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
2.6 非臨床試験の概要文及び概要表
2.6.4 薬物動態試験の概要文

インスメッド合同会社

目次

頁
略号一覧表 6
2.6.4 薬物動態試験の概要文 7
2.6.4.1 まとめ 7
2.6.4.2 分析法 10
2.6.4.3 吸収 12
2.6.4.3.1 ラットに Arikace™を吸入投与した後の PK 及び分布（2.6.5.3.1 項、AMIK-BRD-2007-04-PK、CTD 4.2.2.5-1） 12
2.6.4.4 分布 15
2.6.4.4.1 タンパク結合及び血球中への移行 15
2.6.4.4.2 胎盤通過試験 15
2.6.4.4.3 組織内分布：単回投与 15
2.6.4.4.3.1 ラットに Arikace™を吸入投与した後の PK 及び分布（2.6.5.3.1 項、AMIK-BRD-2007-04-PK、CTD 4.2.2.5-1） 15
2.6.4.4.3.2 アミカシン-TAMRA 及びアミカシンを吸入投与した後の PK プロファイルの比較（2.6.5.5.1 項、AMIK-BIO-2009-25-PCLN、CTD 4.2.2.3-1） 15
2.6.4.4.3.3 アミカシン-TAMRA 及びアミカシンを吸入投与した後の PK プロファイルの比較（2.6.5.5.2 項、AMIK-BIO-2009-27-PCLN、CTD 4.2.2.3-2） 18
2.6.4.4.3.4 ラットに $DiIC_{18}$(5)(DS)リポソームを吸入投与した後の肺組織内分布（2.6.5.5.3 項、AMIK-BIO-2009-26-PCLN、CTD 4.2.2.3-3） 21
2.6.4.4.3.5 ラットに $DiIC_{18}$(5)DS リポソームを吸入投与した後の肺組織内分布（2.6.5.5.4 項、AMIK-BIO-2009-28-PCLN、CTD 4.2.2.3-4） 23
2.6.4.4.3.6 ラットに蛍光脂質 $DiIC_{18}$(5)DS を吸入投与した後の肺組織内分布（2.6.5.5.5 項、AMIK-BIO-2009-31-PCLN、CTD 4.2.2.3-5） 25
2.6.4.4.3.7 ラットに Arikace™を吸入投与した後のリポソーム脂質及びアミカシンの肺組織内分布（2.6.5.5.6 項、AMIK-BIO-2009-29-PCLN、CTD 4.2.2.3-6） 26
2.6.4.4.3.8 ラットに Arikace™を吸入投与した後のリポソーム脂質及びアミカシンの肺組織内分布（2.6.5.5.7 項、AMIK-BIO-2009-32-PCLN、CTD 4.2.2.3-7） 28
2.6.4.4.4 組織内分布：反復投与 31
2.6.4.4.4.1 ラットに Arikace™を反復吸入投与した後のリポソーム脂質及びアミカシンの肺組織内分布及び消失（2.6.5.8.1 項、AMIK-BIO-2009-33-PCLN、CTD 4.2.2.3-8） 31
2.6.4.5 代謝（動物種間の比較） 37
2.6.4.6 排泄 38
2.6.4.6.1 ラットに Arikace™及び遊離アミカシンを単回吸入投与した後の組織内分布及び消失（2.6.5.13.1 項、AMIK-BIO-2009-24-PCLN、CTD 4.2.2.5-2） 38
2.6.4.6.2 ラットに Arikace™及び遊離アミカシンを単回吸入投与した後の組織内分布及び消失（2.6.5.13.1 項、AMIK-BIO-2009-30-PCLN、CTD 4.2.2.5-3） 41
2.6.4.7 薬物動態学的薬物相互作用 43
2.6.4.8 その他の薬物動態試験 44
2.6.4.9 考察及び結論 45

2.6.4.10　図表 47
2.6.4.11　参考文献 48

表一覧

表 2.6.4-1　非臨床 TK 試験で使用した分析法の特性一覧 11
表 2.6.4-2　ラットに ALIS 及び FT を吸入投与した後の $AUC_{0\text{-}48h}$ 12
表 2.6.4-3　ラットに ALIS 及び FA を吸入投与した後のアミカシンの回収量 14
表 2.6.4-4　ラットに 1%アミカシン-TAMRA 又は 1%遊離 TAMRA を含有する FA を吸入投与（90 mg/kg）した後のアミカシン、アミカシン-TAMRA 及び遊離 TAMRA の平均 PK パラメータ 16
表 2.6.4-5　ラットに 0.2% (w/w) $DiIC_{18}(5)DS$ を含有する ALIS を吸入投与（90 mg/kg）した後の肺、血清及び尿中アミカシンの PK パラメータ 23
表 2.6.4-6　$DiIC_{18}(5)DS$ ミセル及び $DiIC_{18}(5)DS$ 標識 ALIS リポソームの肺における PK パラメータの比較 26
表 2.6.4-7　ラットに 0.2% (w/w)アミカシン-TAMRA 及び $DiIC_{18}(5)DS$ を含有する ALIS を吸入投与（90 mg/kg）した後の肺、血清及び尿中アミカシンの PK パラメータ 27
表 2.6.4-8　ラットに 0.2% (w/w)アミカシン-TAMRA 及び $DiIC_{18}(5)DS$ を含有する ALIS を吸入投与（90 mg/kg）した後の肺、血清及び尿中アミカシンの PK パラメータ 29
表 2.6.4-9　ラットに 0.2% (w/w)アミカシン-TAMRA 及び $DiIC_{18}(5)DS$ を含有する ALIS を吸入投与（90 mg/kg）した後の肺中アミカシン-TAMRA 及び $DiIC_{18}(5)DS$ の PK パラメータ 30
表 2.6.4-10　AMIK-BIO-2009-33-PCLN 試験における各投与群の構成表 32
表 2.6.4-11　ラットに ALIS を 10 mg/kg/日（第 4 群）又は 90 mg/kg/日（第 3 群）の用量で 27 日間連日吸入投与後、Day 28 にそれぞれ二重蛍光標識 ALIS（90 mg/kg）を吸入投与したときの肺、血清及び尿中アミカシンの PK パラメータ 32
表 2.6.4-12　ラットに ALIS を 10 mg/kg/日（第 4 群）又は 90 mg/kg/日（第 3 群）の用量で 27 日間連日吸入投与後、Day 28 にそれぞれ二重蛍光標識 ALIS（90 mg/kg）を吸入投与したときの肺、血清及び尿中のアミカシン-TAMRA 及び $DiIC_{18}(5)DS$ の PK パラメータ 33
表 2.6.4-13　ラットに ALIS 又は FA を吸入投与（90 mg/kg）した後のアミカシンの PK パラメータ 39

図一覧

図 2.6.4-1　ラットに ALIS 及び FT を単回吸入投与（60 mg/kg）した後の肺中 PK プロファイル 13
図 2.6.4-2　ラットに ALIS 及び FT を単回吸入投与（60 mg/kg）した後の血清中 PK プロファイル 13

図 2.6.4-3　ラットに 1%アミカシン-TAMRA 又は 1%遊離 TAMRA を含有する FA を吸入投与（90 mg/kg）した後の肺中アミカシン濃度（μg/g）.....17
図 2.6.4-4　ラットに 1%アミカシン-TAMRA 又は 1%遊離 TAMRA を含有する FA を吸入投与（90 mg/kg）した後の肺中のアミカシン-TAMRA 及び遊離 TAMRA 濃度（nmol/kg）.....17
図 2.6.4-5　ラットに 1%アミカシン-TAMRA 又は 1%遊離 TAMRA を含有する FA を吸入投与（90 mg/kg）した後の肺中アミカシン濃度（μg/g）.....18
図 2.6.4-6　ラットに 1%アミカシン-TAMRA 又は 1%遊離 TAMRA を含有する FA を吸入投与（90 mg/kg）した後の肺中のアミカシン-TAMRA 及び遊離 TAMRA 濃度（nmol/kg ）.....19
図 2.6.4-7　ラットに 1%アミカシン-TAMRA 又は 1%遊離 TAMRA を含有する FA を吸入投与（90 mg/kg）した後の血清中アミカシン濃度（μg/mL）.....19
図 2.6.4-8　ラットに 1%アミカシン-TAMRA 又は 1%遊離 TAMRA を含有する FA を吸入投与（90 mg/kg）した後の血清中のアミカシン-TAMRA 及び遊離 TAMRA 濃度（nM） 20
図 2.6.4-9　ラットに 1%アミカシン-TAMRA 又は 1%遊離 TAMRA を含有する FA を吸入投与（90 mg/kg）した後の尿中アミカシン濃度（μg/mL）.....20
図 2.6.4-10　ラットに 1%アミカシン-TAMRA 又は 1%遊離 TAMRA を含有する FA を吸入投与（90 mg/kg）した後の尿中のアミカシン-TAMRA 及び遊離 TAMRA 濃度（nM）....21
図 2.6.4-11　ラットに 0.5 mol% $DiIC_{18}(5)DS$ を含有する ALIS を吸入投与（90 mg/kg）した後の肺中アミカシン濃度（μg/g）.....22
図 2.6.4-12　ラットに 0.5 mol% $DiIC_{18}(5)DS$ を含有する ALIS を吸入投与（90 mg/kg）した後の肺中 $DiIC_{18}(5)DS$ 濃度（μg/g）.....22
図 2.6.4-13　ラットに 0.2% (w/w) $DiIC_{18}(5)DS$ を含有する ALIS を吸入投与（90 mg/kg）した後の肺中アミカシン濃度（μg/g）.....24
図 2.6.4-14　ラットに 0.2% (w/w) $DiIC_{18}(5)DS$ を含有する ALIS を吸入投与（90 mg/kg）した後の肺中 $DiIC_{18}(5)DS$ 濃度（μg/g）.....25
図 2.6.4-15　ラットに 0.2% (w/w)アミカシン-TAMRA 及び $DiIC_{18}(5)DS$ を含有する ALIS を吸入投与（90 mg/kg）した後の肺中アミカシン濃度（μg/g）.....27
図 2.6.4-16　ラットに 0.2% (w/w)アミカシン-TAMRA 及び $DiIC_{18}(5)DS$ を含有する ALIS を吸入投与（90 mg/kg）した後の肺中アミカシン-TAMRA 及び $DiIC_{18}(5)DS$ 濃度（μg/g） 28
図 2.6.4-17　ラットに 0.2% (w/w)アミカシン-TAMRA 及び $DiIC_{18}(5)DS$ を含有する ALIS を吸入投与（90 mg/kg）した後の右肺葉及び左肺組織中のアミカシン濃度（μg/g）.....29
図 2.6.4-18　ラットに 0.2% (w/w)アミカシン-TAMRA 及び $DiIC_{18}(5)DS$ を含有する ALIS を吸入投与（90 mg/kg）した後の各肺葉及び肺組織中のアミカシン-TAMRA 濃度（μg/g）.....30
図 2.6.4-19　ラットに 0.2% (w/w)アミカシン-TAMRA 及び $DiIC_{18}(5)DS$ を含有する ALIS を吸入投与（90 mg/kg）した後の各肺葉及び肺組織中の $DiIC_{18}(5)DS$ 濃度（μg/g） 31
図 2.6.4-20　ラットに ALIS を 10 mg/kg/日（第 4 群）又は 90 mg/kg/日（第 3 群）の用量で 27 日間連日吸入投与後、Day 28 にそれぞれ二重蛍光標識 ALIS（90 mg/kg）を吸入投与したときの肺中アミカシン濃度（μg/g）.....33
図 2.6.4-21　ラットに ALIS を 10 mg/kg/日の用量で 27 日間連日吸入投与後、Day 28 に二重蛍

光標識 ALIS（90 mg/kg）を吸入投与したとき（第 4 群）の肺中のアミカシン-TAMRA 濃度（μg/g） 34
図 2.6.4-22　ラットに ALIS を 90 mg/kg/日の用量で 27 日間連日吸入投与後、Day 28 に二重蛍光標識 ALIS（90 mg/kg）を吸入投与したとき（第 3 群）の肺中のアミカシン-TAMRA 濃度（μg/g） 34
図 2.6.4-23　ラットに ALIS を 10 mg/kg/日の用量で 27 日間連日吸入投与後、Day 28 に二重蛍光標識 ALIS（90 mg/kg）を吸入投与したとき（第 4 群）の肺中の $DiIC_{18}(5)DS$ 濃度（μg/g） 35
図 2.6.4-24　ラットに ALIS を 90 mg/kg/日の用量で 27 日間連日吸入投与後、Day 28 に二重蛍光標識 ALIS（90 mg/kg）を吸入投与したとき（第 3 群）の肺中の $DiIC_{18}(5)DS$ 濃度（μg/g） 35
図 2.6.4-25　ラットに ALIS 又は FA を吸入投与（90 mg/kg）した後の肺中アミカシン濃度（μg/g） 39
図 2.6.4-26　ラットに ALIS 又は FA を吸入投与（90 mg/kg）した後の血清中アミカシン濃度（μg/mL） 40
図 2.6.4-27　ラットに ALIS 又は FA を吸入投与（90 mg/kg）した後の尿中アミカシン濃度（μg/mL） 40
図 2.6.4-28　ラットに ALIS 又は FA を吸入投与（90 mg/kg）した後の肺中アミカシン濃度（μg/g） 41
図 2.6.4-29　ラットに ALIS を吸入投与（90 mg/kg）した後の肺の各部位中アミカシン濃度（μg/g） 42
図 2.6.4-30　ラットに FA を吸入投与（90 mg/kg）した後の肺の各部位中アミカシン濃度（μg/g） 42

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
AUC	area under the concentration-time curve：濃度－時間曲線下面積
AUC_{0-t}	area under the plasma or serum 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もしくは血清中濃度－時間曲線下面積
C_{max}	maximum (peak) plasma or serum concentration of the drug：血漿中もしくは血清中最高（ピーク）薬物濃度
C_{min}	minimum (trough) plasma or serum drug concentration：血漿中もしくは血清中最小（トラフ）薬物濃度
$DiIC_{18}(5)DS$	1,1’-dioctadecyl-3,3,3’,3’-tetramethylindolicarbocyanine-5,5’-disulphonic acid attached to two C_{18} alkyl chains：2 個の C_{18} 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
DMPK	Distribution, Metabolism, Pharmacokinetics：薬物動態
DPPC	dipalmitoylphosphatidylcholine：ジパルミトイルホスファチジルコリン
FA	free amikacin：遊離型アミカシン
FT	free tobramycin：遊離型トブラマイシン
IPD	immediately post-dose：投与終了直後
ISD	insufficient data to calculate parameter：データ不十分により算出せず
IV	intravenous：静脈内
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 quantification：定量下限
MAC	*Mycobacterium avium* complex
NaCl	sodium chloride：塩化ナトリウム
NTM	nontuberculous mycobacteria：非結核性抗酸菌
PK	pharmacokinetics：薬物動態
SLIT™	Sustained release Lipid Inhalation Targeting™
$t_{1/2}$	half-life：半減期
TAMRA	tetramethylrhodamine：テトラメチルローダミン
TDx	Abbott TDx™ Automated Fluorescence Immunopolarization Assay：Abbott TDx™自動蛍光偏光免疫アッセイ
TK	toxicokinetics：トキシコキネティクス

2.6.4　薬物動態試験の概要文

2.6.4.1　まとめ

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）による肺非結核性抗酸菌（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。

臨床推奨用量は、1 日 1 回、70 mg/mL の 10 mL バイアル 1 単位（目標投与量としてアミカシンの遊離塩基として 590 mg）である。母集団薬物動態解析に基づき、年齢や体重に基づいた用量調整は不要である。ALIS は経口吸入用製剤として開発され、ラミラネブライザシステムを用いた噴霧により吸入投与される。

ALIS は、以前は Arikace™、Sustained release Lipid Inhalation Targeting™（SLIT™）Amikacin、及び Liposomal Amikacin for Inhalation（LAI）と称された。本資料中では、原本の記載通りに表現した試験タイトルや一部の図を除いて、Arikace™、SLIT™ Amikacin 及び LAI の代わりに ALIS を使用する。ALIS に含まれるアミカシン硫酸塩をアミカシンと称し、リポソーム製剤以外のアミカシン硫酸塩水溶液を遊離型アミカシン（FA）とする。特に記載がない限り、被験物質の用量及び濃度は、全て遊離塩基（すなわち、アミカシン）として示す。本概要文に示した試験は全て、それぞれの概要表への対応を明記した（すなわち、表番号／試験番号又は報告書番号）。

現在、肺非結核性抗酸菌（NTM）症のような肺感染症では、抗菌薬の経口投与および、静脈注射、筋肉内注射投与による治療が行われている。これらの抗菌薬による治療の有効性は、薬剤感受性によって影響を受けることに加え、これらの投与方法では喀痰／バイオフィルムマトリックスへの移行が限定的であることから、感染部位において抗菌薬が最適に利用されていない。また、NTM の一部は、マクロファージ内（すなわち、細胞内）に感染し、局在化していることから、薬物の菌への接触が制限される。ALIS は、喀痰／バイオフィルムマトリックスに浸透し、感染部位に比較的高濃度のアミカシンを供給し、マクロファージの貪食作用によって ALIS リポソームがマクロファージ内部に取り込まれ、その結果、有効成分アミカシンが菌に到達し接触できるように設計された。これにより ALIS は、上記の課題を克服することを意図して開発された。

本項で記載する薬物動態（PK）試験は、ALIS の単回及び反復吸入投与後のアミカシンの肺内沈着、保時及び消失を評価することを目的に実施された。特に記載がない限り、ALIS 及び他のアミノグリコシドの投与量は 90 mg/kg で実施した。FA 及びトブラマイシン溶液（FT；遊離トブラマイシン）を吸入投与したときの PK との比較も実施した。全ての試験は、ラット（主に CD®IGS；毒性試験で使用したものと同系統）を用いて、鼻腔からの吸入又は経口投与により実施した。ほとんどの試験で、市販予定の ALIS 製剤（すなわち、70 mg/mL のアミカシンを含有し、ヒトで使用されているものと同じ製剤）が使用された。初期の検討では、ALIS 吸入投与後の PK を評価するために、Abbott TDx™自動蛍光偏光免疫アッセイ（TDx 法）により組織、血清及び尿中アミカシン濃度を測定した。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分析を利用して、ALIS の組織内分布を詳細に調べた。マウス、ラット及びイヌを用いた ALIS の毒性試験では、バリデートされた TDx 法及び液体クロマトグラフィー・タンデム質量分析（LC/MS/MS）法を用いて血漿／血清、尿及び肺組織中のアミカシン濃度を測定した。トキシコキネティクス（TK）試験の詳細は、2.6.6 項及び 2.6.7 項中の関連箇所に示した。

アミカシンとして 50 mg/kg の ALIS を単回経口投与したとき、血清中には定量可能なアミカシン濃度は検出されなかった。一方で尿中には、低濃度ではあるが定量可能なアミカシンが確認され、それに基づくと、投与量の 0.002%～0.3%のアミカシンが吸収されたと推定された。

ALIS（70 mg/mL）を 60 mg/kg の用量で単回吸入投与したとき、肺中アミカシン濃度は投与終了後に急速に低下し、その後 672 時間にわたり緩徐に低下するという、二相性の消失が認められた。二相性の消失は FA 及び FT の 60 mg/kg 投与後でも認められた。しかし、肺中アミカシン濃度は、ALIS 投与の方が高くより持続的であった。肺からのアミカシンの初期の消失（約 40%）は、噴霧後の ALIS 中に含まれる FA の消失によるものであり、その後の経時的な緩徐な消失は、肺（主に肺胞マクロファージ）に保持されていた ALIS のリポソームからアミカシンが徐々に放出されることによるものと考えられた。

ラットに ALIS（90 mg/kg）又は FA（90 mg/kg）を単回吸入投与後 24 時間又は 21 日まで評価した試験では、FA 投与群と比較して、ALIS 投与群では濃度-時間曲線下面積（AUC）は 2 倍に上昇し、見かけの消失半減期（$t_{1/2}$）は 2～3 倍延長した。ラットに ALIS を投与したときの蛍光標識された肺切片の顕微鏡観察では、投与直後には拡散性の染色パターンを示したが、経時的に細胞染色（マクロファージ）が増加することが示された。一方、FA を投与したラットでは、非常に薄い拡散性の染色が観察された。これらの結果は、アミカシンをリポソームに封入することにより、FA と比較して消失が遅延し、肺胞マクロファージによるアミカシンの取込みが促進されることを示している。この *in vivo* でのマクロファージ取込み量の増加は、*in vitro* 試験結果（マクロファージに分化させた細胞で ALIS の取り込み量が FA と比較して増加した）により確認された。また、ラットの別の *in vivo* 試験においても、同程度の肺内沈着量をもたらす用量で比較した場合、ALIS 吸入投与後 2、6 及び 24 時間後の肺マクロファージ中のアミカシン濃度が、FA の吸入投与後と比較して 5～8 倍高かったことで示された（2.6.2.2.1 項参照）。

市販されているアミカシンの蛍光誘導体（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（2 個の C_{18} 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［$DiIC_{18}(5)DS$］）は、蛍光標識された ALIS の開発に適していることが確認された。これらの蛍光標識体を用いて調製した 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消失の評価が可能となった。

二重蛍光標識した ALIS を単回投与したとき、投与後 24 時間にわたり、アミカシン及びリポソームの沈着が肺深部を含め肺全体にわたって均一であることが蛍光顕微鏡で明らかとなった。リポソーム内の $DiIC_{18}(5)DS$ は、主に肺胞腔及び実質組織内のマクロファージ中に取り込まれていた。アミカシン-TAMRA に由来する蛍光から、拡散性の分布及びマクロファージ内への取込みが確認された。二重蛍光標識した ALIS を単回投与したとき、投与後 28 日で、沈着したアミカシンの約 90%が肺から消失したが、$DiIC_{18}(5)DS$ の消失は明らかに遅かった。投与終了直後の肺切片の蛍光顕微鏡による評価から、$DiIC_{18}(5)DS$ 及びアミカシン-TAMRA が肺全体に分布し、ほぼ共局在化していることが示された。$DiIC_{18}(5)DS$ 及びアミカシン-TAMRA ともに、その大部分が投与後 4 時間以内に気道内に検出されたが、いずれも投与後 24 時間以後は末梢肺組織に移動した。肺組織 1 g あたりのアミカシンの沈着量は、評価した肺葉又は切片に関係なく同程度であり、アミカシンは肺から一様に消失した。

ALIS の噴霧中に放出されたアミカシン（放出割合約 40%）は、7 時間以下の肺中 $t_{1/2}\ \alpha$ で急速に消失した。一方で、肺中に残存している部分は、主に肺胞マクロファージに取り込まれ、約 400 時間の $t_{1/2}\ \beta$ で肺中に保持されていた。リポソーム成分の $DiIC_{18}(5)DS$ は肺から緩徐に消失し、血清及び尿中に $DiIC_{18}(5)DS$ が検出されなかったことから、リポソームの脂質は主に細胞内経路で消失することが示唆された。

反復吸入投与試験では、ラットに 10 又は 90 mg/kg/日の ALIS（70 mg/mL）を約 1 ヵ月間連日投

与した。単回投与後の試験結果と同様に、この試験からは以下の重要な結果が得られた。肺中アミカシン量は用量に比例して増加した。アミカシンは肺全体に均一に分布した。肺組織 1 g 中のアミカシン量は、採取した肺試料の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、$DiIC_{18}(5)DS$ は肺から緩徐に消失し、主にマクロファージ中に存在が確認された。吸入投与後に肺に残存している ALIS は、主に肺胞及び間質性マクロファージに取り込まれ、肺中 $t_{1/2}$ は 230 時間を超えていた。

以上、ALIS は、FA と比較してより肺中に高く持続したアミカシン濃度を供給できることが示された。したがって、ALIS の吸入投与により、比較的高濃度のアミカシンを細菌性マクロコロニー環境に局所的に送達することが可能となった。ALIS を吸入投与したとき、アミカシンは肺全体に均一に分布し、肺から一様に消失した。ALIS を噴霧中に放出されたアミカシンの部分は急速に消失したが、肺に残存したリポソーム部分は主に肺胞マクロファージによって取り込まれ、より緩徐に消失した（すなわち、depot［貯留］様効果）。

2.6.4.2　分析法

本資料中に記載した PK 試験では、血漿／血清、尿、肺、腎臓及び脳中のアミノグリコシド濃度（アミカシンを含む）を市販の Abbott TDx 自動蛍光偏光分析装置（Abbott TDx キャリブレータ及び対照を含む）を用いて測定した（TDx 法）。肺組織中のアミカシンの可視化（固定）は、蛍光抗体染色法及び蛍光顕微鏡を用いて実施した。

AMIK-RES-2009-21-FORM 試験（2.6.5 項、表 2.6.5-1；CTD 4.2.2.1-15）において、アミカシン-TAMRA（アミカシンのブチリル側鎖上の末端アミノ基にアミド結合を介して結合させた 5-カルボキシテトラメチルローダミンの蛍光色素分子）は、*in vivo* の PK 試験で、ALIS 吸入投与後のアミカシンの体内動態を追跡するためのプローブとして使用できる有用なトレーサーであることが確認された。AMIK-RES-2009-22-FORM 試験（2.6.5 項、表 2.6.5-1；CTD 4.2.2.1-16）では、ALIS 吸入投与後のリポソームの体内動態を追跡するための蛍光標識 ALIS リポソームとして DiIC$_{18}$(5)DS（2 個の C$_{18}$ アルキル鎖に結合した 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）を選択した。アミカシン-TAMRA の蛍光が DiIC$_{18}$(5)DS の蛍光を妨害しないことも確認された。これらの蛍光プローブを用いた PK 試験では、血清、尿、及び／又は肺中のアミカシン-TAMRA、遊離 TAMRA、DiIC$_{18}$(5)DS リポソーム又は遊離 DiIC$_{18}$(5)DS の濃度を、蛍光光度計を用いて測定した。これらの物質の肺組織中の可視化（非固定）は、蛍光顕微鏡を用いて実施した。

PK 試験で使用した分析法は、個々の報告書に記載されている（TDx 法については以下を参照）。

ALIS の毒性試験の一部として実施された TK 試験で使用した動物の体液及び組織中アミカシン濃度の分析法（バリデーション済みの TDx 法及び LC/MS/MS 法）を表 2.6.4-1 に示す。

表 2.6.4-1　非臨床 TK 試験で使用した分析法の特性一覧

Validation Report No. (CTD Module 4 No.)	Used in Study No.	Matrix	Compound	Linear Dynamic Range of Assay (µg/mL or µg/g of lung)	Method	Assay Characteristics			Comments
						Accuracy (%)	Precision (% CV)	LLOQ (µg/mL or µg/g of lung)	
27127 (CTD 4.2.2.1-1)	667621 667637 667396 667574	Rat and Dog Plasma	Amikacin	10-40 µg/mL	TDx[a]	≤ 11	≤ 7	3 µg/mL	Validated assay
27566 (CTD 4.2.2.1-2)	667621 667637 667396 667574	Rat and Dog Urine	Amikacin	10-40 µg/mL	TDx[a]	≤ 20	≤ 7	3 µg/mL	Validated assay
27705 (CTD 4.2.2.1-3)	667621 667637 667396 667574	Rat and Dog Lung	Amikacin	80-2000 µg/g	TDx[a]	≤ 9	≤ 9	80 µg/g	Validated assay
07-8992 (CTD 4.2.2.1-4)	07-6307	Mouse Serum	Amikacin	0.15-40 µg/mL	LC/MS/MS	≤ 5	≤ 10	0.15 µg/mL	Validated assay
07-8993 (CTD 4.2.2.1-5)	07-6307	Mouse Lung	Amikacin	15-4000 µg/g	LC/MS/MS	≤ 14	≤ 11	15 µg/g	Validated assay
07-8995 (CTD 4.2.2.1-6)	07-6308 09-6345	Rat Serum	Amikacin	0.15-40 µg/mL	LC/MS/MS	≤ 6	≤ 10	0.15 µg/mL	Validated assay
07-8995a (CTD 4.2.2.1-7)	14-6002 TQ72SR	Rat Serum	Amikacin	0.15-40 µg/mL	LC/MS/MS	≤ 6	≤ 11	0.15 µg/mL	Partially validated assay
07-8996 (CTD 4.2.2.1-8)	07-6308	Rat Urine	Amikacin	0.15-40 µg/mL	LC/MS/MS	≤ 8	≤ 10	0.15 µg/mL	Validated assay
07-8996b (CTD 4.2.2.1-9)	14-6002	Rat Urine	Amikacin	0.15-40 µg/mL	LC/MS/MS	≤ 3	≤ 5	0.15 µg/mL	Partially validated assay
07-8997 (CTD 4.2.2.1-10)	07-6308	Rat Lung	Amikacin	15-4000 µg/g	LC/MS/MS	≤ 9	≤ 12	15 µg/g	Validated assay
07-8997a (CTD 4.2.2.1-11)	14-6002 TQ72SR	Rat Lung	Amikacin	15-4000 µg/g	LC/MS/MS	≤ 6	≤ 7	15 µg/g	Partially validated assay
07-8516 (CTD 4.2.2.1-12)	07-6306 11-6400	Dog Serum	Amikacin	0.15-40 µg/mL	LC/MS/MS	≤ 5	≤ 11	0.15 µg/mL	Validated assay
07-8517 (CTD 4.2.2.1-13)	07-6306	Dog Urine	Amikacin	0.15-40 µg/mL	LC/MS/MS	≤ 11	≤ 9	0.15 µg/mL	Validated assay
07-8518 (CTD 4.2.2.1-14)	07-6306 11-6400	Dog Lung	Amikacin	15-4000 µg/g	LC/MS/MS	≤ 11	≤ 13	15 µg/g	Validated assay

[a] An automated system (Abbott) that uses fluorescence polarization immunoassay technology.
LC/MS/MS = Liquid Chromatography with tandem Mass Spectrometry., CV = Coefficient of Variation., LLOQ = Lower Limit of Quantification., TK = Toxicokinetic.

2.6.4.3　吸収

2.6.4.3.1　ラットに Arikace™を吸入投与した後の PK 及び分布（2.6.5.3.1 項、AMIK-BRD-2007-04-PK、CTD 4.2.2.5-1）

本項では、ラットへの経口投与を実施した 1 試験及び吸入投与を行った複数の試験の結果を述べる。経口投与試験では、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。血清中には定量可能な濃度のアミカシンは検出されなかったが、投与後 24 時間までの尿中には低濃度ではあるが定量可能なアミカシンが確認された。本試験から、投与量の 0.002%～0.3%に相当するアミカシンが吸収されたと推定された。

吸入投与試験では、雌の Sprague-Dawley ラットに ALIS（75 mg/mL のアミカシン、脂質対アミカシン比は 0.6～0.7：1［w/w］）、遊離型アミカシン（FA：53 又は 75 mg/mL）又は遊離型トブラマイシン（FT：60 mg/mL）を、60 mg/kg の用量で鼻腔内にのみ単回吸入投与した。それぞれ、ALIS：80 分間、FA：96 又は 80 分間、及び FT：100 分間投与した。遊離型アミノグリコシド溶液は生理食塩水で調製した。血清、肺、腎臓、尿及び脳のサンプルを 1 週間まで断続的に採取し、アミノグリコシド濃度を TDx 法により測定した。AMIK-BIO-2009-24-PCLN 試験（CTD 4.2.2.5-2）及び AMI-BIO-2009-30-PCLN 試験（CTD 4.2.2.5-3）においても、同様の試験デザイン（ただし、ALIS の投与量は 90 mg/kg）で実施した（それぞれ、2.6.4.6.1 項及び 2.6.4.6.2 項）。

FT と比較して、ALIS 吸入投与後の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（$AUC_{0\text{-}48h}$）は約 5 倍大きかったが、腎臓における AUC はアミカシンと比較して FT で 2 倍以上大きかった。血清及び尿の AUC については、ALIS と FT との間に顕著な差は認められなかった。これらの結果を表 2.6.4-2 に示す。

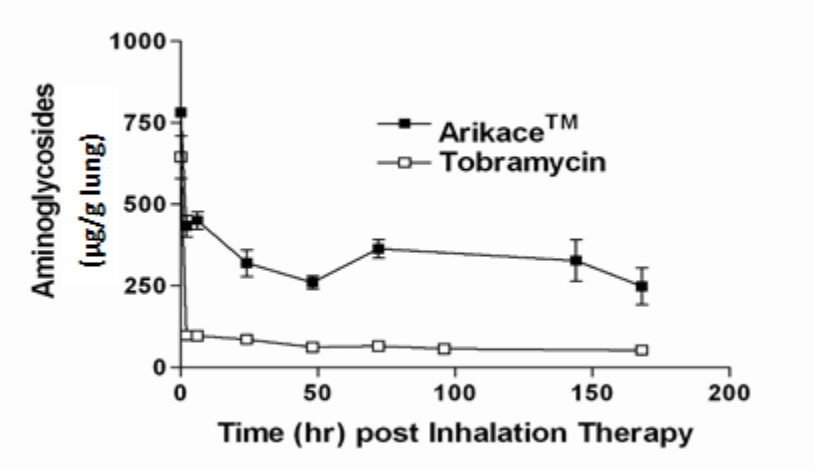
表 2.6.4-2　ラットに ALIS 及び FT を吸入投与した後の $AUC_{0\text{-}48h}$

Drug	AUC (μg･h/g or mL)			
	Lung	Serum	Kidney	Urine
ALIS (60 mg/kg)	56233	281	1883	3674
FT (60 mg/kg)	11504	198	4302	5408

AUC in μg•h/g for lung and kidney and μg•h/mL for serum or urine.

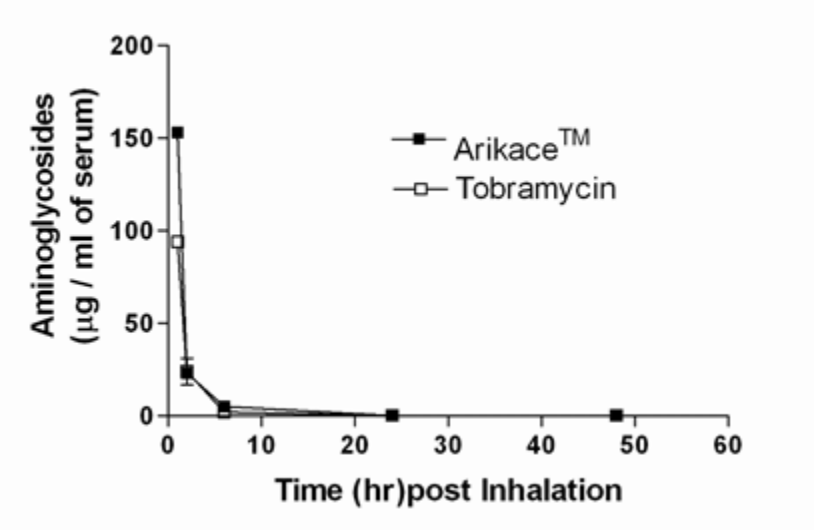
図 2.6.4-1 に示すように、肺中の濃度は、FT 投与後のトブラマイシン（125 μg/g 未満）と比較し、ALIS 投与後において高濃度のアミカシン（250 μg/g 超）が 150 時間にわたって持続的に検出された。したがって、ALIS の単回吸入投与により少なくとも 7 日間にわたってアミカシン濃度を維持することが可能である。FA（53 mg/mL、96 分間吸入）単回投与後の肺中濃度プロファイルは、ALIS 及び FT 投与後と類似しており、初期の速い消失及びその後に数日間続く、持続的な推移を示した。図 2.6.4-2 に示すように、血清中のアミノグリコシド濃度は、ALIS 及び FT ともに、肺中濃度よりもはるかに低かった。

図 2.6.4-1　ラットに ALIS 及び FT を単回吸入投与（60 mg/kg）した後の肺中 PK プロファイル



Symbols and bars represent mean and standard deviation of concentrations of aminoglycoside in the lung (n = 2, 0 h; n = 3, 2-168 h) at each sampling time.

図 2.6.4-2　ラットに ALIS 及び FT を単回吸入投与（60 mg/kg）した後の血清中 PK プロファイル



Symbols and bars represent the means and standard deviations of serum concentrations of each aminoglycoside (n = 3) at each time point.

肺中 PK プロファイルは、3 被験物質ともに肺からの消失が二相性を示した。遊離アミノグリコシド投与後の肺からの消失、並びに ALIS 投与後のアミカシンの消失を比較することにより、投与後 6 時間までのアミカシンの初期の速やかな消失は、噴霧された製剤中に存在する FA の消失によるものであり、その後の消失はリポソームから放出されたアミカシンの消失と関連していることが示唆された。

ALIS 投与後の肺中アミカシンの二相性の消失は、尿中でのアミカシンの検出とよく相関しており、その主要消失経路が糸球体濾過であることが示唆された。ラットに FA（75 mg/mL、80 分間吸入）投与後 6 時間に、肺からアミカシンの 84%が消失し、尿中に投与量の 86%が排泄された。一方、ALIS では、投与後 6 時間に投与量のわずか 43%が肺から消失し、39%が尿中に排泄された（すなわち、噴霧中に放出されたアミカシンの量に相当）。これらの結果を表 2.6.4-3 に示す。

表 2.6.4-3　ラットに ALIS 及び FA を吸入投与した後のアミカシンの回収量

Organ/Fluid	Amikacin from ALIS (µg)		FA (µg)	
	IPD	6 h PD	IPD	6 h PD
Lung	1029 ± 182	590 ± 59	800 ± 55	126 ± 34
Kidney	19 ± 7	44 ± 5	27 ± 1	54 ± 8
Serum	134 ± 31	37 ± 10	304 ± 188	15 ± 9
Urine	32 ± 37	399 ± 283	21 ± 13	688 ± 326
Brain	5 ± 3	3 ± 2	5 ± 2	4 ± 4

IPD = immediately post dosing and PD = post dosing.　All amikacin values are expressed as total µg/organ or fluid (n = 3).

また、本試験では、ALIS 及び FA 投与後の総回収率の 50%超が胃及び腸内容物に存在することが示された。経口投与後のアミノグリコシドは吸収されないため、これら胃腸内に存在するアミカシンが生物学的に重要な経路で全身的に再利用される可能は低いと考えられる。脳中アミカシン濃度が 5 µg 以下（検出限界付近）であったことから、どちらの製剤についてもアミカシンは血液脳関門を通過しなかったと考えられる。

投与後に得られた肺中濃度の結果を比較すると、ALIS を 80 分間投与したときの肺中アミカシン濃度は、FA 投与後の 2 倍以上であった。

結論として、ALIS を吸入投与したとき、アミカシンの肺からの消失は二相性を示した。肺からの初期の速やかな消失は、噴霧中に放出された FA の消失に起因し、その後の数日間にわたるより緩徐な消失は、ALIS から持続的に放出されたアミカシンの消失に起因するものと考えられた。ALIS の投与により、FA と比較して肺中アミカシン濃度をより高く維持することが可能であった。

2.6.4.4　分布

2.6.4.4.1　タンパク結合及び血球中への移行

アミカシンのヒト血清タンパクへの結合率は 3.6%と報告されており（Kirby, 1976）、ALIS を用いたタンパク結合に関する試験は実施しなかった。また、血清も含めて気道以外の組織への移行が限定的であるため（2.6.4.3.1 項、表 2.6.4-3）、ALIS を用いた血球中への移行に関する試験は実施しなかった。

2.6.4.4.2　胎盤通過試験

ヒトにアミカシンを静脈内投与したとき、アミカシンは胎盤を通過すると報告されており（Bernard, 1977）、ALIS を用いた胎盤通過性に関する試験は実施しなかった。

2.6.4.4.3　組織内分布：単回投与

2.6.4.4.3.1　ラットに Arikace™を吸入投与した後の PK 及び分布（2.6.5.3.1 項、AMIK-BRD-2007-04-PK、CTD 4.2.2.5-1）

2.6.4.3.1 項、表 2.6.4-3 に示すように、ラットに ALIS を吸入投与したとき、気道以外の組織（腎臓及び脳）への分布は限定的であった。

2.6.4.4.3.2　アミカシン-TAMRA 及びアミカシンを吸入投与した後の PK プロファイルの比較（2.6.5.5.1 項、AMIK-BIO-2009-25-PCLN、CTD 4.2.2.3-1）

本試験では、アミカシン-TAMRA（アミカシンの蛍光誘導体）の PK プロファイルが遊離アミカシン（FA）と十分に類似しているかどうかを評価するために、ラットにアミカシン-TAMRA 及び FA を吸入投与したときの肺沈着、保持及び消失を比較した。そして、アミカシンの分布及び消失を詳細に理解するために、その後の PK 試験にアミカシン-TAMRA が利用可能であるかどうかを確認した。評価パラメータは、体重及び肺重量（剖検時）、肺、血清及び尿中のアミカシン、アミカシン-TAMRA 及び遊離 TAMRA 濃度、並びに蛍光顕微鏡を用いた肺中のアミカシン-TAMRA 及び遊離 TAMRA の可視化とした。

各 12 匹の雌 CD®IGS ラットに 1%（w/w）アミカシン-TAMRA を含有する FA（90 mg/kg）又は 1%（w/w）遊離 TAMRA を含有する FA（90 mg/kg）を投与した。アミカシンとして 69.4 mg/mL を含有する製剤を、アミカシン-TAMRA を含有する FA 投与群では 84 分間、遊離 TAMRA を含有する FA 投与群では 87 分間投与した。未投与の 4 匹のラットを陰性対照群とした。吸入投与終了直後（IPD）並びに投与後 1、2 及び 4 時間に、各投与群から 3 匹のラット及び対照群から 1 匹のラットを二酸化炭素吸引により安楽死させた。血液、尿及び右肺葉を採取し、TDx 法により各試料中のアミカシン含量を測定した。必要に応じて、蛍光光度計又は蛍光プレートリーダーを用いて、各試料中のアミカシン-TAMRA 又は遊離 TAMRA 含量を測定した。蛍光顕微鏡を用いて、左肺組織切片中の TAMRA 由来の蛍光（アミカシン-TAMRA 又は遊離 TAMRA）を観察した。

一部の PK パラメータ（平均値）を表 2.6.4-4 に、肺中 PK プロファイルを図 2.6.4-3 及び図 2.6.4-4 に示す。TDx 法を用いて測定した場合、肺、血清及び尿中アミカシンの投与後 4 時間までの濃度-時間曲線下面積（$AUC_{0\text{-}4h}$）、$t_{1/2}$、最高濃度（C_{max}）及び最小濃度（C_{min}）は、いずれの投与群でも同程度であった。いずれの投与群でも 99%（w/w）のアミカシンを含有することから、これらのパラメータの類似性は予想されたが、これらの結果から、アミカシン-TAMRA 及び遊離

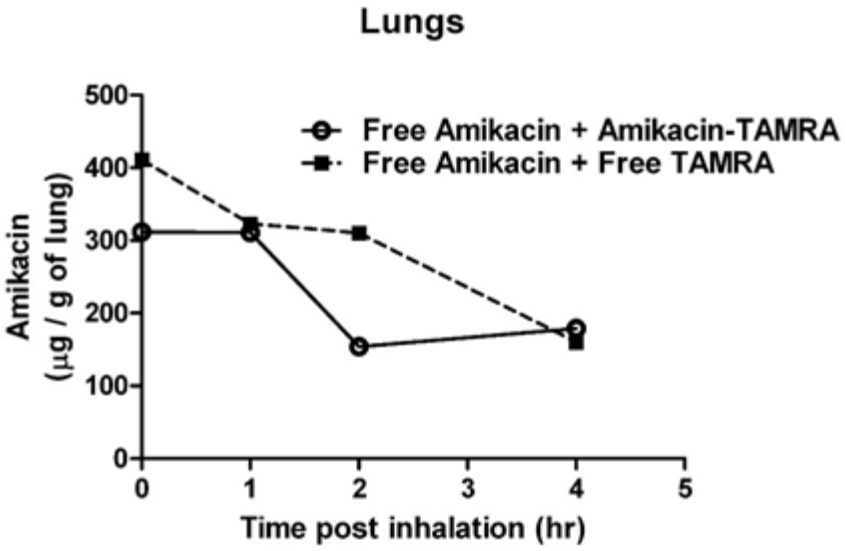
TAMRA が存在していてもアミカシンの PK プロファイルは変化しないことが示された。肺におけるアミカシン及びアミカシン-TAMRA の AUC/C_{max} 比は 2.8 で同様であった。これらの結果から、ラットに吸入投与後の肺、血清及び尿中のアミカシン-TAMRA 及びアミカシンの PK プロファイルが類似していることが示唆された。

蛍光法で測定した場合、肺におけるアミカシン-TAMRA の $AUC_{0\text{-}4h}$ 及び $t_{1/2}$（それぞれ 1309 nmol•h/kg 及び 4 時間）は、遊離 TAMRA の $AUC_{0\text{-}4h}$ 及び $t_{1/2}$（それぞれ 633 nmol•h/kg 及び 2 時間）の 2 倍大きかった。これと比較して、肺におけるアミカシン-TAMRA 及び遊離 TAMRA の C_{max} は類似していたが、遊離 TAMRA では C_{min} が低かった。以上、蛍光法で測定した結果から、同用量で投与したときの肺におけるアミカシン-TAMRA は、遊離 TAMRA と比較して保持時間が長く、消失が緩徐であることが示された。

表 2.6.4-4　ラットに 1%アミカシン-TAMRA 又は 1%遊離 TAMRA を含有する FA を吸入投与（90 mg/kg）した後のアミカシン、アミカシン-TAMRA 及び遊離 TAMRA の平均 PK パラメータ

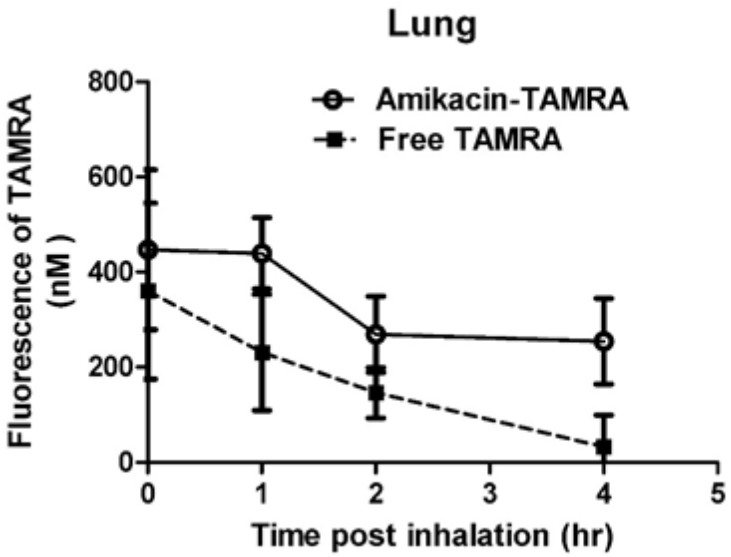
PARAMETER	TREATMENT	Amikacin as Determined by TDx			Amikacin-TAMRA or Free TAMRA as Determined by Fluorometry		
		Lung	Serum	Urine	Lung	Serum	Urine
$AUC_{0\text{-}4h}$ (µg•h/g or mL-TDx; nmol•h/kg or L-Fluorometry)	FA + Amikacin-TAMRA	877	92	809	1309	1148	4941
	FA + Free TAMRA	1154	102	917	633	633	16495
$t_{1/2}$ (h)	FA + Amikacin-TAMRA	4	3	1	4	3	2
	FA + Free TAMRA	3	2	1	2	1	1
C_{max} (µg/g or mL-TDx; nmol/kg or L-Fluorometry)	FA + Amikacin-TAMRA	312	40	270	448	330	3063
	FA + Free TAMRA	411	61	376	361	542	6372
C_{min} (µg/g or mL- TDx; nmol/kg or L-Fluorometry)	FA + Amikacin-TAMRA	154	11	70	254	123	501
	FA + Free TAMRA	160	6	70	32	33	1570

図 2.6.4-3　ラットに 1%アミカシン-TAMRA 又は 1%遊離 TAMRA を含有する FA を吸入投与（90 mg/kg）した後の肺中アミカシン濃度（μg/g）



The symbols (n = 3) represent the mean of the amikacin concentrations in lung homogenates from the right lung lobes of rats as determined by the TDx immunopolarization assay.

図 2.6.4-4　ラットに 1%アミカシン-TAMRA 又は 1%遊離 TAMRA を含有する FA を吸入投与（90 mg/kg）した後の肺中のアミカシン-TAMRA 及び遊離 TAMRA 濃度（nmol/kg）



The symbols and bars (n = 3) represent the means and standard deviations of the fluorescence of TAMRA in lung homogenates from the right lung lobes of rats (excitation at 550 nm and emission at 580 nm). Y axis should be nmol/kg.

アミカシン-TAMRA 又は遊離 TAMRA の存在を確認するために、各剖検時に採取した肺組織切片を蛍光顕微鏡で観察した。蛍光強度の経時的変化は、肺における PK データと一致し、遊離 TAMRA はアミカシン-TAMRA よりもはるかに速く肺から消失した。

以上、アミカシン-TAMRA の *in vivo* 安定性及び PK プロファイルが吸入投与後のアミカシンと

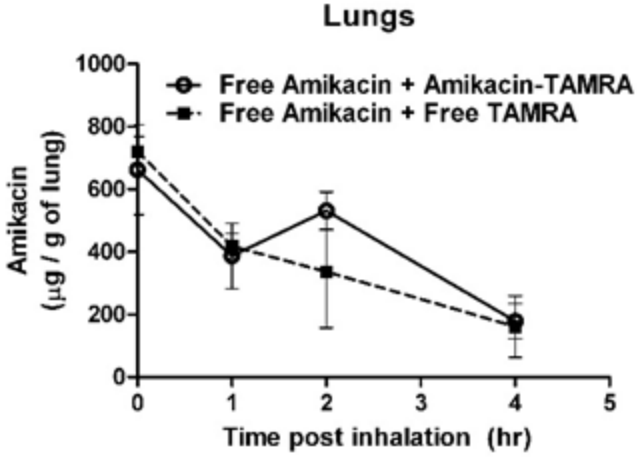
十分に類似しており、組織内分布試験においてアミカシン-TAMRA を ALIS のアミカシン標識体として使用することが可能であることが確認された。

2.6.4.4.3.3　アミカシン-TAMRA 及びアミカシンを吸入投与した後の PK プロファイルの比較（2.6.5.5.2 項、AMIK-BIO-2009-27-PCLN、CTD 4.2.2.3-2）

ラットを用いた本試験のデザインは、AMIK-BIO-2009-25-PCLN 試験と同様であった（2.6.4.4.3.2 項）。アミカシン-TAMRA（アミカシンの蛍光誘導体）の PK プロファイルがアミカシンと十分に類似しているかどうかを評価するために、アミカシン-TAMRA 及び遊離アミカシン（FA）を吸入投与したときの組織内分布及び PK を比較した。そして、ALIS 投与後のアミカシンの分布及び消失を詳細に検討するために、その後の試験にアミカシン-TAMRA が利用可能であるかどうかを確認した。各 12 匹の雌 CD®IGS ラットに 1%（w/w）アミカシン-TAMRA を含有する FA（90 mg/kg）又は 1%（w/w）遊離 TAMRA を含有する FA（90 mg/kg）を投与した。アミカシンとして 69.4 mg/mL を含有する FA 製剤を 129 分間投与した。吸入投与終了直後（IPD）及び投与後 1、2 及び 4 時間に、各投与群から 3 匹のラットを剖検した。血液、尿及び右肺葉を採取し、TDx 法により各試料中のアミカシン含量を測定した。必要に応じて、蛍光光度計又は蛍光プレートリーダーを用いて、各試料中のアミカシン-TAMRA 又は遊離 TAMRA 含量を測定した。蛍光顕微鏡を用いて、左肺組織切片中の TAMRA 由来の蛍光（アミカシン-TAMRA 又は遊離 TAMRA）を観察した。

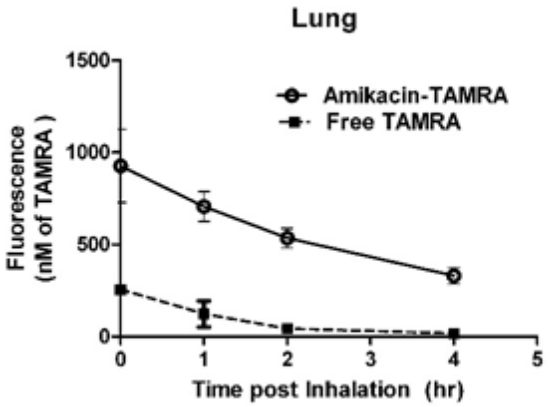
アミカシン-TAMRA を含有する FA 又は遊離 TAMRA を含有する FA を投与したときの肺中アミカシンの濃度-時間プロファイルを図 2.6.4-5 に示す。また、対応するアミカシン-TAMRA 及び遊離 TAMRA の肺中濃度-時間プロファイルを図 2.6.4-6 に示す。

図 2.6.4-5　ラットに 1%アミカシン-TAMRA 又は 1%遊離 TAMRA を含有する FA を吸入投与（90 mg/kg）した後の肺中アミカシン濃度（μg/g）



The symbols and bars (n = 3) represent means and standard deviations of amikacin concentrations in right lung lobe homogenates as determined using the TDx immunopolarization assay.

図 2.6.4-6　ラットに 1%アミカシン-TAMRA 又は 1%遊離 TAMRA を含有する FA を吸入投与（90 mg/kg）した後の肺中のアミカシン-TAMRA 及び遊離 TAMRA 濃度（nmol/kg ）

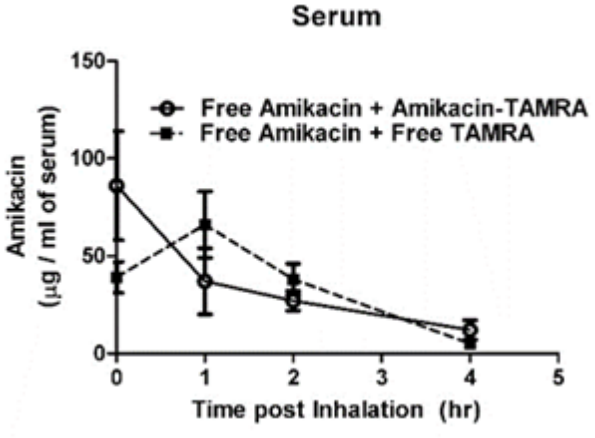


The symbols and bars (n = 3) represent means and standard deviations of the fluorescence of TAMRA in right lung lobe homogenates as determined using a fluorometric assay (excitation at 550 nm and emission at 580 nm). Y axis should be nmol/kg.

全体的に、FA の噴霧液中にアミカシン-TAMRA が存在しても、アミカシンの肺沈着及び消失は影響を受けないと考えられた。

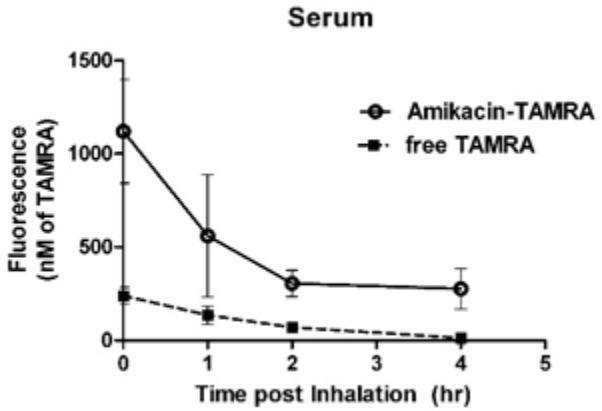
血清及び尿中のアミカシン、遊離 TAMRA 及びアミカシン-TAMRA の濃度-時間プロファイルを図 2.6.4-7、図 2.6.4-8、図 2.6.4-9 及び図 2.6.4-10 に示す。肺と同様に、全体的な結果から、FA の噴霧液中にアミカシン-TAMRA が存在しても、アミカシンの消失は影響を受けないと考えられた。肺及び血清中では、遊離 TAMRA 濃度は結合型 TAMRA（アミカシン-TAMRA）濃度よりも低く、遊離 TAMRA の方が結合型 TAMRA よりも速やかに消失することが示された。

図 2.6.4-7　ラットに 1%アミカシン-TAMRA 又は 1%遊離 TAMRA を含有する FA を吸入投与（90 mg/kg）した後の血清中アミカシン濃度（μg/mL）



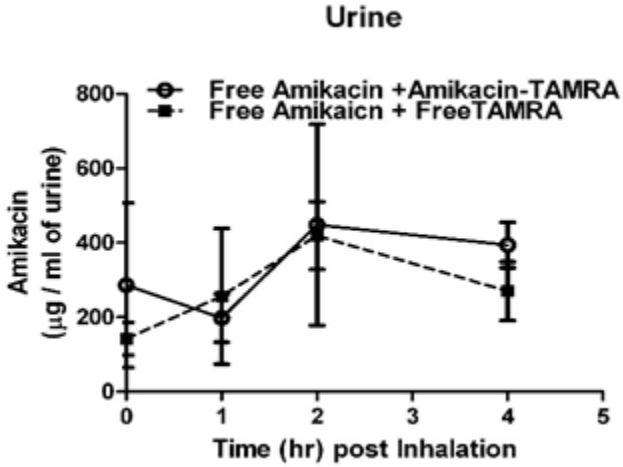
The symbols and bars (n = 3) represent means and standard deviations of amikacin concentrations in serum as determined using the TDx immunopolarization assay.

図 2.6.4-8　ラットに 1%アミカシン-TAMRA 又は 1%遊離 TAMRA を含有する FA を吸入投与（90 mg/kg）した後の血清中のアミカシン-TAMRA 及び遊離 TAMRA 濃度（nM）



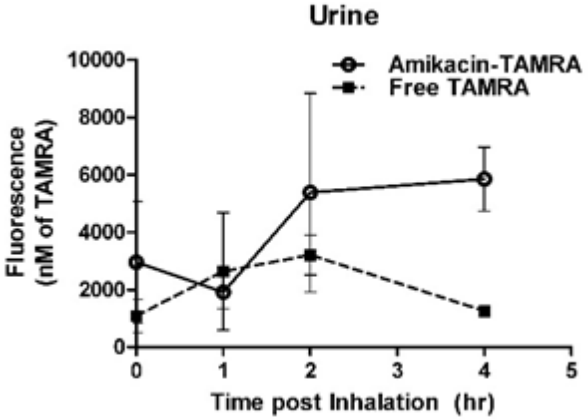
The symbols and bars (n = 3) represent means and standard deviations of the fluorescence of TAMRA in serum as determined using a fluorometric assay (excitation at 550 nm and emission at 580 nm).

図 2.6.4-9　ラットに 1%アミカシン-TAMRA 又は 1%遊離 TAMRA を含有する FA を吸入投与（90 mg/kg）した後の尿中アミカシン濃度（μg/mL）



The symbols and bars (n = 3) represent means and standard deviations of amikacin concentrations in urine as determined using the TDx immunopolarization assay.

図 2.6.4-10　ラットに 1%アミカシン-TAMRA 又は 1%遊離 TAMRA を含有する FA を吸入投与（90 mg/kg）した後の尿中のアミカシン-TAMRA 及び遊離 TAMRA 濃度（nM）



The symbols and bars (n = 3) represent means and standard deviations of the fluorescence of TAMRA in urine as determined using a fluorometric assay (excitation at 550 nm and emission at 580 nm).

右肺葉の定量分析に加えて、各剖検時の左肺組織切片中の遊離 TAMRA 又はアミカシン-TAMRA 由来の TAMRA の存在を、蛍光顕微鏡を用いて評価した。非固定組織での蛍光強度は、1%遊離 TAMRA を含有するアミカシンを投与したときと比較して、1%アミカシン-TAMRA を投与したラットにおいてはるかに強かった。さらに、固定組織では、1%遊離 TAMRA 投与群では蛍光は観察されなかったが、1%アミカシン-TAMRA 投与群では明るい蛍光が観察された。これらの結果は、遊離 TAMRA がアミカシン-TAMRA よりも容易に肺から消失するという点で、肺中の PK プロファイルと一致していた。

以上、この試験の結果から、アミカシン-TAMRA は、ALIS を用いる以後の PK 試験においてアミカシンのトレーサーとして使用可能であることが示された。

2.6.4.4.3.4　ラットに $DiIC_{18}(5)(DS)$リポソームを吸入投与した後の肺組織内分布（2.6.5.5.3 項、AMIK-BIO-2009-26-PCLN、CTD 4.2.2.3-3）

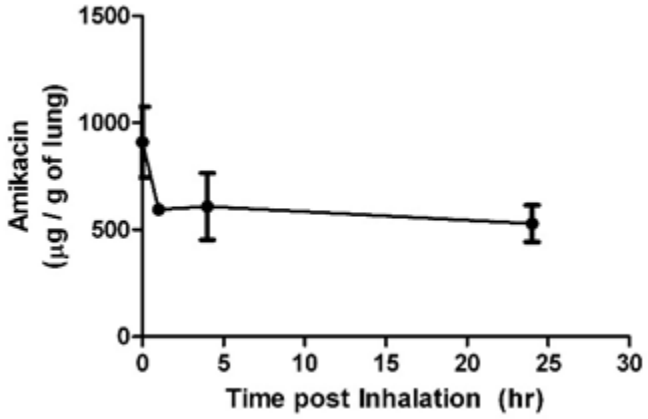
本試験では、以後の試験で肺における ALIS の分布及び消失を評価するときに $DiIC_{18}(5)DS$ 標識リポソームが適しているかどうかを判断するため、ラットに蛍光標識 ALIS を単回吸入投与後 24 時間まで、$DiIC_{18}(5)DS$ 標識リポソームの分布を評価した。12 匹の雌 CD®IGS ラットに、ALIS 中の総脂質量に対して約 0.5 mol%の $DiIC_{18}(5)DS$ で蛍光標識した ALIS（約 70 mg/mL）を 90 mg/kg の用量で 200 分間単回投与した。別のラット 4 匹を対照群とした。投与群の 3 匹及び対照群の 1 匹のラットを、投与終了直後（IPD）並びに投与後 1、4 及び 24 時間に安楽死させ、剖検時に全てのラットの肺を採取した。

剖検時に血液及び尿を同時に採取し、各試料中のアミカシン濃度を TDx 法により測定した。肺ホモジネート中のアミカシン濃度は TDx 法により、$DiIC_{18}(5)DS$ 濃度は蛍光光度法により測定した。剖検時に体重及び肺重量を測定し、蛍光顕微鏡により肺における $DiIC_{18}(5)DS$ 標識リポソームの分布を評価した。

図 2.6.4-11 に示す肺中濃度の経時的推移から、肺中のアミカシン濃度は IPD から投与後 4 時間までの間に速やかに減少することが示された。しかし、投与後 4 時間には、肺中のアミカシン濃

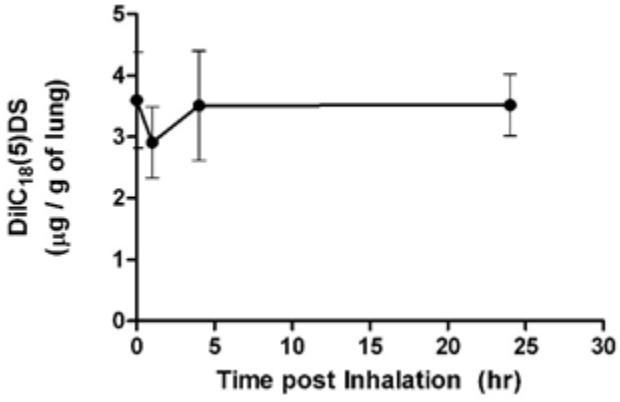
度は定常状態に達し、以後 24 時間までほぼ一定の濃度を維持した。投与終了後の早い時間で、アミカシンが肺から速やかに消失したことは、噴霧中にリポソームから放出されたアミカシンの消失に起因している可能性があるが、それ以後の時間における肺中のアミカシンの保持は、肺胞マクロファージによる ALIS リポソームの取り込みによる結果である可能性が高い。この PK プロファイルは、ラットに ALIS を吸入投与したときの肺からのアミカシンの消失の典型的なプロファイルである。図 2.6.4-12 に示すように、肺中 $DiIC_{18}(5)DS$ 濃度は、投与終了後の期間中は本質的に変化しなかった。

図 2.6.4-11　ラットに 0.5 mol% $DiIC_{18}(5)DS$ を含有する ALIS を吸入投与（90 mg/kg）した後の肺中アミカシン濃度（μg/g）



The symbols and bars (n = 3) represent means and standard deviations of amikacin concentrations in right lung lobe homogenates as determined using the TDx immunopolarization assay.

図 2.6.4-12　ラットに 0.5 mol% $DiIC_{18}(5)DS$ を含有する ALIS を吸入投与（90 mg/kg）した後の肺中 $DiIC_{18}(5)DS$ 濃度（μg/g）



The symbols and bars (n = 3) represent means and standard deviations of the concentration of $DiIC_{18}(5)DS$ in homogenates from right lung lobes.

血清及び尿中のアミカシン濃度は同様の経時的推移を示し、アミカシン濃度は投与後数時間以内に最高濃度に達し、投与後 24 時間には定量下限近くまで低下した。

肺組織切片の顕微鏡評価では、リポソームが肺全体に沈着していることが示された。初期には

気道内及びその周囲に、その後は気道周辺のマクロファージ内及び肺胞腔内に観察された。投与後 24 時間までに標識されたリポソームはほとんど消失しなかった。

結論として、ALIS の単回吸入投与により、肺全体にわたってリポソームの均一な沈着が認められた。肺からのリポソーム（脂質）の消失は、投与後 24 時間内で最小限であった。

2.6.4.4.3.5　ラットに $DiIC_{18}(5)DS$ リポソームを吸入投与した後の肺組織内分布（2.6.5.5.4 項、AMIK-BIO-2009-28-PCLN、CTD 4.2.2.3-4）

本試験では、以後の試験において肺における ALIS の分布及び消失を評価するときに $DiIC_{18}(5)DS$ 標識リポソームが適しているかどうかを判断するため、ラットに単回吸入投与後 28 日まで、$DiIC_{18}(5)DS$ 標識リポソームの肺内分布及び消失を評価した。24 匹の雌 CD®IGS ラットに、$DiIC_{18}(5)DS$ 標識リポソーム（すなわち、0.1% [w/w]ジパルミトイルホスファチジルコリン［DPPC］及び 0.1% [w/w]コレステロールを 0.2% [w/w] $DiIC_{18}(DS)$で置き換えたもの）を含有する ALIS（アミカシンとして約 70 mg/mL）を 90 mg/kg の用量で 90 分間単回投与した。別のラット 4 匹を対照群とした。投与群のラット各 3 匹を、投与終了直後（IPD）並びに投与後 4、24、72、168、336、504 及び 672 時間に安楽死させた。対照群のラット各 1 匹を、投与後 24、72、336 及び 672 時間に安楽死させた。剖検時に全ラットの肺を採取した。各剖検時に血液及び尿を同時に採取し、各試料中のアミカシン濃度を TDx 法により測定した。右肺ホモジネート中のアミカシン濃度を TDx 法により、$DiIC_{18}(5)DS$ 含量を蛍光光度法により測定した。剖検時に体重及び肺重量を測定し、左肺組織切片中の $DiIC_{18}(5)DS$ 標識リポソームの分布を、蛍光顕微鏡を用いて評価した。

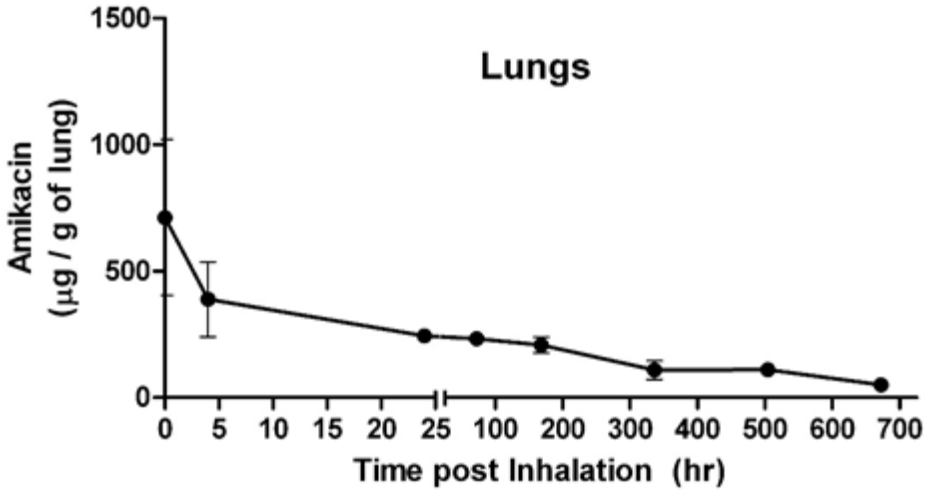
肺、血清及び尿中アミカシンの PK パラメータを表 2.6.4-5 に、肺中アミカシンの濃度の経時的推移を図 2.6.4-13 に示す。

表 2.6.4-5　ラットに 0.2% (w/w) $DiIC_{18}(5)DS$ を含有する ALIS を吸入投与（90 mg/kg）した後の肺、血清及び尿中アミカシンの PK パラメータ

Parameter	Lung	Serum	Urine
$AUC_{0\text{-}24h}$ (µg•h/g or mL)	8532	89	2531
$AUC_{0\text{-}672h}$ (µg•h/g or mL)	99696	89	2579
$t_{1/2}$ β (h)	420	ISD	ISD
C_{max} (µg/g or mL)	712	36	205
C_{min} (µg/g or mL)	54	0	0

ISD = insufficient data to calculate parameter. AUC in µg•h/g for lung and µg•h/mL for serum or urine.　C_{max} in µg/g for lung and µg/mL for serum or urine.

図 2.6.4-13　ラットに 0.2% (w/w) $DiIC_{18}(5)DS$ を含有する ALIS を吸入投与（90 mg/kg）した後の肺中アミカシン濃度（μg/g）

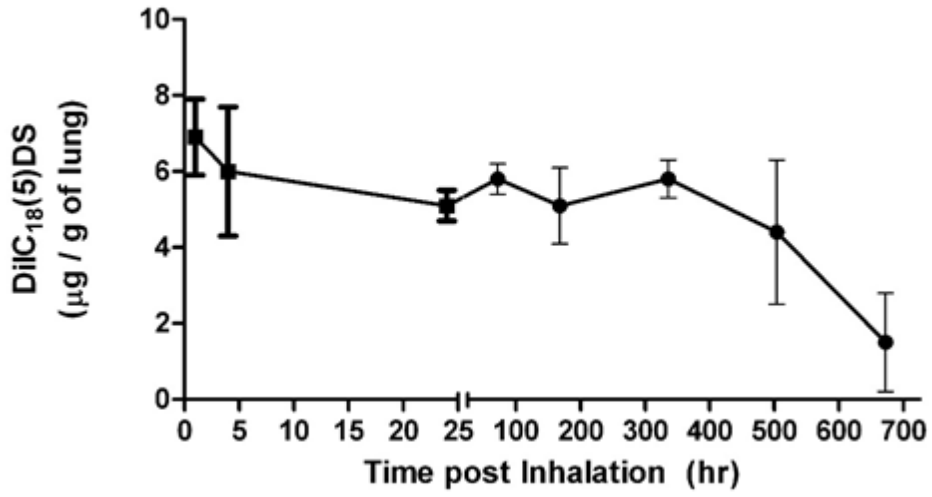


The symbols and bars (n = 3) represent the means and standard deviations of the concentration of amikacin in right lung homogenates.

前述のように、肺からのアミカシンの消失は二相性を示した。投与後 4 時間には、IPD の 45%に相当するアミカシンが肺から消失した。この消失した部分は、噴霧中にリポソームから放出されたアミカシンに相当する部分と考えられる。肺に沈着した残りの 55%は、肺からより緩徐に消失し、その消失速度は約 0.3 μg/g 肺組織/h であった。この部分のアミカシンは、おそらくマクロファージによってその内部に取り込まれた ALIS リポソームから放出された遊離のアミカシンに相当する部分と考えられる。血清及び尿中のアミカシン濃度は、肺からのアミカシンの二相性の消失と一致し、IPD から投与後 4 時間にかけて、血清中濃度は速やかに低下し、尿中濃度の上昇が確認された。

図 2.6.4-14 に示すように、$DiIC_{18}(5)DS$ は、アミカシンと比較して、肺からより緩徐に消失した。投与後 28 日には、アミカシンが IPD の 93%に相当する部分が消失したのに対し、$DiIC_{18}(5)DS$ は IPD の約 64%に相当する部分が肺から消失した。$DiIC_{18}(5)DS$ の消失速度は、0.001 μg/g 肺組織/h 未満であった。

図 2.6.4-14　ラットに 0.2% (w/w) DiIC$_{18}$(5)DS を含有する ALIS を吸入投与（90 mg/kg）した後の肺中 DiIC$_{18}$(5)DS 濃度（μg/g）



The symbols and bars (n = 3) represent means and standard deviations of the concentration of DiIC$_{18}$(5)DS in homogenates from right lung lobes.

IPD における DiIC$_{18}$(5)DS の蛍光は、主に気道及び肺胞腔など左葉全体に均等に分布していた。投与後 4 時間から 28 日まで、左葉における DiIC$_{18}$(5)DS の蛍光は主に細胞内及び間質に分布し、蛍光強度の明らかな減少は認められなかった。しかし、蛍光の面積は、DiIC$_{18}$(5)DS の肺からの消失と並行して、投与後 14 日から 28 日までに減少し始めた。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、脂質の標識体である DiIC$_{18}$(5)DS の肺中保持時間は、ALIS 吸入投与後の肺における 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はあるが、DiIC$_{18}$(5)DS の挙動は肺胞マクロファージによるリポソームの初期沈着化及び内在化を表している。

以上、DiIC$_{18}$(5)DS を用いたリポソームの標識化は、非標識 ALIS を用いた試験（AMIK-BIO-2009-24-PCLN 試験：2.6.4.6.1 項）と同様な結果を示したため、リポソームの標識化によりアミカシンの PK が変化することはなかった。DiIC$_{18}$(5)DS で標識したリポソームは、IPD において小気管及び大気道の周辺に観察され、投与後 4 時間には肺全体に観察された。IPD では、DiIC$_{18}$(5)DS の蛍光の大部分は細胞内（マクロファージ内）に存在し、投与後 28 日まで細胞内にとどまった。血清及び尿中に DiIC$_{18}$(5)DS の蛍光は検出されず、これは肺からの DiIC$_{18}$(5)DS の緩徐な消失と一致するものであった。

2.6.4.4.3.6　ラットに蛍光脂質 DiIC$_{18}$(5)DS を吸入投与した後の肺組織内分布（2.6.5.5.5 項、AMIK-BIO-2009-31-PCLN、CTD 4.2.2.3-5）

本試験では、ラットに 1.5%塩化ナトリウム（NaCl）を投与媒体として 70 μmol/L の遊離 DiIC$_{18}$(5)DS（0.115 mg/kg）を 150 分間単回吸入投与したときの組織内分布を評価し、肺からの DiIC$_{18}$(5)DS の消失がアミカシンと比較して遅い理由を検討した。投与方法は、DiIC$_{18}$(5)DS 標識した ALIS の単回吸入投与後の沈着、保持及び消失を検討した試験（AMIK-BIO-2009-28-PCLN 試験、2.6.4.4.3.5 項）と同じ曝露量を達成できる量とした。見かけ上「遊離」の DiIC$_{18}$(5)DS の溶液

は、ミセル溶液であることが確認されたが、各パラメータはそのまま評価した。AMIK-BIO-2009-28-PCLN 試験の結果との比較も一部実施した。

各 3 匹の雌 CD®IGS ラットを、吸入投与終了直後（IPD）、投与後 4 時間、1、3、7、14、21 及び 28 日に安楽死させた。追加のラット 4 匹を対照群とし、各 1 匹を IPD、投与後 3、14 及び 28 日に剖検した。各剖検時に、肺、血清及び尿を採取し、蛍光光度計を用いて各試料中の $DiIC_{18}(5)DS$ 含量を測定した。さらに、右肺後葉中の $DiIC_{18}(5)DS$ の存在を蛍光顕微鏡で評価した。

表 2.6.4-6 に示すように、肺における $DiIC_{18}(5)DS$（ミセル）及び $DiIC_{18}(5)DS$ 標識 ALIS リポソームの PK パラメータは類似していたが、消失プロファイルは異なっていた。肺中 $DiIC_{18}(5)DS$ 濃度は、ミセル吸入投与後 7 日までにかなり消失したが（約 50%）、$DiIC_{18}(5)DS$ 標識 ALIS リポソーム吸入投与後の $DiIC_{18}(5)DS$ 濃度の実質的な低下は、投与後 28 日においてのみ確認された（78%に低下）。これらの結果から、ラットの肺では $DiIC_{18}(5)DS$ ミセルは $DiIC_{18}(5)DS$ 標識 ALIS リポソームとは異なる方法で消失することが示唆された。

表 2.6.4-6　$DiIC_{18}(5)DS$ ミセル及び $DiIC_{18}(5)DS$ 標識 ALIS リポソームの肺における PK パラメータの比較

PK Parameters	Micellar $DiIC_{18}(5)DS$	$DiIC_{18}(5)DS$-labeled ALIS
$AUC_{0\text{-}24h}$ (µg･h/g of lung)	120	137
$AUC_{0\text{-}672h}$ (µg･h/g of lung)	2275	3190
C_{max} (µg/g of lung)	6.0	6.9
C_{min} (µg/g of lung)	2.5	1.5
Ratio ($AUC_{0\text{-}24h}/C_{max}$)	20	20
Ratio ($AUC_{0\text{-}672h}/C_{max}$)	379	462

また、アミカシン及び ALIS と同様に、$DiIC_{18}(5)DS$ ミセルは肺全体に均等に分布し、肺から一様に消失することも示された。

以上、$DiIC_{18}(5)DS$ ミセルを単回吸入投与することにより、肺全体にミセルが均一に沈着することが、その蛍光から確認された。肺からの $DiIC_{18}(5)DS$ ミセルの消失は、$DiIC_{18}(5)DS$ 標識した ALIS の消失よりも速かった。

2.6.4.4.3.7　ラットに Arikace™を吸入投与した後のリポソーム脂質及びアミカシンの肺組織内分布（2.6.5.5.6 項、AMIK-BIO-2009-29-PCLN、CTD 4.2.2.3-6）

本試験では、ラットに二重蛍光標識した ALIS（アミカシン-TAMRA 及び $DiIC_{18}(5)DS$ 含有）を 90 mg/kg の用量で単回吸入（70 mg/mL を 93 分間）投与したときの投与後 24 時間までの肺におけるアミカシン及びリポソームの組織内分布及び保持を評価した。

12 匹の雌 CD®IGS ラットに、二重蛍光標識した ALIS を 90 mg/kg の用量で単回吸入投与した。二重蛍光標識した ALIS は、リン脂質二重層膜中に 0.2% (w/w) $DiIC_{18}(5)DS$ を含有し、約 0.2% (w/w) アミカシン-TAMRA をアミカシンと共にリポソーム内に封入したものである。投与終了直後（IPD）及び投与後 2、4 及び 24 時間に、各 3 匹のラットを安楽死させ、肺、血清及び尿試料を採取した。別の 2 匹のラットには投与せず（対照群）、1 匹を IPD に、もう 1 匹を投与後 24 時間に安楽死させた。

TDx 法により、右肺、血清及び尿中のアミカシン濃度を測定した。左肺の組織切片を蛍光顕微鏡で検査し、アミカシン-TAMRA 及び $DiIC_{18}(5)DS$ の組織／細胞内分布を評価した。

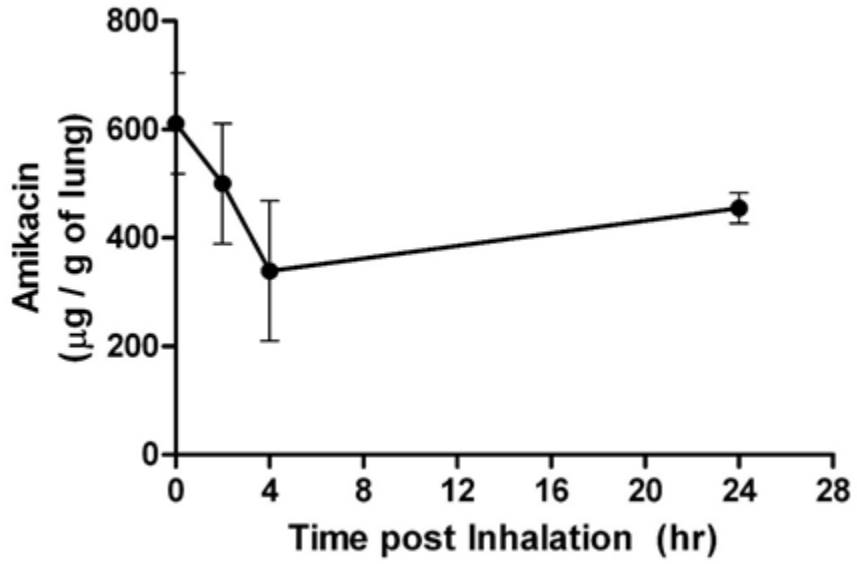
肺、血清及び尿中アミカシンの PK パラメータを表 2.6.4-7 に、アミカシンの平均肺中濃度の経時的推移を図 2.6.4-15 に示す。

表 2.6.4-7　ラットに 0.2% (w/w)アミカシン-TAMRA 及び $DiIC_{18}(5)DS$ を含有する ALIS を吸入投与（90 mg/kg）した後の肺、血清及び尿中アミカシンの PK パラメータ

Parameter	Lung	Serum	Urine
$AUC_{0\text{-}24h}$ (μg･h/g or mL)	10015	131	4049
$t_{1/2}$ α (h)	5	ISD	ISD
C_{max} (μg/g or mL)	609	43	322
C_{min} (μg/g or mL)	339	0	2

ISD = insufficient data to calculate parameter. AUC in μg•h/g for lung and μg•h/mL for serum or urine. C_{max} and C_{min} in μg/g for lung and μg/mL for serum or urine.

図 2.6.4-15　ラットに 0.2% (w/w)アミカシン-TAMRA 及び $DiIC_{18}(5)DS$ を含有する ALIS を吸入投与（90 mg/kg）した後の肺中アミカシン濃度（μg/g）

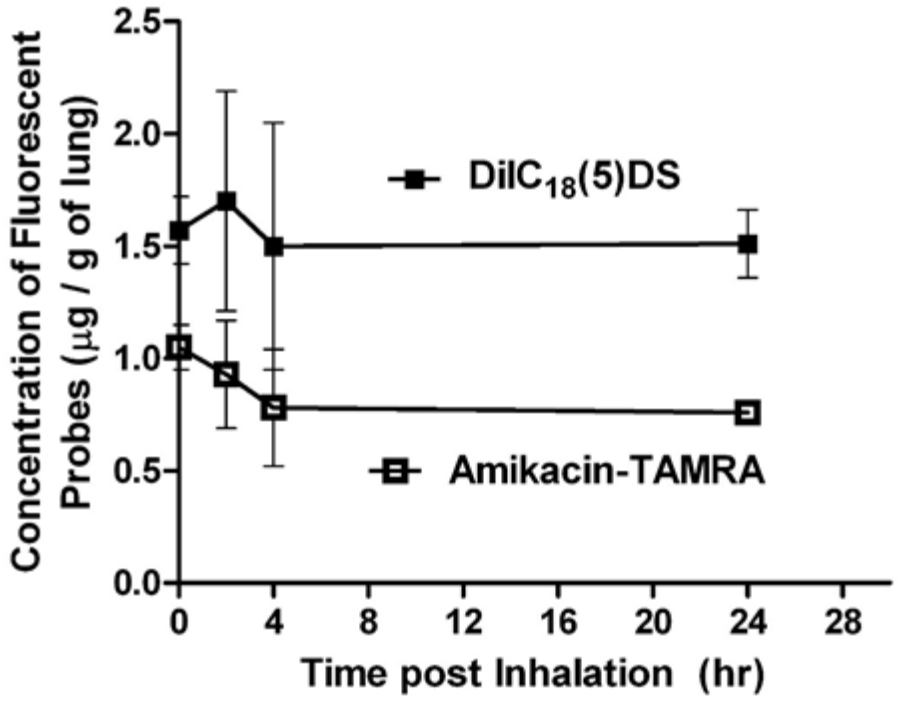


The symbols and bars (n = 3) represent means and standard deviations of the concentration of amikacin in right lung homogenates.

上述したように、肺からのアミカシンの消失は二相性を示した。投与後 24 時間では、IPD に検出された総アミカシンの 44%が肺から消失した。この消失した部分は、噴霧中にリポソームから放出されたアミカシンに相当する部分と考えられる。血清及び尿中アミカシン濃度は、肺からのアミカシンの二相性の消失と一致し、IPD から投与後 4 時間にかけて、血清中濃度は速やかに減少し、尿中濃度は上昇した。

投与後 24 時間までのアミカシン-TAMRA 及び $DiIC_{18}(5)DS$ の平均濃度の経時的推移を図 2.6.4-16 に示す。

図 2.6.4-16　ラットに 0.2% (w/w)アミカシン-TAMRA 及び DiIC$_{18}$(5)DS を含有する ALIS を吸入投与（90 mg/kg）した後の肺中アミカシン-TAMRA 及び DiIC$_{18}$(5)DS 濃度（μg/g）



The symbols and bars (n = 3) represent means and standard deviations of the fluorescent probe concentrations.

投与後 24 時間では、IPD に検出されたアミカシン-TAMRA の総濃度の 29%が肺から消失した。対照的に、DiIC$_{18}$(5)DS については、総濃度のわずか 4%がこの期間中に消失した。血清及び尿中のアミカシン-TAMRA 濃度プロファイルは、非標識アミカシンのプロファイルと一致した。血清及び尿中には DiIC$_{18}$(5)DS は検出されず、投与後 24 時間までに DiIC$_{18}$(5)DS が肺からほとんど消失しなかったことを反映していた。

二重蛍光標識した ALIS の吸入投与により、左肺のパノラマ蛍光画像で観察された肺深部も含め、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確認された。投与後 24 時間までの蛍光顕微鏡観察により、リポソーム内の DiIC$_{18}$(5)DS は、主に肺胞腔及び肺実質内のマクロファージ内に取り込まれていることが明らかとなった。DiIC$_{18}$(5)DS の蛍光と比較すると、アミカシン-TAMRA の蛍光はより拡散しており、リポソーム又はマクロファージからアミカシン-TAMRA が放出されたことが示唆された。アミカシン-TAMRA の蛍光は DiIC$_{18}$(5)DS の蛍光と共局在化していた。肺中のアミカシン及びアミカシン-TAMRA の濃度は、沈着及び保持に関して互いに平行関係にあった。

以上、二重蛍光標識した ALIS を 90 mg/kg の用量で投与したとき、アミカシン及びリポソームが肺に均一に沈着することが明らかとなった。

2.6.4.4.3.8　ラットに Arikace™を吸入投与した後のリポソーム脂質及びアミカシンの肺組織内分布（2.6.5.5.7 項、AMIK-BIO-2009-32-PCLN、CTD 4.2.2.3-7）

本試験では、ラットに二重蛍光標識した ALIS（アミカシン-TAMRA 及び DiIC$_{18}$(5)DS 含有）を

90 mg/kg の用量で単回吸入（70 mg/mL を 98 分間）投与したときの、投与後 28 日までの肺における沈着、保時及び消失を評価した。

24 匹の雌 CD®IGS ラットに ALIS を 90 mg/kg の用量で単回吸入投与した。被験物質の構成比率は、二重蛍光標識 ALIS 及び ALIS の比として 1：4 であった。調製された最終投与液は、リン脂質二重層膜中に 0.2% (w/w) $DiIC_{18}(5)DS$ 及び約 0.2% (w/w)アミカシン-TAMRA を含有していた。投与終了直後（IPD）、投与後 4、24 時間、3、7、14、21 及び 28 日に、それぞれ 3 匹のラットを安楽死させ、肺、血清及び尿試料を採取した。別の 4 匹のラットには投与せず（対照群）、各 1 匹を IPD、投与後 3、14 及び 28 日に安楽死させた。

肺、血清及び尿中のアミカシン濃度を TDx 法により、$DiIC_{18}(5)DS$ 及びアミカシン-TAMRA の濃度を蛍光法により定量した。肺後葉を蛍光顕微鏡で観察し、アミカシン-TAMRA 及び $DiIC_{18}(5)DS$ に由来する蛍光の組織／細胞内分布を評価した。

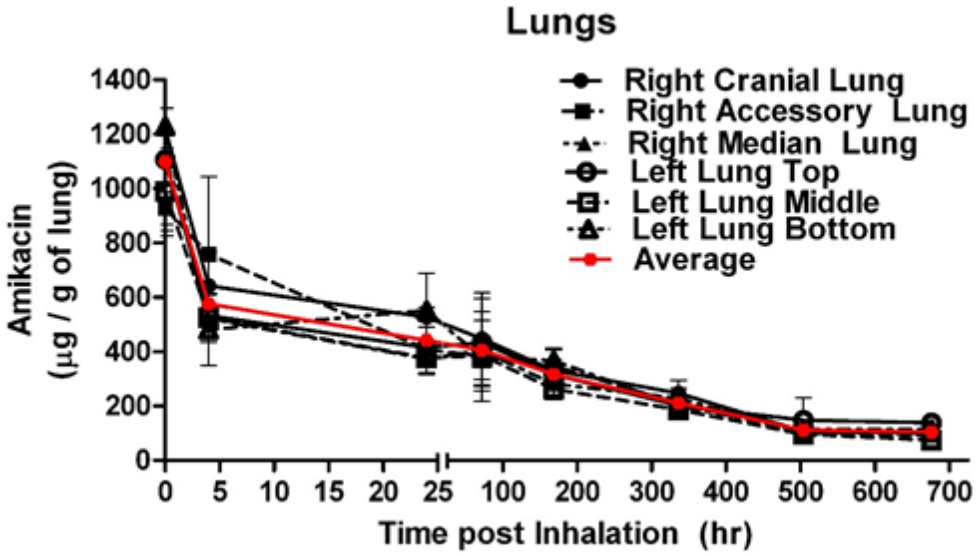
肺、血清及び尿中アミカシンの PK パラメータを表 2.6.4-8 に示す。各右肺葉及び左肺組織切片中の平均アミカシン濃度の経時的推移を図 2.6.4-17 に示す。表 2.6.4-8 に示すパラメータは、図 2.6.4-17 の平均濃度から算出した。

表 2.6.4-8　ラットに 0.2% (w/w)アミカシン-TAMRA 及び $DiIC_{18}(5)DS$ を含有する ALIS を吸入投与（90 mg/kg）した後の肺、血清及び尿中アミカシンの PK パラメータ

Parameter	Lung	Serum	Urine
$AUC_{0\text{-}24h}$ (μg･h/g or mL)	13530	200	3582
$AUC_{0\text{-}672h}$ (μg･h/g or mL)	157974	200	3750
$t_{1/2}$ β (h)	~375	ISD	ISD
C_{max} (μg/g or mL)	1108	46	286
C_{min} (μg/g or mL)	97	0	0

ISD = insufficient data to calculate parameter. AUC in μg•h/g for lung and μg•h/mL for serum or urine. C_{max} and C_{min} in μg/g for lung and μg/mL for serum or urine.

図 2.6.4-17　ラットに 0.2% (w/w)アミカシン-TAMRA 及び $DiIC_{18}(5)DS$ を含有する ALIS を吸入投与（90 mg/kg）した後の右肺葉及び左肺組織中のアミカシン濃度（μg/g）



The symbols and bars (n = 3) represent means and standard deviations of the concentration of amikacin in each lobe/section.

これらの結果は、AMIK-BIO-2009-29-PCLN 試験（2.6.4.4.3.7 項）の結果と一致し、以下のことが示された。IPD における各肺葉及び肺切片に沈着したアミカシンの平均量は、肺組織 1 g あたり 1.10 mg であった。ALIS は肺全体に均一に分布し、すべての部位から同じ速度で同程度に消失した。肺からの消失は二相性であった。急速に消失したアミカシンは、噴霧中に放出されたアミカシンに相当し、残りの緩徐に消失したアミカシンは肺マクロファージによって貪食されたアミカシンを表している可能性が高い。

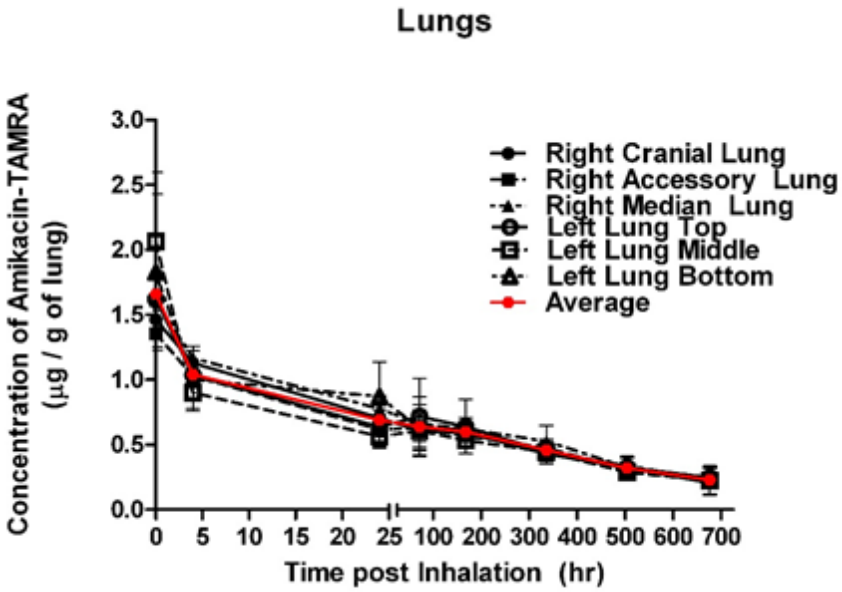
血清及び尿中濃度も以前の試験の結果と一致しており、アミカシンの血清中濃度は IPD 又は IPD から短時間で C_{max} に達し、投与後 24 時間までに定量下限（LLOQ : 3 µg/mL）未満となった。アミカシンの尿中濃度は、投与後 4 時間に C_{max} を示し、大部分のアミカシンは投与後 24 時間以内に尿中に排泄された。

アミカシン-TAMRA 及び $DiIC_{18}(5)DS$ の PK パラメータを表 2.6.4-9 に、その肺中濃度の経時的推移を図 2.6.4-18 及び図 2.6.4-19 に示す。

表 2.6.4-9　ラットに 0.2% (w/w)アミカシン-TAMRA 及び $DiIC_{18}(5)DS$ を含有する ALIS を吸入投与（90 mg/kg）した後の肺中アミカシン-TAMRA 及び $DiIC_{18}(5)DS$ の PK パラメータ

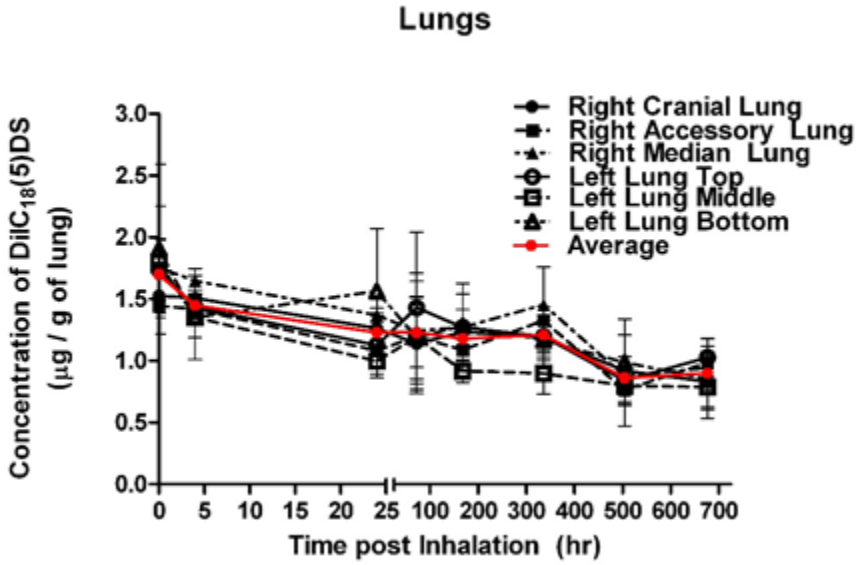
Parameter	Amikacin-TAMRA	$DiIC_{18}(5)DS$
$AUC_{0\text{-}24h}$ (µg･h/g)	23	33
$AUC_{0\text{-}672h}$ (µg･h/g)	315	730
$t_{1/2}\beta$ (h)	~365	>672
C_{max} (µg/g)	1.66	1.70
C_{min} (µg/g)	0.23	0.90

図 2.6.4-18　ラットに 0.2% (w/w)アミカシン-TAMRA 及び $DiIC_{18}(5)DS$ を含有する ALIS を吸入投与（90 mg/kg）した後の各肺葉及び肺組織中のアミカシン-TAMRA 濃度（µg/g）



The symbols and bars (n = 3) represent means and standard deviations of the concentration of Amikacin-TAMRA in each lobe/section.

図 2.6.4-19　ラットに 0.2% (w/w)アミカシン-TAMRA 及び DiIC$_{18}$(5)DS を含有する ALIS を吸入投与（90 mg/kg）した後の各肺葉及び肺組織中の DiIC$_{18}$(5)DS 濃度（μg/g）



The symbols and bars (n = 3) represent means and standard deviations of the concentration of DiIC$_{18}$(5)DS in each lobe/section.

ALIS の結果と同様に、肺における両蛍光プローブの均一な分布が観察された。アミカシン-TAMRA の二相性の消失とは対照的に、DiIC$_{18}$(5)DS は肺からより緩徐に消失した。すなわち、投与後 28 日に、アミカシン-TAMRA の 90%が肺から消失したのに対し、DiIC$_{18}$(5)DS の約 50%が肺から消失した。肺からのより遅い消失と一致して、血清又は尿中に DiIC$_{18}$(5)DS は定量可能な濃度が検出されなかった。アミカシン-TAMRA の血清及び尿中プロファイルは、以前の試験の結果と一致していた（AMIK-BRD-2009-30-PCLN 試験、2.6.4.6.2 項）。

蛍光顕微鏡を用いた肺後葉の組織切片の評価から、IPD においてアミカシン-TAMRA 及び DiIC$_{18}$(5)DS の両方が肺全体に分布し、本質的に共局在していることが明らかとなった。投与後 4 時間以前では、両物質の多くが気道の管腔内に見出されたが、投与後 24 時間以降では、両物質は末梢肺組織にさらに移動した（おそらくマクロファージ内）。顕微鏡による観察結果は、投与後 3 日から 28 日目まで、両物質の異なる消失動態と一致していた。

以上、ラットに二重蛍光標識 ALIS を 90 mg/kg の用量で単回投与したとき、アミカシン、アミカシン-TAMRA 及び DiIC$_{18}$(5)DS の均一な沈着が肺全体で観察された。アミカシン及びアミカシン-TAMRA は、投与後 28 日まで二相性で肺から消失したが、DiIC$_{18}$(5)DS は見かけ上直線的に緩徐に消失した。

2.6.4.4.4　組織内分布：反復投与

2.6.4.4.4.1　ラットに Arikace™を反復吸入投与した後のリポソーム脂質及びアミカシンの肺組織内分布及び消失（2.6.5.8.1 項、AMIK-BIO-2009-33-PCLN、CTD 4.2.2.3-8）

本試験では、二重蛍光標識した ALIS（アミカシン-TAMRA 及び DiIC$_{18}$(5)DS 含有）のラット肺における沈着、保時及び消失について評価した。

72 匹の雌 CD®IGS ラットに ALIS を 27 日間反復吸入投与した。各 36 匹のラットに ALIS を

10 mg/kg/日（70 mg/mL を 9～13 分間）、又は 90 mg/kg/日（70 mg/mL を 79～113 分間）の用量で連日吸入投与した。Day 28 に、各投与群の 12 匹のラットに ALIS を 90 mg/kg の用量で単回吸入投与し、各投与群の残りの 24 匹のラットに二重蛍光標識 ALIS を 90 mg/kg の用量で単回吸入投与した。二重蛍光標識 ALIS は、約 0.2% (w/w)の $DiIC_{18}(5)DS$ 及び約 0.2% (w/w)のアミカシン-TAMRA を含有していた。各投与群を表 2.6.4-10 に示す。

表 2.6.4-10　AMIK-BIO-2009-33-PCLN 試験における各投与群の構成表

Group	Number of Rats	Test Article x 27 Days	Test Article on Day 28
1	12	90 mg/kg ALIS	90 mg/kg ALIS
2	12	10 mg/kg ALIS	90 mg/kg ALIS
3	24	90 mg/kg ALIS	90 mg/kg dual-labeled ALIS
4	24	10 mg/kg ALIS	90 mg/kg dual-labeled ALIS

投与終了直後（IPD）、投与後 4、24 時間、3、7 及び 14 日に、それぞれ第 2 群及び第 4 群の 2 匹のラットを安楽死させ、肺、血清及び尿試料を採取した。IPD、投与後 4、24 時間、3、7、14、21 及び 28 日目に、それぞれ第 3 群及び第 4 群の 3 匹のラットを安楽死させ、肺、血清及び尿試料を採取した。別の 4 匹のラットには投与せず（対照群）、各 1 匹を IPD、投与後 3、14 及び 28 日に安楽死させた。

肺、血清及び尿中のアミカシン濃度を TDx 法により、$DiIC_{18}(5)DS$ 及びアミカシン-TAMRA の濃度を蛍光法により測定した。第 1 群及び第 2 群の後葉切片を蛍光染色し、蛍光顕微鏡を用いて評価した。第 3 群及第 4 群の後葉切片を蛍光顕微鏡で観察し、アミカシン-TAMRA 及び $DiIC_{18}(5)DS$ に由来する蛍光の組織／細胞内分布を評価した。

肺、血清及び尿中アミカシンの PK パラメータを表 2.6.4-11 に、$DiIC_{18}(5)DS$ 及びアミカシン-TAMRA の PK パラメータを表 2.6.4-12 に示す。アミカシン、アミカシン-TAMRA 及び $DiIC_{18}(5)DS$ の平均肺中濃度の経時的推移を図 2.6.4-20、図 2.6.4-21、図 2.6.4-22、図 2.6.4-23 及び図 2.6.4-24 に示す。

表 2.6.4-11　ラットに ALIS を 10 mg/kg/日（第 4 群）又は 90 mg/kg/日（第 3 群）の用量で 27 日間連日吸入投与後、Day 28 にそれぞれ二重蛍光標識 ALIS（90 mg/kg）を吸入投与したときの肺、血清及び尿中アミカシンの PK パラメータ

Parameter	Group No./ Treatment x 27 Days	Treatment on Day 28	Lung	Serum	Urine
$AUC_{0\text{-}24h}$ (µg•h/g or mL)	3/ALIS 90 mg/kg	Dual-labeled ALIS 90 mg/kg	97700	118	3032
	4/ALIS 10 mg/kg		29226	94	4604
$AUC_{0\text{-}672h}$ (µg•h/g or mL)	3/ALIS 90 mg/kg	Dual-labeled ALIS 90 mg/kg	1080000	1246	11132
	4/ALIS 10 mg/kg		494514	514	7304
$t_{1/2}$ β (h)	3/ALIS 90 mg/kg	Dual-labeled ALIS 90 mg/kg	254	ISD	ISD
	4/ALIS 10 mg/kg		131	ISD	ISD
C_{max} (µg/g or mL)	3/ALIS 90 mg/kg	Dual-labeled ALIS 90 mg/kg	4409	25	217
	4/ALIS 10 mg/kg		2205	35	385
C_{min} (µg/g or mL)	3/ALIS 90 mg/kg	Dual-labeled ALIS 90 mg/kg	424	0	4
	4/ALIS 10 mg/kg		441	0	4

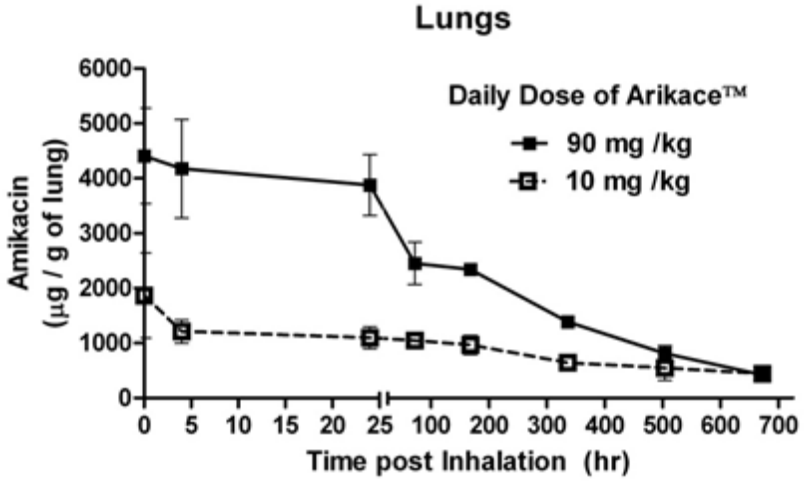
ISD = insufficient data to calculate parameter. AUC in µg•h/g for lung and µg•h/mL for serum or urine. C_{max} and C_{min} in µg/g for lung and µg/mL for serum or urine.

表 2.6.4-12　ラットに ALIS を 10 mg/kg/日（第 4 群）又は 90 mg/kg/日（第 3 群）の用量で 27 日間連日吸入投与後、Day 28 にそれぞれ二重蛍光標識 ALIS（90 mg/kg）を吸入投与したときの肺、血清及び尿中のアミカシン-TAMRA 及び $DiIC_{18}(5)DS$ の PK パラメータ

Parameter	Group No./ Treatment x 27 Days	Treatment on Day 28	Lung		Serum		Urine	
			A-T	DiI	A-T	DiI	A-T	DiI
$AUC_{0\text{-}24h}$ (μg•h/g or mL)	3/ALIS 90 mg/kg	Dual-labeled ALIS 90 mg/kg	35	114	0.12	NA	2.3	0
	4/ALIS 10 mg/kg		46	138	0.12	NA	2.4	0
$AUC_{0\text{-}672h}$ (μg•h/g or mL)	3/ALIS 90 mg/kg	Dual-labeled ALIS 90 mg/kg	530	953	NA	NA	7.4	0
	4/ALIS 10 mg/kg		801	1262	NA	NA	7.5	0
$t_{1/2}$ β (h)	3/ALIS 90 mg/kg	Dual-labeled ALIS 90 mg/kg	412	NA	NA	NA	NA	NA
	4/ALIS 10 mg/kg		638	NA	NA	NA	NA	NA
C_{max} (μg/g or mL)	3/ALIS 90 mg/kg	Dual-labeled ALIS 90 mg/kg	2.0	1.8	25	0	177	0
	4/ALIS 10 mg/kg		3.3	2.8	35	0	188	0
C_{min} (μg/g or mL)	3/ALIS 90 mg/kg	Dual-labeled ALIS 90 mg/kg	0.5	1.2	0	0	2	0
	4/ALIS 10 mg/kg		0.8	1.7	0	0	0	0

A-T = Amikacin-TAMRA, DiI = $DiIC_{18}(5)DS$, NA = not applicable; AUC in μg•h/g for lung and μg•h/mL for serum or urine; C_{max} and C_{min} in μg/g for lung and μg/mL for serum or urine

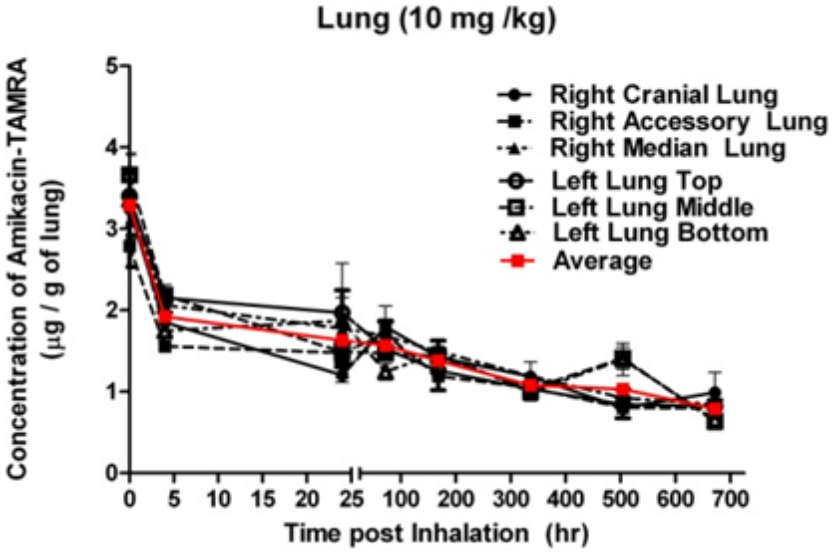
図 2.6.4-20　ラットに ALIS を 10 mg/kg/日（第 4 群）又は 90 mg/kg/日（第 3 群）の用量で 27 日間連日吸入投与後、Day 28 にそれぞれ二重蛍光標識 ALIS（90 mg/kg）を吸入投与したときの肺中アミカシン濃度（μg/g）



The symbols and bars (n = 3 or 5) represent means and standard deviations of the concentration of amikacin in right lung homogenates.

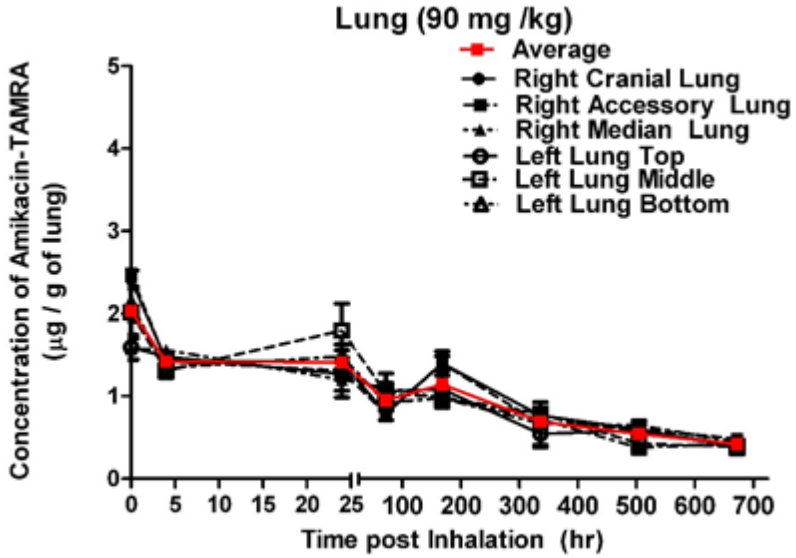
28 日間投与後の肺中アミカシンの量は用量に応じて増加した。IPD においては、高用量群のラットにおける肺中アミカシン量は低用量群の 2 倍以上であった（最終投与量が両群で同じでなかった場合には、差が大きくなった可能性がある）。同様に、高用量群のラットにおけるアミカシンの C_{max}、投与後 672 時間までの濃度-時間曲線下面積（$AUC_{0\text{-}672h}$）及び $t_{1/2}$ は、低用量群の約 2 倍であった。肺からのアミカシンの消失速度は、低用量群（約 1 μg/h）と比較して高用量群（約 5 μg/h）の方が約 5 倍高かった。肺組織（右前葉、副葉及び中葉、並びに左肺の上部、中央及び下部組織）1 g 当たりのアミカシンの沈着量及び消失は同程度であった（すなわち、均一に沈着し、同様に消失）。アミカシンの血清及び尿中プロファイルは、ALIS 及び FA についての以前の結果（AMIK-BIO-2009-24-PCLN 試験、2.6.4.6.1 項）と一致した。

図 2.6.4-21　ラットに ALIS を 10 mg/kg/日の用量で 27 日間連日吸入投与後、Day 28 に二重蛍光標識 ALIS（90 mg/kg）を吸入投与したとき（第 4 群）の肺中のアミカシン-TAMRA 濃度（μg/g）



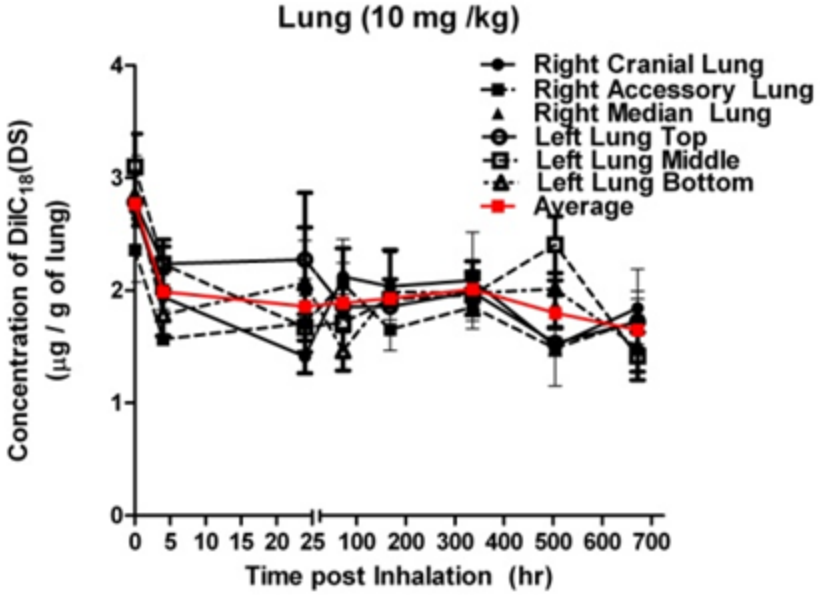
The symbols and bars (n = 3) represent means and standard deviations of the concentration of Amikacin-TAMRA in each lobe/section.

図 2.6.4-22　ラットに ALIS を 90 mg/kg/日の用量で 27 日間連日吸入投与後、Day 28 に二重蛍光標識 ALIS（90 mg/kg）を吸入投与したとき（第 3 群）の肺中のアミカシン-TAMRA 濃度（μg/g）



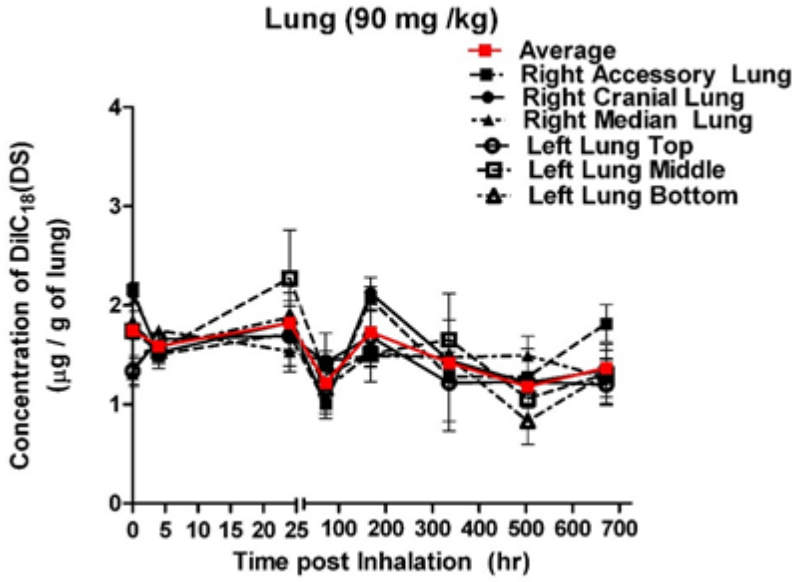
The symbols and bars (n = 3) represent means and standard deviations of the concentration of Amikacin-TAMRA in each lobe/section.

図 2.6.4-23　ラットに ALIS を 10 mg/kg/日の用量で 27 日間連日吸入投与後、Day 28 に二重蛍光標識 ALIS（90 mg/kg）を吸入投与したとき（第 4 群）の肺中の $DiIC_{18}(5)DS$ 濃度（μg/g）



The symbols and bars (n = 3) represent means and standard deviations of the concentration of $DiIC_{18}(5)DS$ in each lobe/section.

図 2.6.4-24　ラットに ALIS を 90 mg/kg/日の用量で 27 日間連日吸入投与後、Day 28 に二重蛍光標識 ALIS（90 mg/kg）を吸入投与したとき（第 3 群）の肺中の $DiIC_{18}(5)DS$ 濃度（μg/g）



The symbols and bars (n = 3) represent means and standard deviations of the concentration of $DiIC_{18}(5)DS$ in each lobe/section.

28 日間投与後のアミカシン-TAMRA の肺中プロファイルは、非標識アミカシンのプロファイルと類似していた（すなわち、初期の急速な減少及び、より遅い消失を伴う 2 相性のプロファイル）。一方で、表 2.6.4-12 に示すアミカシン-TAMRA の肺における PK パラメータは、非標識アミカシンで観察されたような用量に比例した増加を示さなかった。また、10 mg/kg 投与群の PK パラメ

ータは 90 mg/kg 投与群の PK パラメータと同等かそれ以上であり、肺中の $DiIC_{18}(5)DS$ についても同様であった。これらの相違の理由は不明であるが、二重蛍光標識 ALIS を高用量（90 mg/kg）で投与したとき、アミカシン及び脂質の保持能力の低下に関連している可能性がある。また、血清及び尿中アミカシン濃度は主に最終投与時のアミカシンのクリアランスに起因するので、最終投与量が両群で同じであったことから、アミカシン-TAMRA の血清及び尿中濃度が両群で同程度であったことは、予想外のことではなかった。$DiIC_{18}(5)DS$ の肺からのクリアランスは、アミカシン-TAMRA よりも遅く、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。

以前の結果と同様に、肺全体にわたるアミカシン-TAMRA 及び $DiIC_{18}(5)DS$ の均一な分布並びに一様な消失（アミカシン> $DiIC_{18}(5)DS$）が認められた。最終投与後 4 時間に、両蛍光プローブの共局在化が顕著に認められ、これは ALIS がマクロファージによって貪食されたことを示唆していた。吸入投与したとき、肺に残存している ALIS は、主に肺胞及び間質マクロファージによって取り込まれた部分であり、230 時間を超える見かけの半減期（β 相）で肺に保持された。

以上、ラットに単回投与した試験の結果と一致して、ラットに ALIS を約 1 ヵ月間連日吸入投与したとき、肺全体にアミカシン及びリポソームが均一に沈着し、その後アミカシンが一様に消失した。

2.6.4.5　　代謝（動物種間の比較）

アミカシン硫酸塩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。

2.6.4.6 排泄

ALIS の排泄を直接評価する動物試験は実施しなかった。しかし、AMIK-BRD-2007-04-PK 試験（2.6.4.3.1 項）及び本項に記載の雌ラットに 90 mg/kg の用量を投与し、最大 21 日間尿を採取した他の試験結果（2.6.4.4.3.7 項及び 2.6.4.4.3.8 項）に基づいて、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。これは、ヒトに非経口投与されたアミカシンの消失と一致している（Bodey, 1974、Contrepois, 1985）。さらに、ヒトに ALIS（及び遊離アミカシン［FA］）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の吸収はごくわずかであるため、ALIS を吸入投与したときに胃腸管に移行したアミカシンも未変化のまま糞中に排泄されると考えられる。

アミカシン（BB-K8 としても知られる）のイヌを用いた試験では、静脈内投与後 6 時間以内に投与量の約 92%が未変化体として尿中に排泄され、消失は主に糸球体濾過によるものと考えられた（Cabana and Taggart, 1973）。

2.6.4.6.1 ラットに Arikace™及び遊離アミカシンを単回吸入投与した後の組織内分布及び消失（2.6.5.13.1 項、AMIK-BIO-2009-24-PCLN、CTD 4.2.2.5-2）

本試験では、ALIS（70 mg/mL、150 分間）又は遊離アミカシン（FA、70 mg/mL、170 分間）を 90 mg/kg の用量で雌 CD®IGS ラット（12 匹／群）に単回吸入投与後 24 時間まで、アミカシンの肺沈着、保持及び消失を検討した。別に未処置のラット 4 匹を対照群とした。評価したパラメータは、体重及び肺重量、肺（右肺葉 : 前葉、副葉、中葉及び後葉）、血清及び尿中アミカシン濃度、並びに蛍光抗体染色法及び蛍光顕微鏡を用いた肺におけるアミカシンの分布及び染色強度であった。

アミカシン投与群内又はアミカシン投与群と対照群の間に、体重又は肺重量の明らかな差は認められなかった。2.6.4.3.1 項で示したように、ALIS 投与後の肺におけるアミカシンの PK は FA 投与後とは異なっていた。FA 投与群と比較して、ALIS 投与群の肺沈着（$AUC_{0\text{-}24h}$）は 2 倍に増加し、ALIS 投与群の消失時間は約 3 倍延長した。さらに、投与終了直後（IPD）の肺中総アミカシン量に対する投与後 24 時間の残存率は、ALIS 投与群のラットで 43%であったのに対し、FA 投与群ではわずか 12%であった。

ALIS 投与群のラットの左肺葉から採取した肺切片の蛍光顕微鏡による評価では、IPD において拡散性の染色パターンを示した後、投与後 4 時間では、おそらく ALIS の細胞（マクロファージ）取り込みに起因すると考えられる斑点状の外観に移行した。拡散性の染色が消失するのに伴い細胞性染色が増加する様子は、肺ホモジネートからのアミカシンの消失と相関していた。対照的に、FA 投与群のラット左肺葉から採取した組織切片では、IPD において非常に弱い拡散性の染色パターンを示し、その後の時点ではわずかな染色を示すか、又は無染色の状態であった（すなわち、投与後 4 時間に微弱な蛍光性マクロファージが散見されたのみである）。

ALIS 及び FA 投与後の肺、血清及び尿中アミカシン濃度の PK パラメータを表 2.6.4-13 に示す。

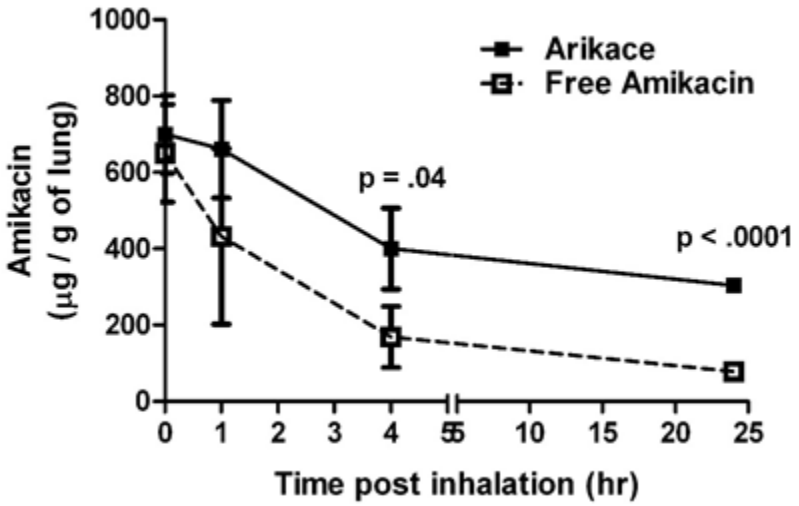
表 2.6.4-13　ラットに ALIS 又は FA を吸入投与（90 mg/kg）した後のアミカシンの PK パラメータ

Parameter	Treatment	Lung	Serum	Urine
$AUC_{0\text{-}24h}$ (µg•h/g or mL)	ALIS	9312	159	4170
	FA	3913	196	5496
$t_{1/2}$ (h)	ALIS	7	ISD	ISD
	FA	2	ISD	ISD
C_{max} (µg/g or mL)	ALIS	700	26	263
	FA	650	68	336
C_{min} (µg/g or mL)	ALIS	304	0	56
	FA	78	0	70

ISD = Insufficient data to calculate parameter.　Amikacin concentrations were determined IPD and 1, 4 and 24 h post dosing (n = 3 at each time point).　AUC in µg•h/g for lung and µg•h/mL for serum or urine.　C_{max} and C_{min} in µg/g for lung and µg/mL for serum or urine.

IPD において、肺に沈着したアミカシンの量は、ALIS 及び FA ともに同程度であった。しかし、FA 投与後の肺からのアミカシンの消失は、ALIS 投与後よりも速やかであった。IPD に肺に吸着したアミカシン量に対する投与後 24 時間でのアミカシンの消失割合は、FA 吸入投与後で約 88%であったが、ALIS 吸入投与後では約 45%であった（図 2.6.4-25）。これらの知見は、肺における ALIS の depot（貯留）効果をより支持するものと考えられた。

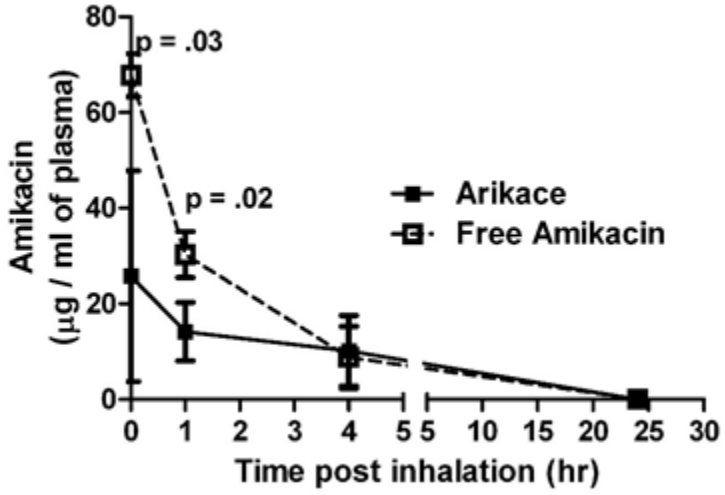
図 2.6.4-25　ラットに ALIS 又は FA を吸入投与（90 mg/kg）した後の肺中アミカシン濃度（µg/g）



Lung samples were analyzed for amikacin content by TDx.

血清中アミカシンプロファイルは肺中のデータと矛盾なく、FA 投与後のアミカシンの全身曝露量（C_{max}：68 µg/mL、$AUC_{0\text{-}24h}$：196 µg•h/mL）は、ALIS 投与後（C_{max}：26 µg/mL、$AUC_{0\text{-}24h}$：159 µg•h/mL）よりも大きかった（図 2.6.4-26）。

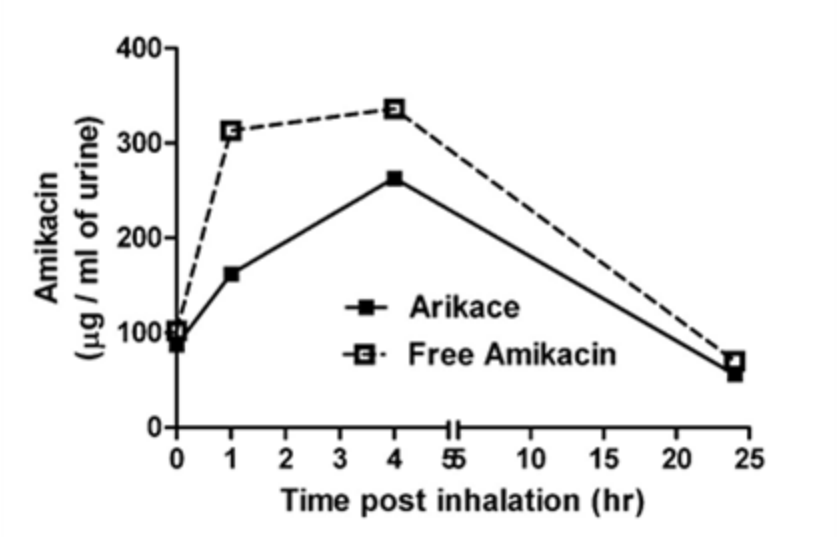
図 2.6.4-26　ラットに ALIS 又は FA を吸入投与（90 mg/kg）した後の血清中アミカシン濃度（μg/mL）



Serum amikacin concentrations were below the lower limit of quantification (LLOQ) of 3 μg/mL by 24 h for both treatment groups.　Y-axis heading should be μg/mL of serum.　Correct p values in figure are 0.0006 and 0.0002 instead of 0.03 and 0.02, respectively.

尿中アミカシンプロファイルも肺中のデータと矛盾なく、尿中アミカシン濃度は、FA 投与後（$AUC_{0\text{-}24h}$：5496 μg•h/mL）の方が ALIS 投与後（$AUC_{0\text{-}24h}$：4170 μg•h/mL）よりも高かった（図 2.6.4-27）。

図 2.6.4-27　ラットに ALIS 又は FA を吸入投与（90 mg/kg）した後の尿中アミカシン濃度（μg/mL）



The symbols (n = 2 or 3) represent the means of amikacin concentrations in urine.

蛍光顕微鏡写真及び対応する位相差画像から、この染色法により肺組織中のアミカシンの分布を検出することが可能であり、ALIS と FA との間の蛍光強度パターンの差異を識別できることが

示された。IPD 及び投与後 1 時間では、ALIS 及び FA ともに拡散性の染色を示したが、投与後 4 及び 24 時間では、ALIS を投与したラットにおいて、おそらく肺胞マクロファージによる取込みのために、主に強い斑点状の染色を示した。一方、FA 投与後では、これらの時点でごくわずかな点状の染色しか観察されず、アミカシンが主に細胞間隙に存在し、投与後 4 時間までに大部分のアミカシンが連続的に肺から消失することが示唆された。

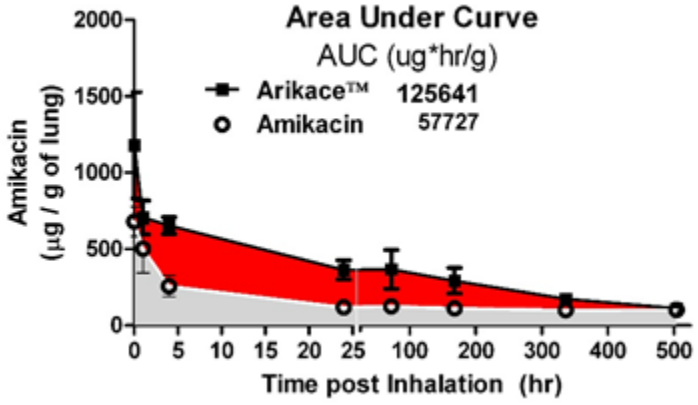
以上、ALIS 投与後のラットの肺におけるアミカシンの沈着及び消失は、曝露量が増大し、半減期が延長するという点で FA 投与後とは異なるものであった。

2.6.4.6.2　ラットに Arikace™及び遊離アミカシンを単回吸入投与した後の組織内分布及び消失（2.6.5.13.1 項、AMIK-BIO-2009-30-PCLN、CTD 4.2.2.5-3）

本試験は、前述の試験（AMIK-BIO-2009-24-PCLN 試験、2.6.4.6.1 項）と一部の条件を除いて同じ試験方法で実施した。すなわち、ラットに ALIS（70 mg/mL、94 分間）又は遊離アミカシン（FA、70 mg/mL、72 分間）を 90 mg/kg の用量で単回吸入投与したときの投与後 21 日までのアミカシンの肺組織内分布、保持及び消失を評価した。各群 24 匹の雌 CD®IGS ラットに ALIS 又は FA を投与し、別に 4 匹の未処置ラットを対照群とした。評価したパラメータは、体重及び肺重量、肺（右前葉、副葉及び中葉、並びに左葉の上部、中央部及び下部組織）、血清及び尿中のアミカシン濃度、並びに蛍光抗体染色法及び蛍光顕微鏡を用いた肺におけるアミカシンの分布及び染色強度である。

前述の結果と同様に、ALIS 投与後 504 時間までの肺中アミカシンの AUC は、FA 投与後の AUC よりも有意に大きかった（図 2.6.4-28）。ALIS 投与後 504 時間までの濃度-時間曲線下面積（$AUC_{0\text{-}504h}$：112855 µg•h/g）は、FA 投与後（42498 µg•h/g）の 2 倍であった。

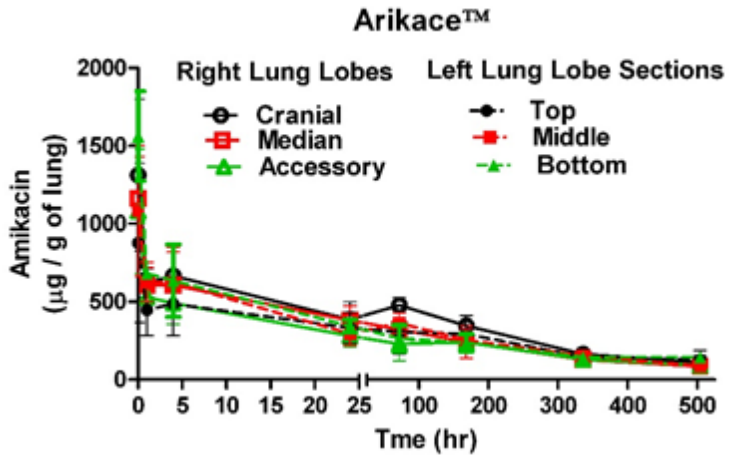
図 2.6.4-28　ラットに ALIS 又は FA を吸入投与（90 mg/kg）した後の肺中アミカシン濃度（µg/g）



Actual AUC values are 112855 and 42498 µg•h/g for Arikace (ALIS) and FA, respectively.

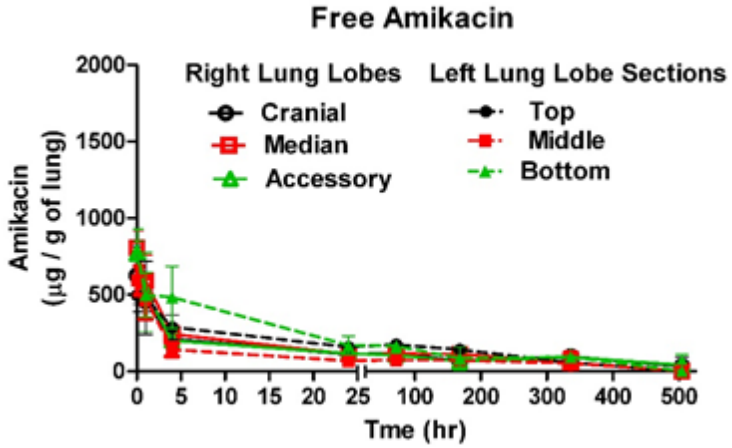
図 2.6.4-29 に示すように、ALIS 投与後では同程度の量のアミカシンが各肺葉及び肺切片に沈着しており、ALIS の投与により肺全体に均一なアミカシンの沈着がもたらされたことを示している。FA 投与後でも同じパターンが観察された（図 2.6.4-30）が、ALIS 投与後の方が FA 投与後に比較してアミカシンの肺中濃度は高く、消失するまでの時間も長かった。

図 2.6.4-29　ラットに ALIS を吸入投与（90 mg/kg）した後の肺の各部位中アミカシン濃度（μg/g）



The symbols and bars (n = 3) represent means and standard deviations of the concentration of amikacin in each lobe/section.

図 2.6.4-30　ラットに FA を吸入投与（90 mg/kg）した後の肺の各部位中アミカシン濃度（μg/g）



The symbols and bars (n = 3) represent means and standard deviations of the concentration of amikacin in each lobe/section.

アミカシンで染色された後葉切片の画像から、両被験物質ともに投与終了直後（IPD）及び投与後 1 時間では拡散性の染色が確認された。ALIS 投与後では、拡散性の染色は投与後 24 時間にわたり徐々に減少し、それと同時に明るく染色されたマクロファージが増加した。一方、FA 投与後では、薄く染色されたマクロファージが若干確認される程度で、拡散性の染色は速やかに減少した。

以上の結果から、（1）免疫蛍光染色法によりアミカシンの肺における細胞外及び細胞内の分布を検出することが可能であり、（2）対応する位相差画像と組み合わせることにより、投与後の経時的推移からアミカシンの組織内分布を追跡することが可能であることが示された。さらに、アミカシンをリポソーム内に封入化することにより、FA 吸入投与と比較して、アミカシンの消失を遅らせ、肺胞マクロファージによるアミカシンの取込みを増強することが示された。したがって、肺マクロファージは ALIS の長期間の貯留庫として機能しているとも考えられた。

2.6.4.7　薬物動態学的薬物相互作用

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。

2.6.4.8 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。

2.6.4.9　考察及び結論

ALIS の毒性試験で用いられた主要なげっ歯類であるラットに吸入投与した一連の PK 試験において、ALIS を単回若しくは反復投与、又は遊離アミカシン（FA）若しくは遊離トブラマイシン（FT）を単回投与したときのアミカシンの肺内沈着、保時及び消失を評価した。遊離アミノグリコシドと比較して、ALIS の投与により、実質的により高い肺中アミカシン濃度が得られ、アミカシンの消失も遅延した（すなわち、depot［貯留］様効果）。FA 投与後と同様に、ALIS 投与後のアミカシンは肺から二相性で消失した。肺からのアミカシンの初期の消失は、噴霧後の ALIS 中に存在する FA の消失によるものと考えられる。FA 吸入投与後と比較して、ALIS を吸入投与したとき肺中にアミカシンが保持され、肺から緩徐に放出されることから、アミカシンの血清中濃度が低く保たれ、アミカシンによる全身性の毒性を低減させる可能性がある。

蛍光偏光免疫アッセイ（TDx 法）を用いた血漿／血清、尿、肺、腎臓及び脳中のアミカシン濃度の測定に加えて、ALIS 投与後の肺における分布を検討するために評価法を加えた。すなわち、蛍光プローブ（アミカシン-TAMRA 及び $DiIC_{18}(5)DS$）を用いた評価によって、蛍光顕微鏡によるプローブの可視化とともに、蛍光測定法により肺中のアミカシン-TAMRA 及び $DiIC_{18}(5)DS$ 濃度の定量が可能となった。

ラットにアミカシン-TAMRA 及び $DiIC_{18}(5)DS$ の両方を含有する ALIS を単回吸入投与したとき、投与後 24 時間までのアミカシン及びリポソームの沈着は、肺の深部を含め肺全体で均一であった。両蛍光プローブは、肺内（ほとんどの気道の周囲及び肺実質内）に共局在化していた。$DiIC_{18}(5)DS$ は、主に肺胞腔及び実質内のマクロファージに取り込まれており、アミカシン-TAMRA の蛍光は、拡散性の分布とマクロファージ内の分布を示した（すなわち、マクロファージからのアミカシンの経時的放出と一致）。アミカシン-TAMRA 及び $DiIC_{18}(5)DS$ の両方を含有する ALIS を単回吸入投与したとき、投与後 28 日までに、沈着したアミカシンの約 90%が肺から消失したが、$DiIC_{18}(5)DS$ の消失はかなり遅いものであった。肺組織 1 g あたりに沈着したアミカシンの量は、測定した肺葉又は切片にかかわらず同程度であった。同様に、測定された肺葉又は切片にかかわらず、アミカシンは肺から一様に消失した。

ALIS の噴霧中に放出されたアミカシンの部分（約 40%）は、7 時間以下の肺中半減期（α 相）で急速に消失した。一方、ALIS 曝露後に肺に残存している部分は、主に肺胞マクロファージに取り込まれ、約 400 時間の半減期（β 相）で肺中に保持されていた。脂質は肺から緩徐に消失し、血清又は尿中に測定可能な濃度の $DiIC_{18}(5)DS$ が検出されなかったことから、脂質は主に細胞経路で消失することが示唆された。

反復吸入投与試験では、ラットにアミカシン-TAMRA 及び $DiIC_{18}(5)DS$ の両方を含有する ALIS を 10 又は 90 mg/kg の用量で約 1 ヵ月間連日投与した。その結果、単回投与後の試験結果と同様に、この試験からは以下の重要な結果が得られた。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、$DiIC_{18}(5)DS$ は肺から緩徐に消失し、主にマクロファージ中に観察された。吸入投与後に肺に残存する ALIS 由来のアミカシンは、主に肺胞及び間質性マクロファージに取り込まれており、肺中半減期が 230 時間を超えた。さらに、肺中のアミカシン量は用量に比例して増加した。

マウス、ラット及びイヌを用いた ALIS の毒性試験では、バリデートされた TDx 法及び LC/MS/MS 法を用いて、血漿／血清、尿及び／又は肺中のアミカシン濃度を測定した。これらの試験の結果は、2.6.6 項及び 2.6.7 項に記載した。

以上のことから、同様の投与量の遊離アミノグリコシドと比較して、ALIS 投与により肺中アミカシン濃度を高く、持続的に維持できることが示された。したがって、ALIS の吸入投与によって、比較的高濃度のアミカシンを細菌性マクロコロニー環境に局所的に送達することが可能となる。ALIS を吸入投与したとき、アミカシンは肺全体に均一に分布し、肺から一様に消失した。ALIS の噴霧中にアミカシンとして放出された部分は急速に肺から消失するが、一方、リポソームとして肺に残存した部分は主に肺胞マクロファージによって取り込まれ、その後緩徐に消失した。

結論として、ALIS により肺からの半減期及び AUC の両方が改善されることによってアミカシンの送達（PK）が最適化され、より少ない投与回数でより良好な薬力学（すなわち、増強された殺菌作用）を引き出す可能性が高まる。別の潜在的な利点として、全身曝露量の低減により全身暴露に関連する有害事象を最小限に抑える効果も期待される。

2.6.4.10　図表

図表は、本文中の適切な場所に記載した。

2.6.4.11 参考文献

Bernard B, Abate M, Thielen PF, Attar H, Ballard CA, and Wehrle PF. Maternal-fetal pharmacological activity of amikacin. J Infect Dis. 1977;135(6):925-932.

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

Cabana BE, Taggart JG. Comparative Pharmacokinetics of BB-K8 and Kanamycin in Dogs and Humans. Antimicrob Ag Chemother. 1973; 3(4):478-483.

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.

Kirby WMM, Clarke JT, Libke RD and Regamey C. Clinical pharmacology. Clinical pharmacology of amikacin and kanamycin. J Infect Dis. 1976;134(S):S312-S315.

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
2.6 非臨床試験の概要文及び概要表
2.6.5 薬物動態試験概要表

インスメッド合同会社

目次

頁
略号一覧表 3
2.6.5 薬物動態試験概要表 4
2.6.5.1 薬物動態試験：一覧表 4
2.6.5.2 分析方法及びバリデーション試験 6
2.6.5.3 薬物動態試験：単回投与後の吸収 7
2.6.5.3.1 総括：ラットに Arikace™を吸入投与した後の PK 及び分布 7
2.6.5.4 薬物動態試験：反復投与後の吸収 8
2.6.5.5 薬物動態試験：分布（単回投与） 9
2.6.5.5.1 アミカシン-TAMRA 及びアミカシンを吸入投与した後の PK プロファイルの比較 9
2.6.5.5.2 アミカシン-TAMRA 及びアミカシンを吸入投与した後の PK プロファイルの比較 11
2.6.5.5.3 ラットに $DiIC_{18}$(5)DS リポソームを吸入投与した後の肺組織内分布 13
2.6.5.5.4 ラットに $DiIC_{18}$(5)DS リポソームを吸入投与した後の肺組織内分布 14
2.6.5.5.5 ラットに蛍光脂質 $DiIC_{18}$(5)DS を吸入投与した後の肺組織内分布 15
2.6.5.5.6 ラットに Arikace™を吸入投与した後のリポソーム脂質及びアミカシンの肺組織内分布 16
2.6.5.5.7 ラットに Arikace™を吸入投与した後のリポソーム脂質及びアミカシンの肺組織内分布 17
2.6.5.6 薬物動態試験：タンパク結合 19
2.6.5.7 薬物動態試験：妊娠又は授乳動物における試験 20
2.6.5.8 薬物動態試験：その他の分布試験（反復投与） 21
2.6.5.8.1 ラットに Arikace™を反復吸入投与した後のリポソーム脂質及びアミカシンの肺組織内分布及び消失 21
2.6.5.9 薬物動態試験：代謝：*In Vivo* 24
2.6.5.10 薬物動態試験：代謝：*In Vitro* 25
2.6.5.11 薬物動態試験：推定代謝経路 26
2.6.5.12 薬物動態試験：薬物代謝酵素の誘導／阻害 27
2.6.5.13 薬物動態試験：排泄 28
2.6.5.13.1 ラットに Arikace™及び遊離アミカシンを単回吸入投与した後の組織内分布及び消失 28
2.6.5.14 薬物動態試験：排泄：胆汁中 29
2.6.5.15 薬物動態試験：薬物相互作用 30
2.6.5.16 薬物動態試験：その他 31

表一覧

表 2.6.5-1 薬物動態試験：一覧表 5

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
AT	Amikacin-TAMRA：アミカシン-TAMRA
AUC	area under the concentration-time curve：濃度－時間曲線下面積
AUC_{t1-t2}	area under the plasma or serum concentration-time curve from t1 to t2：投与後時間 t1 から時間 t2 までの、血漿中もしくは血清中濃度－時間曲線下面積
C_{max}	maximum (peak) plasma or serum concentration of the drug：血漿中もしくは血清中最高（ピーク）薬物濃度
C_{min}	minimum (trough) plasma or serum drug concentration：血漿中もしくは血清中最小（トラフ）薬物濃度
DiI	$DiIC_{18}(5)DS$：－
$DiIC_{18}(5)DS$	1,1’-dioctadecyl-3,3,3’,3’-tetramethylindolicarbocyanine-5,5’-disulphonic acid attached to two C_{18} alkyl chains：2 個の C_{18} 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
DMPK	drug metabolism and pharmacokinetics：薬物動態
F	female：雌性
FA	free amikacin：遊離型アミカシン
FT	free TAMRA：遊離型 TAMRA 又は free tobramycin：遊離型トブラマイシン
GI	gastrointestinal：胃腸
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）
M	male：雄性
PK	pharmacokinetics：薬物動態
SLIT	Sustained release Lipid Inhalation Targeting：－
$t_{1/2}$	half-life：半減期
TAMRA	tetramethylrhodamine：テトラメチルローダミン
TDx	Abbott TDx™ Automated Fluorescence Immunopolarization Assay：Abbott TDx™自動蛍光偏光免疫アッセイ

2.6.5　薬物動態試験概要表

2.6.5.1　薬物動態試験：一覧表

アミカシンリポソーム吸入用懸濁液（ALIS）は、以前は Arikace™、Sustained release Lipid Inhalation Targeting™（SLIT™）Amikacin、及び Liposomal Amikacin for Inhalation（LAI）と称された。ALIS を用いた薬物動態（PK）試験の多くは、肺が有効性の標的器官であるため、ALIS と構成成分の肺における吸着、保持及び消失に焦点を当てた。アミカシンは消化管からほとんど吸収されない。また、アミカシンは代謝されないため、ALIS の代謝試験は実施しなかった。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た。詳細を 2.6.4.7 項に示した。分布試験は、吸入投与時に曝露される経路に基づき、また、肺での曝露に比較して全身曝露が低いことが想定されたことから、主に肺、血清及び尿に限定した。腎臓と脳中濃度は低く、気道外の組織への曝露は限られたものであることが確認された（2.6.4.3.1 項参照）。放射性同位体で標識した ALIS を用いた試験は実施しなかったが、アミカシン（amikacin-TAMRA）及びリポソーム（$DiIC_{18}(5)DS$）の体内動態を検討するために蛍光プローブを使用した。

毒物試験におけるトキシコキネティクスの結果と議論については、2.6.6 項及び 2.6.7 項に記載した。

全ての試験において、評価前の動物の給餌の状態（絶食または非絶食）が報告書に記載されていないものの、試験は吸入投与で実施されたため動物は非絶食状態であったと想定された。さらに、被験物質に用いられた溶媒が全ての試験報告書に記載されている訳ではないが、いくつかの報告書で言及されているように塩化ナトリウム（NaCl）溶液であると想定され、70 mg/mL ALIS 製剤は 1.5% NaCl に懸濁されている。

本概要表中の PK 試験を識別するために試験番号を記載した。被験物質は全ての試験で ALIS と記載した。本概要表に記載されている試験は、利用可能な結果が適切に提示されるように構成されている。

表 2.6.5-1　薬物動態試験：一覧表

Test Article: ALIS

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Report Number	CTD Location
Absorption (Single Dose)	SD Rats	Inhalation, oral	Insmed	AMIK-BRD-2007-04-PK	4.2.2.5-1
	CD® IGS Rats	Inhalation	Insmed	AMIK-BIO-2009-24-PCLN	4.2.2.5-2
	CD® IGS Rats	Inhalation	Insmed	AMIK-BIO-2009-30-PCLN	4.2.2.5-3
Absorption (Multiple Dose)	CD® IGS Rats	Inhalation	Insmed	AMIK-BIO-2009-33-PCLN	4.2.2.3-8
Organ Distribution (Single Dose)	SD Rats	Inhalation, oral	Insmed	AMIK-BRD-2007-04-PK	4.2.2.5-1
	CD® IGS Rats	Inhalation	Insmed	AMIK-BIO-2009-25-PCLN	4.2.2.3-1
	CD® IGS Rats	Inhalation	Insmed	AMIK-BIO-2009-27-PCLN	4.2.2.3-2
	CD® IGS Rats	Inhalation	Insmed	AMIK-BIO-2009-26-PCLN	4.2.2.3-3
	CD® IGS Rats	Inhalation	Insmed	AMIK-BIO-2009-28-PCLN	4.2.2.3-4
	CD® IGS Rats	Inhalation	Insmed	AMIK-BIO-2009-31-PCLN	4.2.2.3-5
	CD® IGS Rats	Inhalation	Insmed	AMIK-BIO-2009-29-PCLN	4.2.2.3-6
	CD® IGS Rats	Inhalation	Insmed	AMIK-BIO-2009-32-PCLN	4.2.2.3-7
Organ Distribution (Multiple Dose)	CD® IGS Rats	Inhalation	Insmed	AMIK-BIO-2009-33-PCLN	4.2.2.3-8
Protein Binding	NA				
Metabolism	NA				
Excretion	SD Rats	Inhalation, oral	Insmed	AMIK-BRD-2007-04-PK	4.2.2.5-1
	CD® IGS Rats	Inhalation	Insmed	AMIK-BIO-2009-24-PCLN	4.2.2.5-2
	CD® IGS Rats	Inhalation	Insmed	AMIK-BIO-2009-30-PCLN	4.2.2.5-3
Pharmacokinetic Drug Interactions	NA				
Development of Fluorescent Probes[a]	NA	NA	Insmed	AMIK-RES-2009-21-FORM	4.2.2.1-15
				AMIK-RES-2009-22-FORM	4.2.2.1-16

NA = Not Applicable (no studies performed)
[a] A brief summary of these studies is provided in Module 2.6.4.2. The reader is referred to the actual reports for further information.

2.6.5.2　　分析方法及びバリデーション試験

2.6.4.2 項を参照のこと

2.6.5.3 薬物動態試験：単回投与後の吸収

2.6.5.3.1 総括：ラットに Arikace™を吸入投与した後の PK 及び分布

Test Article: ALIS

Report No: AMIK-BRD-2007-04-PK

Species	Rat
Gender (M/F)/Number of animals	F/NA
Feeding condition	Fed
Vehicle/Formulation	NaCl 1.5%/ALIS (75 mg Amikacin/mL – for 80 minutes); Free Amikacin (FA) (53 or 75 mg/mL – for 96 or 80 minutes); Free Tobramycin (FT) (60 mg/mL – for 100 minutes)
Method of Administration	Inhalation, oral
Dose (mg/kg)	60 (inhalation), 50 (oral)
Sample	Serum, lung, kidney, urine, brain
Analyte	Amikacin, Tobramycin
Assay	TD_X™
PK parameters - inhalation: $AUC_{0\text{-}48h}$ (µg•h/g or mL)	Lung (56233 Amikacin administered as ALIS; 11504 FT); Serum (281 Amikacin administered as ALIS; 198 FT); Kidney (1883 Amikacin administered as ALIS, 4302 FT); Urine (3674 Amikacin administered as ALIS, 5408 FT)

Additional information: FA = free amikacin. FT = free tobramycin. NA = Not available. Amikacin concentrations were measured using an Abbott TDx automated fluorescence polarization analyzer. After inhalation, lung levels of free aminoglycoside were substantively higher for amikacin (ALIS) compared to FA and FT (see above for FT). For FA, mean lung concentrations immediately post-dose (IPD) and 6-h post-dose were 800 and 126 µg/lung compared to 1029 and 590 µg/lung for amikacin from ALIS. Brain concentrations at these time points were just at or above the level of detection, indicating that Amikacin did not cross the blood-brain barrier for either formulation. In the oral study, no measurable levels of amikacin were detected in serum, whereas low but measurable levels of amikacin were measured in the urine following a 24-hour period post dosing. In this oral study it was estimated that between 0.002% and 0.3% of the amikacin dose was absorbed. Also see studies AMIK-BIO-2009-24-PCLN and AMIK-BIO-2009-30-PCLN in Module 2.6.5.13.

2.6.5.4　　薬物動態試験：反復投与後の吸収

2.6.5.8.1 項（AMIK-BIO-2009-33-PCLN 試験）を参照のこと

2.6.5.5 薬物動態試験：分布（単回投与）

2.6.5.5.1 アミカシン-TAMRA 及びアミカシンを吸入投与した後の PK プロファイルの比較

Test Article: ALIS

Report No: AMIK-BIO-2009-25-PCLN

Species:	Rat
Gender (M/F)/Number of animals:	F/28
Feeding condition:	Fed
Vehicle/Formulation:	FA + 1% Amikacin-TAMRA (FA+1%AT) (69.4 mg Amikacin/mL – for 84 minutes); FA + 1% Free TAMRA (FA+1%FT) (69.4 mg Amikacin/mL – for 87 minutes)
Method of Administration:	Inhalation
Dose (mg/kg):	90
Radionuclide:	NA
Specific Activity:	NA
Sampling time:	IPD and 1, 2, and 4 h post-dose

2.6.5.5.1 アミカシン-TAMRA 及びアミカシンを吸入投与した後の PK プロファイルの比較（続き）

Test Article: ALIS

Report No: AMIK-BIO-2009-25-PCLN, continued

Tissues/organs	Amikacin			AT or FT		
	$AUC_{0\text{-}4h}$ (µg•h/mL or g)	C_{max} (µg/mL or g)	$t_{1/2}$ (h)	$AUC_{0\text{-}4h}$ (nmol•h/L or kg)	C_{max} (nmol/L or kg)	$t_{1/2}$ (h)
Lung (FA+1%AT)	877	312	4	-	-	-
Lung (FA+1%FT)	1154	411	3	-	-	-
Lung (AT)	-	-	-	1309	448	4
Lung (FT)	-	-	-	633	361	2
Serum (FA+1%AT)	92	40	3	-	-	-
Serum (FA+1%FT)	102	61	2	-	-	-
Serum (AT)	-	-	-	1148	330	3
Serum (FT)	-	-	-	633	542	1
Urine (FA+1%AT)	809	270	1	-	-	-
Urine (FA+1%FT)	917	376	1	-	-	-
Urine (AT)	-	-	-	4941	3063	2
Urine (FT)	-	-	-	16495	6372	1

Additional information: AT = amikacin TAMRA. FA = free amikacin. FT = free tobramycin. NA = Not applicable. Lung tissue sections collected at each necropsy were examined using fluorescence microscopy for the presence of AT or FT. Visual changes in fluorescence intensity as a function of time were consistent with the pulmonary PK data (i.e., FT is cleared from the lung much faster than AT). It was concluded that the *in vivo* stability and kinetic profile of AT are sufficiently similar to amikacin following inhalation that AT can be used as a mimetic of amikacin in biodistribution studies.

2.6.5.5.2 アミカシン-TAMRA 及びアミカシンを吸入投与した後の PK プロファイルの比較

Test Article: ALIS

Report No: AMIK-BIO-2009-27-PCLN

Species:	Rat
Gender (M/F)/Number of animals:	F/24
Feeding condition:	Fed
Vehicle/Formulation:	FA + 1% AT (FA+1%AT); FA + 1% FT (FA+1%FT); Both groups: 69.4 mg Amikacin/mL – for 129 minutes
Method of Administration:	Inhalation
Dose (mg/kg):	90
Radionuclide:	NA
Specific Activity:	NA
Sampling time:	IPD and 1, 2, and 4 h post-dose

2.6.5.5.2 アミカシン-TAMRA 及びアミカシンを吸入投与した後の PK プロファイルの比較（続き）

Test Article: ALIS

Report No: AMIK-BIO-2009-27-PCLN, continued

Tissues/organs	Amikacin			AT or FT		
	$AUC_{0\text{-}4h}$ (µg•h/g or mL)	C_{max} (µg/g or mL)	$t_{1/2}$ (h)	$AUC_{0\text{-}4h}$ (nmol•h/kg or L)	C_{max} (nmol/kg or L)	$t_{1/2}$ (h)
Lung (FA+1%AT)	1694	622	1	-	-	-
Lung (FA+1%FT)	1443	720	1	-	-	-
Lung (AT)	-	-	-	2309	927	3
Lung (FT)	-	-	-	333	257	2
Serum (FA+1%AT)	133	86	2	-	-	-
Serum (FA+1%FT)	148	66	2	-	-	-
Serum (AT)	-	-	-	1856	1120	1
Serum (FT)	-	-	-	371	239	2
Urine (FA+1%AT)	1407	448	1	-	-	-
Urine (FA+1%FT)	1226	419	1	-	-	-
Urine (AT)	-	-	-	17297	5845	1
Urine (FT)	-	-	-	9234	3204	0.3

Additional information: AT = amikacin TAMRA. FA = free amikacin. FT = free tobramycin. NA = Not applicable. Lung tissue sections examined using fluorescence microscopy substantiated the observed changes in the pulmonary PK profiles in that FT is cleared from the lung much faster than AT. Micrographs taken from corresponding tissue sections after fixation showed that the fluorescence intensity and distribution patterns were largely preserved for the AT-treated animals. However, all fluorescence intensity was lost from tissue sections collected from FT-treated animals after fixation.
This study had the same design as AMIK-BIO-2009-25-PCLN; Module 2.6.5.5.1 in order to determine the reproducibility of the results. Comparable to AMIK-BIO-2009-25-PCLN, it was concluded that the *in vivo* stability and kinetic profile of AT are sufficiently similar to amikacin following inhalation that AT can be used as a mimetic of amikacin in biodistribution studies.

2.6.5.5.3 ラットに DiIC$_{18}$(5)DS リポソームを吸入投与した後の肺組織内分布

Test Article: ALIS

Report No: AMIK-BIO-2009-26-PCLN

Species:	Rat
Gender (M/F)/Number of animals:	F/16
Feeding condition:	Fed
Vehicle/Formulation:	NaCl 1.5%/ALIS labeled with ca. 0.5 mol% DiIC$_{18}$(5)DS (based on total lipids) (70 mg Amikacin/mL – for 200 minutes)
Method of Administration:	Inhalation
Dose (mg/kg):	90
Radionuclide:	NA
Specific Activity:	NA
Sampling time:	IPD and 2, 4 and 24 h post-dose

Tissues/organs	**Amikacin**			
	$AUC_{0\text{-}24h}$ (µg•h/g or mL)	**C_{max} (µg/g or mL)**	**C_{min} (µg/g or mL)**	**$t_{1/2}$ (h)**
Lung	13941	910	529	2
Serum	101	33	0	ISD
Urine	4246	306	80	ISD

Additional information: ISD = Insufficient data to calculate $t_{1/2}$. NA = Not applicable. Microscopic evaluation of lung sections showed that liposomes were deposited throughout the lung; initially they were found in and around airways and later within macrophages surrounding airways and in the alveolar spaces. There was little loss (2%) of the labeled liposomes 24 h post dosing.
It was concluded that a single inhaled dose of ALIS results in uniform deposition of liposomes throughout the lungs. The clearance of liposomes (lipids) from the lung was minimal 24 h post dosing.

2.6.5.5.4 ラットに DiIC18(5)DS リポソームを吸入投与した後の肺組織内分布

Test Article: ALIS

Report No: AMIK-BIO-2009-28-PCLN

Species:	Rat
Gender (M/F)/Number of animals:	F/28
Feeding condition:	Fed
Vehicle/Formulation:	NaCl 1.5%/ALIS labeled with ca. 0.5% $DiIC_{18}(5)DS$ (based on total lipids) (approximately 70 mg Amikacin/mL for 90 minutes)
Method of Administration:	Inhalation
Dose (mg/kg):	90
Radionuclide:	NA
Specific Activity:	NA
Sampling time:	IPD and 4, 24, 72, 168, 336, 504, and 672 h post-dose

Tissues/organs	**Amikacin**				
	$AUC_{0\text{-}24h}$ (µg•h/g or mL)	**$AUC_{0\text{-}672h}$ (µg•h/g or mL)**	**C_{max} (µg/g or mL)**	**C_{min} (µg/g or mL)**	**$t_{1/2}$ β (h)**
Lung	8532	99696	712	54	420
Serum	89	89	36	0	ISD
Urine	2531	2579	205	0	ISD

Additional information: ISD = Insufficient data to calculate $t_{1/2}$. NA = Not applicable. The fluorescence of $DiIC_{18}(5)DS$ IPD was equally distributed throughout the left lobe primarily in the airways and alveolar spaces. From 4 h to 28 days post dosing, the fluorescence of $DiIC_{18}(5)DS$ in the left lobe was predominately intracellular and interstitial without any apparent decrease in fluorescence intensity. However, the area of fluorescence started to decrease by Day 14 to Day 28 post dosing which paralleled the loss of $DiIC_{18}(5)DS$ from the lungs.
It was concluded that the labeling of liposomes with $DiIC_{18}(5)DS$ did not alter the pharmacokinetics of amikacin as it was similar to unlabeled ALIS (AMIK-BIO-2009-24-PCLN; Module 2.6.5.13.1). $DiIC_{18}(5)DS$-labeled liposomes were observed around the small and large airways soon after inhalation ended and throughout the entire lung after 4 h. IPD, most of the fluorescence of $DiIC_{18}(5)DS$ appeared to be intracellular (macrophages) and remained intracellular during the 28-day post-dose period. There was no evidence of $DiIC_{18}(5)DS$ fluorescence in the serum or urine which is consistent with the slow clearance of $DiIC_{18}(5)DS$ from the lungs.

2.6.5.5.5 ラットに蛍光脂質 DiIC18(5)DS を吸入投与した後の肺組織内分布

Test Article: ALIS

Report No: AMIK-BIO-2009-31-PCLN

Species:	Rat
Gender (M/F)/Number of animals:	F/28
Feeding condition:	Fed
Vehicle/Formulation:	NaCl 1.5%/70 μM DiIC18(5)DS
Method of Administration:	Inhalation (administered for 150 minutes)
Dose (mg/kg):	0.115
Radionuclide:	NA
Specific Activity:	NA
Sampling time:	IPD and 4 h post-dose and 1, 3, 7, 14, 21, and 28 days post-dose

	$AUC_{0\text{-}24\ h}$ (μg•h/g)	$AUC_{0\text{-}672\ h}$ (μg•h/g)	C_{max} (μg/g)	C_{min} (μg/g)
DiIC18(5)DS-Micellar				
Lung	120	2275	6.0	2.5
DiIC18(5)DS-Labeled ALIS Liposomes				
Lung	137	3190	6.9	1.5

Additional information: NA = Not applicable. It was determined that the apparent "free" DiIC18(5)DS solution was a solution of micelles; however, PK parameters were similar for DiIC18(5)DS-Labeled ALIS Liposomes. It was also demonstrated that like amikacin and ALIS, micellar DiIC18(5)DS was equally distributed throughout the lungs and cleared uniformly from the lungs. However, clearance of micellar DiIC18(5)DS from the lungs was more rapid than the clearance of DiIC18(5)DS-labeled ALIS.

2.6.5.5.6 ラットに Arikace™を吸入投与した後のリポソーム脂質及びアミカシンの肺組織内分布

Test Article: ALIS

Report No: AMIK-BIO-2009-29-PCLN

Species:	Rat
Gender (M/F)/Number of animals:	F/14
Feeding condition:	Fed
Vehicle/Formulation:	NaCl 1.5%/ALIS labeled with ca. 0.2% $DiIC_{18}(5)DS$ (based on total lipids) and 0.2% AT (based on total amikacin) (70 mg Amikacin/mL – administered for 93 minutes)
Method of Administration:	Inhalation
Dose (mg/kg):	90
Radionuclide:	NA
Specific Activity:	NA
Sampling time:	IPD and 2, 4, and 24 h post-dose

Tissues/organs	**Amikacin**			
	AUC_{0-24h} (µg•h/g or mL)	**C_{max} (µg/g or mL)**	**C_{min} (µg/g or mL)**	**$t_{1/2}$ α (h)**
Lung	10015	611	339	5
Serum	131	43	2	ISD
Urine	4049	322	4	ISD

Additional information: AT = amikacin TAMRA. ISD = Insufficient data to calculate $t_{1/2}$. NA = Not applicable. Inhalation of dual fluorescently labeled ALIS resulted in the uniform deposition of amikacin and liposomes throughout the lung, including the deep lung based on panoramic fluorescent images of the left lung. Microscopic evaluations over a 24-h period post dosing revealed that $DiIC_{18}(5)DS$ within the liposomes was primarily sequestered in the macrophages within the alveolar spaces and lung parenchyma. The fluorescence of AT was more diffuse than that for $DiIC_{18}(5)DS$ suggesting release of AT from liposomes or macrophages. The fluorescence of AT was co localized with that of $DiIC_{18}(5)DS$. The concentrations of amikacin and AT in the lungs paralleled each other in deposition and retention. It was concluded that uniform deposition of amikacin and liposomes was evident following a single 90 mg/kg dose of dual fluorescently labeled ALIS.

2.6.5.5.7 ラットに Arikace™を吸入投与した後のリポソーム脂質及びアミカシンの肺組織内分布

Test Article: ALIS

Report No: AMIK-BIO-2009-32-PCLN

Species:	Rat
Gender (M/F)/Number of animals:	F/28
Feeding condition:	Fed
Vehicle/Formulation:	NaCl 1.5%/ALIS labeled with ca. 0.2% (w/w) $DiIC_{18}(5)DS$ (based on total lipids) and 0.2% AT (based on total amikacin)
Method of Administration:	Inhalation
Dose (mg/kg):	90 (70 mg Amikacin/mL – administered for 98 minutes)
Radionuclide:	NA
Specific Activity:	NA
Sampling time:	IPD, 4 and 24 h post-dose, and on Days 3, 7, 14, 21, and 28 post-dose

2.6.5.5.7 ラットに Arikace™を吸入投与した後のリポソーム脂質及びアミカシンの肺組織内分布（続き）

Test Article: ALIS

Report No: AMIK-BIO-2009-32-PCLN, continued

Tissues/organs	Amikacin				
	$AUC_{0\text{-}24h}$ (µg•h/g or mL)	**$AUC_{0\text{-}672h}$ (µg•h/g or mL)**	**C_{max} (µg/g or mL)**	**C_{min} (µg/g or mL)**	**$t_{1/2}$ β (h)**
Lung	13530	157974	1108	97	~375
Serum	200	200	46	0	ISD
Urine	3582	3750	286	0	ISD
	AT				
Lung	23	315	1.66	0.23	~365
	$DiIC_{18}(5)DS$				
Lung	33	730	1.70	0.90	>672

Additional information: AT = amikacin TAMRA. ISD = Insufficient data to calculate $t_{1/2}$. NA = Not applicable. Microscopic evaluation of lung sections of the caudal lobe using fluorescence microscopy showed that IPD both AT and $DiIC_{18}(5)DS$ were distributed throughout the lung and were essentially co localized. Large quantities of both materials were found in the lumen of the airways at < 4-h post dosing whereas both materials moved further into peripheral lung tissues at > 24-h post dosing (presumably within macrophages). By Day 3 and continuing through Day 28 post dosing, the microscopic evaluation was consistent with the different clearance kinetics of these substances.
It was concluded that following a single 90 mg/kg dose of dual-labeled ALIS in rats, uniform deposition of amikacin, AT, and $DiIC_{18}(5)DS$ were observed throughout the lung. Amikacin and AT were cleared from the lungs in a biphasic manner over the 28-day post-dose period whereas $DiIC_{18}(5)DS$ was cleared more slowly in an apparent linear manner.

2.6.5.6　　薬物動態試験：タンパク結合

ALIS の血漿タンパク結合試験は実施しなかった。

2.6.5.7　　薬物動態試験：妊娠又は授乳動物における試験

ALIS を用いた妊娠又は授乳動物における試験は実施しなかった。

2.6.5.8 薬物動態試験：その他の分布試験（反復投与）

2.6.5.8.1 ラットに Arikace™を反復吸入投与した後のリポソーム脂質及びアミカシンの肺組織内、血漿、または尿における分布及び消失

Test Article: ALIS

Report No: AMIK-BIO-2009-33-PCLN

Species:	Rat
Gender (M/F)/Number of animals:	F/76
Feeding condition:	Fed
Vehicle/Formulation:	NaCl 1.5%/ ALIS labeled with ca. 0.2% (w/w) of a fluorescent lipid $DiIC_{18}(5)DS$ (DiI, based on total lipids) and a fluorescent Amikacin analogue 0.2% (Amikacin-TAMRA) (AT, based on total amikacin). Amikacin concentrations: 70 mg/mL
Method of Administration:	Inhalation
Dose (mg/kg):	10 (administered 9-13 minutes); 90 (administered 79-113 minutes)
Radionuclide:	NA
Specific Activity:	NA
Sampling time:	IPD, 4 and 24 h, and 3, 7, and 14 days post-inhalation (Groups 2 and 4); IPD, 4 and 24 h, and 3, 7, 14, 21, and 28 days post-inhalation (Groups 3 and 4)

Group	No. of Rats	Test Article x 27 Days	Test Article on Day 28
1	12	90 mg/kg ALIS	90 mg/kg ALIS
2	12	10 mg/kg ALIS	90 mg/kg ALIS
3	24	90 mg/kg ALIS	90 mg/kg dual-labeled ALIS
4	24	10 mg/kg ALIS	90 mg/kg dual-labeled ALIS

2.6.5.8.1 ラットに Arikace™を反復吸入投与した後のリポソーム脂質及びアミカシンの肺組織内、血漿、または尿における分布及び消失（続き）

Test Article: ALIS

Report No: AMIK-BIO-2009-33-PCLN, continued

	Amikacin, AT, and DiI (µg•h/g for lung or nM•h for serum or urine [AUC], µg/g or mL [C_{max} and C_{min}])				
	Amikacin				
Tissues/organs	**AUC_{0-24h}**	**AUC_{0-672h}**	**C_{max}**	**C_{min}**	**$t_{1/2}$ β (h)**
Lung (Group 3)	97700	1080000	4409	424	254
Lung (Group 4)	29226	494514	2205	441	131
Serum (Group 3)	118	1246	25	0	ISD
Serum (Group 4)	94	514	35	0	ISD
Urine (Group 3)	3032	11132	217	4	ISD
Urine (Group 4)	4604	7304	385	4	ISD

2.6.5.8.1 ラットに Arikace™を反復吸入投与した後のリポソーム脂質及びアミカシンの肺組織内、血漿、または尿における分布及び消失（続き）

Test Article: ALIS

Report No: AMIK-BIO-2009-33-PCLN, continued

Tissues/organs	Amikacin, AT, and DiI (µg•h/g for lung or nM•h for serum or urine [AUC], µg/g or mL [C_{max} and C_{min}])				
	AT or DiI				
	AUC_{0-24h}	AUC_{0-672h}	C_{max}	C_{min}	$t_{1/2}$ β (h)
Lung (AT-Group 3)	35	530	2.0	0.5	412
Lung (AT-Group 4)	46	801	3.3	0.8	638
Lung (DiI-Group 3)	114	953	1.8	1.2	NA
Lung (DiI-Group 4)	138	1262	2.8	1.7	NA
Serum (AT-Group 3)	0.12	NA	25	0	NA
Serum (AT-Group 4)	0.12	NA	35	0	NA
Serum (DiI-Group 3)	NA	NA	NA	NA	NA
Serum (DiI-Group 4)	NA	NA	NA	NA	NA
Urine (AT-Group 3)	2.3	7.4	177	2	NA
Urine (AT-Group 4)	2.4	7.5	183	0	NA
Urine (DiI-Group 3)	0	0	0	0	NA
Urine (DiI-Group 4)	0	0	0	0	NA

Additional information: AT = amikacin TAMRA. ISD = insufficient data to calculate parameter; NA = not applicable. As previously observed, there was uniform distribution of AT and DiI throughout the lung as well as uniform clearance (amikacin > DiI). At 4-h post-dosing, there was an abundance of co-localization of both fluorescence probes, which suggested that ALIS was engulfed by macrophages. The fraction of ALIS remaining in the lung after inhalation was sequestered primarily by alveolar and interstitial macrophages and retained in the lung with an apparent half-life (β) of > 230 h.

It was concluded that the results of this study were comparable to those in single-dose studies in rats (i.e., there was uniform deposition of amikacin and liposomes throughout the entire lung followed by uniform clearance of amikacin following almost 1 month of daily inhalation dosing of ALIS in rats).

2.6.5.9　　薬物動態試験：代謝：*In Vivo*

ALIS の *in vivo* 代謝試験は実施しなかった。

2.6.5.10　薬物動態試験：代謝：*In Vitro*

ALIS の *in vitro* 代謝試験は実施しなかった。

2.6.5.11　薬物動態試験：推定代謝経路

ALIS の推定代謝経路に関する試験は実施しなかった。

2.6.5.12　薬物動態試験：薬物代謝酵素の誘導／阻害

ALIS による薬物代謝酵素の誘導あるいは阻害についての試験は実施しなかった。

2.6.5.13 薬物動態試験：排泄

2.6.5.13.1 ラットに Arikace™及び遊離アミカシンを単回吸入投与した後の組織内分布及び消失

Test Article: ALIS

Report No: AMIK-BIO-2009-24-PCLN and AMIK-BIO-2009-30-PCLN

Species	Rat	Rat
Gender (M/F)/Number of animals	F/28	F/52
Feeding condition	Fed	Fed
Vehicle/Formulation	NaCl 1.5%/ALIS, FA (70 mg Amikacin/mL)	NaCl 1.5%/ALIS, FA (70 mg Amikacin/mL)
Method of Administration	Inhalation (150-170 minutes)	Inhalation (72-94 minutes)
Dose (mg/kg)	90	90
Analyte	Amikacin	Amikacin
Assay	TD_x	TD_x

Excretion route	**Urine (ALIS/FA)**	**Serum (ALIS/FA)**	**Lung (ALIS/FA)**	**Urine (ALIS/FA)**	**Serum (ALIS/FA)**	**Lung (ALIS/FA)**
$AUC_{0\text{-}24h}$ (µg•h/g or mL)	4170/5496	159/196	9312/3913	7533/4012	486/490	12607/5418
$AUC_{0\text{-}504h}$ (µg•h/g or mL)	NA	NA	NA	8445/4924	661/582	112855/42498
C_{max} (µg/g or mL)	263/336	26/68	700/650	737/293	57/42	1179/680
C_{min} (µg/g or mL)	56/70	0/0	304/78	0/0	0/0	110/12
$t_{1/2}$(h)	ISD/ISD	ISD/ISD	7/2	ISD/ISD	ISD/ISD	5/3

Additional Information: FA = free amikacin. ISD = Insufficient data to calculate parameter. NA = not applicable. PK parameters are shown for both ALIS and FA (ALIS/FA). These studies had the same study design except that AMIK-BIO-2009-24-PCLN included a 24-h post-dose period compared to a 504-h post-dose period for AMIK-BIO-2009-30-PCLN.

2.6.5.14　薬物動態試験：排泄：胆汁中

ALIS の胆汁中排泄についての試験は実施しなかった。

2.6.5.15　薬物動態試験：薬物相互作用

ALIS の薬物動態学的薬物相互作用試験は実施しなかった。

2.6.5.16　薬物動態試験：その他

ALIS のその他の薬物動態試験は実施しなかった。