward BS, Gordon C. Human placental transfer of glucagon. *Clin Sci Mol Med.* 1974;46(1):125-129.

Stella VJ, He Q. Cyclodextrins. *Toxicol Pathol.* 2008;36:30-42.

バクスミー点鼻粉末剤 3mg

2.6.7　毒性試験概要表

日本イーライリリー株式会社

目次

2.6.7 Toxicology Tabulated Summary 1
2.6.7.1 Toxicology: Overview 1
2.6.7.2 Toxicokinetics: Overview of Toxicokinetics Studies 5
2.6.7.3 Toxicokinetics: Overview of Toxicokinetics Data For Nasal Glucagon 6
2.6.7.4 Toxicology: Drug Product 7
2.6.7.5 Single-Dose Toxicity 8
2.6.7.6 Repeat-Dose Toxicity: Nonpivotal Studies 8
2.6.7.7 Repeat-Dose Toxicity 9
2.6.7.7A Repeat-Dose Toxicity: 28-Day Study with a 14-Day Recovery in Sprague-Dawley Rats 9
2.6.7.7B Repeat-Dose Toxicity: 5-Day Study in Beagle Dogs 12
2.6.7.7C Repeat-Dose Toxicity: 28-Day Study with a 14-Day Recovery in Beagle Dogs 13
2.6.7.8 Genotoxicity: In Vitro 16
2.6.7.8A Genotoxicity: In Vitro, Bacterial Mutation 16
2.6.7.8B Genotoxicity: In Vitro, Chromosome Aberration 20
2.6.7.9 Genotoxicity: In Vivo, Micronucleus 21
2.6.7.10 Carcinogenicity 22
2.6.7.11 Reproductive and Developmental Toxicity: Nonpivotal Studies 23
2.6.7.12 Reproductive and Developmental Toxicity: Fertility and Early Embryonic Development 24
2.6.7.13 Reproductive and Developmental Toxicity: Effects on Embryo-Fetal Development 31
2.6.7.13A Reproductive and Developmental Toxicity: Effects on Embryo-Fetal Development in Rat 31
2.6.7.13B Reproductive and Developmental Toxicity: Effects on Embryo-Fetal Development in Rabbit 34
2.6.7.14 Reproductive and Developmental Toxicity: Effects on Pre- and Postnatal Development 37
2.6.7.15 Studies in Juvenile Animals 42
2.6.7.16 Local Tolerance 42
2.6.7.17 Other Toxicity Studies: Drug Product Impurity Qualification, Ocular Irritation, and Intra-Tracheal Insufflation- 43

2.6.7 Toxicology Tabulated Summary

Note: Nasal glucagon (also referred to as NG, glucagon nasal powder, LY900018, intranasal [IN] glucagon, and AMG504-1) contains 3 mg synthetic glucagon + dodecylphosphocholine (DPC) + beta-cyclodextrin (β-CD) in a [redacted] ratio (w/w/w).

2.6.7.1 Toxicology: Overview

Type of Study	Species, Strain	Route	Test Article	Duration of Dosing	Doses	GLP	Testing Facility	Document ID (Location in CTD)
Single-Dose Toxicity								
Not Applicable								
Repeat-Dose Toxicity								
28-Day Repeat-Dose Toxicity with 14-Day Recovery	Rat, SD	IN	Nasal glucagon, DPC, β-CD	28 days	0[a], 0[b], 0.1, 0.2 mg/day as glucagon	Yes	[redacted] CANADA	75263-AMG015G Amendment 01 (4.2.3.2.1)
5-Day Repeat-Dose Toxicity and Distribution	Dog, Beagle	IN	Nasal glucagon, DPC, β-CD	5 days	20 mg/animal	No	[redacted] CANADA	65114-AMG011 (4.2.3.2.2)
28-Day Repeat-Dose Toxicity with 14-Day Recovery	Dog, Beagle	IN	Nasal glucagon, DPC, β-CD	28 days	0 [a], 0 [b], 2.0, 4.0 mg/day as glucagon	Yes	[redacted] CANADA	65125-AMG014G Amendment 01 (4.2.3.2.3)
Genotoxicity								
Bacterial Reverse Mutation	TA98, TA100, TA1535, TA1537, WP2uvrA	In vitro	DPC	48 hours	5 – 5000 µg/plate	Yes	[redacted] CANADA	963846-AMG016C (4.2.3.3.1.1)
Chromosome Aberration	Human Peripheral Blood Lymphocytes	In vitro	DPC	4 and 21 hours	50,100,200, 400, 800 µg/mL	Yes	[redacted] CANADA	963847-AMG017C (4.2.3.3.1.2)
Micronucleus	Rat, SD	IV	DPC	2 days	10, 20, 40 mg/kg	Yes	[redacted] CANADA	963848-AMG019G-DPC (4.2.3.3.2.1)

(continued)

2.6.7.1 Toxicology: Overview (continued)

Type of Study	Species, Strain	Route	Test Article	Duration of Dosing	Doses	GLP	Testing Facility	Document ID (Location in CTD)
Carcinogenicity								
Not Applicable								
Reproductive and Developmental Toxicity								
Fertility and Early Embryonic Development	Rat, SD	IV	DPC	Males: approximately 28 days prior to mating, during mating and until necropsy Females: 14 days prior to mating, during mating and up to GD 7	0, 1.0, 3.0 mg/kg	Yes	[redacted] CANADA	1013-0531-AMG022-DPC (4.2.3.5.1.1)
Embryo-Fetal Pilot	Rat, SD	IV	DPC	GD 6 to 17	0, 1.0, 2.5, 5.0 mg/kg	No	[redacted] CANADA	2013-0541-AMG023G-DPC (4.2.3.5.2.1)
Tolerability	Rat, SD	IV	DPC	4 days	0.9, 4.5 mg/kg	No	[redacted] CANADA	3012-2851-AMG019-DPC (4.2.3.5.2.2)
Tolerability	Rabbit, NZW	IV	DPC	4 days	0.9, 4.5 mg/kg	No	[redacted] CANADA	3012-2864-AMG020-DPC (4.2.3.5.2.3)

(continued)

2.6.7.1 Toxicology: Overview (continued)

Type of Study	Species, Strain	Route	Test Article	Duration of Dosing	Doses	GLP	Testing Facility	Document ID (Location in CTD)
Reproductive and Developmental Toxicity (continued)								
Embryo-Fetal Pilot	Rabbit, NZW	IV	DPC	GD 7 to 20	0, 1.0, 2.5, 5.0 mg/kg	No	[redacted] CANADA	2013-0564-AMG025G-DPC (4.2.3.5.2.4)
Tolerability	Rabbit, NZW	IV	DPC	3 Days	0.5, 1.0 mg/kg	No	[redacted] CANADA	8013-1654-AMG030-DPC (4.2.3.5.2.5)
Tolerability	Rabbit, NZW	IV	DPC	13 Days	0.5, 1.0 mg/kg	No	[redacted] CANADA	8013-1774-AMG031-DPC (4.2.3.5.2.6)
Embryo-Fetal Development	Rat, SD	IV	DPC	GD 6 to 17	0, 1.0, 2.5 mg/kg	Yes	[redacted] CANADA	1013-0551-AMG024G-DPC (4.2.3.5.2.7)
Embryo-Fetal Development	Rabbit, NZW	IV	DPC	GD 7 to 19	0, 0.5, 1.0 mg/kg	Yes	[redacted] CANADA	1013-0574-AMG026G-DPC (4.2.3.5.2.8)
Prenatal and Postnatal Development	Rat, SD	IV	DPC	GD 6 to PPD 20	0, 0.5, 1.0 mg/kg	Yes	[redacted] CANADA	1013-0581-AMG027G-DPC (4.2.3.5.3.1)
Local Tolerance								
See Repeat-Dose Toxicity								

(continued)

2.6.7.1 Toxicology: Overview (concluded)

Type of Study	Species, Strain	Route	Test Article	Duration of Dosing	Doses	GLP	Testing Facility	Document ID (Location in CTD)
Other Toxicity Studies								
Impurities	Rat, SD	IN	Nasal glucagon, DPC, β-CD	14 days	0 [a], 0 [b], 0.1 mg/day as glucagon	Yes	[redacted] CANADA	7300547 (4.2.3.7.6.1)
Ocular Irritation	Rabbit, NZW	Ocular Instillation	Nasal glucagon, DPC, β-CD	1 day	[redacted]mg	Yes	[redacted] CANADA	1013-0594-AMG021G (4.2.3.7.7.1)
Intra-Tracheal Insufflation	Rat, SD	Insufflation	Nasal glucagon, DPC, β-CD	1 day	0.5 mg	Yes	[redacted] CANADA	75310-AMG013G (4.2.3.7.7.2)
Phototoxicity (molar extinction coefficient determination)	NA	NA	DPC	NA	2.87×10^{-4}M	No	Eli Lilly and Company Indianapolis, IN 46250 USA	PRD-04639-TR (4.2.3.7.7.3)

Abbreviations: β-CD = beta-cyclodextrin; DPC = dodecylphosphocholine; GD = gestation day; GLP = Good Laboratory Practice; IN = intranasal; IV = intravenous; NA = not applicable; NZW = New Zealand White; PPD = postpartum day; SD = Sprague Dawley.

[a] Placebo control group

[b] Saline control group

2.6.7.2 Toxicokinetics: Overview of Toxicokinetics Studies

Type of Study	**Species**	**Route**	**Doses (mg/day)**	**GLP**	**Document ID (Location in CTD)**
Repeat-dose, 28 day	Rat	IN	0.1 and 0.2 as glucagon	Yes [a]	75263-AMG015G Amendment 01 (4.2.3.2.1)
Repeat-dose, 28 day	Dog	IN	2.0 and 4.0 as glucagon	Yes [a]	65125-AMG014G Amendment 01 (4.2.3.2.3)

Abbreviations: IN = intranasal; GLP = Good Laboratory Practice; NG = nasal glucagon.

[a] The testing facility of TK analysis/bioanalysis had no experience of regulatory GLP inspection. These TK and bioanalytical reports contain signed GLP Compliance and Quality Assurance statement.

2.6.7.3 Toxicokinetics: Overview of Toxicokinetics Data For Nasal Glucagon

Daily Dose (mg/day)	Steady State C_{max} (pg/mL) and AUC (pg•min/mL)							
	Rat				Dog			
	C_{max}		AUC		C_{max}		AUC	
	M	F	M	F	M	F	M	F
0.1[a]	970	1742	23328	62743				
0.2[a]	3452	2346	59472	60675				
2[b]					9545	8252	299633	273256
4[b]					17534	10036	510712	287139

Abbreviations: AUC = area under the serum concentration-time curve; C_{max} = maximal observed serum concentration; F = female; M = male.

[a] C_{max} and $AUC_{0\text{-}90min}$ at Day 28 (Study 75263-AMG015G Amendment 01).

[b] C_{max} and $AUC_{0\text{-}90min}$ at Day 28 (Study 65125-AMG014G Amendment 01).

2.6.7.4　Toxicology: Drug Product

Drug Product Lot Number	Purity (%)	Specified Impurities (%)					Total Impurities	Document ID (Location in CTD)	Type of Study
		* 不純物A	* 不純物B	* 不純物C	* 不純物D	* 不純物E			
Specification:	[redacted]	**NMT [redacted]%**	**NMT [redacted]%**	**NMT [redacted]%**	**NMT [redacted]%**	**NMT [redacted]%**	**NMT [redacted]%**		
B110308-001[a]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	75263-AMG015G Amendment 01 (4.2.3.2.1)	Repeat-Dose 28 Days Rat
F110315-001 (Finishing Product of B110308-001)[a]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	65125-AMG014G Amendment 01 (4.2.3.2.3)	Repeat-Dose 28 Days Dog
RA8-H81439-037 (heat stressed lot)[b,c]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	7300547 (4.2.3.7.6.1)	Drug Product Impurity Qualification 14 Days Rat
[redacted][d]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	1013-0594-AMG021G (4.2.3.7.7.1)	Ocular Irritation 1 Day Rabbit
[redacted][a]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	75310-AMG013G (4.2.3.7.7.2)	Intra-Tracheal 1 Day Rat

Abbreviations: NA = not applicable; NMT = not more than.

[a] Drug substance lot[redacted] (original [redacted] manufacturing process).

[b] Nasal glucagon drug product used in this study was heat-stressed in a closed glass container with lid at 50◦C for 82 days to increase the level of the total and specified impurities (Notebook References: [redacted]).

[c] Prepared by optimized [redacted] manufacturing process (i.e., commercial manufacturing process).

[d] Drug substance lot[redacted] (original Bachem manufacturing process).

2.6.7.5　Single-Dose Toxicity

Not applicable.

2.6.7.6　Repeat-Dose Toxicity: Nonpivotal Studies

Not applicable.

2.6.7.7　Repeat-Dose Toxicity

2.6.7.7A　Repeat-Dose Toxicity: 28-Day Study with a 14-Day Recovery in Sprague-Dawley Rats

Report title: A 28-Day Intranasal Toxicity Study Followed by a 14-Day Recovery Period in Sprague-Dawley Rats				
Species/strain: Rat/Sprague-Dawley	Duration of dosing: 28 Days		Document ID: 75263-AMG015G Amendment 01 (4.2.3.2.1)	
Initial age: 9–10 weeks	Duration of reversibility: 14 Days		GLP compliance: Yes	
Date of first dose: 22[redacted]20[redacted]	Route: Intranasal		Test Article: Nasal Glucagon	
NOAEL: 0.2 mg glucagon/rat/day	Placebo Control Powder: 15% DPC + 85% β-CD (0.3 mg + 1.7 mg/rat/day) dissolved in 100 mM acetic acid		Saline Control: Phosphate Buffered Saline	
Special features: None				
Composite ± SE Toxicokinetics				
Sample: Serum	Analyte: Glucagon		Number of animals: 3/sex/group/time point	
Feeding condition: Fed	Dose frequency: Daily		Assay/Method Validation ID: RIA/ S0125 (4.2.2.1.1)	
Dose (mg/day):	0.1[a]		0.2[b]	
Sex [c]	M	F	M	F
Toxicokinetics (Day 1)				
C_{max} (pg/mL)	710 ± 425	192 ± 192	3956 ± 2499	15966 ± 12854
$AUC_{0\text{-}90min}$ (pg•min/mL)	9003 ± 5379	7187 ± 4720	82340 ± 31745	263447 ± 144044
T_{max} (min)	10	60	10	10
Toxicokinetics (Day 28)				
C_{max} (pg/mL)	970 ± 767	1742 ± 1732	3452 ± 2983	2346 ± 1230
$AUC_{0\text{-}90min}$ (pg•min/mL)	23328 ± 7901	62743 ± 42207	59472 ± 38190	60675 ± 11014
T_{max} (min)	10	60	20	10

(continued)

2.6.7.7A　Repeat-Dose Toxicity: 28-Day Study with a 14-Day Recovery in Sprague-Dawley Rats (continued)

Daily Dose (mg/day)	0 (Placebo Control)		0 (Saline Control)		0.1[a]		0.2[b]	
Sex: Number of Animals	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10
Sex: Number of Recovery Animals	M: 5[d]	F: 5[d]					M: 5[d]	F: 5[d]
Noteworthy Findings								
Died or euthanized moribund	1[e]	0	0	0	0	0	0	0
Body weight	–	–	–	–	–	–	–	–
Food consumption	–	–	–	–	–	–	–	–
Clinical signs	–	–	–	–	–	–	–	–
Ophthalmology	–	–	–	–	–	–	–	–
Hematology	–	–	–	–	–	–	–	–
Coagulation	–	–	–	–	–	–	–	–
Clinical chemistry	–	–	–	–	–	–	–	–
Urinalysis	–	–	–	–	–	–	–	–

(continued)

2.6.7.7A　Repeat-Dose Toxicity: 28-Day Study with a 14-Day Recovery in Sprague-Dawley Rats (concluded)

Daily Dose (mg/day)	0 (Placebo Control)		0 (Saline Control)		0.1[a]		0.2[b]	
Sex: Number of Animals	M: 9	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10
Sex: Number of Recovery Animals	M: 5[d]	F: 5[d]					M: 5[d]	F: 5[d]
Gross pathology	–	–	–	–	–	–	–	–
Organ weight	–	–	–	–	–	–	–	–
Histopathology (n[f])								
Nasal Cavity								
Erosion/ulceration-olfactory epithelium								
Mild	0	0	0	0	0	0	1	1
Moderate	0	0	0	0	0	0	1	2
Inflammation-lamina propria-olfactory epithelium at the dorsal turbinates								
Minimal	0	0	0	0	0	0	1	0
Mild	0	0	0	0	0	0	1	2

Abbreviations: – = no important findings; $AUC_{0\text{-}90min}$ = area under the serum concentration-time curve from time 0 to 90 minutes postdose; β-CD = beta-cyclodextrin; C_{max} = maximum serum concentration; DPC = dodecylphosphocholine; F = female; GLP = Good Laboratory Practice; M = male; NOAEL = no-observed-adverse effect level; RIA = radio-immunoassay; SE = standard error; T_{max} = time to maximum concentration.

[a] 0.1 mg glucagon +[redacted]mg DPC +[redacted]mg β-CD/rat/day.

[b] 0.2 mg glucagon +[redacted]mg DPC +[redacted]mg β-CD/rat/day.

[c] n=3/sex/treatment group. Data are from a composite analysis from sparse sampling to enable a complete serum profile in the rat.

[d] Following 14 days of recovery, no organ weight change or macroscopic and microscopic changes were observed in the Placebo Control or 0.2 mg/day treated animals demonstrating reversibility of the findings noted at the end of the treatment phase.

[e] This animals death was most likely due to physical trauma of uncertain causation.

[f] Number of animals or tissues.

2.6.7.7B　Repeat-Dose Toxicity: 5-Day Study in Beagle Dogs

Report title: Preliminary Evaluation of the Effect of Intranasally Administered DPC Powder on Nasopharyngeal Mucosa and the Distribution of Intranasally Administered Glucagon Powder Following Dosing Using a Unit Dose Powder Device in Beagle Dogs		
Species/strain: Dogs/Beagle	Duration of dosing: 5 Days	Document ID: 65114-AMG011 (4.2.3.2.2)
Initial age: 11–12 months	Duration of reversibility: NA	GLP compliance: No
Date of first dose: [redacted]20[redacted]	Route: Intranasal	Test Articles: DPC and Nasal Glucagon[a] powders
Special features: None		

Daily Dose (mg/day)	DPC (Days 1-5) = 4[b] Glucagon (Day 5) = 20[b]		DPC (Days 1-5) = 10[b] Glucagon (Day 5) = 20[b]					
Sex: Number of Animals	M: 1		M: 1					
Noteworthy Findings								
Died or euthanized moribund	–		–					
Clinical signs	–		–					
Gross pathology[c, d, e]	–		–					
Histopathology[c, d]	–		–					

Abbreviations: – = no important findings; DPC = dodecylphosphocholine; GLP = Good Laboratory Practice; M = male; NA = not applicable; NE = not evaluated.

[a] Glucagon powder contains glucagon, DPC and beta-cyclodextrin plus dye.

[b] Animals received DPC in the left nostril on Days 1–5 and then Glucagon powder on Day 5 in the right nostril 2 or more hours after their last DPC powder dose.

[c] Minimal inflammation and mild accumulation of basophilic material was noted in the nasal cavity of both animals.

[d] Only animal identification, esophagus, nasopharynx, nasal passage, frontal sinus, lungs, trachea, and abnormal findings were retained and of those, only esophagus, nasopharynx, nasal passage, and abnormal findings were examined.

[e] Blue powdered dye was present in the nasal passages, the nasopharynx, and the stomach for both animals and also in the esophagus and on the tongue for animal #1002. There was no evidence of dye in the larynx or trachea indicating powder did not go to the lung.

2.6.7.7C　Repeat-Dose Toxicity: 28-Day Study with a 14-Day Recovery in Beagle Dogs

Report title: A 28-Day Intranasal Toxicity Study Followed by a 14-Day Recovery Period in Beagle Dogs		
Species/strain: Dog/Beagle	Duration of dosing: 28 Days	Document ID: 65125-AMG014G Amendment 01 (4.2.3.2.3)
Initial age: 6–7 months	Duration of reversibility: 13 Days	GLP compliance: Yes
Date of first dose: [redacted]20[redacted]	Route: Intranasal	Test Article: Nasal Glucagon
NOAEL: 4.0 mg/dog/day	Placebo Control Powder: 15% DPC + 85% β-CD (6 mg + 34 mg/dog/day)	Saline Control: 0.9% sodium chloride for injection USP
Special features: None		

Mean ± SE Toxicokinetics				
Sample: Serum	Analyte: Glucagon		Number of animals: 3/sex/group	
Feeding condition: Fed	Dose frequency: Daily		Assay/Method Validation ID: RIA/S0124 (4.2.2.1.2)	
Dose (mg/day):	2.0[a]		4.0[b]	
Sex	M	F	M	F
Toxicokinetics (Day 1)				
C_{max} (pg/mL)	7161 ± 1450	7236 ± 828	8693 ± 2346	7037 ± 2481
$AUC_{0\text{-}90min}$ (pg•min/mL)	223543 ± 22495	272208 ± 51413	226674 ± 38132	178888 ± 61957
T_{max} (min)	16.7 ± 3.33	10.0 ± 0.00	11.7 ± 4.41	10.0 ± 0.00
Toxicokinetics (Day 28)				
C_{max} (pg/mL)	9545 ± 2045	8252 ± 1630	17534 ± 5381	10036 ± 2368
$AUC_{0\text{-}90min}$ (pg•min/mL)	299633 ± 90168	273256 ± 43152	510712 ± 162997	287139 ± 78119
T_{max} (min)	8.33 ± 1.67	10.0 ± 0.00	11.7 ± 4.41	11.7 ± 4.41

(continued)

2.6.7.7C　Repeat-Dose Toxicity: 28-Day Study with a 14-Day Recovery in Beagle Dogs (continued)

Daily Dose (mg/day)	0 (Placebo Control)		0 (Saline Control)		2.0[a]		4.0[b]	
Sex: Number of Animals	M: 3	F: 3	M: 3	F: 3	M: 3	F: 3	M: 3	F: 3
Sex: Number of Recovery Animals	M: 2[c]	F: 2[c]					M: 2[c]	F: 2[c]
Noteworthy Findings								
Died or euthanized moribund	–	–	–	–	–	–	–	–
Body weight	–	–	–	–	–	–	–	–
Food consumption	–	–	–	–	–	–	–	–
Clinical signs [d]	–	–	–	–	–	–	–	–
Ophthalmology	–	–	–	–	–	–	–	–
Electocardiography	–	–	–	–	–	–	–	–
Hematology	–	–	–	–	–	–	–	–
Coagulation	–	–	–	–	–	–	–	–
Clinical chemistry	–	–	–	–	–	–	–	–
Urinalysis	–	–	–	–	–	–	–	–

(continued)

2.6.7.7C　Repeat-Dose Toxicity: 28-Day Study with a 14-Day Recovery in Beagle Dogs (concluded)

Daily Dose (mg/day)	0 (Placebo Control)		0 (Saline Control)		2.0[a]		4.0[b]	
Sex: Number of Animals	M: 3	F: 3	M: 3	F: 3	M: 3	F: 3	M: 3	F: 3
Sex: Number of Recovery Animals	M: 2[c]	F: 2[c]					M: 2[c]	F: 2[c]
Gross pathology	–	–	–	–	–	–	–	–
Organ weight	–	–	–	–	–	–	–	–
Histopathology (n[e])								
Nasal Cavity								
Atrophy/degeneration – olfactory epithelium								
Minimal	1	1	0	0	2	3	3	1
Mild	0	0	0	0	1	0	0	0
Moderate	0	0	0	0	0	0	0	2

Abbreviations: – = no important findings; $AUC_{0\text{-}90min}$ = area under the serum concentration-time curve from time 0 to 90 minutes postdose; β-CD = beta-cyclodextrin; C_{max} = maximum serum concentration; DPC = dodecylphosphocholine; F = female; GLP = Good Laboratory Practice; M = male; NOAEL = no-observed-adverse effect level; RIA = Radio-immunoassay; T_{max} = time to maximum concentration.

[a] 2 mg glucagon +[redacted]mg DPC +[redacted]mg β-CD/dog/day.

[b] 4 mg glucagon + 4 mg DPC + 32 mg β-CD/dog/day

[c] Following 14 days of recovery, no treatment-related macroscopic and microscopic changes were observed in the Placebo Control or 4.0 mg/day treated animals demonstrating reversibility of the findings noted at the end of the treatment phase.

[d] Immediately following IN dosing, most dogs exhibited transient salivation and some sneezing. However, these effects did not affect the overall health of the dogs; thus, these findings were not considered to be adverse.

[e] Number of animals or tissues.

2.6.7.8 Genotoxicity: In Vitro

2.6.7.8A Genotoxicity: In Vitro, Bacterial Mutation

Report Title: Dodecylphosphocholine Bacterial Reverse Mutation Test in *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*		
Test for Induction of: Reverse Mutations (Ames)	**Number of Independent Assays:** 1	**Test Article:** DPC
Strains: *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*	**Number of Replicate Cultures:** 3	Document ID: 963846-AMG016C (4.2.3.3.1.1)
Metabolizing System: phenobarbital/5, 6-benzoflavone-induced rat liver S9	**No. of Cells Analyzed/Cultured:** NA	**GLP Compliance:** Yes
Treatment: Plate incorporation and Pre-Incubation		**Date of Treatment:** [redacted]20[redacted]
Vehicles: Test Article: 0.9% Sodium Chloride Injection USP (Saline) **Positive Controls:** DMSO (2NF, NQO, 2AA, BaP), Saline (NaAz, 9AC)		
Cytotoxic Effects: Yes		
Genotoxic Effects: None		

Treatment Plate Incorporation	**Concentration (μg/plate)**	**Revertant Colony Counts (Mean ± SD) Strain**				
		TA98	**TA100**	**TA1535**	**TA1537**	**WP2*uvr*A**
Without Metabolic Activation						
Vehicle	saline	27 ± 10	187 ± 3	16 ± 1	14 ± 3	53 ± 3
DPC	15.8	NT	163 ± 14	NT	NT	NT
	50	36 ± 3	166 ± 26	18 ± 2	19 ± 4	35 ± 8
	158	33 ± 3	176 ± 12	17 ± 5	16 ± 1	60 ± 12
	500	38 ± 9	154 ± 37	21 ± 7	19 ± 3	57 ± 4
	1581	37 ± 10	121 ± 4	22 ± 3	13 ± 2	58 ± 5
	5000	25 ± 6	IL, T	18 ± 4	14 ± 5	47 ± 6
NaAz	0.5	NT	538±14	302±9	NT	NT
9AC	50	NT	NT	NT	256±55	NT
2NF	1	210 ± 11	NT	NT	NT	NT
NQO	0.5	NT	NT	NT	NT	171 ± 9

(continued)

2.6.7.8A　Genotoxicity: In Vitro, Bacterial Mutation (continued)

Treatment Plate Incorporation	Concentration (μg/plate)	Revertant Colony Counts (Mean ± SD) Strain				
		TA98	TA100	TA1535	TA1537	WP2*uvr*A
With Metabolic Activation						
Vehicle	saline	39 ± 6	145 ± 5	27 ± 7	18 ± 2	61 ± 7
DPC	15.8	NT	132 ± 6	NT	NT	NT
	50	51 ± 8	119 ± 21	20 ± 4	17 ± 4	41 ± 10
	158	49 ± 9	200 ± 18	23 ± 2	18 ± 2	60 ± 5
	500	48 ± 7	199 ± 8	18 ± 7	17 ± 4	61 ± 1
	1581	51 ± 6	150 ± 16	23 ± 7	17 ± 3	69 ± 9
	5000	27 ± 5	49 ± 11 T	21 ± 4	22 ± 5	51 ± 19
2AA	5	NT	NT	368 ± 7	NT	NT
2AA	15	NT	NT	NT	NT	256 ± 26
BaP	5	351 ± 14	1065 ± 26	NT	92 ± 6	NT

(continued)

2.6.7.8A　Genotoxicity: In Vitro, Bacterial Mutation (continued)

Treatment Pre-Incubation	Concentration (μg/plate)	Revertant Colony Counts (Mean ± SD) Strain				
		TA98	**TA100**	**TA1535**	**TA1537**	**WP2*uvr*A**
Without Metabolic Activation						
Vehicle[a]	saline	27 ± 10	187 ± 3	16 ± 1	14 ± 3	53 ± 5
DPC	5.0	NT	154 ± 11	NT	11 ± 2	NT
	15.8	NT	157 ± 30	NT	12 ± 4	NT
	50	40 ± 5	157 ± 8	25 ± 3	12 ± 4	44 ± 4
	158	33 ± 3	117 ± 13	21 ± 6	9 ± 2	52 ± 8
	500	24 ± 1	111 ± 13	21 ± 6	9 ± 2	51 ±2
	1581	28 ± 2	IL, T	11 ± 3	IL, T	48 ± 14
	5000	34 ± 2	NL, IL, T	13 ± 2	IL, T	34 ± 10
NaAz	0.5	NT	563±34	302±9	NT	NT
9AC	1.5	NT	NT	NT	451±58	NT
2NF	1	218 ± 2	NT	NT	NT	NT
NQO	0.5	NT	NT	NT	NT	1236 ± 61

(continued)

2.6.7.8A　Genotoxicity: In Vitro, Bacterial Mutation (concluded)

Treatment Pre-Incubation	Concentration (μg/plate)	Revertant Colony Counts (Mean ± SD) Strain				
		TA98	**TA100**	**TA1535**	**TA1537**	**WP2*uvr*A**
With Metabolic Activation						
Vehicle[a]	saline	39 ± 6	145 ± 5	27 ± 7	18 ± 2	61 ± 7
DPC	15.8	NT	180 ± 3	21 ± 11	NT	NT
	50	46 ± 5	148 ± 27	19 ± 2	15 ± 7	64 ± 5
	158	44 ± 4	183 ± 11	16 ± 4	22 ± 5	68 ± 1[b]
	500	45 ± 10	139 ± 6	20 ± 6	21 ± 2	54 ± 5
	1581	46 ± 7	112 ± 11	18 ± 5	23 ± 5	66 ± 5
	5000	27 ± 8	31 ± 6 T	14 ± 5 T	21 ± 2	51 ± 6
2AA	5	NT	NT	377±17	NT	NT
2AA	15	NT	NT	NT	NT	326±24
BaP	5	249±13	998±21	NT	891±13	NT

Abbreviations: BaP = benzo[a]pyrene; DMSO = dimethyl sulfoxide; DPC = dodecylphosphocholine; GLP = Good Laboratory Practice; IL = incomplete lawn; NA = not applicable; NaAz = sodium axide; NL = no lawn; NQO = 4-nitroquinoline n-oxide; NT = not tested; SD = standard deviation; T = toxic as indicated by incomplete lawn (no meaningful count results for plates with IL); 2AA = 2-aminoanthracene; 2NF = 2-nitrofluorene; 9AC = 9-aminoacridine.

[a] Due to a technical oversight, no control with saline was dosed in the pre-incubation method. Therefore, controls from plate-incorporation method were used for fold response calculation and comparison.

[b] Based on 2 plate counts.

2.6.7.8B　Genotoxicity: In Vitro, Chromosome Aberration

Report Title: Dodecylphosphocholine In Vitro Mammalian Chromosome Aberration Test in Human Peripheral Blood Lymphocytes		**Test Article:** DPC
Test for Induction of: Chromosome aberrations	**Number of Independent Assays:** 3	Document ID: 963847-AMG017C (4.2.3.3.1.2)
Cell Type: Human Peripheral Blood Lymphocytes	**Number of Replicate Cultures:** 2	
Metabolizing System: phenobarbital/5, 6-benzoflavone-induced rat liver S9	**Number of Cells Analyzed/Culture:** 100	**GLP Compliance:** Yes
		Date of Treatment: [redacted]20[redacted]
Vehicles: **Test Article**: 0.9% Sodium Chloride Injection, USP **Positive Controls**: Purified water (Sterile Water for Irrigation USP)		
Treatment: Continuous 21 hour without S9; 4 hour treatment and recovery time 21 hour with and without S9.		
Cytotoxic Effects: Yes		
Genotoxic Effects: None		

Metabolic Activation/ Treatment	Test Article	Concentration (μg/mL)	Total Cells Analyzed	RMI (%)	% Aberrant	Chromatid gap (Number of cells)
No/ 4 hour treatment 21 hour recovery	Saline	50 μL/mL	200	100	0.5	1
	DPC	100	200	90	0.5	0
		200	200	77	2.0	4
		400	200	57	1.5	3
		800	NA	0	NA	NA
	Mitomycin C	0.10	200	90	12.0**	5
Yes/ 4 hour treatment 21 hour recovery	Saline	50 μL/mL	200	100	0.5	1
	DPC	100	200	128	0.0	2
		200	200	106	1.0	1
		400	200	57	1.0	8
		800	NA	0	NA	NA
	CP	8	200	45	28.0**	9
No/ 21 hour treatment 0 hour recovery	Saline	50 μL/mL	200	100	0.5	3
	DPC	50	200	131	1.5	7
		100	200	93	1.0	6
		200	200	57	1.5	5
		400	NA	2	NA	NA
	Mitomycin C	0.05	200	86	11.5**	5

Abbreviations: CP = cyclophosphamide; DPC = dodecylphosphocholine; GLP = Good Laboratory Practice; NA = not assessable (insufficient cells available due to toxicity); RMI = relative mitotic index (vehicle = 100%).
Results of statistical analysis using one-tailed Fisher's exact test: **p ≤ 0.001 (highly significant); otherwise, p > 0.01 (not significant).

2.6.7.9 Genotoxicity: In Vivo, Micronucleus

Report Title: Dodecylphosphocholine Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test in Rat Bone Marrow		**Test Article:** DPC
Test for Induction of: Bone marrow micronuclei	**Treatment Schedule:** single dose	Document ID: 963848-AMG019G-DPC (4.2.3.3.2.1)
Species/Strain: Rat/Sprague-Dawley (SD)	**Sampling Time:** 24 and 48 hours	**GLP Compliance:** Yes
Age: 7–9 weeks	**Number of Cells Analyzed/Animal:** 2000	**Date of Treatment:** [redacted]
Method of Administration: Intravenous	**Cells Evaluated:** Immature erythrocytes	
Vehicle/Formulation: **Test Article:** 0.9% Sodium Chloride for Injection, USP **Positive Control:** Ultra pure water		
Toxic/Cytotoxic Effects: Yes		
Genotoxic Effects: None		

Treatment	Dose (mg/kg/day)	Number of Animals/Sex	Harvest Time (Hour)	% IE/(IE+ME) Males	% IE/(IE+ME) Females	% IE/(IE+ME) Males & Females	Incidence MIE Males	Incidence MIE Females	Incidence MIE Males & Females	Incidence MME Males & Females
Vehicle	10 mL/kg	5	24	49.8	48.2	49.0	1.0	3.0	2.0	0.7
		5	48	47.8	45.1	46.4	2.0	2.0	2.0	0.0
DPC	10	5	24	45.1	49.1	47.1	2.2	2.6	2.4	0.0
	20	5	24	49.1	45.3	47.2	3.4	1.6	2.5	0.0
	40	5	24	41.5	48.7	45.1	1.8	0.4	1.1	0.7
		5	48	42.5	46.8	44.6	1.8	2.0	1.9	0.3
CP	20	3	24	38.7	35.9	37.3	45.3	24.3	34.8	0.5

Abbreviations: %IE/(IE+ME) = proportion of immature erythrocytes; CP = cyclophosphamide; DPC = dodecylphosphocholine; GLP = Good Laboratory Practice; MIE = number of micronucleated cells observed per 2000 immature erythrocytes examined; MME = number of micronucleated mature erythrocytes observed (mean value expressed per 2000 mature erythrocytes examined).

2.6.7.10　Carcinogenicity

Not applicable.

2.6.7.11 Reproductive and Developmental Toxicity: Nonpivotal Studies

Species Strain	**Route**[a]	**Dosing Period**[b]	**Doses (mg/kg)**	**Sex #/Group**	**Noteworthy Findings**	**Document ID (Location in CTD)**
Rat/SD	IV	GD 6 through17	0, 1.0, 2.5, 5.0	F/6	5 mg/kg: adverse effects at the dosing sites resulted in the cessation of dosing from GD 12 for all animals. Adverse decreases in FC, mean BW, and BWG. 2.5 mg/kg: ↓ BWG, ↓BW, ↓FC.	2013-0541-AMG023G-DPC (4.2.3.5.2.1)
Rat/SD	IV	4 Days	0.9, 4.5	F/3	≤ 4.5 mg/kg: no adverse findings.	3012-2851-AMG019-DPC (4.2.3.5.2.2)
Rabbit/NZW	IV	4 Days	0.9, 4.5	F/2	≥ 0.9 mg/kg: clinical signs at the injection sites of bluish skin discoloration and skin swelling.	3012-2864-AMG020-DPC (4.2.3.5.2.3)
Rabbit/NZW	IV	GD 7 through 19	0, 1.0, 2.5, 5.0	F/6	≥ 1 mg/kg: adverse effects at dosing sites resulted in the cessation of dosing from GD 11 for all animals.	2013-0564-AMG025G-DPC (4.2.3.5.2.4)
Rabbit/NZW	IV	3 Days	0.5, 1.0	F/1	≥ 0.5 mg/kg: clinical signs at the injection sites of bluish skin discoloration and skin swelling.	8013-1654-AMG030-DPC (4.2.3.5.2.5)
Rabbit/NZW	IV	13 Days	0.5, 1.0	0.5 mg/kg: M/1 and F/2 1.0 mg/kg: M/2 and F/1	≥ 0.5 mg/kg: clinical signs at the injection sites of bluish skin discoloration and skin swelling; ↓FC.	8013-1774-AMG031-DPC (4.2.3.5.2.6)

Abbreviation: ↓ = decreased; # = number; BW = body weight; BWG = body weight gain; F = female; FC = food consumption; IV = intravenous; GD = gestation day; M = male; NZW = New Zealand White; SD = Sprague Dawley.

[a] Vehicle = 0.9 % Sodium Chloride for Injection USP.

[b] Test material = Dodecylphosphocholine.

2.6.7.12　Reproductive and Developmental Toxicity: Fertility and Early Embryonic Development

Report title: Dodecylphosphocholine: An Intravenous Fertility Study in Male and Female Sprague-Dawley Rats		
Design similar to ICH4.1.1: Yes	Duration of dosing for males: approximately 28 days prior to mating, during mating and until necropsy Duration of dosing for females: 14 days prior to mating, during mating and through Gestation Day 7	Document ID: 1013-0531-AMG022-DPC (4.2.3.5.1.1)
Species/strain: Rat/Crl:CD(SD)	Day of mating: Gestation Day 0	GLP compliance: Yes
Initial age: Males 11 weeks Females 10 weeks	Day of C-section: Gestation Day 13 (14 or 15 when necessary)	Test Article: DPC
Date of first dose:[redacted]20[redacted]	Route: Intravenous	
Vehicle: 0.9 % Sodium Chloride for Injection USP		
Special features: None		
NOAEL:		
	F_0 general toxicity for males and females: 1 mg/kg	
	F_0 male and female reproductive performance: 3 mg/kg	
	F_1 early embryonic development: 3 mg/kg	

(continued)

2.6.7.12 Reproductive and Developmental Toxicity: Fertility and Early Embryonic Development (continued)

	Daily Dose (mg/kg)	0 (Control)	1	3
Males	Number evaluated	24	24	24
	Number died or euthanized moribund	0	0	0
	Clinical observations (n[a])[b]			
	Hypersensitive	0	0	8
	Skin Black	0	0	20
	Skin Wound	0	0	19
	Skin Flaking	0	0	5
	Skin Green	0	0	7
	Skin Pale	0	0	2
	Skin Blue	2	17	24
	Skin Wound with Discharge	0	0	18
	Tail Partly Missing	0	0	14
	Swelling Firm	0	1	17
	Swelling Soft	1	1	24

(continued)

2.6.7.12 Reproductive and Developmental Toxicity: Fertility and Early Embryonic Development (continued)

	Daily Dose (mg/kg)	0 (Control)	1	3
Males (continued)	Body weight gain, g (% change[c])			
	Body weight gain Days 1-8	49	0.0	↓2.0
	Body weight gain Days 8-15	36	0.0	↓25.0
	Body weight gain Days 15-22	32	↓21.9	↓59.4
	Body weight gain Days 22-29	23	↓17.4	↓65.2
	Body weight gain, Days 29-36	24	↓8.3	↓33.3
	Body weight gain Days 36-43	25	0.0	↓36.0
	Body weight gain Days 43-50	22	↑4.5	0.0
	Food consumption, g/rat/day (% change[c])			
	Food consumption Days 1-8	35.8	0.0	↑3.6
	Food consumption Days 8-15	35.8	↓2.2	↓7.5
	Food consumption Days 15-22	35.2	↓3.1	↓12.2**
	Food consumption Days 22-28	34.8	↓4.0	↓14.4**
	Food consumption Days 49-56	35.7	↓2.2	↓9.8*
	Mean number of days prior to mating	3	3	3
	Number of males placed for mating	24	24	24
	Number of males mated	20	21	21
	Number of males producing pregnancy	20	19	20
	Necropsy observations			
	Injection site			
	Dark area/discoloration	0	2	15
	Scab/wound/dry/swelling	0	4	23
	Sperm motility (% mobile)	82.5	84.7	87.3
	Sperm count (total)	121	115	113
	Sperm concentration (millions/gram of epididymis)	406.6	417.0	412.4
	Sperm morphology	–	–	–

(continued)

2.6.7.12 Reproductive and Developmental Toxicity: Fertility and Early Embryonic Development (continued)

	Daily Dose (mg/kg)	0 (Control)	1	3
Males (continued)	Organ weight relative to final BW (% change[c])			
	Testes, lt	0.3068	↑7.2	↑11.3*
	Testes, rt	0.3067	↑6.9	↑11.7*
	Epididymis, lt	0.1069	↑2.4	↑12.3**
	Epididymis, rt	0.1093	↑4.9	↑12.4**
	Prostate, seminal vesicles	0.5328	↑0.4	↑12.3*

(continued)

2.6.7.12 Reproductive and Developmental Toxicity: Fertility and Early Embryonic Development (continued)

	Daily Dose (mg/kg)	0 (Control)	1	3
Males (continued)	Histopathological examinations of testes, rt (n[a])			
	Atrophy/hypoplasia, tubuli			
	Minimal	2	NE	2
	Marked	1	NE	0
Females	Number evaluated	24	24	24
	Number died or euthanized moribund	0	0	0
	Clinical observations (n[a])			
	Material Liquid Red	0	0	23
	Skin Dry	2	5	10
	Skin Blue	0	0	9
	Skin Red	10	16	18
	Skin Scab	3	12	14
	Swelling Soft	0	0	2
	Clinical Observations during Gestation (n[a])			
	Skin Black	0	0	3
	Skin Dry	14	21	23
	Skin Blue	0	1	14
	Skin Red	17	18	24
	Skin Scab	17	20	22
	Swelling Firm	0	0	3
	Swelling Soft	0	0	21
	Tail Partly Missing	0	0	2
	Body weight gain, g (% change[c])			
	Premating Days 1-11	16	0.0	↓18.8
	Gestation Days 0-4	23	↓8.7	↓21.7*
	Gestation Days 4-7	13	↓7.7	↓15.4
	Gestation Days 7-10	19	↓5.3	↓5.3
	Gestation Days 10-13	20	↑20.0*	↑10.0

(continued)

2.6.7.12 Reproductive and Developmental Toxicity: Fertility and Early Embryonic Development (concluded)

	Daily Dose (mg/kg)	0 (Control)	1	3
Females (continued)	Food consumption, g/rat/day (% change[c])			
	Premating Days 1-8	24.3	↓1.6	↓5.8
	Premating Days 8-14	24.1	↓0.8	↓3.7
	Gestation Days 0-4	27.6	↓1.8	↓5.8
	Gestation Days 4-7	30.3	↓0.7	↓8.3
	Gestation Days 7-10	33.4	↓2.7	↓7.8
	Gestation Days 10-13	33.4	↑1.2	↓2.1
	Necropsy observations			
	Injection site			
	Dark area/discoloration	0	0	3
	Scab/wound/dry/swelling	0	0	5
	Average Cycle Length during Treatment (days)	4.1	4.2	4.1
	Number of mating females	24	24	24
	Number of pregnant females	24	22	23
	Organ weight relative to BW (% change[c])			
	Ovary, lt	0.0151	↓2.0	0.0
	Ovary, rt	0.0152	↑5.3	↑3.3
	Mating index (%)	83.3	87.5	87.5
	Fertility index (%)	83.3	79.2	83.3
	Conception rate (%)	100.0	91.7	95.8
	Number of Live embryos	15	15	15
	Number of early resorptions	1	1	1
	Number of dead embryos	0	0	0
	Sum of early resorptions and dead embryos	1	1	1
	Mean number corpora lutea/dam	18	17	17
	Mean number implantation/dam	16	16	16
	Mean preimplantation loss (%)	10.2	7.4	6.7
	Mean postimplantation loss (%)	6.0	8.8	7.5

Abbreviations: ↑ = increase; ↓ = decrease; – = no important findings; DPC = dodecylphosphocholine; GLP = Good Laboratory Practice;.NE = not evaluated; NOAEL = no-observed-adverse-effect level.

[a] Number of animals or tissues.

[b] Test article-related clinical signs were observed at the dosing sites (tail) that included but not limited to pale/blue/black skin that at times progressed to swelling, scabs and/or wounds and hypersensitivity from Day 2 onwards on a majority of animals in the 3 mg/kg group with more severity in males and the 3 mg/kg group.

[c] For controls, group means are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown. Statistical significance based on actual data (not on the percent differences).*p≤0.05, **p≤0.01 (Dunnett's test).

2.6.7.13　Reproductive and Developmental Toxicity: Effects on Embryo-Fetal Development
2.6.7.13A Reproductive and Developmental Toxicity: Effects on Embryo-Fetal Development in Rat

Report title: Dodecylphosphocholine: An Intravenous Embryo-Fetal Developmental Toxicity Study in Sprague-Dawley Rats			
Design similar to ICH4.1.3: Yes	Duration of dosing: Gestation Day 6 through Gestation Day 17	Document ID: 1013-0551-AMG024G-DPC (4.2.3.5.2.7)	
Species/strain: Rat/Sprague-Dawley	Day of mating: Gestation Day 0	GLP compliance: Yes	
Initial age: 10–12 weeks	Day of C-section: Gestation Day 21	Test Article: DPC	
Date of first dose: [redacted]20[redacted]	Route: Intravenous		
Vehicle: 0.9% Sodium Chloride for Injection USP			
Special features: None			
No-observed-adverse-effect level:			
F_0 maternal toxicity: 2.5 mg/kg			
F_1 embryo/fetal development: 2.5 mg/kg			

	Daily Dose (mg/kg)	0 (Control)	1	2.5
Dams	Number pregnant	24	24	24
	Number died or euthanized moribund	0	0	0
	Number aborted or with total resorption of litter	0	0	0
	Clinical observations (n[a])			
	Fur Thin	3	9	10
	Material Liquid Green	0	0	2
	Material Liquid Red	1	0	12
	Skin Wound	0	0	4
	Skin Black	0	0	3
	Skin Dry	12	16	22
	Skin Red	14	19	24
	Skin Scab	5	9	20
	Skin Blue	0	1	14
	Swelling Firm	0	0	4
	Skin Wound with Discharge	0	0	2
	Tail Partly Missing	0	0	2

(continued)

2.6.7.13A　Reproductive and Developmental Toxicity: Effects on Embryo-Fetal Development in Rat (continued)

	Daily Dose (mg/kg)	0 (Control)	1	2.5
Dams (continued)	Necropsy observations Injection Sites Tail: Scab black, scab red, swelling subcutis, dark discoloration and/or wound red	0	0	10
	Body weight gain, g (% change[b])			
	Gestation Days 6-9	15	0.0	0.0
	Gestation Days 9-12	16	↑12.5	↑12.5
	Gestation Days 12-15	18	↓5.6	↑5.6
	Gestation Days 15-18	36	↑5.6	↓8.3
	Gestation Days 18-21	54	↓3.7	↓3.7
	Food consumption, g/rat/day (% change[b])			
	Gestation Day 6-9	26.9	↓1.1	↑2.2
	Gestation Days 9-12	28.1	↓1.8	↑2.1
	Gestation Days 12-15	28.5	↓0.7	↑13.0
	Gestation Days 15-18	32.0	↓2.5	↓3.1
	Gestation Days 18-21	30.4	↑1.0	↑0.7

(continued)

2.6.7.13A　Reproductive and Developmental Toxicity: Effects on Embryo-Fetal Development in Rat (concluded)

	Daily Dose (mg/kg)	0 (Control)	1	2.5
Dams	Mean number corpora lutea/dam	16	16	17
	Mean number implantations/dam	14	14	13
	Gravid uterus weights, g	105	106	107
(concluded)	Pregnancy rate (%)	100	100	100
Litters	Number of litters evaluated	24	24	24
	Number of in utero deaths/litter (early)	1	1	0
	Number of in utero deaths/litter (late)	0	0	0
	Number of live fetuses/litter	13	13	13
	Preimplantation Loss (%)	11.4	13.5	18.5
	Postimplantation Loss (%)	4.9	6.1	2.4
	Fetal weight (g, gender combined)	6.0	6.0	6.0
	Fetal sex ratios (% male)	50.3	52.6	49.3
	Fetal anomalies (number of fetuses [litters] examined)	314 [24]	312 [24]	315 [24]
	External anomalies	-	-	-
	Visceral anomalies			
	Liver, dark discoloration	1 [1]	4 [3]	5 [5]
	Ureter, dilated	1 [1]	7 [5]	4 [4]
	Skeletal anomalies			
	Femur, incomplete ossification	5 [3]	16 [11]*	13 [8]

Abbreviations: ↑ = increase; ↓ = decrease; DPC = dodecylphosphocholine; GLP = Good Laboratory Practice.

[a] Number of animals.

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

*p≤0.05 (Fisher's exact test).

2.6.7.13B Reproductive and Developmental Toxicity: Effects on Embryo-Fetal Development in Rabbit

Report title: Dodecylphosphocholine: An Intravenous Embryo-Fetal Developmental Toxicity Study in New Zealand White Rabbits				
Design similar to ICH4.1.3: Yes		Duration of dosing: Gestation Day 7 through Gestation Day 19		Document ID: 1013-0574-AMG026G-DPC (4.2.3.5.2.8)
Species/strain: Rabbit/NZW		Day of mating: Gestation Day 0		GLP compliance: Yes
Initial age: 5–6 Months		Day of C-section: Gestation Day 29		Test Article: DPC
Date of first dose: [redacted]20[redacted]		Route: Intravenous		
Vehicle: 0.9% Sodium Chloride for Injection USP				
Special features: None				
No-observed-adverse-effect level:				
	F_0 maternal toxicity: 1 mg/kg			
	F_1 embryo/fetal development: 1 mg/kg			

	Daily Dose (mg/kg)	0 (Control)	0.5	1
Dams	Number pregnant	21	20	22
	Number died or euthanized moribund	0	0	0
	Number aborted or with total resorption of litter	1	1	0
	Clinical observations (n[a])			
	Discoloration: Marginal Vein Blue from Injection Site	0	2	20
	Skin Blue	2	1	14
	Swelling Firm Pinna	1	0	6
	Swelling Soft Pinna	0	0	2
	Necropsy observations			
	Injection sites			
	Scab/red	0	0	1
	Thickening	0	0	1

(continued)

2.6.7.13B　Reproductive and Developmental Toxicity: Effects on Embryo-Fetal Development in Rabbit (continued)

	Daily Dose (mg/kg)	0 (Control)	0.5	1
Dams (continued)	Body weight mean, kg			
	Gestation Day 7	3.8	3.9	3.8
	Gestation Day 16	3.9	4.0	4.0
	Gestation Day 20	3.9	4.0	4.0
	Gestation Day 29	4.0	4.2	4.1
	Food consumption, g/rabbit/day (% change[b])			
	Gestation Days 7-8	162.2	↓14.7	↓7.9
	Gestation Days 10-11	148.1	↓11.8	↓5.3
	Gestation Days 13-14	124.4	↓17.0	↓11.5
	Gestation Days 16-17	111.7	↑6.8	↓3.6
	Gestation Days 19-20	118.4	↑0.7	↓14.4
	Mean number corpora lutea/dam	12	11	11
	Mean number implantations/dam	10	10	9
	Gravid uterus weights, g	564	586	551
	Pregnancy rate (%)	95.5	90.9	100
Litters	Number of litters evaluated	20	19	22
	Number of live fetuses/litter	10	9	9
	Number of early resorptions/litter	0	0	0
	Number of late resorptions/litter	0	0	0
	Number of dead fetuses/litter	0	0	0
	Preimplantation Loss (%)	11.5	7.1	14.6
	Postimplantation Loss (%)	5.5	5.9	3.0
	Fetal weight, gender combined (g)	41.5	45.3	43.9
	Male fetal weights (g)	41.5	45.9	44.2
	Female fetal weights (g)	41.4	44.6	43.7
	Sex ratio (% male)	60.0	50.9	53.1

(continued)

2.6.7.13B　Reproductive and Developmental Toxicity: Effects on Embryo-Fetal Development in Rabbit (concluded)

	Daily Dose (mg/kg)	0 (Control)	0.5	1
Litters (continued)	Fetal anomalies			
	External anomalies (number of fetuses [litters] examined)	195 [20]	176 [19]	194 [22]
	Abdominal muscles herniated	0	0	1 [1]
	Visceral anomalies (number of fetuses [litters] examined)	195 [20]	176 [19]	195 [22]
	Abdomen fluid-filled	0	0	1 [1]
	Thorax fluid-filled	0	0	1 [1]
	Interventricular septum defect	0	3 [2]	0
	Interventricular septum absent	0	1 [1]	1 [1]
	Ascending and descending aorta dilated	0	4 [2]*[c]	1 [1]
	Aortic arch dilated	0	4 [2]*[c]	1 [1]
	Pulmonary Trunk narrowed (stenosis)	0	4 [2]*[c]	1 [1]
	Skeletal anomalies (number of fetuses [litters] examined)	195 [20]	149 [16]	186 [21]
	Minor skeletal abnormalities	-	-	-
	Common skeletal variants	-	-	-

Abbreviations: ↑ = increase; ↓ = decrease; DPC = dodecylphosphocholine; GLP = Good Laboratory Practice; NZW = New Zealand White.

[a] Number of animals.

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

[c] Findings occurred in the same fetuses and litters.

*p≤0.05, ** p≤0.01 (Fisher's exact test).

2.6.7.14 Reproductive and Developmental Toxicity: Effects on Pre- and Postnatal Development

Report title: Dodecylphosphocholine: A Pre and Post-Natal Intravenous Study in Female Sprague-Dawley Rats		
Design similar to ICH4.1.2: Yes	Duration of dosing: Gestation Day 6 through Lactation Day 20	Document ID: 1013-0581-AMG027G-DPC (4.2.3.5.3.1)
Species/strain: Rat/Crl:CD(SD)	Day of mating: Gestation Day 0	GLP compliance: Yes
Initial age: approximately 11–13 weeks	Litters culled/not culled: culled to 4M/4F when possible	Test Article: DPC
Date of first dose: [redacted]20[redacted]	Route: Intravenous	
Vehicle: 0.9% Sodium Chloride for Injection USP	Special features: None	

No-observed-adverse-effect level:	F_0 maternal toxicity and reproduction: 1 mg/kg	
	F_1 survival, growth, behavioral development, reproductive capacity: 1 mg/kg	
	F_2 survival: 1 mg/kg	

	Daily Dose (mg/kg)	0 (Control)	0.5	1
F_0 females	# pregnant	22	22	22
	# died or euthanized moribund	0	0	0
	Clinical observations	-	-	-
	Necropsy observations (animals with the finding)	-	-	-
	Body weight (g), Gestation Day 20 (% change)[a]	399	↑4.8	↑1.8
	Body weight (g), PPD 21 (% change)[a]	334	↑2.7	↓0.3
	Food consumption (g/rat/day), GD 6-9 (% change)[a]	28.4	↑2.1	↓1.1
	Food consumption (g/rat/day), GD 18-20 (% change)[a]	26.6	↓0.8	↑0.4
	Food consumption (g/rat/day), PPD 4-7 (% change)[a]	44.8	↑9.6****	↑8.3***
	Food consumption (g/rat/day), PPD 14-21 (% change)[a]	81.1	↑3.2	↑0.1
	Mean duration of gestation (days)	22	22	22
	Mean duration of parturition (hours)	2.20	3.60***	3.29***
	Abnormal parturition	0	0	0

(continued)

2.6.7.14 Reproductive and Developmental Toxicity: Effects on Pre- and Postnatal Development (Continued)

	Daily Dose (mg/kg)	0 (Control)	0.5	1
F_1 litters Preweaning	# of litters evaluated	22	22	22
	Mean # of implantations	14	15	14
	Mean # liveborn pups/litter	12	14	13
	Mean # stillborn pups/litter	0	0	0
	# of litters with stillborn pups	4	4	4
	Postnatal survival to Day 4 (%)	98.3	93.2	94.1
	Postnatal survival to weaning (after cull) (%)	98.5	100.0	96.4
	# of total litter losses	0	1	1
	# live newborn pups with external anomalies	0	0	0
	Pup body weight (g), (% change)[a]			
	Newborn			
	Male	7.1	↑1.4	0.0
	Female	6.7	0.0	0.0
	Change from birth to weaning			
	Male	61.6	↑4.1	↑3.1
	Female	58.9	↑4.1	↑2.9
	Pup sex ratio on Day 0 (% males)	50.4	50.6	50.9
	Pup clinical observations	-	-	-
	Physical development			
	Righting reflex (day of age)	2.5	2.3	2.3
	Pinna unfolding (day of age)	2.3	2.0	2.0
	Tooth eruption (day of age)	10.8	10.6	10.9
	Negative geotaxis (day of age)	9.2	8.9	9.0
	Auricular startle response (day of age)	12.4	12.1*	12.1**
	Eye Opening (day of age)	13.4	13.2	13.3
	Visual function (% passed)	100%	100%	100%
	Pup necropsy observations	-	-	-

(continued)

2.6.7.14 Reproductive and Developmental Toxicity: Effects on Pre- and Postnatal Development (continued)

	Daily Dose (mg/kg)	0 (Control)	0.5	1
F_1 males Postweaning	# evaluated per litter	22	21	21
	# died or euthanized moribund	0	0	0
	Clinical observations	-	-	-
	Necropsy observations	-	-	-
	Preputial separation (day of attainment)	41	41	41
	Motor activity (total mean counts)	430.5	421.3	420.2
	E-shaped water maze			
	Time on Trial 7 (seconds)	10	8	10
	# Errors on Trial 7	1	0	0
	Mean days prior to mating	4	4	5
	# males placed for mating	22	21	21
	# of males that mated	18	17	15
F_1 females Postweaning	# evaluated per litter	22	21	20
	# died or euthanized moribund	0	0	0
	Clinical observations	-	-	-
	Necropsy observations	-	-	-

(continued)

2.6.7.14 Reproductive and Developmental Toxicity: Effects on Pre- and Postnatal Development (continued)

	Daily Dose (mg/kg)	0 (Control)	0.5	1
F_1 females (continued)	Body weight (g), Gestation day 7-20 (% change)[a]	115	↑8.7	↑7.8
	Body weight (g), Postpartum day 4 (% change)[a]	402	↓0.7	↑5.5
	Vaginal opening (day of attainment)	32	31	32
	Motor activity (total mean counts)	584.0	556.4	546.0
	E-shaped water maze			
	Time on Trial 7 (seconds)	18	12	15
	# Errors on Trial 7	1	1	1
	Estrous cycle length (average days)	3.9	3.9	3.9
	Mean days prior to mating	4	4	5
	# of females placed for mating	22	21	20
	# of females copulated	20	20	19
	# of pregnant females	19	19	17
	Mating index (%)	81.8	81.0	71.4
	Fertility index (%)	86.4	90.5	85.0
	Conception rate (%)	95.0	95.0	89.5
	# aborted	0	0	0
	Mean # corpora lutea	19	19	18
	Mean # implantations	16	16	15

(continued)

2.6.7.14 Reproductive and Developmental Toxicity: Effects on Pre- and Postnatal Development (concluded)

	Daily Dose (mg/kg)	0 (Control)	0.5	1
F_2 litters	Mean % preimplantation loss	14.1	11.3	17.1
	Mean % postimplantation loss	16.0	7.8	10.8
	Mean # liveborn pups/litter	13	15	14
	Mean # stillborn pups/litter	0	0	0
	# of litters with stillborn pups	5	6	3
	# live newborn pups with external anomalies	0	0	0
	Pup sex ratio on Day 0 (% males)	58.6	46.1**	52.5
	# Total litter losses	0	0	0
	Postnatal survival to Day 4 (%)	97.5	98.5	98.9
	Pup body weight (g), (% change)[a]			
	Newborn			
	Male	7.1	↑1.4	↑1.4
	Female	6.8	↓1.5	0.0
	Postnatal Day 4			
	Male	10.8	↑2.8	↑4.6
	Female	10.6	↓0.9	0.0
	Pup clinical observations	–	–	–
	Pup necropsy observations	–	–	–

Abbreviations: # = number; ↑ = increase; ↓ = decrease; – = no important findings; DPC = dodecylphosphocholine; F = female; GD = gestation day; GLP = Good Laboratory Practice; LD = lactation day; M = male; PPD = postpartum day.

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

*p≤0.05, **p≤0.01 (Dunn's test).

***p≤0.05, ****p≤0.01 (Dunnett's test).

2.6.7.15　Studies in Juvenile Animals

Not applicable.

2.6.7.16　Local Tolerance

Not applicable.

2.6.7.17　Other Toxicity Studies: Drug Product Impurity Qualification, Ocular Irritation, and Intra-Tracheal Insufflation-

Study Type **Species** **Strain**	**Route**	**Duration of Dosing**	**Test article/** **Doses**	**Sex** **#/Group**	**Noteworthy Findings**	**Document ID (Location in CTD)**
Drug Product Impurity Qualification Rat SD	Intranasal Instillation	14 days	Nasal glucagon/ 0[a], 0[b], 0.1 mg/rat/day as glucagon	10/sex/group	None	7300547 (4.2.3.7.6.1)
Ocular Irritation Rabbits NZW	Ocular Instillation	Single Dose/3 day Observation Phase: 24 hr before dosing; 1, 24, 48, 72 hr after dosing	Nasal Glucagon/ [redacted]mg/rabbit	3 M/group	Minimal ocular irritation limited to slight erythema and edema localized to the conjunctiva and palpebral membrane	1013-0594-AMG021G (4.2.3.7.7.1)
Intra-Tracheal Insufflation Rat SD	Intra-Tracheal Insufflation	Single Dose/14 day Recovery	Nasal Glucagon/ 0.5 mg/rat	Main: 5/sex/group, Recovery: 3sex/group	None	75310-AMG013G (4.2.3.7.7.2)
Phototoxicity (molar extinction coefficient determination)	NA	NA	DPC/ 2.87×10^{-4}M	NA	Footnote [c]	PRD-04639-TR (4.2.3.7.7.3)

Abbreviations: # = number, β-CD = beta-cyclodextrin; DPC = dodecylphosphocholine; M = male; NA = not applicable; NZW = New Zealand White; SD = Sprague Dawley.

[a] 0.9% Saline for Injection, USP.

[b] 88.9% β-CD + 11.1% DPC in 100 mM acetic acid solution.

[c] No molar extinction coefficients were determined above the 1000 L mol^{-1} cm^{-1} cutoff that would constitute a photoreactive compound that could result in direct phototoxicity. For this reason, no formal phototoxicity studies of DPC were warranted.