アミカシンリポソーム吸入用懸濁液
アリケイス吸入液 590 mg

第 2 部 CTD の概要

2.4 非臨床試験の概括評価

インスメッド合同会社

目次

頁
略号一覧表 4
2.4 非臨床試験の概括評価 5
2.4.1 緒言 5
2.4.2 非臨床試験計画概略 6
2.4.3 薬理試験 8
2.4.3.1 効力を裏付ける薬理試験 8
2.4.3.2 副次的薬理試験 9
2.4.3.3 安全性薬理試験 9
2.4.4 薬物動態試験 10
2.4.4.1 緒言 10
2.4.4.2 吸収 10
2.4.4.3 分布 11
2.4.4.3.1 単回吸入投与後の分布 11
2.4.4.3.2 反復吸入投与後の分布 12
2.4.4.4 代謝 12
2.4.4.5 排泄 12
2.4.4.6 薬物動態学的薬物互作用 13
2.4.4.7 その他の薬物動態試験 13
2.4.5 毒性試験 14
2.4.5.1 単回投与毒性試験 14
2.4.5.2 反復投与毒性試験 14
2.4.5.2.1 緒言 14
2.4.5.2.2 ラット 15
2.4.5.2.3 イヌ 18
2.4.5.2.4 反復投与毒性試験における標的臓器 21
2.4.5.3 遺伝毒性 23
2.4.5.4 がん原性試験 24
2.4.5.4.1 ALIS のがん原性評価 24
2.4.5.4.2 アミノグリコシド系抗生物質のがん原性評価 25
2.4.5.4.3 アプラマイシン 26
2.4.5.4.4 ジヒドロストレプトマイシン及びストレプトマイシン 26
2.4.5.4.5 ネオマイシン 27
2.4.5.4.6 ネチルマイシン 27
2.4.5.4.7 パロモマイシン 27
2.4.5.4.8 トブラマイシン 27
2.4.5.5 生殖発生毒性試験 27
2.4.5.6 局所刺激性試験 28
2.4.5.7 その他の毒性試験 28
2.4.5.7.1 毒性発現の機序に関する試験 28

2.4.5.7.2 依存性試験 29
2.4.5.7.3 代謝物の毒性試験 29
2.4.5.7.4 不純物の毒性試験 29
2.4.5.7.5 添加物の評価 29
2.4.6 考察及び結論 30
2.4.6.1 げっ歯類における肺病変の関連性（種特異性及び粒子過負荷概念） 31
2.4.6.1.1 粒子過負荷 32
2.4.6.1.2 肺病変に関する閾値概念 33
2.4.6.1.3 粒子過負荷とげっ歯類における肺腫瘍形成 34
2.4.6.1.4 ALIS の肺の安全性についての比較 36
2.4.6.2 その他の毒性試験 40
2.4.7 総括及び結論 41
2.4.8 参考文献 42

表一覧

表 2.4-1 毒性試験一覧 14
表 2.4-2 ラット及びヒトにおける定常状態平均アミカシン肺中濃度 18
表 2.4-3 イヌ及びヒトでの定常状態における肺中の平均アミカシン濃度 21
表 2.4-4 げっ歯類を用いた 2 年間がん原性試験又は構造類似体のがん原性試験結果に基づいて評価したアミノグリコシド系抗生物質 26
表 2.4-5 動物の重要な吸入毒性試験における NOAEL での、ヒトと比較した推定肺曝露安全域 31
表 2.4-6 粒子肺過負荷の肺への影響に関する動物種間の比較（Mauderly, 1996） 35
表 2.4-7 動物とヒトの肺パラメータの比較 [a] 36
表 2.4-8 ラットを用いた 6 ヵ月間反復吸入毒性試験における推定肺負荷量 36
表 2.4-9 ラットを用いたがん原性試験における推定肺負荷量 37
表 2.4-10 TOBI のラットを用いた 6 ヵ月間反復吸入毒性試験における肺の病理組織学的変化 38
表 2.4-11 TIP のラットを用いた 6 ヵ月間反復吸入毒性試験における肺の病理組織学的変化 39
表 2.4-12 アミノグリコシド系薬剤のラットを用いた 2 年（TIP のみ 6 ヵ月）反復吸入毒性試験における肺の病理組織学的変化 39

図一覧

図 2.4-1 ラットにおける肺の粒子沈着に対する適応性変化及び毒性変化の概要 33
図 2.4-2 ラットにおける肺沈着粒子による発がんの推定発現機序 34

略号一覧表

略語・用語	内容
ALIS	Amikacin Liposome Inhalation Suspension：アミカシンリポソーム吸入用懸濁液
Amikacin-TAMRA	amikacin-tetramethylrhodamine：アミカシンーテトラメチルローダミン
ASA	alveolar surface area：肺胞表面積
AUC	area under the concentration-time curve：濃度－時間曲線下面積
AUC_{0-t}	area under the plasma concentration-time curve from time zero to time of last measurable concentration：最終定量可能時点までの血漿中濃度－時間曲線下面積
BAL	bronchoalveolar lavage：気管支肺胞洗浄
BALF	bronchoalveolar lavage fluid：気管支肺胞洗浄液
CFU	colony forming units：コロニー形成単位
CHMP	Committee for Medicinal Products for Human Use：欧州医薬品庁ヒト用医薬品委員会
CHO	chinese hamster ovary：チャイニーズハムスター卵巣
C_{max}	maximum (peak) plasma concentration of the drug：最高（ピーク）血漿中薬物濃度
C_{min}	minimum (trough) plasma drug concentration：最小（トラフ）血漿中薬物濃度
DPPC	dipalmitoylphosphatidylcholine：ジパルミトイルホスファチジルコリン
ELC	empty liposomes control：リポソーム対照
EMA (EMEA)	European Medicines Agency：欧州医薬品庁
EU	European Union：欧州
FA	free amikacin：遊離型アミカシン（リポソーム非封入型アミカシン硫酸塩水溶液）
FDA	Food and Drug Administration：アメリカ食品医薬品局
FT	free tobramycin：遊離型トブラマイシン
GLP	Good Laboratory Practice：医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準
[redacted]	[redacted]：[redacted]
ICH	International Conference of Harmonisation：医薬品規制調和国際会議
IPD	immediately post dose：投与終了直後
LAI	liposomal amikacin for inhalation：－（吸入用アミカシンリポソーム製剤）
LC/MS/MS	liquid chromatography with tandem mass spectrometry：液体クロマトグラフィー・タンデム質量分析
LLOQ	lower limit of quantitation：定量下限
不純物X*	[redacted]：[redacted]
M avium	*Mycobacterium avium*
MAC	*Mycobacterium avium* complex
NaCl	sodium chloride：塩化ナトリウム
NOAEL(s)	no observed adverse effect level(s)：無毒性量
NTM	nontuberculous mycobacteria：非結核性抗酸菌
P aeruginosa	*Pseudomonas aeruginosa*
pH	potential of hydrogen
PK	pharmacokinetics：薬物動態
PMNs	polymorphonuclear cells：多形核白血球
RRT	relative retention time：相対保持時間
SLIT™	Sustained release Lipid Inhalation Targeting™
$t_{1/2}$	half-life：半減期
TIP	tobramycin inhalation powder：トブラマイシン吸入パウダー
TK	toxicokinetic(s)：トキシコキネティクス
TOBI®	Tobramycin Solution For Inhalation：トービイ、吸入用トブラマイシン溶液
US	United States

＊新薬承認情報提供時に置き換え

2.4　非臨床試験の概括評価

2.4.1　緒言

非結核性抗酸菌（NTM）による肺感染症は重篤な肺疾患を引き起こし、難治症例では死亡に至る場合もある。また、肺 NTM 症に対する化学療法として、多剤併用化学療法が標準的に行われているが、その効果は限定的である。*M avium* の一部は肺胞マクロファージ内に存在するが、ほとんどの抗生物質はマクロファージへ十分に浸透しない。

アミカシンリポソーム吸入用懸濁液（ALIS）は、マイコバクテリウム・アビウムコンプレックス（MAC）による肺 NTM 症を適応症とする、噴霧による吸入投与用の無菌水性リポソーム懸濁液である。

推奨される用法用量は、70 mg/mL の 10 mL バイアル 1 本（遊離塩基換算でのアミカシン含有量は 590 mg）の 1 日 1 回投与を予定している。母集団薬物動態解析の結果から、年齢や体重によって投与量を調節する必要がないことが支持されている。ALIS は吸入投与可能なように開発され、専用のネブライザー（ラミラネブライザシステム）を用いて投与される。

ALIS は、以前、Arikace™、Sustained release Lipid Inhalation Targeting™（SLIT™）Amikacin 又は Liposomal Amikacin for Inhalation（LAI）と呼ばれていたが、本資料中では、一部の試験タイトルやグラフを除き ALIS と表記する。また、ALIS に含まれるアミカシン硫酸塩はアミカシンと、また、リポソーム非封入型アミカシン硫酸塩水溶液は遊離型アミカシン（FA）と表記する。特に記載がない限り、用量及び濃度は、遊離塩基（アミカシン）として示されている。本資料に提示した全ての試験には、それぞれの概要文への参照及び試験番号を記した。

ALIS は 70 mg/mL アミカシン封入リポソーム製剤である。本リポソームはジパルミトイルホスファチジルコリン（DPPC）とコレステロール（[redacted]）からなり、また、他の添加剤として塩化ナトリウム、水酸化ナトリウム（pH 調整用）及び注射用水を製剤中に含有する。ALIS 製剤に含まれる添加剤は他の医薬品で使用されているものである。DPPC とコレステロールは、新投与経路（吸入）に該当すること（3.2.P.4.6 項）から、日本では新規添加剤となる。塩化ナトリウムもまた、塩化ナトリウムの量（1 日あたり 101 mg）により、日本では新規添加剤に該当する。したがって、いくつかの重要な非臨床試験では、空リポソーム（DPPC、コレステロール及び塩化ナトリウムを含有するリポソーム対照［ELC］）を用いて、ALIS 試験中で追加の安全性情報を提供することとした。脂質とアミカシンの重量比は約 0.7 である。脂質は肺サーファクタントの主要成分であり、肺サーファクタントで最も一般的な単一物質は DPPC である。DPPC は、肺サーファクタント中のリン脂質の約 3 分の 1 を占める二飽和リン脂質である。一方で、肺サーファクタントの主な中性脂質はコレステロールである。したがって、ALIS で使用される脂質は生体適合性が良好であると考えられ、それらが重要な副作用を引き起こすとは考え難い。アミカシンは、カナマイシン由来の半合成アミノグリコシド系抗生物質であり、リボソーム 30S サブユニットに不可逆的に結合することにより感受性細菌のタンパク質合成を阻害し、殺菌作用を発揮する。アミカシンは、非経口抗生物質として 30 年以上にわたって臨床使用されており、患者におけるアミカシン全身曝露後の安全性プロファイルはよく知られている。したがって、ALIS の毒物試験プログラムは、吸入経路のみの投与にて ALIS の潜在的な影響を評価できるように計画した。ALIS は、アミカシン 590 mg を含む単回投与用のブロモブチル栓及びアルミニウムシール付きの 10 mL 透明ガラスバイアルで供給される予定である。

2.4.2　非臨床試験計画概略

ALIS の効力、薬物動態（PK）及び安全性を評価するために、一連の非臨床試験を実施した。本剤の臨床開発及び製造販売承認申請のために Insmed が実施した重要な毒性試験はすべて、適切な試験系及び試験デザインを選択し、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）を遵守し、関連する医薬品規制調和国際会議（International Conference on Harmonisation、ICH）の非臨床ガイドラインに従っている。また、非臨床開発全般にわたって、「リポソーム製剤の開発に関するガイドライン（厚生労働省医薬・生活衛生局審査管理課長、薬生審査発 0823 第 19 号、平成 28 年 3 月 28 日）」並びに「リポソーム製剤の開発に関するガイドライン　質疑応答集（厚生労働省医薬・生活衛生局審査管理課、事務連絡、平成 28 年 3 月 28 日）」を参照した。

効力を裏付ける薬理試験は、Insmed、カルガリー大学、ワシントン大学及びオレゴン州立大学で実施した。PK 試験は探索的試験も含め Insmed で実施し、毒性試験は、[redacted]（[redacted]）、[redacted]（[redacted]、その後[redacted]に社名変更し、最近は[redacted]として統合）及び[redacted]（[redacted]）等の受託機関（CRO）で実施した。一部の薬理試験、PK 試験及び初期又は探索的毒性試験は、開発初期の ALIS 製剤で実施した。初期の製剤と製造販売予定の製剤では薬物濃度や脂質／薬物比は異なるが、同一の活性成分と添加剤（すなわち、アミカシン、DPPC、コレステロール及び NaCl）を含有するため、これらの試験結果は、製造販売予定の ALIS 製剤（70 mg/mL アミカシン）の開発に関連したものと考えた。ただし、全ての重要な反復吸入毒性試験、ラット吸入小核試験、ラット 2 年間吸入がん原性試験、及びラット 6 ヵ月免疫毒性試験は、製造販売予定の ALIS 製剤で実施した。製剤開発に関しては 3.2.P.2 項を参照のこと。

効力を裏付ける試験として *Pseudomonas aeruginosa (P aeruginosa*) の臨床分離株を用いた *in vitro* 試験、並びに、*in vitro* 及び／又は *in vivo*（ラット）感染モデル（*P aeruginosa* 及び *M avium*）にて検討したところ、ALIS は殺菌作用を示した。FA との効力の比較もいくつかの試験で実施した。安全性薬理試験については、6 ヵ月（ラット）と 9 ヵ月（イヌ）までの反復吸入毒性試験において、被験物質に関連した実質的な変化が気道以外に観察されなかったため、独立した安全性薬理試験は実施しなかった。ALIS の心血管系及び呼吸器系に及ぼす影響について、イヌを用いた 1 ヵ月間反復吸入毒性試験の中で評価したところ、最大 31 mg/kg/日投与しても、心拍数、心電図、呼吸数、換気量及び 1 回換気量に対する影響は認められなかったこと（Charles River Study 667574, Report No. 2765）から、ALIS はイヌの心血管系及び呼吸器系に影響を与えないことが示された。ALIS は肺へ局所的に送達されること、アミカシンの非経口投与と比較して吸入時のアミカシンの全身曝露が低いこと、及び、ALIS の持続的な放出特性から、ALIS 投与により生理機能に対して重大な異常が引き起こされる可能性は低いと考えられた。

ALIS を単回及び反復吸入投与したときのアミカシンの肺における吸着、保持及び消失を評価するために PK 試験を実施した。ヒトにおけるアミカシンの肺沈着係数は、本資料中では 43%を使用しており、これは、NTM 患者に ALIS を治験用 eFlow®ネブライザーにより吸入投与したときのシンチグラフィー結果に基づいている（Olivier, 2016; Clinical Study Report for TR02-112, Appendix 16.1.16）。PK 試験では、最高濃度（C_{max}）、濃度-時間曲線下面積（AUC）及び半減期（$t_{1/2}$）を含むアミカシンの血清及び尿中 PK パラメータを評価した。水溶液とした FA 及び遊離トブラマイシン（FT）を吸入投与したときの PK の比較も行った。全ての試験は、ラット（主に CD®IGS；毒性試験で使用されたものと同系統）を用いて、鼻腔内吸入投与により実施された。

ALIS を吸入投与したときの初期の探索的 PK 試験では、Abbott TDx 自動蛍光偏光免疫アッセイ（TDx 法）により組織、血漿及び尿中アミカシン濃度を評価した。その後の試験では、蛍光免疫染色、蛍光プローブ、蛍光顕微鏡及び蛍光分光光度計による分析法を用いて、ALIS の組織内分布を詳細に検討した。アミカシンは代謝されないため（Bodey, 1974）、ALIS の PK 試験において代謝を評価する必要性はないと考えられた。ラット及びイヌを用いた重要な反復吸入投与毒性試験、並びにラットを用いたがん原性試験を含む GLP 適用試験において、ALIS 投与によるトキシコキネティクス（TK）プロファイル（すなわち、肺、血清及び／又は尿中アミカシン濃度）が評価された。

ALIS の毒性は次に示す一連の毒性試験を通じて評価を行った；ラット及びイヌでの 1 ヵ月反復吸入投与試験、マウス及びイヌ 3 ヵ月反復吸入毒性試験、ラット 6 ヶ月反復吸入毒性試験、イヌ 9 ヵ月反復吸入毒性試験、ALIS を 3 日間連日投与した後の小核試験を含む遺伝毒性試験の標準的組合せ、ラット 2 年間吸入がん原性試験、幼若ラットを用いた 1 ヵ月吸入試験、ALIS 投与後のマクロファージ機能を評価したラットでの免疫毒性試験。6 ヵ月（ラット）及び 9 ヵ月（イヌ）までの反復吸入毒性試験において、被験物質に関連した実質的な変化が気道以外に観察されなかったことから、ALIS を用いてさらに生殖毒性試験を実施する必要はないと考えた。また、ALIS が肺へ局所的に送達されること、アミカシンの非経口投与と比較して吸入時のアミカシンの全身曝露が低いこと、及び、ALIS の持続的な放出特性から、生殖機能に対して重大な異常が引き起こされる可能性は低いと考えられた。さらに、アミカシンの生殖発生毒性に関して、ラット、マウス及びウサギの生殖能力及び／又は胎児へ影響を与えなかったことが報告されている（阿久津, 1982、松崎, 1975a、松崎, 1975b）。2014 年に PMDA と実施した LAI の医薬品第 I 相試験開始前相談（#P3435）において、PMDA は「本剤の製造販売承認申請にあたり、提示された非臨床毒性試験データパッケージについて、現時点で特段の不足はないと考える」との見解を示した。また、この相談で助言された通り、アミノグリコシド系抗菌剤に関するがん原性評価について文献調査等を実施し、その情報を 2.4.5.4.2 項に含めた。

ヒトの PK 試験のサポートと同様に，毒性試験をサポートするために，血漿／血清，肺及び尿中のアミカシン濃度を測定するための高感度で特異的な分析法が開発され，バリデートされた。

不純物を評価する毒性試験として、アミカシン原薬に含まれる不純物[redacted]と 2 つの未知の不純物については、遺伝毒性試験として細菌を用いた復帰突然変異試験を実施し、高含量の[redacted]（不純物X*）についてはラット 2 週間毒性試験を実施した。これら以外に、アミカシンの不純物又は ALIS の分解物を評価する毒性試験は、次の理由で不要と考えた。ICH ガイドライン Q3A(R2)「新有効成分含有医薬品のうち原薬の不純物に関するガイドライン（医薬審発第 1216001 号、平成 14 年 12 月 16 日）及びその一部改訂（薬食審査発第 1204001 号、平成 18 年 12 月 4 日）に照らし合わせて、その量が閾値よりも低かったこと、反復投与毒性試験に用いたロットには臨床試験ロット以上の量が含まれていたこと、動物に投与された用量（mg/g 肺重量及び／又は体表面積に基づいたヒト等価用量）はヒトよりも高かったこと。アミカシン不純物と ALIS 分解物の詳細は、2.6.7.4.1 項、2.6.7.4.2 項、並びに、3.2.S.3.2 項 、3.2.P.5.5 項を参照のこと。ALIS の出荷時規格及び有効期間を考慮した規格は 3.2.P.5.1 項に示す。

＊新薬承認情報提供時に置き換え

2.4.3 薬理試験

2.4.3.1 効力を裏付ける薬理試験

ALIS の有効成分であるアミカシンは、カナマイシン由来の半合成アミノグリコシド系抗生物質である。アミカシンは、NTM を含む広範囲のグラム陰性菌感染症の治療に有効であることが証明されており、既に長年にわたって臨床使用されている。アミノグリコシド系抗生物質の抗菌作用は殺菌的である。アミカシンは、大部分の細菌の不活化酵素による不活化について当該薬効クラスの他の薬剤ほど感受性を示さないという点で、アミノグリコシド系薬剤とは異なる。以上より、アミカシンは、ALIS の抗菌性有効成分として適していると考えられる。

NTM に対する臨床使用を裏付けるために、ALIS の非臨床薬理学的（微生物学的）プロファイルの特徴を、*M avium* 感染マクロファージを用いた、標準的な組合せの *in vitro* 及び *in vivo* 試験で明らかにした。

培養ヒトマクロファージを用いた試験において検討した濃度範囲において ALIS の取り込み量は、FA よりも 4 倍高いことが示された（2.6.2.2.1 項）。*In vivo* では、ラットに ALIS もしくは FA を吸入投与した 2、6 及び 24 時間後の肺胞マクロファージ内アミカシン濃度については、両群間でアミカシン肺沈着量に差は認められなかったにもかかわらず、気管支肺胞洗浄（BAL）細胞内アミカシン濃度は ALIS 投与群で 5～8 倍高かった（2.6.2.2.1 項）。さらに、FA 高用量群ではアミカシン肺沈着量が ALIS 群の 2 倍となったが、BAL 細胞内アミカシン濃度は ALIS 群の方が 4～6 倍高かった。ALIS 群のラットでは、投与 24 時間後でも、肺組織中及び BAL 中アミカシン濃度が、低用量及び高用量の FA 群ラットに比べて高かった。

M avium に対する ALIS（アミカシン 70 mg/mL）の有効性は、ヒト接着性単球由来マクロファージ（THP-1 細胞株）に 3 種の *M avium*（MAC 104、A 5 及び MAC 3388）を 1 時間感染させた後、ALIS（1～10 μg/mL）、FA（10 μg/mL）又は ELC（脂質濃度 6.4 μg/mL）で 1 日 1 回 4 日間処置した *in vitro* 試験により示された（2.6.2.2.2 項、[redacted]-ARIKACE 試験）。検討したアミカシン最高用量（10 μg/mL）における全ての菌株に対して、ALIS は FA より優れた殺菌作用を示した（回収された平均生菌数［$\times 10^4$］は、ALIS 群；3 種の *M avium* でそれぞれ 4.6、2.1 及び 4.4、FA 群；6.7、12 及び 9.2 であり、A 5 及び MAC 3388 においては ALIS 群で統計学的に有意［$p<0.05$］）。ALIS は感染又は非感染マクロファージに対して細胞毒性を示さなかった。また非封入リポソームは、有意な抗菌活性を示さなかった（回収された平均生菌数は 250×10^4、培地対照で 260×10^4）。

in vitro で見られた ALIS の *M avium* に対する抗菌効果は、*in vivo* でも認められた。ALIS（アミカシンとして 70 mg/mL）の吸入は、NTM モデル（C57Bl/6 雌マウス）の *M avium* 肺感染に対して有効であることが示された（2.6.2.2.3 項、[redacted]-4257 試験）。NTM の臨床分離株 *M avium* 104 株をマウスに鼻腔内注入し、肺感染モデルを作成した。感染 3 週間後からマウス 2 群に 1.5%生理食塩水又は ALIS を最長 28 日間吸入投与、他方の群に FA を 28 日間連日腹腔内投与した。投与開始時の *M avium* の肺内平均生菌数は 0.7×10^5 CFU（コロニー形成単位）/肺であった。投与終了時の各群の肺内平均生菌数（log10 CFU/肺±標準偏差）を以下に示す。

- 第 1 群：1.5%生理食塩水 1 日 1 回（Q1D） × 28 日間投与：4.1 ± 0.9
- 第 2 群：ALIS 76 mg/kg Q1D × 28 日間投与（総投与量 2128 mg/kg)：1.6 ± 1.1
- 第 3 群：ALIS 152 mg/kg Q1D × 14 日間投与後、2 週間休薬（総投与量 2128 mg/kg)：2.3 ± 0.8

- 第 4 群：ALIS 152 mg/kg 隔日（Q2D）× 14 日間投与（総投与量 2128 mg/kg)：1.3 ± 1.2
- 第 5 群：FA 100 mg/kg Q1D × 28 日間投与（総投与量 2800 mg/kg)：2.1 ± 1.7

アミカシン群ではいずれも、1.5%生理食塩水投与対照群と比較して統計学的に有意であった。特に第 2 群及び第 4 群の有効性は、他のアミカシン群より高く、マウスでの *M avium* の完全除菌率は、第 4 群が最も高かった（42%）。当該試験の結果から、ALIS は、肺胞マクロファージの *M avium* 感染に対して極めて有効性が高いことが示された。

別の *in vitro* 試験では、リポソームが嚢胞性線維症患者から採取したヒト喀痰層へ生理学的意義のある時間経過で浸透できることが示された。

以上、ALIS は、*M avium* 感染マクロファージに対する殺菌作用が FA より強く、また NTM 臨床分離株に感染したマウスの肺胞マクロファージへの *M avium* 感染に対する極めて高い有効性を示した。

2.4.3.2　副次的薬理試験

ALIS リポソーム（0.2 μm）と同じ脂質組成でほぼ同サイズの蛍光標識リポソームを、約 1 mm 厚の *P aeruginosa* 感染ヒト喀痰層に加えて 30 分間培養したところ、喀痰層への浸透が鏡検により確認された（2.6.2.3.1 項、AMIK-BRD-2007-01-PC 試験）。24 時間中にリポソームの大部分が喀痰層を通過した（Cytofluor プレートリーダーを用いた蛍光測定により評価）。これとは対照的に、1 μm のポリスチレンビーズが喀痰層を浸透／通過した割合は極めて低かった。当該試験の結果から、リポソームは生理学的に意義のある時間経過で *P aeruginosa* のバイオフィルムに充分浸透する可能性があることが示唆された。

2.4.3.3　安全性薬理試験

前述したとおり、投与期間が 6 ヵ月（ラット）及び 9 ヵ月（イヌ）までの反復吸入投与毒性試験において、気道以外の器官に薬剤に関連した顕著な変化が観察されなかったことから、追加の動物を用いて ALIS の安全性薬理試験の実施する必要ないと考えられた。イヌを用いた 1 ヵ月間反復投与試験において、ALIS を最大 31 mg/kg/日までの用量で連日投与しても、呼吸数、1 回換気量、毎分呼吸量及び心電図パラメータに影響は認められなかった（2.6.2.4 項、Charles River Study 667574、Report No. 27657）。これらの試験結果から、ALIS は、呼吸器系及び心血管系パラメータに影響を及ぼさないことが示された。ALIS は肺へ局所送達されること、アミカシン全身曝露量がアミカシンの非経口投与時より低いこと、および ALIS の持続的な放出特性から、ALIS は重要臓器の生理機能に対して重大な副作用を引き起こす可能性は低いと考えられた。この考え方は、ICH ガイドライン S7A（安全性薬理試験ガイドライン）とも合致している。

2.4.4 薬物動態試験

2.4.4.1 緒言

ALIS の PK 試験は、ラットの鼻腔内に単回及び反復吸入投与したときのアミカシンの肺沈着、保時及び消失の評価が可能となるように計画された。FA 及び FT（すなわち、それぞれアミカシン及びトブラマイシンの水溶液）を吸入投与したときの PK との比較も実施した。特に明記しない限り、ALIS 及び他のアミノグリコシドの用量は 90 mg/kg であった。

ALIS を吸入投与した初期の探索的 PK 試験では、バリデーション済みの TDx 法を用いて、組織、血漿及び尿中アミカシン濃度を評価した。この分析法の定量下限（LLOQ）は、血漿及び尿で 3 µg/mL、肺組織で 80 µg/g であった。一方、3 ヵ月以上の反復投与毒性試験（GLP）で使用されたバリデーション済みの液体クロマトグラフィー・タンデム質量分析（LC/MS/MS）法の LLOQ は、血清及び尿で 0.15 µg/mL、肺組織で 15 µg/mL であった。その後の PK 試験では、ALIS の肺における分布を詳細に検討するため、蛍光免疫染色、蛍光プローブ、蛍光顕微鏡及び蛍光光度計による分析法が使用された。これらの試験では、市販のアミカシン蛍光誘導体（アミカシン-テトラメチルローダミン［アミカシン-TAMRA］）及び脂質の蛍光誘導体である $DiIC_{18}(5)DS$（2 個の C18 アルキル側鎖に結合した 1,1’-ジオクタデシル-3,3,3’,3’-テトラメチルインドールカルボシアニン-5-5’-ジスルホン酸）を使用した（2.6.4.2 項、AMIK-RES-2009-21-FORM 試験及び AMIK-RES-2009-22-FORM 試験）。これらの蛍光標識体を用いて調製された ALIS を使用することにより、肺における ALIS の主要構成成分の組織内分布及びクリアランスを評価することが可能となった（以下の 2.4.4.3 項及び 2.4.4.5 項参照）。

ALIS の毒性試験に付随して評価された全ての TK 試験は、ICH ガイドライン S3A（トキシコキネティクス（毒性試験における全身的暴露の評価）に関するガイダンス）に従い、バリデーション済みの TDx 法及び LC/MS/MS 法を用い、GLP に準拠して実施された。これらの試験ではマウス、ラット及びイヌを用い、血漿／血清、尿、肺、腎臓及び／又は脳中のアミカシン濃度が測定された。

2.4.4.2 吸収

ラットに ALIS を 60 mg/kg の用量で単回吸入投与したとき、投与終了後に肺中アミカシン濃度は急速に減少し、アミカシンの消失は二相性を示すことが明らかとなった（2.6.4.3.1 項、AMIK-BRD-2007-04-PK 試験）。FA 及び FT を 60 mg/kg の用量で投与したときにも二相性の消失が認められたが、肺中アミカシン濃度は、ALIS 投与の方が実質的に高く、より持続的であった（例えば、肺中アミカシンの投与後 48 時間までの濃度-時間曲線下面積［$AUC_{0\text{-}48h}$］は、ALIS：56233 µg•h/mL、FT：11504 µg•h/mL）。ALIS 投与後の二相性の消失は、尿中へのアミカシンの排泄とよく相関しており、吸入投与後 6 時間において ALIS 投与量中のアミカシンの 43%が肺から消失し、39%が尿中に排泄された。一方、ラットに FA を投与したとき、投与後 6 時間までに、肺に沈着したアミカシンの 84%が消失し、86%が尿中に排泄された。肺からのアミカシンの初期の消失は、噴霧後に ALIS 中に存在する FA の消失に起因し、その後の緩徐な消失は、肺に沈着した ALIS リポソームからのアミカシンの放出に起因するものと考えられた。

この試験では、経口投与後の吸収についても評価され、雌ラットにアミカシンのリポソーム製剤を 50 mg/kg の用量で強制経口投与したとき、投与量の 0.002%～0.3%のアミカシンが吸収された。

2.4.4.3　分布

2.4.4.3.1　単回吸入投与後の分布

ラットにアミカシンを 90 mg/kg の用量で単回吸入投与した一連の試験において、アミカシン、アミカシン-TAMRA、DiIC$_{18}$(5)DS 標識リポソーム、遊離 TAMRA、及び／又は遊離 DiIC$_{18}$(5)DS の肺内沈着、保時及び消失が評価された。アミカシンの濃度は TDx 法により、蛍光標識したアミカシン及びリポソームは蛍光分析法により測定された。各試験の主な結論は以下のとおりである。

初期の予備的試験において、アミカシン-TAMRA の分布を評価した結果、アミカシン-TAMRA の *in vivo* 安定性及び PK プロファイルは、アミカシンを吸入投与したときの結果と十分に類似していた。したがって、組織内分布を評価する試験において、アミカシン-TAMRA は ALIS 中のアミカシンの標識体として使用可能であることが示された（2.6.4.4.3.2 項及び 2.6.4.4.3.3 項）。

肺における ALIS の分布及び消失（2.6.4.4.3.1 項）を詳細に検討するための試験実施に際し、DiIC$_{18}$(5)DS 標識リポソームの使用が適切であるか、DiIC$_{18}$(5)DS 標識リポソームを含有する ALIS の組織内分布及び PK を評価した。DiIC$_{18}$(5)DS 標識リポソームを含有する ALIS を投与したときのアミカシンの PK は、非標識の ALIS を投与したときの PK と類似していた。すなわち、他の分布試験の結果も含めて、吸入投与後の肺中のアミカシンは投与後の速い段階で肺から急速に消失した（$t_{1/2}$ α は 7 時間以下）。しかし、DiIC$_{18}$(5)DS の濃度は、投与後 24 時間まで本質的に変化しなかった。AMIK-BIO-2009-26-PCLN 試験（2.6.4.4.3.4 項）と同条件で、投与後 28 日まで評価した試験においては、DiIC$_{18}$(5)DS はアミカシンと比較して肺からより緩徐に消失した。すなわち、投与後 28 日において、アミカシンは投与終了直後（IPD）の濃度の 93%が消失したのに対し、DiIC$_{18}$(5)DS は IPD の濃度の 64%が消失した。DiIC$_{18}$(5)DS の肺からの緩徐な消失と一致して、血清及び尿中に DiIC$_{18}$(5)DS は検出されなかった。投与後 28 日までの大部分の期間において、DiIC$_{18}$(5)DS の蛍光は主に細胞（マクロファージ）内に検出された。ただし、DiIC$_{18}$(5)DS は DPPC 又はコレステロールの構造を模したものではないので、肺中の DiIC$_{18}$(5)DS の保持時間は、ALIS 吸入投与後の肺中の DPPC 又はコレステロールの保持時間を反映していない可能性がある。しかし、DiIC$_{18}$(5)DS の挙動は、リポソームの肺への初期沈着及び肺マクロファージによる取込みを表している。その後の試験において、AMIK-BIO-2009-28-PCLN 試験（2.6.4.4.3.5 項）と同じ曝露量が得られるように計画された投与方法を用い、ラットに DiIC$_{18}$(5)DS 溶液を吸入投与した。その溶液は見かけ上ミセルではあったが、曝露パラメータ（AUC、C_{max} 及び最小濃度［C_{min}］）は AMIK-BIO-2009-28-PCLN 試験の結果と同程度であった。しかし、肺からの消失は DiIC$_{18}$(5)DS 標識リポソームと比較して DiIC$_{18}$(5)DS 溶液の方が速かった。

二重蛍光標識した ALIS（すなわち、アミカシン-TAMRA 及びリン脂質二重層膜中に DiIC$_{18}$(5)DS を含有）を投与したとき、パノラマ蛍光画像により、投与後 24 時間にわたって肺深部を含む肺全体にアミカシン及びリポソームが均一に沈着していることが明らかとなった（2.6.4.4.3.7 項、AMIK-BIO-2009-29-PCLN 試験）。同様の条件で投与後 28 日まで評価した試験においても、アミカシン及びリポソームの沈着は AMIK-BIO-2009-29-PCLN 試験の結果と一致していた（2.6.4.4.3.8 項、AMIK-BIO-2009-32-PCLN 試験）。顕微鏡による評価から、IPD では、アミカシン-TAMRA 及び DiIC$_{18}$(5)DS は肺全体に分布し、本質的に共局在化していることが示された。肺組織 1 g あたりのアミカシンの沈着量は、どの肺葉を評価したか、あるいは肺葉のどの部分を測定したかに関わらず同程度であった。投与後 28 日までに、沈着したアミカシンの約 90%

が肺から一様に消失したのに対し、$DiIC_{18}(5)DS$ は約 50%が消失した。他の組織分布試験の結果と合わせて考えると、肺からのアミカシン消失の $t_{1/2}\beta$ は約 400 時間であった。$DiIC_{18}(5)DS$ の消失はさらに遅く、それを反映するように投与後 28 日目までの期間で血清又は尿中に測定可能な濃度の $DiIC_{18}(5)DS$ は検出されなかった。

2.4.4.3.2　反復吸入投与後の分布

ラットにアミカシンとして 10 及び 90 mg/kg の用量で反復吸入投与したときのアミカシン、アミカシン-TAMRA 及び $DiIC_{18}(5)DS$ 標識リポソームの肺内沈着、保時及び消失を評価した。アミカシンの濃度は TDx 法により、蛍光標識したアミカシン及びリポソームは蛍光分析法により測定された。ラットに ALIS（アミカシンとして 70 mg/mL）を 10 又は 90 mg/kg/日の用量で 27 日間連日投与した。Day 28 に、ALIS 又は二重蛍光標識 ALIS（すなわち、アミカシン-TAMRA 及び $DiIC_{18}(5)DS$ を含有）を 90 mg/kg の用量で投与した（2.6.4.4.4.1 項、AMIK-BIO-2009-33-PCLN 試験）。この試験により、単回投与試験 AMIK-BIO-2009-29-PCLN 試験の結果と同様に、以下の注目すべき知見が得られた。肺中のアミカシン量は用量に伴って増加を示した。アミカシンは肺全体に均一に分布し、肺組織 1 g あたりのアミカシン量は、採取された部位にかかわらず同程度であった。アミカシンは肺から一様に消失したが、$DiIC_{18}(5)DS$ の肺からの消失は緩徐であった。ALIS 吸入投与後の肺に残存している部分は、主に肺胞及び間質性マクロファージに取り込まれた部分であり、肺中 $t_{1/2}\beta$ は 230 時間を超えていた。

2.4.4.4　代謝

アミカシンは代謝されないため（Bodey, 1974）、ALIS の代謝試験は実施しなかった。

2.4.4.5　排泄

ALIS の排泄を直接評価する試験は実施しなかった。しかし、2 回の試験により、ラットに ALIS（90 mg/kg）を単回吸入投与したときのアミカシンの組織内分布及び消失を評価し、FA（90 mg/kg）を投与したときの結果と比較した。これらの試験から、アミカシンの消失は主に腎臓を介して起こると考えられた。

最初の試験では投与後 24 時間まで評価したが、その結果は、既に述べた試験（2.4.4.3 項）と同様の結果であった。すなわち、FA 投与後と比較して、ALIS 投与後の肺沈着量は 2 倍に増加し、消失時間は約 3 倍延長した。さらに、投与後 24 時間の肺中アミカシン量は ALIS 投与後の方が高く、投与終了直後（IPD）の肺中アミカシン量に対する投与後 24 時間のアミカシン残存率は、ALIS の 43%に対し、FA では 12%であった。また、血清及び尿中アミカシン濃度は、ALIS 投与後よりも FA 投与後の方が高かった（2.6.4.6.1 項、AMIK-BIO-2009-24-PCLN 試験）。さらに、ALIS 投与後のラットの肺では、マクロファージへの取込みに一致する、主に斑点状の強い染色が認められた。一方、FA 投与後では弱い斑点状の染色が観察されたのみであり、マクロファージへの取込み量が低く、FA の肺からの消失が速いことと一致した。

次の試験では、AMIK-BIO-2009-24-PCLN 試験と同条件で、投与後 21 日まで評価した（2.6.4.6.2 項、AMIK-BIO-2009-30-PCLN 試験）。肺に関しては同様の結果が得られ、FA 投与後と比較して、ALIS 投与後ではアミカシンの肺沈着量の増加及び消失時間の延長、並びに主として斑点状の染色が認められた。一方、以前の結果とは対照的に、アミカシンの血清中濃度は、両被験物質で同程度であり（血清中アミカシンの投与後 24 時間までの濃度-時間曲線下面積

［$AUC_{0\text{-}24h}$］は、ALIS；486 μg•h/mL、FA；490 μg•h/mL）、尿中レベルは FA 投与後よりも ALIS 投与後の方が高かった（尿中アミカシンの $AUC_{0\text{-}24h}$ は、ALIS；約 7500 μg•h/mL、FA；約 4000 μg•h/mL）。各時点で使用した動物数が少なく（AMIK-BIO-2009-24-PCLN 試験［2.6.4.6.1 項］：2～3 匹／時点、AMIK-BIO-2009-30-PCLN 試験［2.6.4.6.2 項］：3 匹／時点）、この結果の変動の要因である可能性が考えられた。さらに、吸入チャンバー内のアミカシン濃度は、AMIK-BIO-2009-24-PCLN 試験（ALIS；1.3 mg/mL、FA；0.7 mg/mL）よりも AMIK-BIO-2009-30-PCLN 試験（ALIS；1.8 mg/mL、FA；1.7 mg/mL）の方が高かった。しかし、両試験ともに、FA 投与後の肺からの速い消失に対して、ALIS 投与後では depot（貯留）様効果を明確に示した。また、この試験により、ALIS 投与後の肺中アミカシン濃度が肺全体で均一であり、肺からの消失速度及び消失量がどの部位でも同程度であることが示された。また、この試験の結果から、非経口投与されたアミカシンと同様に、ALIS の排泄経路は尿中排泄であることが示唆された（2.6.4 項、Bodey et al, 1974、Contrepois et al, 1985）。さらに、ALIS を吸入投与したとき、投与量の 50%超が胃及び腸内容物中に存在することが示された。経口投与されたアミノグリコシドは吸収されないため、ALIS を吸入投与したときに胃腸管に移行したアミカシも未変化のまま糞中に排泄されると考えられた。

2.4.4.6　　薬物動態学的薬物互作用

ALIS に関する入手可能な情報に基づいて、動物を用いた追加の薬物動態学的薬物相互作用試験を実施する必要はないと考えられた。現時点で、膵臓酵素、ドルナーゼ α、高張食塩水、短期及び長時間作用型気管支拡張薬、全身性及び吸入ステロイド、並びに全身投与抗生物質と ALIS を併用投与した臨床試験において、ALIS との薬物相互作用を示唆する結果は得られていない。

2.4.4.7　　その他の薬物動態試験

ALIS に関する、その他の薬物動態試験は実施していない。

毒性試験で評価された主要なトキシコキネティクスの結果は、以下の 2.4.5 項で述べる。

2.4.5　毒性試験

本剤の毒性試験の一覧を表 2.4-1 に示す。

表 2.4-1　毒性試験一覧

Type of Study	Route of Administration	Test System	GLP Compliance
Repeat Dose			
28-Day Range Finding	Inhalation	Rat and Dog	No
1-Month Toxicity	Inhalation	Rat and Dog	Yes
3-Month Range Finding	Inhalation	Mouse	Yes
3-Month Toxicity	Inhalation	Dog	Yes
6-Month Toxicity	Inhalation	Rat	Yes
9-Month Toxicity	Inhalation	Dog	Yes
Genetic toxicity			
Ames	*In vitro*	*Salmonella and E coli*	Yes
Chromosomal Aberration	*In vitro*	Chinese Hamster Ovary Cells	Yes
Gene Mutation	*In vitro*	Mouse Lymphoma L5178Y Cell Line	Yes
Micronucleus	Inhalation	Rat	Yes
Carcinogenicity			
2-Year Carcinogenicity	Inhalation	Rat	Yes
Reproductive and Developmental Toxicity			Yes
28-Day Range-Finding	Inhalation	Juvenile Rat	No
28-Day Toxicity	Inhalation	Juvenile Rat	Yes
Other Toxicity Studies			
Immunotoxicity	Inhalation	Rat	No
Impurities			
Ames	*In vitro*	*Salmonella* and *E coli*	Yes
2-Week Toxicity	Inhalation	Rat	Yes

本剤の臨床開発及び製造販売承認のための重要な毒性試験は、全て適切な試験系及び試験デザインを選択し、GLP 基準及び関連する ICH ガイドラインに準拠して実施した。

2.4.5.1　単回投与毒性試験

本剤の単回吸入毒性試験は実施しなかったが、マウス、ラット及びイヌを用いた重要な反復吸入投与毒性試験の初回投与日のデータから、本剤の忍容性は概ね良好であることが示された。これらの試験における初回投与日のアミカシン最高用量は、30 mg/kg（イヌ）～135 mg/kg（ラット）であった。

2.4.5.2　反復投与毒性試験

2.4.5.2.1　緒言

ラット及びイヌを用いた 1 ヵ月間、マウス及びイヌを用いた 3 ヵ月間、ラットを用いた 6 ヵ月間、イヌを用いた 9 ヵ月間反復吸入投与毒性試験を実施した。これらの動物種は、新原薬及び新製剤の安全性評価に通常使用されるものである。これらの試験では、目標用量と実際の投与量と

の間に顕著な差異が認められない限り、目標用量を記載した。全ての試験に、TK 評価を含めた。主要な試験は全て、GLP 基準並びに関連する ICH ガイドライン（S4；動物を用いた慢性毒性試験の投与期間について（げっ歯類及び非げっ歯類の毒性試験）、M3(R2)；医薬品の臨床試験及び製造販売承認申請のための非臨床安全性試験の実施についてのガイダンス、及び、S3A；トキシコキネティクス（毒性試験における全身的暴露の評価）に関するガイダンス）を遵守して実施した。ラット及びイヌを用いた 28 日間反復吸入投与毒性試験は、1 ヵ月間の GLP 適合試験の試験デザインを裏付けるための探索的試験であったことから、GLP 非適合で実施した。ラット及びイヌを用いた 28 日間及び 1 ヵ月間の試験では、開発初期の ALIS 製剤（SLIT™ Amikacin）を投与した。なお、構成成分であるアミカシン、DPPC 及びコレステロールは、市販予定の ALIS 製剤と同一であった。

毒性標的器官の評価に加えて、ラット 6 ヵ月間毒性試験の 3 ヵ月目の中間評価の結果（2.6.6.3.3.3 項、[redacted] Study 07-6308 試験）を用いて、ラット 2 年間吸入投与がん原性試験の用量を選択した。マウスを用いた 3 ヵ月間吸入投与用量設定試験（2.6.6.3.2.1 項、[redacted]Study 07-6307 試験）は、主としてマウスを用いた吸入投与がん原性試験のための用量選択についての情報を得るために実施され、その結果、マウス吸入投与がん原性試験は、ALIS の開発を裏付けるためには不要であると判断されたことから、当該試験については本モジュールでは論じないこととした。当該試験については 2.6.6.3.2.1 項で詳述する。当該試験で得られた所見は、ラットを用いた反復吸入毒性試験の所見と一致した。

2.4.5.2.2　　ラット

Sprague Dawley ラットを用いて一連の ALIS 吸入毒性試験を実施した。ラット 1 ヵ月間反復投与毒性試験の用量を選択する目的でデザインされた投与期間 28 日間の用量設定試験（非 GLP 試験）では、ALIS を目標アミカシン用量 10 及び 100 mg/kg/日にて鼻腔内吸入投与した。また、リポソーム対照（ELC）群も設定した（2.6.6.3.3.1 項、[redacted] Study 667621 試験）。当該試験では、ALIS 投与に関連した生存中の毒性所見は認められなかった。注目すべき剖検所見は、高用量群における肺重量の ELC 群に比した増加、ELC 群及び低用量群における多巣性マクロファージ集簇及び高用量群における軽度ないし中等度のびまん性の泡沫肺胞マクロファージの集簇であった。このような肺の変化は、ALIS 製剤／脂質製剤からの吸入粒子の排除に関連した適応性変化と考えられる。

28 日間用量設定試験の結果に基づき、GLP 適合のラット 1 ヵ月間反復吸入（鼻腔内）毒性試験の投与量として 10、30 及び 100 mg/kg/日を選択した（2.6.6.3.3.2 項、[redacted] Study 667396 試験）。対照群ラットには空気、1.5%生理食塩水又は ELC を、また別の群のラットには FA を、ALIS 高用量群と同一期間にわたり吸入投与した。当該試験では、1 ヵ月間の投与後観察期間も設定した。定常状態（Day 30）におけるアミカシン全身曝露量（C_{max} 及び AUC）は、FA 群及び ALIS 高用量群においてのみ検出可能であった（5.4 µg/mL 及び 15.5 µg•h/mL［FA 群雌］、4.2 µg/mL 及び 6.9 µg•h/mL［ALIS 群雌］）。Day 30 時点におけるアミカシンの総尿中排泄量は、FA 群で、ALIS 高用量群に比べて多かった（FA 群で、血漿中アミカシン濃度が ALIS 高用量群より高いことと一致した）。肺中平均アミカシン濃度は、ALIS 投与ラットで、FA 投与ラットに比べて 3 倍高かった。生存中に薬物関連の変化は認められなかった。可逆性の肺重量の増加が、FA 群並びに ALIS 中用量群及び高用量群で顕著に認められた。病理組織学的検査では、アミカシンの全群で肺にびまん性泡沫肺胞マクロファージの集簇が認められた。重症度は、ALIS 低用

量群では軽微から軽度、FA 及び ALIS 中用量群では軽度から中等度、ALIS 高用量群では中等度であった。このような肺の変化は、前述の 28 日間反復投与毒性試験の場合と同様、ALIS 製剤／脂質製剤からの吸入粒子の排除に関連した適応性変化と考えられた。当該試験のアミカシン群全てで認められた投与に関連した所見は、軽度から中等度の気管支クララ細胞の肥厚であった（注：当該所見は、投与期間が 2 年間までのラット試験では報告されなかった）。ELC 群ラットでは、軽微ないし軽度の泡沫肺胞マクロファージの集簇も認められた。肺切片の脂質染色では、その大部分が中性脂肪であることが確認された。上気道刺激性（鼻腔、喉頭及び気管）を示す所見が FA 群及び全 ALIS 群で認められ、これはラットを用いた鼻腔内吸入試験で高頻度にみられる非特異的な局所刺激性と考えられた。1 ヵ月間の投与後観察期間終了時には、回復性、又は回復傾向が認められた。以上から、当該試験における無毒性量（NOAEL）は 100 mg/kg/日と判断された。

1 ヵ月間反復吸入毒性試験の結果に基づき、GLP 適合のラット 6 ヵ月間反復吸入（鼻腔内）毒性試験の投与量として 10、30 及び 90mg/kg/日を選択した（2.6.6.3.3.3 項、[redacted]Study 07-6308 試験）。対照群ラットには、1.5%生理食塩水を、ALIS 高用量群と同一期間にわたり吸入投与した。当該試験では、3 ヵ月の投与期間終了後の中間評価及び 12 週間の回復期間も設定した。

ALIS 吸入投与後、全ラットでアミカシンの全身曝露が認められた。6 ヵ月間反復投与後の血清中 AUC 値は約 2.3～10 µg•h/mL であった。ALIS の 3 及び 6 ヵ月間投与後には、アミカシンの尿中濃度は用量依存的で、概ね用量に比例して増加した。肺中の平均アミカシン濃度（雌雄併せて）は、投与 6 ヵ月後では 3 mg/g 肺重量以下であった。回復期間終了時では 0.036 mg/g 肺重量以下となったことから、投与中止により、アミカシンは肺から容易に消失することが示唆された。ALIS は、当該試験で検討した全ての用量で良好な忍容性を示した。

投与期間終了時、90 mg/kg/日群の雄ラットでは、体重が対照群雄ラットより 17%少なく、摂餌量が当該試験期間を通して対照群ラットより一貫して少なかった。90 mg/kg/日群では、当該試験期間を通して被毛の発育不全、立毛及び湿性ラ音等の一般状態が、低頻度に、かつ一過性又は散発的に観察された。投与 6 ヵ月後の臨床検査値の変動は軽微で、認められたのは、30 及び 90 mg/kg/日群における好中球の絶対数の増加（投与 3 ヵ月後にも認められた）、30 及び 90 mg/kg/日群雄における血清リン値の上昇、90 mg/kg/日群雄における血清トリグリセライド値の低下及び 90 mg/kg/日群雌における血清グロブリン値の低下であった。

3 及び 6 ヵ月間投与後の両時点で、全用量群に肺重量の増加が認められ、また 30 及び 90 mg/kg/日群ラットでは、剖検により肺に黄褐色ないし白色の病巣が認められた（後述するとおり、肺胞マクロファージ集簇に関連）。3 及び 6 ヵ月間投与後の両時点には、肺、鼻甲介、喉頭、気管及び腎臓に被験物質関連の顕微鏡的変化も認められた。3 及び 6 ヵ月間投与後には、全用量群において、肺での泡沫肺胞マクロファージの集簇が認められた（6 ヵ月間投与後では 10 mg/kg/日群で軽度、30 mg/kg/日群で大部分が中等度、90 mg/kg/日群で大部分が重度）。このような肺の変化は、ALIS 製剤／脂質製剤からの吸入粒子の排除に関連した適応性変化と考えられ、当該所見については文献でも報告されている。前述の適応性変化に加えて、30 及び 90 mg/kg/日群ラットの肺では投与 13 週間後に、全用量群ラットの肺では投与 26 週間後に、亜急性／慢性活動性炎症の多発性病巣が認められ、2 高用量群では肺胞上皮の再生性過形成を伴った炎症が認められた。

肺におけるこのような有害な炎症性及び過形成性変化は、ALIS（薬剤／脂質）からの吸入粒子に慢性曝露した結果、肺粒子高負荷に至ったことにより二次的に発現したと考えられ、これに関しては、げっ歯類は非げっ歯類動物種に比較して感受性が特に高いことが知られている（2.4.6 項）。ALIS を用量 10、30 及び／又は 90 mg/kg/日にて 3 及び 6 ヵ月間投与したときに認められた上気道における所見は、鼻甲介の変性、喉頭の偽重層円柱上皮の扁平上皮／扁平上皮様化生／過形成及び気管上皮の変性であった。鼻甲介及び気管の変性は、ALIS の鼻腔内吸入での長期連日投与による局所刺激性変化と考えられたが、喉頭での所見は、ALIS 吸入投与に対する非特異的な反応と考えられた（Boorman, 1990）。

26 週間投与終了後の腎所見を、13 週間投与終了後と比較したところ、90 mg/kg/日群の雄で、尿細管皮質性腎症の発現率及び重症度が増加し（26 週間投与後：軽微～軽度、13 週間投与後：軽微）、一方 90 mg/kg/日群雌では軽微な腎症の発現率のみの増加が認められた。腎臓は、アミカシン及び他のアミノグリコシド系抗生物質の標的器官として知られているため、本剤投与により腎症が発現することは予期せぬことではなかった。

12 週間の回復期間終了後では、体重減少は高用量群の雄ラットで（ただし投与後期間中の体重増加は、対照群と同程度）、またいくつかの臨床検査値変動は雌ラットで依然として顕著に認められた（30 及び 90 mg/kg/日群で血清リン値の上昇、90 mg/kg/日群で血清グロブリン値の低下）。標的組織の病理組織学的変化は、10 mg/kg/日群では大部分が完全に回復し、30 及び 90 mg/kg/日群では回復性が示された。高用量群ラットで 3 又は 6 ヵ月間の投与終了後に消失した肺所見は、ラット 2 匹における肺胞線維症の極めて軽微な単一病巣、及びラット 4 匹における臓側胸膜被膜の亜急性／慢性炎症／線維症の極めて軽微な病巣であった。当該変化は、ALIS による肺粒子高負荷に伴って生じた炎症性及び過形成変化の後遺症であると判断された。

上気道の変化に対する NOAEL は、10 mg/kg/日未満と判断された。前述した通り、肺におけるマクロファージの集簇は、ALIS 投与で予測された適応性変化であり、したがって毒性所見とは判断されなかった。しかし、肺胞マクロファージの浸潤を伴った亜急性／慢性炎症及び／又は肺胞上皮過形成が発現したことに基づき、肺における変化に対する NOAEL は 10 mg/kg/日未満と判断された。アミノグリコシド系抗生物質の既知の標的器官である腎臓における腎症に対する NOAEL は、30 mg/kg/日とされた。

表 2.4-2 に示す通り、定常状態における肺中のアミカシンの平均濃度は、ラットでは、検討した全用量でヒトより高いと推定される。一方で AUC は、ラットで検討した全用量で、ヒトの場合より小さかったことから、アミカシンの定常状態血漿／血清中曝露量データは表示していない。

表 2.4-2　　ラット及びヒトにおける定常状態平均アミカシン肺中濃度

SPECIES	STUDY	DOSE (mg/kg/day)	LUNG AMIKACIN LEVEL (mg/g of lung)	MULTIPLE OF HUMAN LUNG AMIKACIN LEVEL (adult)
Human[a]	ALIS clinical development program	12 (50-kg adult)	0.254	-
Rat[b]	1 month; inhalation	10	0.569	2.2
		30	1.221	4.8
		100	2.777	11
Rat[c]	6 months; inhalation	10	1.314	5.2
		30	2.451	9.6
		90	2.959	12

[a] Lung amikacin concentrations in humans were calculated as follows: 590 mg ALIS dose/1000 g (adult) × 0.43 (deposition factor). For information on how amikacin lung concentrations were calculated, (Module 2.6.6, Section 1).
[b] Study No. 667396 (combined-gender data); NOAEL 100 mg/kg/day.
[c] Study No. 07-6308 (combined-gender data); NOAEL < 10/mg/kg/day (lung) and 30 mg/kg/day (kidneys).

2.4.5.2.3　　イヌ

ビーグル犬を用いて一連の ALIS 吸入毒性試験を実施した。イヌ 1 ヵ月間反復投与毒性試験の用量を選択する目的でデザインされた投与期間 28 日間の非 GLP 用量設定試験では、ALIS を目標アミカシン用量 5 及び 50 mg/kg/日にて口腔チューブを装着した閉鎖性フェイスマスクを用いて吸入投与し、空リポソーム対照（ELC）群も設定した（2.6.6.3.4.1 項、[redacted] Study 667637 試験）。

投与後 15 分以内での定常状態におけるアミカシン血漿中濃度は、低用量群では、自動 Abbott TD_x 法によるアミカシン定量法の LLOQ である 3 µg/mL 未満、高用量群では約 9～15 µg/mL の範囲であった。1 ヵ月間投与後のアミカシン尿及び肺中濃度は、用量依存的に増加した（高用量群では用量比例性を上回って増加）。当該試験では、ALIS 投与に関連した生存中の有害所見は認められなかった。

注目すべき剖検所見は、高用量群イヌにおける肺重量の ELC 群に比した増加、ELC 群及び低用量群における多巣性肺胞マクロファージ集簇、及び高用量群における一般的なびまん性の泡沫肺胞マクロファージの集簇であった。このようなマクロファージの集簇は、ラットの場合と同様に、ALIS 製剤／脂質製剤からの吸入粒子の排除に関連した適応性変化と考えられた。全用量群のいずれのイヌにおいても、ALIS からの粒子による肺負荷が相対的に高いにもかかわらず（1 mg/g 肺重量を超える）、肺の炎症性、過形成性又は前がん性変化は認められなかった。

腎臓に関しては、高用量群の雄 1 匹において、極めて軽微な近位尿細管の再生／変性が認められた。

28 日間用量設定試験の結果に基づき、GLP 適合のイヌ 1 ヵ月間反復吸入毒性試験の投与量として 5、15 及び 50 mg/kg/日を選択した（2.6.6.3.4.2 項、[redacted] Study 667574 試験）。対照群イヌには 1.5%生理食塩水又は ELC を、ALIS 高用量群と同一期間にわたり吸入投与した。また別の群のイヌには FA を、ALIS 高用量群と同一期間にわたり吸入投与した。当該試験では、1 ヵ月間の投与後観察期間も設定した。吸入投与は、口腔チューブを装着した閉鎖性フェイスマスクを用いて行った。当該試験期間を通して投与されたアミカシンの用量は、目標用量未満（FA 及び ALIS

群それぞれで 38、4、10 及び 31 mg/kg/日）であった。したがって当該試験の結果は、実際に投与した用量を用いて記載した。31 mg/kg/日の高用量は、測定した毎分呼吸量、当該試験で使用した吸入投与装置を用いて得られた最高エアロゾル濃度及び最長曝露期間（技術的限界）に基づいて、投与可能な最高用量であることが示された。定常状態での曝露量データ（C_{max} 及び AUC）は、FA 及び ALIS 高用量群についてのみ得られた。Day 30 の雌雄両性を併せた AUC 値は、FA 群で約 24 µg•h/mL、それに対して ALIS 高用量群で約 20 µg•h/mL であった。雌雄両性を併せた場合の定常状態での肺中の平均アミカシン濃度は、FA 及び ALIS 群それぞれで約 0.2、0.3、0.9 及び 3.2 mg/g 肺重量であった。したがって ALIS 群のイヌ肺中では、アミカシンが FA 群の最大 16 倍多く保持されたことになる。当該試験ではアミカシンの全用量において、忍容性が良好であった。生存中の観察所見は、全群における流涎（発現率はアミカシン群で高かった）、FA 群雄及び ALIS 高用量群雌雄における血清トリグリセライド値の軽度上昇及び、FA 及び ALIS 高用量群雌における血清リン値の軽度上昇であった（注：当該変化のいずれも、ALIS を用いたイヌ長期毒性試験では発現しなかったことから、当該試験での投与との関連性は不明である）。肺重量については、中及び高用量 ALIS 群で、対照群に比べて高かった。病理組織学的評価では、ALIS 投与イヌ肺において、用量依存的な肺胞及び間質の泡沫マクロファージ集簇が認められ、その重症度は、低用量群では極めて軽微、中及び高用量群では軽度～重度であった。マクロファージは細胞質の空胞化を特徴とし、高用量 ALIS 群では時に、小型の不規則な好塩基性含有物が観察された。脂肪染色では、マクロファージの大部分が染色されないか、又は中性脂肪が染色された。このような肺の変化は、ALIS 製剤／脂質製剤からの吸入粒子の排除に対する適応性変化と考えられた。これに関連した所見として、ALIS 高用量群で、流入気管リンパ節での泡沫マクロファージの増加、また中及び高用量 ALIS 群で、肺の血管周囲／細気管支周囲のリンパ様細胞の浸潤が認められ、当該所見もイヌにおける適応反応と判断された。ALIS 高用量群のイヌ 2 匹で、喉頭に軽微な限局性びらんが認められたが、毒性学的意義は不明と判断された。投与終了 1 ヵ月後には、生存中の変化及び肺重量の増加は回復し、マクロファージ集簇については回復性が示された。したがって ALIS 群での NOAEL は 31 mg/kg/日と判断された。

1 ヵ月間反復吸入毒性試験の結果に基づき、GLP 適合のイヌ 3 ヵ月間反復吸入毒性試験の投与量として 5、10 及び 30mg/kg/日を選択した（2.6.6.3.4.3 項、[redacted] Study 07-6306 試験）。対照群イヌには、1.5%生理食塩水を投与した。吸入投与は、フェイスマスクを用いて行った。当該試験では、2 ヵ月間の投与後回復期間も設定した。

3 ヵ月間の投与終了時点における定常状態における血清中 AUC_{last} 値（投与終了後 0～4 時間）は、5 mg/kg/日群の雄で約 2.4 µg•h/mL、雌で約 2.6 µg•h/mL、30 mg/kg/日群の雄で約 15 µg•h/mL、雌で約 13 µg•h/mL であった。Day 89 の曝露量は、Day 1 と比較して高頻度に高く（最大 2.6 倍）、性差は認められなかった。定常状態での肺中の平均アミカシン濃度（雌雄両性を併せて）は、ALIS 群で約 1、3 及び 5 mg/g 肺重量であった。アミカシンは、2 ヵ月間の投与後観察期間終了時点においても肺中に検出されたが、濃度は大幅に減少していた（30 mg/kg/日群で約 30%）。当該試験では、ALIS の全用量について、忍容性は良好で、投与に関連した生存中の所見、又は肉眼的剖検所見は認められなかった。1 ヵ月間反復投与毒性試験の場合と同様に、ALIS の全用量群において、肺に肺胞泡沫マクロファージが検出され、重症度は軽度～重度であった。当該マクロファージは、高頻度に細胞質に好塩基性顆粒を含む空胞化を呈することを特徴とした。30 mg/kg/日群では、マクロファージの集簇が、肺重量の増加と関連していた。このような肺における変化は、他の試験と同様に、ALIS 製剤／脂質製剤からの吸入粒子の排除に

対する適応性変化と考えられた。また全用量群のいずれのイヌにおいても、ALIS からの粒子による肺負荷が相対的に高いにもかかわらず（1 mg/g 肺重量を超える）、肺の炎症性、過形成性又は前がん性変化は認められなかった。泡沫マクロファージは、全用量群の雄及び 10 mg/kg/日以上の用量群の雌で、縦隔リンパ節及び気管気管支リンパ節にも認められ、肺の異物排除の結果である可能性が考えられた。30 mg/kg/日用量群では、イヌ 8 匹中 1 匹における喉頭潰瘍（ALIS 吸入に対する非特異的反応と判断された）及び、軽微～軽度の腎臓近位尿細管における好酸性物質の沈着の増加が認められた。

2 ヵ月間の回復期間終了後、全用量群において、投与に関連した肺の変化の回復は部分的であったが、一方でリンパ節、腎臓及び喉頭の変化は完全に回復した。したがって肺及び流入リンパ節の変化に対する NOAEL は 30 mg/kg/日と判断された。腎臓の変化に対する NOAEL は、30 mg/kg/日用量で好酸性物質の沈着の増加が認められたことに基づき、10 mg/kg/日と判断された。

3 ヵ月間反復吸入毒性試験の結果に基づき、GLP 適合のイヌ 9 ヵ月間反復吸入毒性試験の投与量として 5、10 及び 30 mg/kg/日を選択した（2.6.6.3.4.4 項、[redacted] Study 11-6400 試験）。対照群には 1.5%生理食塩水又は ELC を投与した。当該試験では、吸入投与はフェイスマスクを用いて行った。当該試験では 3 ヵ月間の投与後回復期間も設定した。

イヌ 9 ヵ月間反復吸入毒性試験では、3 ヵ月間反復吸入毒性試験（2.6.6.3.4.3 項、[redacted] Study 07-6306 試験）とは対照的に、アミカシンの蓄積は認められなかった。定常状態における血清中 AUC_{last} 値は、Day 1 では約 2～13.6 µg•h/mL、6 ヵ月時点では 1.8～9.2 µg•h/mL、9 ヵ月時点では 1.8～9.5 µg•h/mL であった。雌雄両性の定常状態における肺中の平均アミカシン濃度は、5 mg/kg/日群で 0.678 mg/g 肺重量、30 mg/kg/日群で 2.685 mg/g 肺重量であった。3 ヵ月間回復期間終了後の血清中アミカシン濃度は LLOQ（150 ng/mL）未満であったが、肺中アミカシン濃度は、30 mg/kg/日群で 0.02～0.8 mg/g 肺重量であった。

全用量において忍容性は良好であった。イヌ 9 ヵ月間反復吸入毒性試験では、他の ALIS イヌ反復投与毒性試験結果と一致して、標的臓器は肺及び腎臓であった。主要所見は、肺胞泡沫マクロファージの集簇と、近位尿細管における細胞質内褐色色素の増加であった。マクロファージの集簇は、ALIS 製剤／脂質製剤からの吸入粒子の肺からの排除に関連した適応性変化と考えられた。ただし当該所見には、組織壊死、扁平上皮化生又は増殖性/腫瘍性病変との関連が認められなかった。9 ヵ月間の投与期間終了時点の肺所見の発現率及び重症度は、3 ヵ月間の投与期間終了時点と同等であった。以上から、ALIS を連日反復投与しても、イヌでの ALIS 投与に関連した肺の変化はそれ以上進行しないと考えられた。9 ヵ月間反復吸入毒性試験における腎臓の近位尿細管所見の特徴は、3 ヵ月間反復吸入毒性試験とは異なった（9 ヵ月間試験では細胞質内褐色色素であったが、3 ヵ月間試験では好酸性物質の沈着）。さらに 9 ヵ月間試験では、全用量群で腎所見が顕著に認められたが、3 ヵ月間試験では、腎所見が認められたのは 30 mg/kg/日群においてのみであった。しかし腎所見の重症度は両試験で同程度であり（軽微～軽度）、かつ解剖学的分布も同程度であった。また、褐色色素と他の細胞変化（炎症、上皮変性／壊死、又は細胞増殖等）、又は関連する血液生化学検査のパラメータ上昇との関連が認められなかったことから、褐色色素が腎機能に影響を及ぼす可能性は低く、したがって褐色色素は毒性変化ではないと判断された

ALIS 投与に関連して認められたその他の変化は、鼻甲介の変性、気管分岐部の塩基性顆粒であった。しかしこのような変化は、ALIS を 3 ヵ月間吸入投与したイヌでは認められなかったこ

とから（2.6.6.3.4.3 項、[redacted] Study 07-6306 試験）、長期投与による影響を示している可能性がある。鼻甲介の変化は局所刺激性と一致した（Herbert, 1999）。ALIS は、（イヌではフェイスマスクを用いた吸入投与であるのに対して）ヒトでは経口ネブライザーによる吸入投与であることから、鼻甲介で認められた変化の臨床的意義は不明である。ALIS 投与イヌの大部分で認められた二次性変化は、全用量群における肺の主な流入リンパ節中のマクロファージの増加である。当該所見の発現率及び重症度は、9 ヵ月間試験では 3 ヵ月間試験に比べて増加し、長期投与による影響を示している可能性があった。気管支の変化は完全に回復したが、肺、肺の流入リンパ節、鼻甲介及び気管分岐部の変化については、回復傾向が示された。腎所見は完全に回復した。9 ヵ月間試験での NOAEL は、30 mg/kg/日と判断された。

表 2.4-3 に示す通り、イヌでの定常状態における肺中の平均アミカシン濃度は、検討した全用量群でヒトより高いと推定された。イヌにおいて検討した全用量での AUC 値は、ヒトの AUC 値より低いことから、アミカシンの定常状態における血漿／血清中曝露量データについては表示していない（ただし、イヌ 1 ヵ月試験における高用量群では、アミカシン AUC がヒトでの AUC と同等であった）。

表 2.4-3　　イヌ及びヒトでの定常状態における肺中の平均アミカシン濃度

SPECIES	STUDY	DOSE (mg/kg/day)	LUNG AMIKACIN LEVEL (mg/g of lung)	MULTIPLE OF HUMAN LUNG AMIKACIN LEVEL (adult)
Human[a]	ALIS clinical development program	12 (50-kg adult)	0.254	-
Dog[b]	1 month; inhalation[c]	5	0.331	1.3
		15	0.899	3.5
		50	3.166	12
Dog[d]	3 months; inhalation	5	1.237	4.9
		10	2.659	10
		30	5.223	21
Dog[e]	9 months; inhalation	5	0.678	2.7
		10	1.270	5.0
		30	2.685[f]	11

[a] Lung amikacin concentrations in humans were calculated as follows: 590 mg ALIS dose/1000 g (adult) lung weight × 0.43 (deposition factor). For information on how amikacin lung concentrations were calculated (Module 2.6.6, Section 1).
[b] Study No. 667574 (combined-gender data); NOAEL was 31 mg/kg/day.
[c] Achieved doses were 4, 10, and 31 mg/kg/day.
[d] Study No. 07-6306 (combined-gender data); NOAEL 10 mg/kg/day (kidneys) and 30 mg/kg/day (lungs).
[e] Study No. 11-6400 (combined-gender data); NOAEL 30 mg/kg/day.

2.4.5.2.4　　反復投与毒性試験における標的臓器

本剤の投与経路が吸入投与経路であったことから予測された通り、アミカシンに対する全身の曝露量（ng/mL～低 μg/mL）が肺における曝露量（μg～低 mg/g 肺重量）より相対的に低かったことと一致して、肺は、ALIS の反復投与毒性試験における主な標的臓器であった。反復投与毒

性試験では、イヌ 3 及び 9 ヵ月間毒性試験及びラット 6 ヵ月間毒性試験で軽度の腎臓の変化が認められたことを除いて、呼吸器系以外の臓器又は組織に投与に関連した変化は認められなかった。腎臓は、アミノグリコシド系抗生物質の標的器官であることは周知のことであるため、アミカシン及び当該クラスの他の薬剤を反復投与した場合に腎臓の変化が認められることは予期せぬことではなかった。上気道の変性は、鼻腔、喉頭及び／又は気管で認められた。ラットでは鼻部曝露であったのに対して、イヌではフェイスマスクを用いた吸入投与であったことから、上気道の変化はラットでより顕著であった（特に鼻甲介において）。イヌで認められた二次性変化には、肺の主な流入リンパ節における変化があった。これらの結果に基づき、肺及び腎臓に焦点を当てて以下に考察する。

2.4.5.2.4.1　　肺

マウス、ラット及びイヌを用いて、名目用量 10～100 mg/kg/日で投与した反復吸入毒性試験において、ALIS 又はそのリポソーム構成成分曝露後に認められた主要な所見は、泡沫肺胞マクロファージの集簇であった（ALIS > 非封入リポソーム）。肺における泡沫マクロファージの集簇は用量依存的であり、ALIS 高用量では発現率及び重症度が高く、非封入リポソームでは重症度が低かった。全般的に見て、このような肺の変化は、ALIS 製剤／脂質製剤からの吸入粒子の排除に関連した適応性変化と考えられ、当該所見については文献でも報告されている。非臨床試験では、1～3 ヵ月間の回復期間後に、マクロファージ集簇の完全な回復又は回復性の傾向が示された。ラットでは投与の長期化に伴いマクロファージ集簇の重症度が高くなる傾向が見られたが、当該傾向は、イヌに ALIS を最長 9 ヵ月間投与した試験では認められなかった。さらに本剤をラットに 3 サイクル吸入投与レジメン（ALIS 90 mg/kg/日を 1 ヵ月間投与、その後 1 ヵ月間休薬を 1 サイクルとして 3 サイクル）にて投与したところ、連続投与サイクルで見られたマクロファージ浸潤の増大は認められなかった。

6 ヵ月間反復投与毒性試験でラットに大部分が中等度～重度のマクロファージの集簇を引き起こした用量（30 mg/kg/日以上）にて、3 ヵ月間投与したところ、軽微～軽度の炎症病巣が認められ、一方 6 ヵ月間投与後では、10 mg/kg/日投与ラットの数匹、並びに 30 及び 90 mg/kg/日投与ラットの大部分で、軽度～中等度の亜急性／慢性炎症の多発性病巣が認められた。ラットでは、30 mg/kg/日以上の用量で、肺胞上皮の軽微～大部分が軽度の限局性の再生性過形成を伴った炎症が認められた。肺におけるこのような有害な炎症性及び過形成性変化は、ALIS（薬剤／脂質）からの吸入粒子に慢性的に曝露された結果、肺粒子高負荷に至ったことにより二次的に発現したと考えられ、これに関しては、げっ歯類は非げっ歯類動物種に比較して感受性が特に高いことが知られている（2.4.6 項）。

げっ歯類とは対照的に、イヌでは、ALIS を 3 又は 9 ヵ月間連日吸入投与した場合、肺中アミカシン濃度はげっ歯類と同等又はそれより高く、ALIS からの肺粒子負荷はげっ歯類と同等又はそれより高かったにもかかわらず、マクロファージ浸潤に伴った炎症又は肺胞過形成のエビデンスは認められなかった（中等度～重度のマクロファージ集簇は認められた）。気管支リンパ節及び縦隔リンパ節における泡沫マクロファージ集簇の発現率増加には、用量及び投与期間との関連性が認められ、泡沫マクロファージのリンパ節への遊走は、吸入投与された不溶性粒子に対する非特異的な免疫／排除反応と考えられている（Lewis, 2014）。重要なことは、ALIS の長期投与データでは、リンパ節において、投与に関連した有害な炎症反応のエビデンスが示されなかったことである。

2.4.5.2.4.2　　腎臓

ラットを用いた 6 ヵ月間反復吸入毒性試験では、連日投与 3 ヵ月時点に高用量群の雄数匹で軽微な腎症が認められた。連日投与 6 ヵ月終了時点には対照群ラットの雌雄各 2 匹（軽微）、高用量群の雄ラットの大部分（軽微～軽度）及び高用量群雌ラットの多数（軽微）で腎症が認められた。腎症は、12 週間の回復試験期間後にほぼ完全に回復した

イヌを用いた 3 ヵ月間吸入毒性試験では、30 mg/kg/日群で、腎臓の近位尿細管に好酸球物質の軽微～軽度沈着が認められ、アミカシンの腎細胞内への取り込みの可能性があることが示唆された。腎尿細管の変性又は壊死に関連する所見は認められなかった。また臨床検査で、血清クレアチニン等の関連するパラメータの異常は認められなかった。好酸球物質の沈着は、投与 2 ヵ月間後に完全に回復した。イヌを用いた 9 ヵ月間吸入毒性試験では、全用量群（5～30 mg/kg/日）の雄、並びに 10 及び 30 mg/kg/日の雌で腎臓の近位尿細管に軽微～軽度の細胞質内褐色色素が認められた。3 ヵ月間吸入毒性試験における好酸性物質の沈着と同様に、褐色色素でも、生存中の腎異常所見又は病理組織学的変化との関連は認められず、完全に回復した。

2.4.5.3　　遺伝毒性

本剤の遺伝毒性について、充分に確立したバリデーション済みの *in vitro* 及び *in vivo* 遺伝毒性試験の標準的組合せにより評価した。遺伝毒性試験の標準的組合せは、ICH ガイドライン S2(R1)「医薬品の遺伝毒性試験及び解釈に関するガイダンス」に記載のオプション 1 に準拠し、個々の試験デザインは、ICH ガイドライン S2(R1) 及び ICH ガイドライン M3(R2) を遵守した。試験は全て GLP 適合で実施した。*In vitro* 試験は、S9 活性下及び非活性下の双方で実施した。開発初期の ALIS 製剤（1 mL 中アミカシン 21.4 mg 含有）は、細菌を用いる復帰突然変異試験（Ames 試験）で変異原性を示さず、チャイニーズハムスター卵巣由来細胞（CHO）において染色体構造異常を引き起こさなかった。これらの試験結果は、以下の理由から、市販予定の ALIS 製剤（1 mL 中アミカシン 70 mg 含有）の開発に適用できると判断した。1. ALIS の全ての製剤は DPPC とコレステロールを[redacted]で含有する。2. 開発初期の ALIS 製剤は、脂質／薬物比は異なる（3.3:1 vs 0.8:1）が、ALIS 70 mg/mL 製剤と同一の有効成分及び添加剤、すなわち、アミカシン、DPPC、コレステロール及び NaCl を含有する。3. Ames 試験における細胞毒性又は CHO 細胞を用いた染色体異常試験における被験物質の析出があり、検討濃度には制限があった。

ALIS は、Ames 試験（2.6.6.4.1.1 項、[redacted]Study 7522-100 試験）、マウスリンフォーマ突然変異試験（2.6.6.4.2.1 項、[redacted] Study 7522-102 試験）又は CHO 細胞を用いた染色体異常試験（2.6.6.4.2.2 項、[redacted]Study 7522-101 試験）のいずれの試験菌株においても変異原性は示されなかった。さらに、遊離型アミカシンは、マウスリンフォーマ突然変異試験（2.6.6.4.2.1 項、[redacted]Study 7522-102 試験）及び Ames 試験（2.4.5.7.4 項）で変異原性を示さなかった。Ames 試験及びマウスリンフォーマ試験の双方で細胞毒性が認められ、染色体異常試験では被験物質の析出が認められた。細胞毒性の確認試験で検討した最高濃度は、Ames 試験では *Salmonella* 菌株（+/-S9）で 500/1000 µg/プレート、*E coli* WP2 uvrA 菌株（+/-S9）で 100 µg/プレートであった。また、マウスリンフォーマ試験では 5000 µg/mL（S9 活性下で 4 時間、非活性下 24 時間培養）、染色体異常試験では 100 µg/mL（S9 非活性下で 18 時間曝露）及び 50 µg/mL（S9 活性下で 3 時間曝露）であった。

Sprague Dawley ラットに ALIS を 15～135 mg/kg の用量にて 3 日間吸入投与して実施した小核試験において、ALIS は染色体異常誘発性を示さなかった（2.6.6.4.3.1 項、[redacted] Study 07-6315 試験）。

上記試験結果に基づき、ALIS には遺伝毒性は認められず、したがってヒトに対する遺伝毒性リスクはないものと結論付けられた。

2.4.5.4　がん原性試験

2.4.5.4.1　ALIS のがん原性評価

Sprague Dawley ラットを用いたがん原性試験を、ICH ガイドライン（S1A；医薬品におけるがん原性試験の必要性に関するガイダンス、S1B；医薬品のがん原性を検出するための試験に関するガイダンス、S1C(R2) に基づき改訂されたがん原性試験ガイドライン、及び M3(R2)）に準拠し、GLP 基準を遵守して実施した。Sprague Dawley ラットは、がん原性試験で通常用いられる動物種であり、ALIS の重要なラット反復投与毒性試験で使用されたラットと同一系統である。当該がん原性試験は、全用量でアミカシンに対する全身曝露量を評価できるよう計画された。データ解析のために、腫瘍発生率についての群間差を、Peto-Pike 検定（Peto, 1980）を用い、死亡時期及び死亡原因で調整して算出した。高頻度に認められる腫瘍及び稀な腫瘍について、それぞれ P<0.005 及び<0.025 で、正の線形傾向は統計学的に有意であると判断した。高頻度な腫瘍（発生率 1%超）と稀な腫瘍（発生率 1%未満）は、現行及び／又は既存の対照の腫瘍発生率データに基づいて区別した。

FDA との相談の結果、ALIS の開発をサポートするために、マウスを用いたがん原性試験の実施は不要であるとの合意に達した（注：TOBI®［トブラマイシン吸入液］のがん原性評価では、ラットのみが用いられている）（TOBI® 2019）。当該見解は、呼吸器官用薬の開発についての考慮事項を記載した FDA のポジションペーパーと完全に一致している（DeGeorge, 1997）。当該ポジションペーパーでは、気道での高い局所曝露量を達成するために吸入経路で投与される薬剤のがん原性評価は、1 種類の動物種のみで実施可能であると記載されている。

当該がん原性試験の用量選択は、ICH ガイドライン S1C(R2) に基づいて行った。ラット 6 ヵ月間反復吸入毒性試験の投与 13 週時点の中間評価における生存中の肉眼的及び顕微鏡的気道所見（2.6.6.3.3.3 項、[redacted] Study 07-6308 試験）に基づいて、当該がん原性試験の高用量として 45 mg/kg/日、低及び中間用量として 5 及び 15 mg/kg/日を選択した。本がん原性試験で使用した当該用量については、米国 FDA より同意を得た。

ラットを用いたがん原性試験では、ALIS を目標用量 5、15 及び 45 mg/kg/日で吸入投与した（2.6.6.5.1.1 項、[redacted] Study 09-6345 試験）。対照群には、1.5%生理食塩水又は非封入リポソーム（ELC）を、ALIS 高用量群と同一期間にわたり吸入投与した。別の群のラットを用いて 6 ヵ月間投与後に TK 評価を行ったところ、アミカシン全身曝露量（AUC_{last}）は、全用量で ALIS 投与ヒト被験者における AUC_{last} より小さかった（ラット：≤8500 ng•h/mL、ヒト：17000 ng•h/mL）。高用量群の雌で生存数が減少したため、96 週目の始めに当該用量群への投与を中止した。1.5%生理食塩水群の生存数がほぼ 20 匹になった時点の 98 週目に、雌の全ての群を屠殺した。生存雄ラットは、2 年間の投与後に屠殺した。前述のがん原性試験の統計解析に関する FDA 規制ガイダンスに基づき、これらの時点での生存率は、ALIS のがん原性を評価する上で充分かつ適切であると判断された。

ALIS 投与に直接関連すると判断された腫瘍性変化は、肺のみに限定された。高用量群の雌 2 匹に肺の扁平上皮癌が認められ、これらの腫瘍は、剖検時に肉眼で確認された。肺の扁平上皮癌は Sprague Dawley ラットでは稀な腫瘍であり、試験実施施設（[redacted]）において肺の自然発生癌には含まれていないことから、本剤との関連性ありと判断された。これらの癌は、約 2 年間の投与後の最終屠殺時に検出され、したがって当該ラットの死因ではなかった。高用量群の雌 1 匹に角化型肺嚢胞、雌 2 匹に肺胞上皮の扁平上皮化生が認められた。ラットにおける扁平上皮癌及び角化型肺嚢胞は、肺のマクロファージ過負荷（粒子吸入による）に関連した変化であることが報告されており（Oberdörster, 1995）、肺のマクロファージ過負荷が、発癌の原因として最も可能性が高いと判断された。本試験ではアミカシンの肺中濃度は測定しなかったが、肺腫瘍の発生が認められた 45 mg/kg 用量は、肺重量ベースで正規化した場合、ヒト用量の 6 倍に相当する。

高用量群の雄 1 匹（剖検時に肉眼で検出）及び雌 1 匹に細気管支／肺胞腺腫が認められた。[redacted] の背景情報の範囲内の発現頻度であることから、ALIS 投与との関連性は不明と判断された。ALIS 投与ラットで認められたその他の腫瘍性変化は、5 mg/kg/日群の雌雄各 1 匹及び 45 mg/kg/日群の雄 1 匹における口蓋の扁平上皮癌（これらのラットの死因）であった。45 mg/kg/日群の雄で、膵内分泌組織（膵島細胞がん及び膵島細胞腺腫と膵島細胞がんの複合体）の腫瘍発現頻度の増加が認められた。口蓋及び膵臓の腫瘍の発現頻度の増加に統計学的有意差が認められず、[redacted] の背景情報の範囲内の発現頻度であること、及び／又は用量反応関係が認められないことから、ALIS との関連性は不明と判断された。

2.4.5.4.2　アミノグリコシド系抗生物質のがん原性評価

最近 Insmed が実施した科学文献の検索結果（2019 年 9 月）によると、アミカシンを含むアミノグリコシド系抗生物質のげっ歯類を用いてがん原性を評価した 2 年間の試験では、がん原性は認められなかった。検索したデータベースは、National Library of Medicine (PubMed, TOXNET Toxicology Data Network)、United States (U.S.) Food and Drug Administration (FDA) Approved Drug Products、European Medicines Agency (EMA)、the National Toxicology Program (NTP) of the U.S. Department of Health and Human Services、the International Agency for Research and Cancer (IARC)、the European Chemicals Agency (ECHA)、the International Programme on Chemical Safety (IPCS)、the Food and Agriculture Organization (FAO) of the United Nations 及び検索エンジンクエリからの化学物質等安全データシートである。情報が得られた化学物質を、表 2.4-4 に記載する。データベースを検索したが、情報が得られなかったその他のアミノグリコシド系抗生物質は以下の通りである。アミカシン、アルベカシン、アストロマイシン、ベカナマイシン（カナマイシン B）、ジベカシン、framycetin、ゲンタマイシン、ハイグロマイシン B、イセパマイシン、カナマイシン A、nourseothricin、プラゾマイシン、プロマイシン、リボスタマイシン、シソマイシン、スペクチノマイシン及び verdamicin。

表 2.4-4　　げっ歯類を用いた 2 年間がん原性試験又は構造類似体のがん原性試験結果に基づいて評価したアミノグリコシド系抗生物質

Compound	**CAS No.**	**Route of exposure/Species**	**Outcome**	**Source**
Apramycin	37321-09-8	Diet/rat and mouse	Not carcinogenic	WHO, 2012
Dihydrostreptomycin	128-46-1	Diet/rat	Not carcinogenic	WHO, 1995a
Neomycin	1404-04-2	Diet/rat	Not carcinogenic	WHO, 1995b
Netilmicin	56391-56-1	Route not specified/rat and mouse	Not carcinogenic	Drugs.com, 2019
Paromomycin (also known as aminosidine)	7542-37-2	Diet/rat	Not carcinogenic	EMA, 1996
Streptomycin	57-92-1		Not considered carcinogenic based on the carcinogenicity evaluation with dihydrostreptomycin	WHO, 1995a
Tobramycin	32986-56-4	Inhalation/rat	Not carcinogenic	TOBI® PODHALER®, 2019

2.4.5.4.3　　アプラマイシン

マウス及びラットを用いた 2 年間がん原性試験で、アプラマイシンのがん原性が評価された（WHO, 2012）。2 年間マウス試験では、B6C3F1 マウスの雌雄にアプラマイシン 0、1500、5000、15000 又は 45000 mg/kg 飼料を混餌投与した。各用量群の動物数は、雌雄各 60 匹であった。時間加重平均用量は、雄で 0、189、623、1928 及び 7183 mg/kg 体重/日、雌で 0、213、688、2043 及び 7570 mg/kg 体重/日であった。2 年間ラット試験では Fischer 344 ラットの雌雄にアプラマイシン 0、2500、5000、10000 又は 50000 mg/kg 飼料を混餌投与した。動物数は、対照群で雄 59 匹及び雌 61 匹、投与群で各群雌雄各 50 匹であった。時間加重平均用量は、雄で 0、124、245、488 及び 2772 mg/kg 体重/日、雌で 0、154、301、610 及び 3451 mg/kg 体重/日であった。アプラマイシンのマウス及びラットを用いた混餌投与による 2 年間がん原性試験で、がん原性は認められなかった。

2.4.5.4.4　　ジヒドロストレプトマイシン及びストレプトマイシン

Charles River CD ラットを用いた 2 年間がん原性試験で、ジヒドロストレプトマイシンのがん原性が評価された（WHO, 1995a）。2 年間ラット試験では、雌雄各 35 匹からなる各用量群に、ジヒドロストレプトマイシン 0、1、5 又は 10 mg/kg 体重/日を混餌投与した。投与 6 及び 12 ヵ月時点に、各用量群の雌雄各 5 匹を早期屠殺し、残りの動物 25 匹にはジヒドロストレプトマイシンを 2 年間投与した。当該 2 年間ラット試験では、ジヒドロストレプトマイシンにがん原性は認められなかった。なお、ジヒドロストレプトマイシンとストレプトマイシンは化学構造、薬物動態特性及び毒性プロファイルがほぼ同一であることから、評価委員会は、ストレプトマイシンのがん原性に関する問題は、ラットを用いたジヒドロストレプトマイシンの 2 年間経口投与試験で充分に評価されたと結論づけた。

2.4.5.4.5　　ネオマイシン

Sprague-Dawley（SD）BR F1a 離乳ラットを用いた 2 年間がん原性試験で、硫酸ネオマイシンのがん原性が評価された（WHO, 1995b）。試験動物は、F0 世代のラットに、ネオマイシンを同一段階の用量で 11 週間にわたり混餌投与し、その後交配させて得た出生児であった。2 年間ラット試験では、雌雄各 54～56 匹からなる各用量群に、硫酸ネオマイシン 0、6.25、12.5 又は 25 mg/kg 体重/日を混餌投与した。投与 12 ヵ月時点に、各用量群の雌雄各 10 匹を早期屠殺し、残りの動物には硫酸ネオマイシン、ジヒドロストレプトマイシンを少なくとも 2 年間投与した。がん原性は認められなかった。

2.4.5.4.6　　ネチルマイシン

マウス及びラットを用いた生涯投与によるがん原性試験では、ネチルマイシン投与に起因した腫瘍は認められなかった（Drugs.com, 2019）。これ以上の詳細情報は得られていない。

2.4.5.4.7　　パロモマイシン

パロモマイシンは別名、アミノサイジンともいう。SD 系ラットを用いた 2 年間がん原性試験で、アミノサイジンのがん原性が評価された（EMA, 1996）。ラット 2 年間試験で、動物にアミノサイジン 0、100、2000 又は 50000 mg/kg 飼料を混餌投与した。アミノサイジンにがん原性は認められなかった。

2.4.5.4.8　　トブラマイシン

ラットを用いた 95 週間がん原性試験で、トブラマイシンのがん原性が評価された（TOBI® PODHALER®, 2019）。当該試験では、トブラマイシン吸入液を、各群雌雄各 50 匹からなる群に、推定総トブラマイシン吸入量として 0、2.9、7.6 及び 25.7 mg/kg 体重/日の用量で吸入投与した。当該 95 週間ラット試験では、トブラマイシンにがん原性は認められなかった。

2.4.5.5　　生殖発生毒性試験

ALIS 吸入投与では、アミカシンの全身曝露量は、アミカシン非経口投与に比べてはるかに少なく、また入手可能なデータからは、ラット、マウス及びウサギにおいて生殖能及び／又は胎児への影響が認められないことが示されていること（阿久津, 1982、松崎, 1975a、松崎, 1975b）から、ALIS については、ヒトへの安全性を裏付けるための吸入投与による生殖発生毒性試験の実施は必要ないと判断した。さらに、本剤のげっ歯類及びイヌを用いた反復吸入毒性試験では、雌雄生殖器に対する投薬に関連した有害な影響は認められなかった。詳細情報については 2.6.6.6 項の考察を参照のこと。

一方で、今後実施予定の小児患者を対象とした試験をサポートするために、幼若ラットを用いた反復投与毒性試験を実施した。28 日間 GLP 毒性試験（PND 10～37）では、28 日間の回復期間を設定し、幼若ラットに ALIS を 0、10、30 又は 90 mg/kg/日の用量で吸入投与した。アミカシンの全身曝露量、尿中及び肺中濃度は、用量依存的に増加した。留意すべき所見として、30 mg/kg/日以上の投与群における肺重量の増加、10 mg/kg/日以上の投与群における肺胞泡沫マクロファージの増加（肺からの排除に関連した適応性変化であって有害事象ではない）、及び 30 mg/kg/日以上の投与群における呼吸器官及び扁平上皮の上皮びらん／潰瘍、慢性炎症及び過形成等の喉頭部変化が認められた。肺及び喉頭の変化は全て、28 日間の回復期間終了後に回復したか、又は回復傾向を示した。死亡率、一般状態、眼科学的検査、自発運動量、オープンフィ

ールド試験、臨床病理試験（血液学的検査、血液生化学検査及び血液凝固検査パラメータ）、臓器重量、大腿骨長及び顕微鏡的観察所見に被験物質投与に関連した有害な影響はみられなかった。したがって当該試験の条件下での NOAEL は、喉頭部所見に基づいて、10 mg/kg/日と判断された。肺変化についての NOAEL は 90 mg/kg/日とされた。ALIS の幼若ラット試験における所見は、ALIS 投与の成熟ラットでの所見と一致した。

2.4.5.6　局所刺激性試験

局所忍容性（肺及び上気道）については、マウス、ラット及びイヌを用いた反復投与毒性試験の中で適切に評価した（2.6.6.3.2 項、2.6.6.3.3 項、2.6.6.3.4 項）。

2.4.5.7　その他の毒性試験

ALIS のマクロファージの機能に対する影響を評価する目的で、ラットを用いた吸入投与による探索的試験 2 試験を実施した。最初の試験では、開発初期の ALIS 製剤（1 mL 中アミカシンを約 20 mg 含有）を 2 週間連日投与（2.6.6.8.2.1 項、AMIK-BRD-2005-19-TOX 試験）し、もう一つの試験では、市販予定の ALIS 製剤（1 mL 中アミカシンを 70 mg 含有）を 1 ヵ月間投与、その後 1 ヵ月間休薬の投与レジメンにて 6 ヵ月間投与して評価を実施した（2.6.6. 8.2.2 項、AMIK-BIO-2009-16-MAC 試験）。二つ目の試験は、検討した剤型及び投与パラダイムについて最初の試験より適切であると判断されたことから、本項では二つ目の試験についてのみを考察する。

ALIS を 90 mg/kg 用量にて連日投与した結果、6 ヵ月間の試験期間を通して忍容性は良好であった。30 日間の投与期間終了後、肺における主な組織学的所見は、びまん性の軽度又は中等度の泡沫肺胞マクロファージの集簇（ALIS 製剤／脂質製剤からの吸入粒子の肺からの排除に関連した適応性変化）であった。各サイクルの 30 日間の回復期間終了後には、マクロファージの集簇の回復性及び／又は回復傾向が認められた。最後の 30 日間投与期間終了後、一部ラットの肺において、マクロファージの集簇に伴う軽度の間質性炎症及び／又は細気管支肺胞過形成（ALIS の直接的な影響ではない）が認められた。ALIS 投与ラットでは、当該病理組織学的所見と一致して、気管支肺胞洗浄液（BALF）中のマクロファージ数及び多形核細胞（PMN）数の増加、マクロファージの大きさの増大、マクロファージにおける非極性の脂質（コレステロール、コレステロールエステル等）の存在が認められた。ALIS 投与ラットからの肺胞マクロファージでは、適切な細胞機能（貪食能、酵母殺菌作用及びサイトカイン発現）刺激に対する反応が正常であることが確認された。以上より、ALIS を 30 日間投与後に 30 日間休薬を 3 サイクル実施しても、肺胞マクロファージの正常な細胞機能を阻害又は変化させることはないと結論づけた。

現時点までで、ALIS の吸入投与による臨床試験において、安全性の問題として抗原性は確認されていない（2.7.4 項）。ALIS は、アミカシン及びアミノグリコシド系抗生物質又はその添加剤に対する過敏症の既往歴がある患者には禁忌とすることが適切と考えられる。当該情報に基づき、動物を用いた ALIS の抗原性試験は、科学的及び倫理的観点の双方から不要であると考えられた。

1.0 mg/mL 濃度のアミカシン水溶液は、波長 240 nm 付近においてのみ吸収端が観測されること（Monteleone, 1983）から、アミカシンには光毒性の問題は生じないと判断された。

2.4.5.7.1　毒性発現の機序に関する試験

本剤では、毒性発現の機序に関する試験は実施しなかった。

2.4.5.7.2　依存性試験

本剤の薬理学的分類、またアミノグリコシド系抗菌薬全般に依存性に関する事象は報告されていないことから、本剤の依存性に関する評価は必要ないと判断された。

2.4.5.7.3　代謝物の毒性試験

アミカシンは生物学的に意義のある代謝を受けないため、ALIS の代謝物に関する試験は必要ないと考えられた（Bodey, 1974）。

2.4.5.7.4　不純物の毒性試験

アミカシン不純物又は ALIS 分解物については、下記に記載の試験を除いて、これに特化した毒性試験の実施は不要と判断した。ALIS の *in vitro* 遺伝毒性試験では、アミカシン原薬中に 0.30%を超える不純物（すなわち不純物[redacted]、[redacted]及び[redacted]）が検出されなかったことから、これらの不純物については細菌を用いる復帰突然変異試験（2.6.6.8.6.1 項、[redacted] Study No. HUD0381 試験）を実施して遺伝毒性に関する特性を評価した。当該試験では、アミカシン 2 ロットを、最高 5000 µg/プレートまでの濃度で S9 活性下及び非活性下で評価した。一方のロット（081001-X）では、不純物[redacted]及び[redacted]がそれぞれ約 0.6%、別のロット（990167 0015 9）では[redacted]が約 0.36%認められた。細胞毒性が、サルモネラ菌では 150 µg/プレート以上、大腸菌では 50 µg/プレート以上で認められた。当該アッセイにおいて、いずれのロットのアミカシンも変異原性を示さなかった。したがって不純物[redacted]及び 2 種類の未知不純物は、遺伝毒性に影響を与えないと判断した。

不純物X*の評価を目的として実施された 2 週間ラット試験では、ALIS を用量 0（1.5%生理食塩水）及び 90 mg/kg/日にて、低、中及び高用量の不純物X*(0.04、0.48 及び 1.7 mg/kg/日）と併用して 1 日 1 回鼻部吸入により吸入投与した（2.6.6.8.6.2 項、[redacted] Study No. TQ72SR 試験）。肺重量 1 g あたりで算出した不純物X*濃度は、低、中及び高用量の不純物X*併用群で 0.61、7.20 及び 26.9 µg/g であり、これは不純物X*の規格である 1.5% 不純物X*(4.66 µg/g ヒト肺重量）に基づくと、ヒト肺重量 1 g あたりの不純物X*濃度は最大 5.8 倍と算出された。ALIS 投与に関連して認められた所見は、喉頭、鼻甲介、肺及び気管気管支リンパ節の変化で、げっ歯類において ALIS 製剤投与により既に認められていた所見であった。当該変化の発現率又は重症度は､不純物X*濃度の増加に伴って増大しなかったことから、被験物質中の不純物X*量は、ALIS 懸濁液の毒性学的プロファイルに実質的な影響を与えないと判断された。以上の結果から､不純物X* は 1.5%の濃度で使用可能であると判断された。

2.4.5.7.5　添加物の評価

本剤の添加物である DPPC、コレステロール及び NaCl を評価するために、一部の主要な非臨床試験において、非封入リポソーム（DPPC 及びコレステロール含有の ELC）及び／又は 0.9%生理食塩水投与の対照群を別途設定して、ALIS 試験の一環として追加の安全性情報を得た。ELC 及び／又は 0.9%生理食塩水群では、それに対応する対照群と比較して、有害所見は認められなかった。

2.4.6 考察及び結論

ALIS の薬理試験は、MAC による肺 NTM 症を有する成人患者に対する抗生物質併用療法の一部となる ALIS の治療を裏付けるために、*in vitro* 及び *in vivo* 試験の組み合わせにより実施された。3 種類の *M avium* を用いたマクロファージ化 THP-1 細胞感染モデル、及び NTM 患者から分離された *M avium* を用いたマウス感染モデルにおいて ALIS は FA よりも優れた抗菌効果を発揮した。また、ALIS リポソームのバイオフィルムへの優れた浸透能も確認された。培養ヒトマクロファージを用いた試験結果から、ALIS は FA よりも取り込みが 4 倍優れていることが示された。さらに、ラットに ALIS を吸入投与した 2、6 及び 24 時間後の肺胞マクロファージ内アミカシン濃度は、同程度の肺沈着量を示す用量の FA を吸入投与した時と比較して 5〜8 倍高かった。これらの ALIS 特性により、遊離アミノグリコシド水溶液投与よりも高い肺中アミカシン濃度が維持され、ALIS の優れた効果が発揮されると考えられた。

ラットを用いた吸入投与 PK 試験の結果から、ALIS 投与時のアミカシンの肺からの消失は、遊離アミノグリコシド投与時と比較して緩徐であり、(すなわち、depot［貯留］様効果)、実質的に肺中アミカシン濃度を高く維持できることが示された。ALIS を噴霧したときに、アミカシンの一部はリポソームから放出され、その部分は速やかに消失するが（$t_{1/2}$ α は 7 時間以下)、肺中にリポソームとして残存したアミカシンは主に肺胞マクロファージに取り込まれ（この部分が depot［貯留］様を発現)、肺内に長時間保持される（$t_{1/2}$ β は 230 時間超)。ラットに蛍光プローブ（すなわち、アミカシン-TAMRA 及び $DiIC_{18}(5)$DS リポソーム）で標識した ALIS を投与したとき、肺深部を含む肺全体にアミカシン及びリポソームが均一に沈着することが示された。さらに、肺組織 1 g あたりのアミカシンの沈着量は、どの肺葉又は肺葉のどの部分を測定したかに関わらず同程度であった。同様に、アミカシンは肺の部位に関わらず、肺から一様に消失した。したがって、遊離アミノグリコシドよりも ALIS の方が抗菌活性に優れている主な要因は、ALIS を吸入投与したときの方が細菌マクロコロニーに対して高濃度で持続的にアミカシンを供給できるところである。ALIS の吸入投与によりアミカシンの全身曝露量が減少することから、肺以外における副作用の低減効果が期待される。

本剤の反復吸入毒性試験の定常状態における曝露量は、予定臨床用量（590 mg/日）におけるヒト曝露量以下の数値であった。しかしながら、動物では肺以外に顕著な変化が認められなかったことから、ヒトに対して動物で全身曝露の安全域がないことは重要な意味を持たない。安全性に関してより重要なのは、肺におけるアミカシン曝露の安全域であり、肺が ALIS の主要な depot（貯留）部位であり、そこで抗菌作用を発揮する。これに関連して、ラット及びイヌの NOAEL での肺組織中濃度は、ヒトの推定肺組織中濃度を上回っている（表 2.4-5)。

表 2.4-5　　動物の重要な吸入毒性試験における NOAEL での、ヒトと比較した推定肺曝露安全域

Species	Study	Dose (mg/kg/day)		Lung amikacin level (mg/g of lung)	Multiple of human lung amikacin level (adult)
Human [a]	ALIS clinical development program	12 (50-kg adult)		0.254	-
Rat [b]	6 months	NOAEL	< 10	1.314	< 5.2
			30	2.451	9.6
Rat [c]	2 years		5	1.314	0.67
			15	2.451	2.0
			45	2.959	5.9
Dog [d]	3 months	NOAEL	10	2.659	10
			30	5.223	21
Dog [e]	9 months	NOAEL	30	2.685[f]	11

[a] Lung amikacin concentrations were calculated as follows: 590 mg ALIS dose/1000 g (adult) lung weight × 0.43 (deposition factor). For information on how amikacin lung concentrations were calculated (Module 2.6.6, Section 1).
[b] Study No. 07-6308 (combined-gender data); NOAEL < 10 mg/kg/day (lungs) and 30 mg/kg/day (kidneys).
[c] Study No. 09-6345, calculated dose based on rat body weight of 0.5 kg and lung weight of 1.5 g.
[d] Study No. 07-6306 (combined-gender data); NOAEL 10 mg/kg/day (kidneys) and 30 mg/kg/day (lungs).
[e] Study No. 11-6400 (combined-gender data); NOAEL 30 mg/kg/day.
[f] Exclusion of a low outlier value in males of 0.0689 mg/g of lung weight (compared to values of 2.070, 3.650, and 2.690 mg/g of lung weight for other males in the 30-mg/kg/day group) results in a mean combined-gender value of 3.059 mg/g of lung weight).

2.4.6.1　　げっ歯類における肺病変の関連性（種特異性及び粒子過負荷概念）

気道における粘液線毛運動、並びに下気道及び肺胞におけるマクロファージによる吸入異物の排除等、肺には異物排除に関する多くの防御機構が存在する。沈着した大部分の吸入粒子は、肺胞マクロファージにより速やかに貪食される。マクロファージは、異物を酸及び酵素で消化するために異物周囲にファゴソームを形成する。粒子が小さく、沈着量が少なく、生物学的活性が低い場合、大部分の異物は肺胞マクロファージの遊走及び粘液線毛運動により肺から除去される（Mauderly, 1996）。非臨床試験において、本剤のリポソームの成分は吸入異物として肺から排除すべき粒子負荷と認識された。本剤投与後に認められた泡沫マクロファージ集簇の原因となった異物取込みに関連した反応は、他のリポソーム粒子において既に報告されている事象である（Greaves, 2007、Greenspan, 1997、Kelly, 2011）。

ラットでは、慢性的な粒子高負荷により、粒子を貪食したマクロファージの肺胞及び間質への集簇、持続的炎症、肺胞上皮過形成及び線維化等の肺における一連の変化が生じる。長期間大量曝露を受けたラットでは、異形成又は腫瘍（上皮細胞由来の原発性肺腫瘍）への進行がみられるが、マウス及びハムスターでは稀であり、過負荷に関連した腫瘍の発現傾向が認められる程度である（Mauderly, 1996）。ラットでは、上皮損傷に対する一般的な反応として II 型肺胞上皮細胞の再生性過形成が認められる。殆どの系統のラットにおいて、肺の自然発生腫瘍の発現頻度は非常に低く、腺房中心領域の肺胞上皮細胞の再生性過形成は、多くの毒性物質による損傷に対する一般的な反応と考えられている。II 型肺胞上皮細胞は分裂・増殖による肺胞上皮細胞に対する修復能を有することから、これらの変化の大部分は肺胞修復領域である可能性が高い（Renne, 2009、Schwartz, 1994）。一般に、長期損傷に関連して肺胞実質に扁平上皮化生が発現する。損傷の例として、吸入刺激性粉塵、肺に埋植又は注入された不溶性物質による大きな負荷が挙げられ

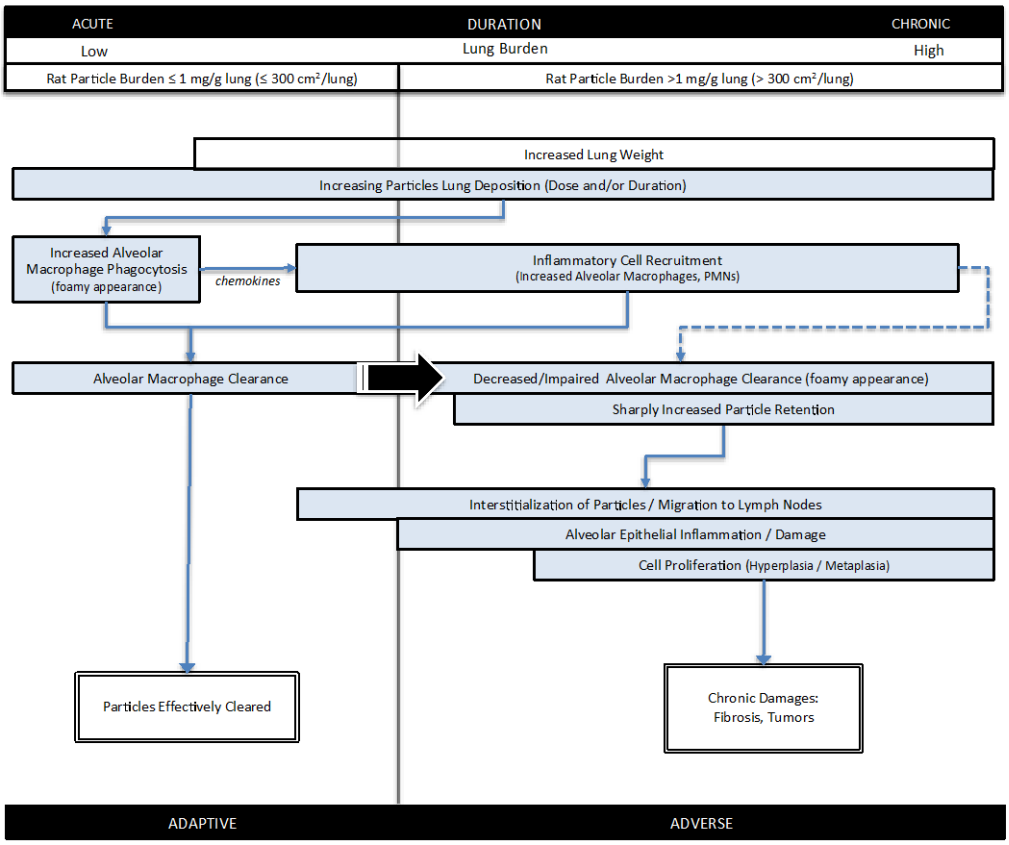
る。肺胞実質の扁平上皮化生は、通常、慢性炎症、肺胞中隔線維症又は局所瘢痕に伴い発現する。より進行した病変は、細胞間橋、細胞過多及び大量の角質化を示し、後期には扁平（表皮）嚢胞を形成することがある。ラットにおける扁平上皮嚢胞は偶発的病変として認められるが、通常は不活性粒子の長期曝露後に扁平上皮化生に伴い発現する（Renne, 2009、Schwartz, 1994）。

2.4.6.1.1　　粒子過負荷

肺における粒子沈着量の増加に伴い、個々のマクロファージが取込む粒子数は増加し、肺に存在するマクロファージ数も増加する。粘液線毛輸送によるマクロファージのクリアランスは、マクロファージのリンパ節への遊走により増加する。したがって、動物（特に非げっ歯類）への長期吸入曝露において、粒子状物質の肺リンパ節における蓄積は一般的な変化である。粒子状物質の細胞内負荷の増大及び長期曝露により、肺への蓄積（又は過負荷）が生じる可能性が高くなる（Hext, 1994）。

粒子過負荷の概念に関しては、多くの公表文献で概説されている（Mauderly, 1996、Oberdörster, 1990、Hext, 1994、Borm, 2004、Hahn, 1999）。この概念では、肺胞マクロファージの肺領域からの粒子除去速度を上回る速度で肺に沈着する呼吸域粉塵について言及している。除去能を上回る沈着に伴い粒子除去が遅くなり、沈着した粒子は肺に残留又は蓄積し、一般に「肺負荷」と言われている。粒子過負荷によるマクロファージの除去機能の障害に伴い、肺炎、並びに腺房中心及び間質への粒子の蓄積がみられ、最終的には線維症及び腫瘍形成等の慢性障害となる可能性のある上皮細胞の増殖性変化が発現する（図 2.4-1、ILSI Risk Science Institute, 2000、Borm, 2004）。

図 2.4-1　　ラットにおける肺の粒子沈着に対する適応性変化及び毒性変化の概要



2.4.6.1.2　　肺病変に関する閾値概念

高用量での非臨床吸入毒性試験では、マクロファージ除去能を上回る肺負荷となり、結果として過負荷による変化が生じる。一般に、ラットで過負荷となる粒子状物質量は、総肺用量 1～3 mg/g 肺重量又は 200～300 cm^2/肺とされている（Jones, 2012、Nikula, 2014、Oberdörster, 2002）。マクロファージを介したクリアランスが低下する前に、個々の肺胞マクロファージの粒子取込みが限界量に達することを示す結果から、粒子誘発毒性の閾値が提案された。

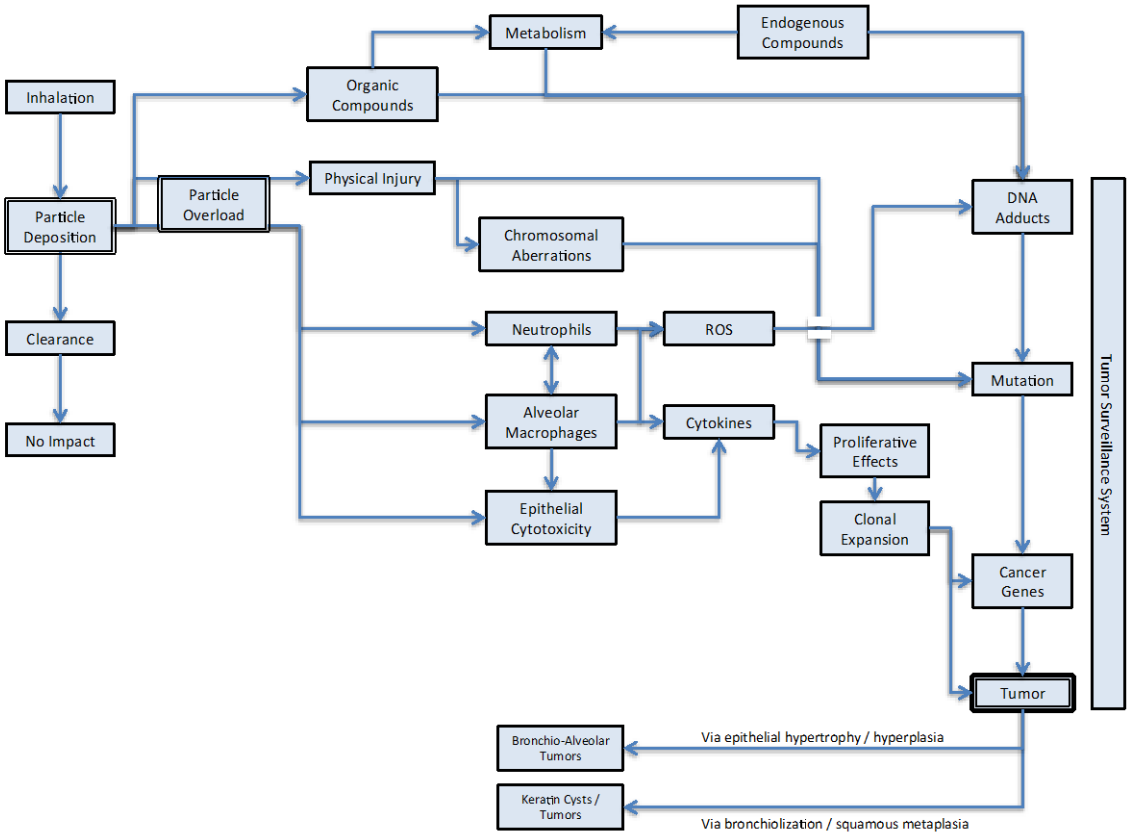
公表文献で報告された反復吸入毒性試験の成績から、ラット肺当りの蓄積粒子表面積（m^2/肺）はラットにおける肺腫瘍形成と強く相関するという概念が生じた。この概念は、粒子吸入試験におけるラットの肺腫瘍形成と蓄積粒子の量及び表面積とを比較した Oberdörster, 1996 の報告により補強された。粒子表面積は腫瘍形成と非常に有意な相関性を示し、その曲線から閾値の存在が明らかになった（Borm, 2004、Mauderly, 1996、Oberdörster, 1997）。この閾値を確認するため、二酸化チタンのような不活性粒子により発現する同様の変化の閾値（Jones, 2012）と比較し、肺粒子負荷量及び関連する病理組織学的変化を推定した。試験期間にかかわらず、1 mg/g 肺重量を超える推定肺負荷に関連したラットの肺における毒性変化は、不活性不溶性粒子で報告されている毒性変化と一致した。この閾値と肺表面積との相関性は、本剤の非臨床安全性評価における重要な要素と考える。

2.4.6.1.3　粒子過負荷とげっ歯類における肺腫瘍形成

ラットにおける肺過負荷及び発がん性に関する現在の関心は、ディーゼル煤煙及び他の粒子に曝露された過負荷状態のラットにおいて腫瘍成長の原因となる一連の肺病変が発現することを示した Vostal, 1986 の報告に端を発している。ラットでは（他の動物種では様々な程度で）、肺過負荷と肺の炎症及び組織反応に関連性が認められている。

種々の粒子による慢性過負荷によるラットの肺における病理組織学的変化として、肺胞及び間質で粒子貪食マクロファージの集簇、流入リンパ節への粒子の輸送、慢性活動性炎症、線維症、肺胞上皮過形成（細胞増殖）、化生及び腫瘍形成が認められる（図 2.4-2）。これらの変化の範囲及び重症度は、各動物種の解剖学的及び生理学的特徴に加えて、粒子の種類、沈着物質量、曝露期間又は観察期間と関連している（Mauderly, 1996）。粒子固有の物理化学的性質、並びに粒子が有する肺の炎症及び細胞／組織増殖の誘発能が、げっ歯類における吸入粒子の発がん性に関与していることが示されている。ラットにおける粒子誘発性肺発がんの推定発現機序では、粒子誘発性炎症が気道上皮における遺伝毒性学的変化、細胞増殖及び組織リモデリング等、突然変異及び腫瘍性病変への進行に必要な変化を誘導すると考えられている。

図 2.4-2　ラットにおける肺沈着粒子による発がんの推定発現機序



Adapted from Mauderly, 1996.

毒性変化発現における一つの必須条件は、肺胞マクロファージの正常クリアランス機構に対する過負荷又は毒性発現のいずれかによって、肺負荷が正常クリアランス能を上回ることである。肺過負荷により炎症反応が生じ、上皮細胞の肥大又は過形成、扁平上皮化生が誘発される。これ

らの組織反応の長期持続により、ラット特異的な肺腫瘍形成を誘発すると考えられている（Hext, 1994）。イヌ及びサルにエアロゾルを長期間投与した限られた試験では、粒子過負荷による変化は認められていない（Snipes, 1996）。他の動物種とは異なり、ラットでは粒子過負荷による肺における毒性変化として、慢性炎症、肺胞中隔線維症、肺胞蛋白症、上皮過形成、扁平上皮化生、及び良性／悪性肺腫瘍が認められる（表 2.4-6）。マウス及びシリアンハムスターでも粒子クリアランスの障害はみられるが、慢性的変化への進行は低頻度であり、肺腫瘍形成の発生率の増加は認められない（Hahn, 1999）。

げっ歯類と非げっ歯類の肺の構造及び機能には、重要な解剖学的相違がある（Mauderly, 1996）。げっ歯類では、気管末端から分枝する誘導気道は、肺胞のない線毛を有する最小気道である終末細気管支となる。粘膜線毛層の下方にある細気管支／肺胞接合部では、主にマクロファージの貪食による肺クリアランスが行われるため、ラットにおける吸入粒子の沈着部位となる（Mauderly, 1996）。誘導気道上の沈着粒子及び肺胞表面上に集簇した粒子を貪食したマクロファージは、通常、粘膜線毛輸送により肺から排除される。

表 2.4-6　　粒子肺過負荷の肺への影響に関する動物種間の比較（Mauderly, 1996）

Effect	Rat	Mouse	Hamster	Human
Impaired particle clearance	++	++	++	Yes
Chronic inflammation	+++	++	+	Yes
Septal fibrosis	++	+	+	Yes
Squamous metaplasia	++	No	No	Yes
Epithelial hyperplasia	+++	+	+	Yes
Neoplasia	Yes	No	No	No

+ = minimal; ++ = mild; +++ = moderate

ヒト及び大動物に比べて、ラットの肺胞表面積は非常に小さい。したがって、同じ粒子径及び用量では、大動物に比較して、ラットでは単位表面積あたりの粒子負荷が高くなると考えられる。非げっ歯類の誘導気道は、げっ歯類の終末細気管支に類似した複数の分岐した呼吸細気管支となり、肺胞群に至る前にさらに細かく分枝し肺胞管となり肺胞管を囲む肺胞数が増加する。表 2.4-7 に示す通り、肺胞は動物種間で類似しているが、ラットの肺胞表面積（体重 250 g で 0.39 m^2）と比較すると、イヌ（体重 10 kg で 90 m^2）は約 230 倍、ヒト（体重 60 kg で 82 m^2）は約 210 倍であり、これらの動物種では、粒子負荷のクリアランスの効果的な処理が可能であることが示唆される。

ラットで顕著な特徴として、粒子負荷に対する反応の種類の決定要因である肺容量、肺表面積、肺胞数、並びに肺胞マクロファージ数及びサイズの違いが挙げられる（表 2.4-7）。ラットの肺胞マクロファージ数は非常に少なく（イヌ及びヒトの約 1/1300）、マクロファージ当たりの担当肺胞面積は約 5 倍と広い（Newton, 2002）。ラットのマクロファージが明らかに小さいこと（ヒトの約 1/4）を考慮すると、これらの差異から大動物及びヒトに比較してラットの粒子排除能が低いことが示唆される。以上の生物学的及び解剖学的知見から、ラットを用いた 2 年間がん原性試験において粒子過負荷により誘発された腫瘍性病変について説明可能と考えられる。

表 2.4-7　　動物とヒトの肺パラメータの比較 [a]

Parameter	Units	Mammalian species			Human difference versus animals (Fold)	
		Rat	Dog	Human	Rat	Dog
Average body weight	kg	0.38	16	74	195	4.6
Lung volume	mL	10.9	1,320	4,340	398	3.3
Lung surface area	m^2	0.66	52	143	217	2.8
Alveolar surface area	m^2	0.39	90	82	210	0.9
Number of alveoli	millions	43	1,040	950	22	0.9
AM number	millions	4.9	3,876	6,500	1,327	1.7
AM size/volume	μm^3	639	654	2,492	3.9	3.8
Area patrolled by each AM	μm^2	140,000	13,400	22,000	0.2	1.6

a = Data from: Newton, 2002 (p.306).
AM = alveolar macrophages

2.4.6.1.4　　ALIS の肺の安全性についての比較

本剤のラットを用いた 3 ヵ月間及び 6 ヵ月間反復吸入毒性試験、並びに 2 年間がん原性試験における肺の変化は、前述した肺過負荷により発現する変化と一致していた。

ラットを用いたすべての試験で、本剤の吸入投与により、吸入粒子に対する適応性クリアランス機構と考えられる顕著な肺胞マクロファージの反応が認められた。しかし、本剤の用量及び投与期間の増加に伴い、ラットでは本剤由来の粒子肺負荷が高いことから、粒子過負荷を示唆するマクロファージの集簇を上回る肺の病理組織学的変化が認められた。実際、ラットを用いた 3 ヵ月又は 6 ヵ月間吸入毒性試験における肺用量の 1 mg/kg/日から 9 mg/kg/日への増量と、泡沫肺胞マクロファージ集簇の発現頻度及び重篤度の増大（さらには肺重量の増加）には明らかな関連性が認められた。ラットを用いたがん原性試験においても同様の変化がみられ、ELC 群の結果から、この変化におけるリポソームの関与について考察した。ELC 群の肺における巣状／多巣性泡沫マクロファージの発現頻度は、本剤の中・高用量群と同等であった。投薬群と ELC 群との巣状マクロファージ反応に差がみられないことについては、各群における相対的肺負荷に起因した可能性が考えられた（表 2.4-9）。ELC 群における推定総肺負荷量は約 1 mg/g 肺重量（3 mg/kg/日）であり、本剤の低、中及び高用量群では、それぞれ 0.3、0.8 及び 2.5 mg/g 肺重量であった。

表 2.4-8　　ラットを用いた 6 ヵ月間反復吸入毒性試験における推定肺負荷量

Dose Group	6-month rat pulmonary achieved daily dose [c]								
	Amikacin				Liposomes [d]		Total lung burden		
	(mg/kg)	(mg) [a]	(mg/g lung) [b]	(mg/m^2 ASA) [b]	(mg/kg)	(mg/g lung) [b]	(mg/kg)	(mg/g lung) [b]	(mg/m^2 ASA) [b]
LD	1.0	0.5	0.3	1.3	0.7	0.2	1.7	0.6	2.2
MD	3.0	1.5	1.0	3.8	2.0	0.7	5.0	1.7	6.4
HD	9.0	4.5	3.0	11.5	6.5	2.2	15.5	5.2	19.9

ASA = alveolar surface area; LD = low dose; MD = mid dose; HD = high dose
[a] Calculation assumes average rat body weight of 0.5 kg.
[b] Theoretical lung dose calculations assume rat total lung weight of 1.5 g and alveolar surface area of 0.39 m^2.
[c] Daily pulmonary doses estimated assuming 10% lung deposition of total dose.
[d] Estimated average doses

ラットを用いた 6 ヵ月間吸入毒性試験では、本剤の用量増加及び投与期間の長期化に伴う粒子過負荷により、明らかな病理組織学的変化が認められた。用量及び投与期間に依存して泡沫マクロファージの発現頻度及び重篤度の増加がみられ、続いて炎症及び過形成の発現頻度及び重篤度

の増加が認められた。これらの変化は、ラットにおける粒子肺高負荷に対する毒性変化の閾値の概念に一致した。これらの変化においては、10 mg/kg/日群では休薬による回復性がみられたが、30 mg/kg/日以上の群では完全な回復は認められず、肺からの本剤の緩徐な消失を反映した吸入粒子の蓄積性及び消失の遅延が示唆された。イヌを用いた 3 及び 9 ヵ月間反復吸入毒性試験の高用量（30 mg/kg/日）群では、ラットを用いた 6 ヵ月間反復吸入毒性試験と同等以上の中等度から重度のマクロファージ集簇がみられ、肺粒子高負荷量にもかかわらず、肺の炎症は認められなかった。

ラットを用いた 2 年間がん原性試験では、ELC 群及びすべての投薬群で、肺の炎症及び過形成を伴う顕著な泡沫肺胞マクロファージの集簇が認められた。高用量（45 mg/kg/日）群の雌 2 匹に肺の扁平上皮癌が認められた。この腫瘍性変化は投薬との関連性が考えられ、肺重量で補正した用量で比較した場合、臨床用量の約 6 倍の用量で発現した。ラットを用いた 6 ヵ月間反復吸入毒性試験と同様に、推定総肺負荷量（アミカシン及びリポソーム）を算出した。本剤におけるリポソームの存在は、ラットにおける総肺負荷に対して明らかな寄与を示した（表 2.4-8、表 2.4-9）。

表 2.4-9　　ラットを用いたがん原性試験における推定肺負荷量

Dose Group	2-year rat pulmonary achieved daily dose [c]								
	Amikacin				Liposomes[d]		Total lung burden		
	(mg/kg)	(mg) [a]	(mg/g lung) [b]	(mg/m^2 ASA) [b]	(mg/kg)	(mg/g lung) [b]	(mg/kg)	(mg/g lung) [b]	(mg/m^2 ASA) [b]
ELC	0	0	0	0	3.0	1.0	3.0	1.0	3.8
LD	0.50	0.25	0.17	0.6	0.4	0.1	0.9	0.3	1.2
MD	1.5	0.75	0.50	1.9	1.0	0.3	2.5	0.8	3.2
HD	4.5	2.25	1.5	5.8	3.0	1.0	7.5	2.5	9.6

ASA = alveolar surface area; ELC = empty liposome control (liposome load equivalent to HD); (LD = low dose; MD = mid dose; HD = high dose)

[a] Calculation assumes average rat body weight of 0.5 kg.
[b] Theoretical lung dose calculations assume rat total lung weight of 1.5 g and alveolar surface area of 0.39 m^2.
[c] Daily pulmonary doses estimated assuming 10% lung deposition of total dose.
[d] Estimated average doses

本剤のがん原性試験の結果から、高用量（45 mg/kg/日）群における肺用量は 4.5 mg/kg/日、総肺負荷量（アミカシンとリポソームの合計）の肺重量換算は 2.5 mg/g 肺重量と推定され、肺における腫瘍形成の閾値を上回ったものと考えられる。これは、Jones, 2012 の提唱する有害作用の閾値である 1 mg/g を上回る肺負荷量であった。中用量（15 mg/kg/日）群の総肺負荷量は 0.8 mg/g 肺重量であり、同群では投薬に関連した肺腫瘍の発現は認められなかった。以上のように、本剤のラットを用いたがん原性試験における粒子の総肺負荷量は、ラットの吸入粒子高負荷による毒性反応発現の閾値を上回っていたものと考えられた。

がん原性試験では流入リンパ節にも泡沫肺胞マクロファージがみられたが、3 及び 6 ヵ月間反復吸入毒性試験では認められず、毒性変化の閾値に関する考察を裏付けるものであった。縦隔リンパ節及び気管支リンパ節の泡沫マクロファージの集簇には、用量及び投与期間との関連性が認められた。泡沫マクロファージのリンパ節への遊走は、吸入投与された不溶性粒子に対する非特異的な免疫反応と考えられている（Lewis, 2014）。流入リンパ節における泡沫マクロファージ集簇の増加は ELC 群でも認められ、その頻度はアミカシンの中用量群と同等であった。ELC 群と中用量群の相対的肺粒子負荷量はほぼ同等（肺粒子負荷は ELC 群：2.5 mg/kg；1 mg/g 肺重量、

中用量群：3 mg/kg；0.8 mg/g 肺重量）であった。これらの結果から、肺病変が本剤の毒性作用によるものではなく、肺の総粒子負荷量に起因したものであることが示唆された。

さらに、本剤の遺伝毒性試験はすべて陰性であったことから、がん原性試験の腫瘍性病変には非遺伝毒性的機序が関与している可能性が考えられた。これに関しては、ラットはヒトを含む他の動物種に比較して吸入粒子に対する感受性が高いことが知られている。したがって、ラットに粒子を反復吸入投与した結果、肺胞マクロファージに対する過負荷が生じ、肺の扁平上皮癌が誘発される可能性がある（Oberdörster, 1995）。本剤のがん原性試験で認められた扁平上皮細胞癌についても、この腫瘍発生機序により発現した可能性が高いものと考えられる。

ラットで認められた変化については、毒性試験全体、並びにヒト及び大動物との関連性を考慮しなければならない。そのため、ヒトリスク評価におけるラットで発現した変化の外挿性の指標として、動物種間に生物学的及び解剖学的相違が存在する。

イヌを用いた 9 ヵ月間までの反復吸入毒性試験を比較的高用量で実施した。9 ヵ月間反復吸入毒性試験では、対照群と比較して、すべての投薬群及び ELC 群で泡沫肺胞マクロファージの増加が認められた。投薬群の泡沫マクロファージは、細胞質に好塩基性顆粒を含む空胞化を呈し、肺胞内、細気管支及び血管壁に認められた。これらの変化に伴う肺炎症はみられず、肺の前がん病変及び腫瘍性病変は認められなかった。

他のアミノグリコシド系抗菌剤の非臨床安全性試験成績は、本剤のラットにおける肺病変を評価する上で重要であることから、吸入用トブラマイシン溶液（TOBI）及びトブラマイシン吸入パウダー（TIP）の非臨床安全性成績と本剤の非臨床試験成績を比較した。TOBI のラットを用いた 6 ヵ月間反復吸入毒性試験では、TOBI 吸入溶液（60 mg/mL）を 20、60 又は 180 分/日の投与時間（推定肺用量 1、3 及び 9 mg/kg/日）で鼻部曝露により 6 ヵ月間吸入投与した結果、投薬に関連した肺の変化として、肺重量の増加（低、中及び高用量群で 18%、28%及び 45%）、肺胞マクロファージの浸潤、慢性間質性炎症及び細気管支上皮過形成が認められた（表 2.4-10）。

前述のとおり、ラットは肺粒子高負荷に対して高感受性であり、肺病変における閾値は 1 mg/g 肺重量と報告されている（Jones, 2012）。TOBI のラットを用いた 6 ヵ月間反復吸入毒性試験では、過形成が閾値（1 mg/g 肺重量）を上回る用量でのみ認められた（表 2.4-10）。

表 2.4-10　　TOBI のラットを用いた 6 ヵ月間反復吸入毒性試験における肺の病理組織学的変化

	Finding		**Male (15/sex/group)**				**Female (15/sex/group)**			
Organ/ Tissue	Pulmonary Dose	(mg/kg/day) [a]	0	1.2	3.7	11.2	0	1.2	3.7	11.2
		(mg/g lung weight) [b]	0	0.4	1.2	3.7	0	0.4	1.2	3.7
Lungs	Hyperplasia of bronchiole/chronic interstitial inflammation		2	0	3	15	0	0	5	15
	Alveolar macrophages infiltration		1	14	15	15	0	14	15	15
	Bronchiolar hyperplasia [c]		-	-	+	+	-	-	+	+

[a] Achieved pulmonary doses corrected as per FDA Center for Drug Evaluation and Research pharmacology/toxicology reviewer as stated in Vantobra CHMP assessment report.
[b] Assuming rat body weight of 0.5 kg and lung weight of 1.5 g.
[c] Finding of bronchiolar hyperplasia reported as drug related in the mid and high dose groups for TOBI in Vantobra CHMP assessment report but no incidence values were provided.

さらに、TOBI のラットを用いた 2 年間がん原性試験では、TOBI 吸入溶液（60 mg/mL）を 90 分/日までの投与時間で 95 週間吸入投与した。当該試験の最高肺用量は約 2.7 mg/kg/日（0.9 mg/g

肺重量）であり、肺病変における閾値（1 mg/g 肺重量）未満であった。当該試験では、投薬に関連した腫瘍性病変は認められなかった（試験方法及び結果の詳細は公開されていない）。

また、TIP のラットを用いた 6 ヵ月間反復吸入毒性試験では、肺の変化として、肺重量増加、色素／好塩基性顆粒を含む肺胞マクロファージの集簇及び細気管支／肺胞上皮の過形成が認められた（表 2.4-11）。

表 2.4-11　TIP のラットを用いた 6 ヵ月間反復吸入毒性試験における肺の病理組織学的変化

	Finding		**Male (15/sex/group)**				**Female (15/sex/group)**			
Organ/Tissue	Pulmonary Dose	(mg/kg/day)	0	0.6	1.1	3.8	0	0.6	1.1	3.8
		(mg/g lung weight)	0	0.2	0.4	1.3	0	0.2	0.4	1.3
Lungs	Increased lung weights		-	-	+	+	-	-	+	+
	Macrophage accumulation		-	+	+	+	-	+	+	+
	Hyperplasia of bronchio/alveolar epithelium		-	-	-	+	-	-	-	+
	Inflammation lamina propria		-	-	-	+	-	-	-	+

+ = present or observed; - = absent or not observed

TIP のラットを用いた 6 ヵ月間吸入毒性試験では、TOBI 及び ALIS の吸入毒性試験と同様の肺の病理組織学的変化が認められた。さらに、肺過負荷によりラットでみられる肺における過形成及び炎症は、1 mg/g 肺重量を超える肺用量群のみで認められており、ラットにおける肺病変の閾値の概念を裏付けるものであった。

表 2.4-12　アミノグリコシド系薬剤のラットを用いた 2 年（TIP のみ 6 ヵ月）反復吸入毒性試験における肺の病理組織学的変化

Drug		**TOBI**	**TIP** [a]	**ALIS** [b]	
Treatment Group		**(HD)**	**(HD)**	**(MD)**	**(HD)**
Pulmonary Dose	(mg/kg/day) [d]	2.7	3.8	2.5	7.5
	(mg/g lung weight)	0.9	0.8	0.8	2.5 [c]
	(mg/m^2 ASA)	3.5	4.9	3.2	9.6
Non-Proliferative Lesions					
Increased lung weight		+	+	+	+
Foamy alveolar macrophage accumulation		+	+	+	+
Inflammation (acute/subacute/chronic)		+	+	+	+
Proliferative Lesions					
Hyperplasia (bronchio/alveolar epithelium)		+	+	+	+
Squamous metaplasia		-	N/A	-	+
Alveolar fibrosis		-	N/A	-	+
Keratinizing cyst		-	N/A	-	+
Neoplasms (adenomas, carcinomas)		-	N/A	-	+

+ = present or observed; - = absent or not observed; ASA = alveolar surface area; N/A = data not available/studies not conducted as the Sponsor relied on TOBI nonclinical safety database; HD = highest dose tested; MD = mid dose.

[a] Data from 6-month toxicology study as carcinogenicity studies were not conducted.

[b] Data calculated for total lung burden including liposomal mass estimated to deposit in lungs (10% deposition). Doses of amikacin only are 1.5 and 4.5 mg/kg corresponding to 0.5 and 1.5 mg/g lung.

[c] Value above the established threshold of 1 mg/g lung weight for particle overload-associated lung neoplasms.

[d] Assuming a body weight of 0.5 kg, lung weight of 1.5 g, and alveolar surface area of 0.39 m^2.

以上、アミノグリコシド系抗菌剤の吸入投与による非臨床安全性試験では、本剤と同様の変化がみられ、ラットにおける粒子過負荷による肺病変の発現状況は、肺病変に関する閾値の概念を支持するものであった。本剤のラットを用いた 2 年間がん原性試験における腫瘍性病変は、投薬

との関連性が明らかであり、肺粒子過負荷に対する閾値を上回る肺用量で発現したことが確認された（表 2.4-12）。

2.4.6.2　その他の毒性試験

ALIS を用いた免疫毒性試験の結果、マクロファージ機能へ影響を与えず、ヒトでの安全上の懸念はないものと考えられた。アミカシン原薬中のいくつかの不純物については遺伝毒性を評価し、それ以外のアミカシン不純物又は ALIS 分解物では安全性を評価する特別な試験は不要であった。

2.4.7　総括及び結論

効力を裏付ける薬理試験の結果から、ALIS がマウス *M avium* 肺感染モデルに対して有効であること、培養ヒトマクロファージを用いたアミカシン取り込み能の検討で ALIS では FA よりもアミカシンの取り込み量が 4 倍高いことが示された。また、ラットに ALIS を吸入投与した際の肺胞マクロファージ内アミカシン濃度は、同程度の肺沈着量を示す用量の FA を吸入投与した時と比較して 5～8 倍高かった。非臨床 PK 試験の結果から、遊離アミノグリコシドと比較して ALIS 投与により実質的に高い肺中アミカシン濃度を維持できることが示された。

本剤の反復吸入毒性試験の結果、肺及び腎臓が毒性標的器官と考えられた。がん原性試験では、高用量群 120 匹中 2 匹で投薬に関連した肺腫瘍が認められたが、明らかなげっ歯類特異的病変と考えられことから、ヒトの安全性との関連は明らかではなかった。ラットにおける長期の持続的な肺粒子高負荷は、慢性炎症、過形成、化生及び腫瘍形成等の毒性変化の進行度と関連していることが報告されている。本剤のラットを用いた吸入毒性試験でみられた一連の毒性変化は、粒子過負荷の概念と一致しており、肺高負荷による肺病変の閾値を支持するものであった。

この粒子過負荷の概念から、リポソームは吸入物質総沈着量に寄与すると考えられ、本剤投与後のラットにおける肺負荷反応に重要な役割を有する可能性が考えられる。

ヒトやイヌと比較して、ラットが粒子過負荷に対して高感受性を示す理由の根底には、生物学的及び解剖学的な相違があると考えられる（Mauderly, 1996）。ラットにおける吸入粒子の沈着部位である細気管支／肺胞接合部は粘膜線毛層の下方にあり、主要な肺クリアランスはマクロファージによる貪食である（Mauderly, 1996）。肺病変に関するラット特異的な閾値の概念は、本剤のイヌを用いた毒性試験において肺病変が認められないことにより支持される。実際、イヌでは吸入粒子に対する適応性変化である泡沫肺胞マクロファージの集簇がみられたが、肺の上皮炎症、過形成及び腫瘍性病変は認められなかった。さらに、気管支リンパ節及び縦隔リンパ節に泡沫マクロファージの集簇がみられたが、リンパ節の炎症は認められなかった。イヌを用いた 9 ヵ月間反復吸入毒性試験の高用量群では、肺用量は 2.8 mg/g 肺重量と推定され、肺病変の閾値（1 mg/g 肺重量）を上回っていた。

アミノグリコシド系の吸入剤（TOBI、TIP 及び ALIS）のラットを用いた非臨床安全性試験では、肺の病理組織学的変化として、泡沫マクロファージの集簇、急性から慢性の炎症及び細気管支／肺胞の上皮過形成がみられ、本剤の 2 年間がん原性試験では腫瘍性病変が認められた。各薬剤の非臨床試験で認められた慢性反応の類似性は、報告されている粒子肺高負荷に対するラットの反応と一致するものであった。本剤のラットを用いたがん原性試験においてみられた明らかに高い反応性は、本剤に含まれるリポソームにより肺用量が高用量になったためと考えられる。がん原性試験における総肺用量（2.5 mg/g 肺重量）が肺病変の閾値（1 mg/g 肺重量）を上回ったことが、ラットにおける腫瘍性病変の発現に関与したものと考える。

本剤の安全性については、各アミノグリコシド系吸入剤の非臨床安全性試験で認められた適応性変化及び毒性変化、並びにラットが粒子の吸入肺負荷に高感受性であることを裏付ける根拠について、併せて考慮する必要がある。ラットで認められた肺病変は、ヒトに類似した動物肺モデルであるイヌでは認められなかったことから、本剤の臨床使用（成人 NTM 肺疾患患者）において粒子過負荷に関連した変化が発現する可能性は低いものと考える。

2.4.8 参考文献

Bodey GP, Valdivieso M, Feld R, Rodrigues V. Pharmacology of amikacin in humans. Antimicrob Ag Chemother. 1974;5(5):508-512.

Borm PJA, Schins RPF, Albrecht C. Inhaled particles and lung cancer, part B: paradigms and risk assessment. Int J Cancer 2004;110:3-14.

Boorman GA, Morgan KT, Uriah LC. Nose, larynx, and trachea, Pathology of the Fischer Rat Reference and Atlas. Academic Press, Inc. 1990;20:315-337.

Contrepois A, Brion N, Garaud JJ, et al. Renal disposition of gentamicin, dibekacin, tobramycin, netilmicin, and amikacin in humans. Antimicrob Agents Chemother. 1985;27(4):520-524.

Daigle CC, Chalupa DC, Gibb FR, Morrow PE, Oberdörster G, Utell MJ, et al. Ultrafine particle deposition in humans during rest and exercise. Inhal Toxicol. 2003;15(6):539-552.

DeGeorge JJ, Ahn CH, Andrews PA, Brower ME, Choi YS, Chun M, et al. Considerations for toxicology studies of respiratory drug products. Reg Toxicol Phamacol. 1997;25:189-193.

Drugs.com (2019). https://www.drugs.com/mmx/netilmicin-sulfateaminoglycosides.html#citec00102973. Accessed 23 September 2019.

European Agency for the Evaluation of Medicinal Products (EMA) (1996). Committee for Veterinary Medicinal Products. Aminosidine. Summary report. https://www.ema.europa.eu/en/documents/mrl-report/aminosidine-summary-report-1-committee-veterinary-medicinal-products_en.pdf

Greaves, P. Histopathology of Preclinical Toxicity Studies (3rd ed.): Interpretation and Relevance in Drug Safety Evaluation, Amsterdam: Elsevier Science; 2007.

Greenspan P, Yu H, Mao F, Gutman RL. Cholesterol deposition in macrophages: foam cell formation mediated by cholesterol-enriched oxidized low density lipoprotein. J Lipid Res 1997;38(1):101–9.

Hahn FF. Carcinogenicity: Testing, predicting, and interpreting chemical effects. Marcel Dekker (ed) New York: 1999; 531-561.

Herbert RA, Leninger JR. Nose, larynx and trachea. In: Maronpot RR, Boorman GA, Gaul BW (eds) Pathology of the mouse. Cache River Press; 1999:278.

Hext PM. Current perspectives on particulate induced pulmonary tumours. Hum Exp Toxicol 1994;13(10):700–15.

ILSI Risk Science Institute. The relevance of the rat lung response to particle overload for human risk assessment: a workshop consensus report. Inhal Toxicol 2000;12:1-17.

Jones RM, Neef N. Interpretation and prediction of inhaled drug particle accumulation in the lung and its associated toxicity. Xenobiotica 2012; 42(1):86-93.

Kelly C, Jefferies C, Cryan S-A. Targeted liposomal drug delivery to monocytes and macrophages. J Drug

Deliv. 2011;2011:1-11.

Lewis DJ, Williams TC, Beck SL. Foamy macrophage responses in the rat lung following exposure to inhaled pharmaceuticals: a simple, pragmatic approach for inhaled drug development. J Appl Toxicol. 2014;34(4):319-331.

Mauderly JL and McCunney RJ (Eds.). Particle Overload in the Rat Lung and Lung Cancer: Implications for Human Risk Assessment, Philadelphia, PA: Taylor & Francis; 1996.

Monteleone PM, Muhammad N, Brown RD, et al. Amikacin Sulfate. In: Florey K; ed. Analytical Profiles of Drug Substances. Academic Press; 1983;(Vol 12):37-71.

Newton PE. Fundamental Inhalation Toxicology. In: MJ Delranko and MA Hollinger (Eds). Handbook of Toxicology (2nd ed.), Boca Raton, FL: CRC Press. 2002;267-333.

Nikula KJ, McCartney JE, McGovern T, Miller GK, Odin, M, Pino MV, et al. STP position paper: interpreting the significance of increased alveolar macrophages in rodents following inhalation of pharmaceutical materials. Toxicol Pathol. 2014;42(3):472-486.

Oberdörster G, Yu CP. The carcinogenic potential of inhaled diesel exhaust: a particle effect? J Aersol Sci. 1990;21(sup 1):S397-S401.

Oberdörster G. Lung particle overload: implications for occupation exposure to particles. Regul Toxicol and Pharmacol. 1995;27:123-135.

Oberdörster G. Significance of particle parameters in the evaluation of exposure-dose-response relationships of inhaled particles. Inhal Toxicol. 1996;8(Suppl 1):73-89.

Oberdörster G. Pulmonary carcinogenicity of inhaled particles and the maximum tolerated dose. Environ Health Perspect. 1997;105(supp5):1347-1355.

Oberdörster G. Toxicokinetics and effects of fibrous and nonfibrous particles. Inhal Toxicol. 2002;14(1), 29-56.

Olivier KN, Maass-Moreno R, Whatley M, Cheng KT, Lee J-h, Folio L, et al. Airway deposition and retention of liposomal amikacin for inhalation in patients with pulmonary nontuberculous mycobacterial disease. American Thoracic Society meeting, 2016, Poster A3732.

P3435 LAI Pre-PI Consultation Minutes 20141216.

Peto R, Pike MC, Day NE, Gray RG, Lee PN, Parish S, et al. Guidelines for simple, sensitive significance tests for carcinogenic effects in long-term animal experiments. In: IARC Mongr Eval Carcinog Risk Chem Hum. WHO IARC, Lyon. 1980;(suppl 2):311-426.

Renne R, Brix A, Harkema J, Herbert R, Kittel B, Lewis D, et al. Proliferation and Nonproliferative Lesions of the Rat and Mouse Respiratory Tract. Toxicol Pathol. 2009;37:5S-73S.

Schwartz et al. (1994), Proliferative Lesions of the Rat Respiratory Tract, In: Guides for Toxicologic

Pathology, Washington, DC: STP/ARP/AFIP. 1-24.

Snipes MB. Current Information on Lung Overload in Nonrodent Mammals: Contrast with Rats. Inhal Toxicol. 1996;8(suppl):91-109.

TOBI® PODHALER®. Product Monograph Including Patient Medication Information. April 10, 2019 version.

Vostal JJ. (1986), Factors limiting the evidence for chemical carcinogenicity of diesel emission in long-term inhalation experiments, In: N. Ishinishi, A. Koizumi, R.O. McClelland and W. Stober (Eds.), Carcinogenic and Mutagenic Effects of Diesel Engine Exhaust, New York: Elsevier. 329-348.

World Health Organization, WHO (1995a). Toxicological evaluation of certain veterinary drug residues in food. WHO Food Additives Series 34. Geneva. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA). http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v34je03.htm

World Health Organization, WHO (1995b). Toxicological evaluation of certain veterinary drug residues in food. WHO Food Additives Series 34. Geneva. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA). http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v34je07.htm

World Health Organization, WHO (2012). Toxicological evaluation of certain veterinary drug residues in food. WHO Food Additives Series 66. Geneva. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v66je01.pdf

阿久津貞夫、加藤誠、川名研一、他（1982）Amikacin の点滴静注による生殖に及ぼす影響 ラットにおける妊娠前及び妊娠初期腹腔内投与実験 Seg.I. Jpn J Antibiot; 2100:194-204.

松崎明紀、阿久津貞夫、向川秀生、他（1975a）Amikacin (BB-K8) の催奇形性に関する研究 妊娠ウサギに対する筋肉内注射による胎仔に及ぼす影響. Jpn J Antibiot; 28:366-71.

松崎明紀、阿久津貞夫、向川秀生、他（1975b）Amikacin (BB-K8) の催奇形性に関する研究 マウス・ラットの胎児および新生仔の発育に及ぼす影響. Jpn J Antibiot; 28:372-84.