# 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
## 2.6.6 毒性試験の概要文

インスメッド合同会社

# 目次

頁
略語一覧表 5
2.6.6 毒性試験の概要文 6
2.6.6.1 要約 6
2.6.6.2 単回投与毒性試験 14
2.6.6.3 反復投与毒性試験 15
2.6.6.3.1 概要 15
2.6.6.3.2 マウスを用いた反復投与毒性試験 15
2.6.6.3.2.1 マウスを用いた 13 週間吸入用量設定試験（2.6.7.6 項, [redacted] Study No. 07-6307, CTD 4.2.3.2-1） 15
2.6.6.3.3 ラットを用いた反復投与毒性試験 16
2.6.6.3.3.1 ラットを用いた 28 日間反復吸入投与による探索的試験（2.6.7.6 項, [redacted] Study 667621, CTD 4.2.3.2-2） 17
2.6.6.3.3.2 ラットを用いた 30 日間吸入毒性試験（2.6.7.6 項, [redacted] Study 667396, CTD 4.2.3.2-3） 18
2.6.6.3.3.3 ラットを用いた 6 ヵ月間吸入毒性試験（2.6.7.7.1 項, [redacted] Study 07-6308, CTD 4.2.3.2-4） 19
2.6.6.3.4 イヌを用いた反復投与毒性試験 21
2.6.6.3.4.1 イヌを用いた 28 日間探索的試験（2.6.7.6 項, [redacted] Study 667637, CTD 4.2.3.2-5） 22
2.6.6.3.4.2 イヌを用いた 30 日間吸入毒性試験（2.6.7.6 項, [redacted] Study 667574, CTD 4.2.3.2-6） 23
2.6.6.3.4.3 イヌを用いた 3 ヵ月間吸入毒性試験（2.6.7.7.2 項, [redacted] Study 07-6306, CTD 4.2.3.2-7） 24
2.6.6.3.4.4 イヌを用いた 9 ヵ月間吸入毒性試験（2.6.7.7.3 項, [redacted] Study 11-6400, CTD 4.2.3.2-8） 25
2.6.6.4 遺伝毒性試験 28
2.6.6.4.1 非哺乳動物細胞系での *In Vitro* 試験 28
2.6.6.4.1.1 細菌を用いた復帰突然変異試験（2.6.7.8.1 項, [redacted] Study 7522-100, CTD 4.2.3.3.1-1） 28
2.6.6.4.2 哺乳動物細胞系での *In Vitro* 試験 28
2.6.6.4.2.1 マウスリンフォーマ T*k* 試験（2.6.7.8.2 項, [redacted] Study 7522-102, CTD 4.2.3.3.1-2) 28
2.6.6.4.2.2 チャイニーズハムスター卵巣細胞を用いた染色体異常試験（2.6.7.8.3 項, [redacted] Study 7522-101, CTD 4.2.3.3.1-3） 29
2.6.6.4.3 哺乳動物系での *In Vivo* 試験 29
2.6.6.4.3.1 ラットを用いた小核試験（2.6.7.9 項, [redacted] Study 07-6315, CTD 4.2.3.3.2-1） 29
2.6.6.4.3.2 他の器官 30
2.6.6.5 がん原性試験 31
2.6.6.5.1 長期試験 31

2.6.6.5.1.1　ラットを用いた 2 年間吸入投与がん原性試験（2.6.7.10 項, [redacted] Study 09-6345, CTD 4.2.3.4.1-1）.....31
2.6.6.5.2　短期又は中期試験.....34
2.6.6.5.3　その他の試験.....34
2.6.6.6　生殖発生毒性試験.....35
2.6.6.6.1　受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験.....35
2.6.6.6.2　胚・胎児発生に関する試験.....35
2.6.6.6.3　出生前及び出生後の発生に関する試験.....35
2.6.6.6.4　幼若動物を用いた試験.....35
2.6.6.6.4.1　幼若ラットを用いた 28 日間反復吸入投与予備試験（2.6.7.15.1 項, [redacted] Study 14-6480, CTD 4.2.3.5.4-1）.....36
2.6.6.6.4.2　幼若ラットを用いた 28 日間反復吸入投与毒性試験（2.6.7.15.2 項, [redacted] Study 14-6002, CTD 4.2.3.5.4-2）.....36
2.6.6.7　局所忍容性.....37
2.6.6.8　その他の毒性試験.....38
2.6.6.8.1　抗原性試験.....38
2.6.6.8.2　免疫毒性試験.....38
2.6.6.8.2.1　14 日間反復吸入投与による肺マクロファージの機能に関する試験（2.6.7.17.1 項, [redacted] Report AMIK-BRD-2005-19-TOX, CTD 4.2.3.7.2-1）.....38
2.6.6.8.2.2　3 サイクル吸入投与による肺胞マクロファージの機能に関する 6 ヵ月間試験（2.6.7.17.1 項, [redacted] Report AMIK-BIO-2009-16-MAC, CTD 4.2.3.7.2-2）.....38
2.6.6.8.3　機序試験.....40
2.6.6.8.4　依存性試験.....40
2.6.6.8.5　代謝物試験.....40
2.6.6.8.6　不純物試験.....40
2.6.6.8.6.1　不純物評価のための細菌を用いた復帰突然変異試験（2.6.7.17.2 項, [redacted] Study No. HUD0381, CTD 4.2.3.7.6-1）.....40
2.6.6.8.6.2　不純物X*評価のためのラットを用いた 14 日間反復投与毒性試験（2.6.7.17.2 項, [redacted] Study No. TQ72SR, CTD 4.2.3.7.6-2）.....41
2.6.6.8.7　その他の試験.....42
2.6.6.9　考察及び結論.....44
2.6.6.10　参考文献.....49

## 表一覧

表 2.6.6- 1　毒性試験一覧.....8
表 2.6.6- 2　ラットを用いた ALIS の反復吸入投与毒性試験における定常状態のアミカシン全身曝露量の平均値のヒトとの比較.....17
表 2.6.6- 3　ラットを用いた ALIS の反復吸入投与毒性試験における定常状態の肺中アミカシン濃度の平均値のヒトとの比較.....17



＊新薬承認情報提供時に置き換え

表 2.6.6- 4　イヌを用いた ALIS の反復吸入投与毒性試験における定常状態のアミカシン全身曝露量平均値のヒトとの比較 ..... 21
表 2.6.6- 5　イヌを用いた反復吸入投与毒性試験における定常状態の肺中アミカシン濃度平均値とヒトとの比較 ..... 22
表 2.6.6- 6　ラットを用いた ALIS 吸入がん原性試験における定常状態のアミカシン全身曝露量の平均値のヒトとの比較 ..... 32
表 2.6.6- 7　ラットを用いた ALIS 吸入がん原性試験：肺及び膵臓腫瘍の発現状況（雄） ..... 33
表 2.6.6- 8　ラットを用いた ALIS 吸入がん原性試験：肺腫瘍の発現状況（雌） ..... 33
表 2.6.6- 9　ラットを用いた 2 週間試験における算出した肺不純物X*濃度のヒトとの比較 ..... 42
表 2.6.6- 10　反復投与毒性試験にて算出された肺中 DPPC 濃度のヒトとの比較 ..... 43
表 2.6.6- 11　反復投与毒性試験にて算出された肺中コレステロール濃度のヒトとの比較 ..... 43
表 2.6.6- 12　反復投与毒性試験にて算出された肺中 NaCl 濃度のヒトとの比較 ..... 43
表 2.6.6- 13　ラット及びイヌを用いた主要な反復吸入毒性試験における推定肺中濃度（平均値）のヒトとの比較 ..... 44
表 2.6.6- 14　各動物種の肺関連パラメータ [a] ..... 47



＊新薬承認情報提供時に置き換え

## 略語一覧表

| 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 |
| AM | alveolar macrophages：肺胞マクロファージ |
| AUC | area under the concentration-time curve：濃度 - 時間曲線下面積 |
| BA | bronchiolo-alveolar：細気管支肺胞 |
| BALF | bronchoalveolar lavage fluid：気管支肺胞洗浄液 |
| CAC | Carcinogenicity Assessment Committee：発がん性評価委員会 |
| 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 |
| DPPC | Dipalmitoylphosphatidylcholine：ジパルミトイルホスファチジルコリン |
| *E coli* | *Escherichia coli*：大腸菌 |
| EMA | European Medicines Agency：欧州医薬品庁 |
| ELC | Empty Liposomes Control：空リポソーム対照 |
| 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：米国食品医薬品局 |
| 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 quantification：定量下限 |
| 不純物X* | [redacted]：[redacted] |
| LPS | Lypopolysaccharide：リポ多糖体 |
| MAC | *Mycobacterium avium* Complex |
| MN-PCE(s) | micronucleated polychromatic erythrocyte(s)：小核を有する多染性赤血球 |
| MMAD | median mass aerodynamic diameter：空気力学的質量中央粒子径 |
| 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 |
| PCE(s) | polychromatic erythrocyte(s)：多染性赤血球 |
| PMNs | polymorphonuclear cells：多形核白血球細胞 |
| PND | Postnatal Day：生後日数 |
| RRT | relative retention time：相対保持時間 |
| SLIT™ | Sustained release Lipid Inhalation Targeting™：徐放性脂質吸入標的化 |
| *S typhimurium* | *Salmonella typhimurium*：ネズミチフス菌 |
| TK | Toxicokinetics：トキシコキネティクス |



＊新薬承認情報提供時に置き換え

# 2.6.6 毒性試験の概要文

## 2.6.6.1 要約

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。

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。本概要文では、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）。

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。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された。

ALIS の非臨床毒性プロファイルは、一連の *in vitro* 及び *in vivo* 試験により特徴付けられた（表 2.6.6- 1）。本剤の製造販売承認のための主な毒性試験は、「医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施基準（GLP）」の規制を遵守して適切にデザイン、実施し、医薬品規制調和国際会議（ICH）ガイドライン M3(R2)「医薬品の臨床試験及び製造販売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（2009 年）」を遵守した。すべての重要な試験では製造販売予定の ALIS 製剤を用いた（初期の一部の試験では、類似した開発初期の ALIS 製剤を用いた）。製剤開発については 3.2.P.2 項を参照のこと。

イヌを用いた 1 ヵ月間試験を除き、目標用量を用いて結果を示す。イヌを用いた 1 ヵ月間試験については、目標用量と実際に投与された用量が大幅に異なったため、実際に投与された用量を用いて記述する。

ヒトと動物間のアミカシンの用量の比較には、ヒトにおける本剤の最高用量である 590 mg を用いた。アミカシンのヒト肺曝露量については、ここでは、成人の肺重量の平均 1000 g を用いた。また、本概要書をとおしてアミカシンのヒト肺沈着係数を 43%とし、これは試験用 eFlow®ネブライザーを用いた本剤の吸入シンチグラフィー試験の結果に基づいた（Olivier, 2016、Clinical Study Report for TR02-112, Appendix 16.1.16.）。本文書に示すアミカシンの全身曝露には、血漿又は血清中濃度 - 時間曲線下面積（AUC）値（投与 0～4 時間後を $AUC_{last}$ として算出）を用い、ア

ミカシン肺中の曝露には、肺 1 g 当たりのアミカシン（mg）を示した（動物に対しては実測値又は計算値、ヒトに対しては上述の沈着係数 43%に基づく計算値）。

アミカシン原薬の不純物[redacted]及び 2 つの未知不純物に対する Ames 試験、ALIS 製剤に含まれる[redacted]（不純物X*）に対するラットの反復投与毒性試験を除き、アミカシン原薬又は ALIS 製剤の分解物における不純物のいずれも、以下に挙げる 1 つ以上の理由から、特段試験は不要と考えた：

- ICH 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［2006 年］」）に記述されている閾値未満であること。
- 内因性の ALIS 添加物（コレステロール、DPPC）に由来したものであること。
- 毒性試験で使用したロットに、臨床試験に用いたロットと同等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。

本剤に関連する不純物及び分解物についての詳細な情報は、2.6.7.8.6 項の表 4A 及び 4B、3.2.S.3.2 項、並びに 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。

また、本剤の製造に使用した、10 mL バイアル及びストッパーの構成成分並びに滅菌フィルター及びシリコンチューブの溶出／浸出試験から、ヒトに対する安全性の懸念事項は示されなかった（3.2.P.2.4 項及び 3.2.P.2.3 項）。

全体として、反復投与毒性試験では、鼻甲介（げっ歯類を用いた 1、3 及び 6 ヵ月試験及びイヌを用いた 9 ヵ月試験）及び肺（げっ歯類及びイヌを用いた全試験）の変化が一貫して認められた。げっ歯類では鼻部吸入、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を介して肺に本剤が送達されることから、動物での鼻甲介についての所見のヒトへの関連性は不明である。肺については、すべての動物種及び試験で泡沫肺胞マクロファージの集簇が一貫して認められた。関連する肺の所見は、黄褐色／白色病巣及び肺重量の増加であった。マクロファージの集簇は、吸入した薬剤／脂質製剤からの吸入粒子の排除に関連した適応性変化であり、無毒性量（NOAEL）設定の根拠となる毒性変化ではないと考えられた。ラットへの本剤の長期投与により 1 mg/g 肺重量を上回ると、肺に対する粒子高負荷が認められ、さらに炎症、過形成及び腫瘍形成（がん原性試験のみ）を含めた肺の変化を伴った。イヌでは本剤の 1 mg/g 肺重量を超える粒子高負荷においても、炎症、過形成又は腫瘍形成病変が認められなかったことから、これらの毒性変化はラット特異的と考えられた。また、承認済みの他のアミノグリコシド系抗菌剤の一般的安全性プロファイルと同様に腎症が認められた。

表 2.6.6- 1　毒性試験一覧

| Type of Study | Route of Administration | Test System |
|---|---|---|
| **Repeat Dose** | | |
| 28-Day Range Finding | Inhalation | Rat and Dog |
| 1-Month Toxicity | Inhalation | Rat and Dog |
| 3-Month Range Finding | Inhalation | Mouse |
| 3-Month Toxicity | Inhalation | Dog |
| 6-Month Toxicity | Inhalation | Rat |
| 9-Month Toxicity | Inhalation | Dog |
| **Genetic toxicity** | | |
| Ames | *In vitro* | *Salmonella and Escherichia coli* |
| Chromosomal Aberration | *In vitro* | Chinese Hamster Ovary Cells |
| Gene Mutation | *In vitro* | Mouse Lymphoma L5178Y Cell Line |
| Micronucleus | Inhalation | Rat |
| **Carcinogenicity** | | |
| 2-Year Carcinogenicity | Inhalation | Rat |
| **Reproductive and Developmental Toxicity** | | |
| 28-Day Range Finding | Inhalation | Juvenile Rat |
| 28-Day Toxicity | Inhalation | Juvenile Rat |
| **Other Toxicity Studies** | | |
| Immunotoxicity | Inhalation | Rat |
| Impurities | *In vitro* | *Salmonella and Escherichia coli* |
| Impurity | Inhalation | Rat |

ALIS の単回投与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反復投与吸入毒性試験の初回投与日のデータから、本剤の忍容性が良好であることが示された。これらの試験において初回投与日のアミカシンの最高投与量は、30 mg/kg（イヌ）から 135 mg/kg（ラット）の範囲であった。

本剤の反復投与吸入毒性試験は、ラットを用いた 6 ヵ月間試験（3 ヵ月に中間評価を実施）、イヌを用いた 3 ヵ月間試験、イヌを用いた 9 ヵ月間試験（6 ヵ月で生存所見の中間評価を実施）を実施し、各試験では回復期間を設けた。これらの試験を重要な試験と判断し、それ以外の試験は補足的試験とみなした。ラット及びイヌを用いた 1 ヵ月試験では、初期の ALIS 製剤を投与した。マウスを用いた 3 ヵ月間試験は、吸入投与のがん原性試験の用量設定のための試験であった（ただし、米国食品医薬品局［FDA］への相談後、吸入投与のがん原性試験は本剤の開発を裏付けるためには必要ではないと判断された）。1 ヵ月試験の結果は長期試験の結果と一致し、マウスを用いた結果はラット及びイヌを用いた結果と一致した（すべての試験において肺が主要な標的器官であった）。

ラットを用いた 6 ヵ月間鼻腔内反復吸入毒性試験では、1 日 1 回 ALIS をアミカシンとして 0（1.5% NaCl対照）、10、30及び90 mg/kg/日の用量を目標に吸入投与し、3ヵ月での中間評価（ラットを用いたがん原性試験の用量設定のために使用）及び 3 ヵ月間の回復期間を設けた。アミカシンの全身曝露（$C_{max}$及び$AUC_{last}$）は、用量依存的に増加し、試験期間中をとおして概ね同等であり、雌雄間で明らかな差は認められなかった。尿中及び肺中アミカシン濃度も用量依存的な増加を示した。定常状態の平均アミカシン $AUC_{last}$ 値はすべての用量でヒトを下回り、一方で平均肺中濃度は、ヒトにおける肺沈着係数 43%に基づくと成人の 5～12 倍の範囲であった。回復期間後、平均尿中濃度は26週間の投与後の値の0.2%以下、平均肺中濃度は2%以下となった。この結果から、投与中止後には、肺から速やかにアミカシンが排除されることが示された。本試験では、本剤のすべての用量で忍容性は良好であった。生存中の所見では、90 mg/kg/日群の雄の体重及び摂餌量の減少、並びに、26 週間投与終了後の臨床検査パラメータの一部に変化（例：30 及び／又は 90 mg/kg/日群の軽度～中等度の絶対好中球数の増加及び血清リンの増加［雌のみ］）が認められた。肺におけるマクロファージの集簇は、投与 3 ヵ月及び 6 ヵ月終了後の剖検時のすべての用量での主な所見であった。両時点の重症度は同様であった（10 mg/kg/日群で軽度、30 mg/kg/日群の大多数で中等度、90 mg/kg/日群の大多数で顕著）。マクロファージの集簇は、すべての用量で肺重量の増加と関連し、30 及び 90 mg/kg/日群では肺の顕著な黄褐色ないし白色の病巣が認められた。肺におけるこれらの所見は、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、これまでに他の吸入粒子について文献報告されている。上述の適応性変化に加え、10、30及び90 mg/kg/日群のマクロファージの集簇は、30及び90 mg/kg/日群で肺胞上皮の再生過形成を伴う亜急性／慢性活動性炎症の多発性病巣が認められた。肺での炎症性及び過形成変化は、ALIS（製剤／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た。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。10、30 及び／又は 90 mg/kg/日群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。90 mg/kg/日群では、尿細管皮質性腎症の発現頻度及び／又は重症度が上昇した。12週の回復期間後にも一部の変化が依然として認められたが、病理組織学的検査から、10 mg/kg/日群でほぼ完全な回復、30 及び 90 mg/kg/日群で回復傾向が示された。90 mg/kg/日群の肺に 3 ヵ月又は 6 ヵ月間投与終了後にはみられなかった所見が複数認められた（ラット2匹の軽微な肺胞繊維症及び4匹の軽微な臓側胸膜被膜の亜急性／慢性炎症／線維症）。これらの変化は、本剤の肺での粒子高負荷による炎症及び増殖反応の後遺症と考えられた。上気道の変化に対する NOAEL は 10 mg/kg/日未満と判断された。マクロファージの浸潤を伴う亜急性／慢性の炎症及び／又は肺胞上皮過形成に基づき、肺の変化に対する NOAEL は 10 mg/kg/日未満と判断された。腎臓（アミノグリコシド系抗菌剤の既知の標的器官）の腎症に対する NOAEL は 30 mg/kg/日とされた。

イヌでの3ヵ月間吸入毒性試験は、ALISをアミカシンとして0（1.5% NaCl対照）、5、10及び30 mg/kg/日を目標用量に、フェイスマスクを用いて 1 日 1 回投与を行い、2 ヵ月間の回復期間を設けた。アミカシンの 全身曝露量（$C_{max}$及び$AUC_{last}$）は用量依存的に増加し 89 日目の曝露量は 1 日目と比較して高値であった。アミカシンの曝露量に関して明らかな性差は認められなかった。尿中及び肺中アミカシン濃度も用量比例的に増加した。定常状態のアミカシン $AUC_{last}$ 平均値は、

すべての用量でヒトを下回った。肺中の平均アミカシン濃度は、43%の肺沈着係数に基づくと成人の 5～21 倍の範囲であった。2 ヵ月の回復期間後の尿中及び肺中濃度は、3 ヵ月間投与後の濃度と比較して大きく減少した（尿中で 3%以下、肺中で 5～32%）。本試験中、すべての用量で本剤の忍容性は良好であり、生存中、投与に関連した毒性所見は認められなかった。ラットと同様に、剖検後の主な所見は、肺におけるすべての用量での泡沫肺胞マクロファージの集簇（適応性変化と考えられた）であった。最高用量の 30 mg/kg/日では、マクロファージの集簇が肺重量の増加と関連していた。この重症度は、5 mg/kg/日群で軽微～軽度、10 mg/kg/日群で軽度～中等度、30 mg/kg/日群で重度であった。すべてのイヌにおいて、いずれの用量でも、本剤による肺の粒子負荷が比較的高い場合（肺重量 1 g 中 1 mg 超）であっても、肺の炎症性、過形成性又は前がん性の変化は認められなかった。また、すべての用量群の雄、10 及び 30 mg/kg/日群の雌では、流入リンパ節に泡沫マクロファージが認められた。30 mg/kg/日群では、腎臓の近位尿細管内に軽微～軽度の好酸性物質の増加が認められた。2 ヵ月間の回復期間終了後、肺の変化の回復は部分的であったが、他の投与に関連した変化はすべて完全に回復した。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。腎臓での変化に対する NOAEL は、30 mg/kg/日で好酸性物質が増加したことに基づき、10 mg/kg/日と判断された。

イヌの 9 ヵ月間毒性試験は、ALIS をアミカシンとして 0（1.5% NaCl 対照群）、0（空リポソーム対照、ELC 群）、5、10 及び 30 mg/kg/日を目標用量に、フェイスマスクを用いて 1 日 1 回吸入投与した。6 ヵ月時点で中間評価を実施し（生存所見のみ）、3 ヵ月間の回復期間を設けた。本試験期間中にアミカシンの全身曝露量（$C_{max}$ 及び $AUC_{last}$）は用量依存的に増加した。アミカシンの全身曝露量に関して顕著な性差は認められず、蓄積性も示されなかった。投与 9 ヵ月後の肺中アミカシン濃度も用量依存的に増加し、顕著な性差は認められなかった。定常状態のアミカシンの $AUC_{last}$ 平均値はすべての用量でヒトを下回った。これに対し、肺中アミカシン濃度の平均値は、肺沈着係数 43%に基づくと成人の同平均値の 3～11 倍の範囲であった。3 ヵ月の回復期間終了後、高用量群の血清中アミカシン濃度は定量下限（LLOQ）未満、肺中アミカシン濃度は投与 9 ヵ月後よりも大きく低下した（1～24%以下）。これは、イヌでの 3 ヵ月間反復投与毒性試験の結果と同様であった。本試験において ALIS の忍容性は良好であった。生存中、投与に関連した毒性所見は認められなかった。剖検後の主な所見は、すべての用量での肺における泡沫マクロファージの集簇（ラット及びイヌを用いた他の反復投与試験で認められた想定された適応性変化）であった。これに関連して、肺重量の増加が 10 及び 30 mg/kg/日群で認められた。泡沫マクロファージは細胞質に塩基性顆粒を含む空胞化を呈することを特徴とした。重症度は、5 mg/kg/日群での軽微～軽度から 30 mg/kg/日群での中等度～重度であった。すべての用量で、肺の流入リンパ節に泡沫マクロファージが認められた。ELC 群のほとんどのイヌ及び 1.5% NaCl 群の雄 2 匹の肺にも軽微な泡沫マクロファージが認められた。しかし、ALIS 投薬群と比較して顕著な空胞化はみられず、塩基性顆粒を含まなかった。3 ヵ月間のイヌ試験の結果と同様に、被験物質に関連した炎症、過形成又は前がん性の肺の病変はいずれの用量でも、また、本剤による肺の粒子負荷が比較的高い場合でも認められなかった。他の病理学的所見では、5 mg/kg/日以上の群での軽微～中等度の鼻甲介上皮の変性、並びに 10 及び 30 mg/kg/日群の気管分岐部の上皮細胞における主として軽微な塩基性顆粒が挙げられた。これらの変化は、イヌに被験物質を投与するために使用した実験方法（フェイスマスク）に関連すると考えられ、ヒトへの関連性は不明である。すべての用量群の雄及び 10 mg/kg/日以上の群の雌で、腎臓の近位尿細管に細胞質内褐色色素の軽微～中等度の増加も認められた。3 ヵ月間の回復期間後（1.5% NaCl 群、ELC 群、30 mg/kg/日群）、

以下の所見がみられた：ALIS 投与群のイヌにおける肺重量の変化の一部回復（雌のみ）及び泡沫マクロファージの集簇の一部回復、ELC 群の泡沫マクロファージの集簇の完全な回復、並びに、ALIS 投与群のイヌにおける鼻甲介の変性の回復又は回復傾向、気管分岐部の塩基性顆粒のほぼ完全な回復、腎臓の近位尿細管の褐色色素の完全な回復及び気管気管支リンパ節におけるマクロファージの部分的な回復。本試験の NOAEL は、検討した最高用量の 30 mg/kg/日であった。

*Salmonella typhimurium*（ネズミチフス菌）及び *Escherichia coli*（大腸菌）を用いた *in vitro* での細菌を用いた復帰突然変異試験では、代謝活性下／非活性下のいずれも染色体異常誘発性は示されなかった。チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞を用いた *in vitro* 染色体異常試験において、代謝活性下／非活性下のいずれも染色体異常誘発性は認められなかった。これらの試験は、初期の ALIS 製剤を用いて実施したが、この試験成績は以下の理由により市販予定の ALIS 製剤に適用可能と考える：（1）初期の製剤は、脂質対薬剤比（3.3 対 1 vs. 0.7 対 1）が異なるものの、市販予定製剤と同一の有効成分及び添加物の成分（アミカシン硫酸塩、DPPC、コレステロール及び NaCl）を含有していること、（2）検討した濃度には、細胞毒性（Ames 試験）又は沈殿物の生成（CHO 試験）により制限があったこと。また、市販予定の ALIS 製剤を用いた試験（*in vitro* マウスリンフォーマ試験及びラットを用いた 3 日間吸入投与後の *in vivo* 小核試験）では、遺伝毒性は認められなかったこと。終了した一連の試験成績に基づき、本剤に遺伝毒性は認められないため、本剤がヒトに対して遺伝毒性リスクを与えることはないと結論づけた。追加の Ames 試験において、0.30%を上回る不純物 [redacted] 及び 2 つの不明な不純物を含有するアミカシン硫酸塩を評価したが、変異原性を示さなかった。

ALIS をアミカシン 0（NaCl 対照）、0（ELC）、5、15 及び 45 mg/kg/日の目標用量で 1 日 1 回ラットへ最長 104 週間吸入投与したときの忍容性は、雄では良好、雌では概ね良好であった（45 mg/kg/日群の雌では生存数が減少したため、96 週目から投与を中止した）。高用量群における雌の投薬の中止にもかかわらず、被験物質投与に関連した死亡率の上昇は認められず、投与に関連すると考えられた臨床所見は 45 mg/kg/日群の湿性ラ音のみであった（雌よりも雄で顕著）。最も多い死亡原因は下垂体腫瘍及び乳腺腫瘍並びに皮膚感染であったが、いずれも ALIS との関連は否定された。最高用量 45 mg/kg/日群の雌ラット 2 匹に肺の扁平上皮癌が認められた。これは SD 系ラットでは極めて稀な腫瘍性病変であり、当該実施施設において自然発生性病変としてこれまでに認められていないことから、本剤との関連性ありと判断された。認められた腫瘍は、約 2 年間の投与後の剖検時に観察されたため死亡原因ではなく、肺重量に基づき補正した場合、臨床用量の 6 倍以上の用量を約 2 年間投与されたことに相当した。文献では、ラットにおいて一定以上の閾値（1 mg/g 肺重量）を上回る粒子（非活性粒子を含む）の過負荷が長期に持続した場合、慢性炎症、過形成、化生及び最終的には腫瘍形成などの一連の進行性の有害な変化を引き起こすことが報告されている（Jones, 2012）。さらに、肺の扁平上皮癌は、肺のマクロファージの過負荷に関連することがラットにおいて知られている（Oberdörster, 1995）。ALIS のラットを用いた試験で認められた一連の毒性所見は、粒子の過負荷という概念に一致し、ALIS よる肺の粒子過負荷に伴う肺への有害な影響に対して閾値が存在することとも合致する。ラットで認められた腫瘍のヒトへの関連性は不明であるが、イヌを用いたいずれの試験においても、ALIS による粒子過負荷はラットと同等以上であったにも関わらず、毒性変化が認められていないことから、これらの変化はラットに特異的な変化と考えられる。さらに、ALIS は一連の遺伝毒性試験で陰性であり、本剤に直接的な遺伝毒性がないことが示された。また、本剤との関連性が不明な腫瘍性病変（用量反応なし及び／又は試験実施施設の背景値の範囲内）が、5 mg/kg/日群のラット 2

匹（雌雄各 1 匹）及び 45 mg/kg/日群の雄 1 匹の口蓋（扁平上皮癌）、45 mg/kg/日群のラット 2 匹（雌雄各 1 匹）の肺（細気管支／肺胞腺腫）、及び 45 mg/kg/日群の雄 10 匹の膵内分泌腫瘍（膵島細胞癌及び膵島細胞腺腫）（1.5% NaCl 群及び ELC 群では雄各 4 匹）に認められた。ALIS 投与群では、鼻腔、喉頭、流入領域リンパ節及び肺に非腫瘍性病変が認められ、ALIS によるラットを用いた過去の反復投与試験結果（鼻腔の上皮変性、喉頭の扁平上皮化生、肺及び流入領域リンパ節の泡沫マクロファージ）と概ね一致した。肺及び流入領域リンパ節は、ELC 群の標的組織でもあったが、発現頻度及び重症度は ALIS 群を概ね下回った。

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不要と判断した。

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（生後 10～37 日）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、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、大腿骨長及び病理組織学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。

肺胞マクロファージの機能に及ぼす ALIS の影響を評価するため、ラットを用いた GLP 非適合試験を 2 試験実施した。最初の試験では ALIS を 2 週間吸入投与し 1 ヵ月間回復期間を設ける試験（2 週間試験）、もう一方の試験では 1 ヵ月投与／1 ヵ月休薬を 1 サイクルとして 3 サイクル行った（6 ヵ月試験）。2 週間試験と 6 ヵ月試験間にマクロファージの機能に関して注目すべき差は認められなかったことから、本項では 6 ヵ月試験のみを考察する。しかし、2.6.6.8.2 項には両試験について記載する。6 ヵ月試験で用いたアミカシン 90 mg/kg/日の忍容性は良好であった。この試験結果から、肺で測定された濃度（3～4 mg/g 肺）において、各 1 ヵ月の投与期間後に観察された肺のマクロファージの集簇はその後の各 1 ヵ月の回復期間後に概ね回復した（反復投与試験の成績と一致）。この用量はヒトでの算出肺中濃度（0.254 mg/g 肺）の約 12～16 倍高い用量であり、ALIS が肺胞マクロファージの正常な細胞機能を阻害又は変性させないことが示された。

以上、ALIS の毒性試験の結果、ラット及びイヌの双方において肺及び腎臓が標的臓器であることが明らかとなった。ALIS の投与により、ラット及びイヌの双方において、吸入粒子に対する適応性変化である肺の泡沫肺胞マクロファージの集簇が認められた。しかし、高用量の長期投与により、ラットでは肺の炎症、前がん病変及び腫瘍形成（ラットを用いた 2 年間がん原性試験のみ）も認められたが、イヌでは認められなかった。ラットにおける肺の炎症及び増殖性病変は、

ALIS 吸入による長期曝露による肺の粒子過負荷に至る変化であり、非げっ歯類と比較してげっ歯類で特に感受性が高い事象と考えられた。ALIS を 45 mg/kg/日で最大 2 年間投与したラットの肺における投与に関連した扁平上皮癌のヒトへの関連性は不明である。しかし、ラットにおいて一定の閾値（1 mg/g 肺重量）を上回る粒子過負荷が長期間にわたり持続したことで発現する変化と、ALIS で観察されたような一連の進行性の毒性変化には関連性が認められる。そして、これらの事象がげっ歯類に特異的でありヒトで発現する可能性は低いことは、広く認識され文献でも報告されている。さらなる詳細なデータ及び考察は以下の当該項に記載する。

### 2.6.6.2 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。しかし、本剤の反復吸入毒性試験の初回投与日のデータ、すなわち、マウスを用いた 3 ヵ月吸入毒性試験（2.6.6.3.2.1 項）の 90 mg/kg/日、ラットを用いた 3 日間吸入毒性試験（小核試験、2.6.6.4.3.1 項）の 135 mg/kg/日、並びにイヌを用いた 3 ヵ月間吸入毒性試験（2.6.6.3.4.3 項）及び 9 ヵ月間吸入毒性試験（2.6.6.3.4.4 項）の 30 mg/kg/日において、ALIS の忍容性は良好であることが示された（注：ALIS の単回投与後の病理組織学的評価は実施しなかった）。

## 2.6.6.3 反復投与毒性試験

### 2.6.6.3.1　概要

マウス、ラット及びイヌを用いた 1 日 1 回吸入投与による反復投与毒性試験を実施した。これらの試験のすべての用量は、ALIS の有効成分であるアミカシンに基づいた（ラット及びイヌを用いた 28 日間探索試験及び 1 ヵ月間試験では、ALIS の初期製剤を使用した）。いずれの試験においても対照群には 1.5% NaCl 溶液（本剤の添加物）及び／又は空リポソーム（ELC；アミカシンを除くすべての本剤の構成成分を含有するリポソーム）を投与した。マウスを用いて、ALIS の毒性を評価し、マウスを用いた吸入によるがん原性の用量設定のために、3 ヵ月間吸入用量設定試験を実施した。しかしながら、FDA との相談の結果、本剤の開発をサポートする上で、マウスを用いたがん原性試験は不要であるとの合意に達した（注：トービイ®［トブラマイシン吸入液］のがん原性評価もラットのみであった）。これ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）。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 2.4.5.6.2 項に含めた。

FDA のポジションペーパーには、吸入経路により上気道で局所的に高曝露量となる製剤についてのがん原性の影響は、1 種類の動物種で評価できる旨が記述されている。ラット及びイヌを用いて、ALIS の探索的 28 日間吸入毒性試験を実施し、これらの動物種を用いた 1 ヵ月吸入毒性試験の用量選定を行った。ラットを用いた 6 ヵ月間吸入毒性試験の 3 ヵ月中間解析の結果を用いて、ラットを用いた 2 年間の吸入がん原性試験の用量選択を検討した。イヌを用いた追加試験として、3 ヵ月及び 9 ヵ月間吸入毒性試験実施した。28 日間探索試験を除き、すべての試験は GLP を遵守して実施した。

GLP 適用の反復投与毒性試験には、アミカシンの全身曝露量及び尿中及び／又は肺中アミカシン濃度の測定、動物における ALIS の全身毒性、及びヒトに対する潜在的リスクの十分な特性評価、投与終了後の薬剤に関連した影響からの回復性の評価（ラット及びイヌ）を含め、適用される ICH ガイドラインを遵守して実施した。

### 2.6.6.3.2　マウスを用いた反復投与毒性試験

#### 2.6.6.3.2.1　マウスを用いた 13 週間吸入用量設定試験（2.6.7.6 項, [redacted] Study No. 07-6307, CTD 4.2.3.2-1）

本 GLP 適用試験において、1 群雌雄各 10 匹のマウス 3 群に、ALIS をアミカシンとして 10、30 及び 90 mg/kg/日の目標用量で 1 日 1 回最長 90 分間の鼻部吸入により連続 13 週間投与した。対照群のマウスには、1.5% NaCl 溶液（本剤の溶媒、対照）を高用量群と同時間、吸入投与した。さらに、Day 1 及び Day 91 にトキシコキネティクス（TK）評価用の血清検体を得る目的で各投与群に雌雄各 36 匹を追加した。Day 91 には肺中のアミカシン濃度も測定した。被験用エアロゾルは、ヒト臨床用ジェットネブライザー（Heart®）を用いて作製した。本試験では以下の項目を評価した：チャンバー内エアロゾル濃度、生存性、一般状態の観察、眼科学的検査、体重、摂餌量、臨床病理検査、臓器重量、剖検及び病理組織学的検査。試験期間中の本剤の雄／雌への平均投与量は、目標用量と同様であった（11/12、31/32、92/95 mg/kg/日）。そのため、目標用量を用いて本

試験の結果を記載する。試験期間中の被験物質投与群における空気力学的質量中央粒子径（MMAD）の平均値は 4.3 µm 以下であった。

アミカシンの定常状態の全身曝露量（$C_{max}$ 及び $AUC_{last}$）及び肺中アミカシン濃度は、用量依存的に増加した。Day 91 では用量比を上回る増加を示した。高用量群の平均 $AUC_{last}$ は、590 mg の本剤を投与したヒトの $AUC_{last}$ とほぼ同等であったが、肺中濃度はヒトでの最大 9 倍と推定された。明らかな性差は認められなかった。

ALIS はすべての用量で忍容性は良好であった。体重及び摂餌量は高用量群のマウスで低かった。一時的な増加を示した一般状態の変化として、90 mg/kg/日群の数匹に粗毛、立毛、円背位、努力性呼吸及び乾性ラ音が認められた（主として雄に投与開始から数週間にみられた）。剖検後の注目すべき所見として、高用量群における肺重量の増加及びすべての用量で軽度な肺の泡沫肺胞マクロファージの集簇が認められた。さらに、一部の高用量群のマウスの肺に、複数の亜急性／慢性の活動性炎症の病巣が認められた。重症度は大多数が軽微であった。炎症性反応は、鼻部吸入による本剤の 1 日 1 回長期投与後の貪食機能に対する過負荷に伴うマクロファージの変性に対する反応であると考えられた。30 mg/kg/日以上の群では、鼻甲介の変性も認められ、本剤の 1 日 1 回鼻部投与の長期投与に伴う局所刺激性が示唆された。肺の変化に対する NOAEL は 30 mg/kg/日と判断された。これに対し、上気道刺激に対する NOAEL は 10 mg/kg/日と判断された。

### 2.6.6.3.3 ラットを用いた反復投与毒性試験

ラットを用いた反復投与吸入毒性試験では、1 ヵ月間及び 6 ヵ月間試験を実施し、6 ヵ月間投与試験では 3 ヵ月間投与後に詳細な中間評価を実施した。さらに、ラットを用いた 2 週間試験を実施し、より高含量の不純物X*を含む ALIS 製剤を評価した（2.6.6.8.6.2 項）。本試験で使用した分析法（Abbott $TD_X$）の定量下限（LLOQ）が 3 µg/mL であったため、1 ヵ月間吸入試験の定常状態の血漿中アミカシン $AUC_{last}$ の平均値は、最高用量の 100 mg/kg/日群でのみ得られた。これに対し、ラットを用いた 6 ヵ月間吸入試験では、液体クロマトグラフィー・タンデム質量分析（LC-MS/MS 法）（LLOQ：0.15 µg/mL）を使用したため、定常状態の血清中 $AUC_{last}$ 平均値は、3 ヵ月の中間評価後を含め、検討したすべての用量（10、30 及び 90 mg/kg/日）で得られた。表 2.6.6- 2 に 1 ヵ月間及び 6 ヵ月間試験における目標用量での $AUC_{last}$ 値を要約し、ヒトにおける $AUC_{last}$ 値と比較した。両試験の $AUC_{last}$ はヒトでの 590 mg よりも低値であったため、各試験で評価された最高用量のデータのみを示す。ラットではアミカシンの曝露量について明らかな性差は認められなかった。

表 2.6.6- 3 に示すとおり、ラットにおけるすべての目標用量において、定常状態の肺中アミカシン濃度はヒトよりも高いと推定された。ヒトにおける定常状態の肺中アミカシン濃度の算出方法の説明は 2.6.6.1 項を参照のこと。



＊新薬承認情報提供時に置き換え

表 2.6.6- 2　ラットを用いた ALIS の反復吸入投与毒性試験における定常状態のアミカシン全身曝露量の平均値のヒトとの比較

| SPECIES | STUDY | DOSE (mg/kg/day) | $AUC_{last}$ (µg•hr/mL) | MULTIPLE OF HUMAN AUC |
|---|---|---|---|---|
| Human[a] | ALIS clinical development program | 12 (50-kg adult) | 21 | - |
| Rat[b] | 1 month | 100 | 6.9 (Day 30) | < 1 |
| Rat[c] | 3 months | 90 | 10 (Day 86) | < 1 |
| Rat[c] | 6 months | 90 | 9 (Day 177) | < 1 |

[a] Module 2.7.2 (Summary of Clinical Pharmacology Studies); in the ALIS development program, the mean daily amikacin AUC at steady state after administration of ALIS at 590 mg in NTM (Nontuberculous Mycobacteria) patients is approximately 21 µg•hr/mL.
[b] Study 667396; data available for females only.
[c] Study 07-6308; combined-gender data at 3 months (interim evaluation) and 6 months.

表 2.6.6- 3　ラットを用いた ALIS の反復吸入投与毒性試験における定常状態の肺中アミカシン濃度の平均値のヒトとの比較

| 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 | 10 | 0.569 | 2.2 |
| | | 30 | 1.221 | 4.8 |
| | | 100 | 2.777 | 10.9 |
| Rat[c] | 6 months | 10 | 1.314 | 5.2 |
| | | 30 | 2.451 | 9.6 |
| | | 90 | 2.959 | 11.6 |

[a] Lung amikacin concentrations in humans were calculated as follows: 590 mg ALIS dose/1000 g (adult) lung weight × 0.43 (deposition factor).
[b] Study No. 667396; combined-gender data.
[c] Study No. 07-6308; combined-gender data.

### 2.6.6.3.3.1　ラットを用いた 28 日間反復吸入投与による探索的試験（2.6.7.6 項, [redacted] Study 667621, CTD 4.2.3.2-2）

本 GLP 非適用試験では、1 群雌雄各 4 匹のラット 2 群に、ALIS をアミカシン 10 及び 100 mg/kg/日の目標用量で 1 日 1 回最長 200 分間の鼻部吸入により 28 日間反復投与した。ネブライザーにより効率的に噴霧可能な最高濃度（75 mg アミカシン/mL）及び反復投与毒性試験での吸入時間に基づき、最高用量 100 mg/kg/日を選択した。対照群のラットには空リポソーム（ELC）を高用量群と同時間、吸入投与した。被験液エアロゾルは臨床用のジェットネブライザー（Heart®）を用いて作製した。本試験では以下の評価を行った：チャンバー内エアロゾル濃度、生存性、一般状態の観察、体重、摂餌量、臨床病理検査、トキシコキネティクス（血漿、肺、尿）、臓器重量（肺及び腎臓）、剖検及び病理組織学的検査（肺及び腎臓）。試験期間にわたるアミカシンの推

定投与量は 11 及び 118 mg/kg/日であった。試験期間中の投薬群の MMAD の平均値は 3.3 µm であった。

定常状態の血漿中アミカシンの濃度は、低用量群では Abbott $TD_X$ アミカシン試験の定量下限である 3 µg/mL を下回り、高用量群では投与後 15 分の時点で約 4～6 µg/mL の範囲であった。他の唯一の測定時点（投与後 3 時間）では定量可能な値は得られなかった。投与 1 ヵ月後の尿中及び肺中アミカシン濃度は用量依存的に上昇した。

本試験において ALIS の忍容性は良好であった。剖検後の注目すべき所見として、ELC 群と比較した ALIS 高用量群での肺重量の増加、ELC 群及び ALIS 低用量群における多巣性マクロファージの集簇、高用量群に軽度又は中等度のびまん性の泡沫肺胞マクロファージの集簇が認められた。これらの所見は、吸入した異物に対する肺のクリアランス反応であり、毒性所見ではないと判断された。腎臓では、高用量群の雄 1 匹に腎近位尿細管の軽度の再生／変性が認められた。このラットと高用量群の他の雄ラット 1 匹において、腎近位尿細管に軽微～軽度の硝子滴形成が認められた。本試験の結果に基づき、ラットを用いた 1 ヵ月間吸入毒性試験の用量として 10、30 及び 100 mg/kg/日を選択した。

### 2.6.6.3.3.2　ラットを用いた 30 日間吸入毒性試験（2.6.7.6 項, [redacted] Study 667396, CTD 4.2.3.2-3）

本 GLP 適用試験では、1 群雌雄各 10 匹のラット 3 群に、ALIS をアミカシンとして 10、30 及び 100 mg/kg/日の目標用量で 1 日 1 回最長 140 分間の鼻部曝露により 1 ヵ月間投与した。さらに対照群のラットに、空気、1.5% NaCl 又は ELC を高用量群と同時間、吸入投与した。別のラットの群に FA を高用量群と同様に 140 分間吸入投与した。1 群雌雄各 10 匹の追加群（空気対照群を除く）を投与期間終了 1 ヵ月後に評価し、さらに 1 群雌雄 9 匹を用いて（ALIS 群及び FA 群のみ）TK 評価を行った。被験液エアロゾルは、臨床用のジェットネブライザー（Heart®）を用いて作製した。本試験では以下の評価を行った：チャンバー内エアロゾル濃度、生存性、一般状態の観察、体重、摂餌量、眼科学的検査、臨床病理検査、TK（血漿、肺及び尿）、臓器重量、剖検及び病理組織学的検査。試験期間中のアミカシンの推定投与量は目標用量と同様であった（FA 群及び ALIS 群でそれぞれ 98、11、25、89 mg/kg/日）であった。そのため、目標用量を用いて本試験の結果を述べる。試験期間中のアミカシン群の MMAD の平均値は 2.9 µm.以下であった。

Day 15 及び Day 30 の定常状態の血漿中アミカシン濃度の平均値は、ALIS 低用量及び中用量群で LLOQ であり、FA 群で高用量群よりも幾分高値であった（FA 群の雄で 6.2 µg/mL 以下及び雌で 5.4 µg/mL 以下に対し、ALIS 高用量群の雄で 4.5 µg/mL 以下及び雌で 4.2 µg/mL）。高用量群では、$C_{max}$ 及び $AUC_{last}$ は雌のみで得られ、FA 群の雌よりも低値であった（それぞれ 4.2 µg/mL 及び 6.9 µg•hr/mL に対し、FA 群では 5.4 µg/mL 及び 15.5 µg•hr/mL）（注：Abbott $TD_X$ の分析感度の低さから、ALIS の低用量及び中用量の用量で、並びに 2 時間を超える時点［FA 群］及び 1 時間を超える時点［高用量群］では定量下限未満となった）。尿中アミカシン濃度は用量依存的に増加し、ALIS 群においては概ね用量比例的に増加した。Day 30 に尿中に排泄された総アミカシン量は、高用量群と比較して FA 群のほうが高かった（FA 群における血漿中濃度が高かったことと一致）。肺中アミカシン濃度の雌雄合算の平均値は、FA 群、低用量群、中用量群及び高用量群でそれぞれ約 1、0.6、1 及び 3 mg/g であった。そのため、目標用量 100 mg/kg/日で ALIS を投与したラットでは、FA 群と比較して肺に約 3 倍高いアミカシン濃度が保持された。

被験物質投与に関連すると考えられる生存中の変化は認められなかった。肺重量は FA 群並びに中用量及び高用量群で増加した。1 ヵ月間の回復期間後、肺重量の増加について完全な回復が認められた。組織病理学的評価により、投薬群すべてにびらん性肺胞泡沫マクロファージの集簇が認められた。重症度は、低用量群で軽微～軽度、FA 群及び中用量群で軽度～中等度、高用量群で中等度であった。本試験では、すべての ALIS 群で気管支クララ細胞の肥大が認められた（注：この所見はラットを用いた最大 2 年間の長期試験ではみられなかった）。重症度は軽微～中等度であった。ELC 群のラットにも軽微／軽度な限局性泡沫肺胞マクロファージの集簇が認められた。肺の脂質染色は、リン脂質の過剰な集簇を示すものではなく、むしろ中性脂肪を示すものであった。FA 群及びすべての ALIS 群に上気道の刺激のエビデンス（鼻腔、喉頭及び気管）が認められ、ラットを用いた鼻部吸入試験（被験物質の範囲）でみられることの多い非特異的な局所刺激性を反映したものと考えられた。投与後 1 ヵ月の回復期間後、すべての所見は回復又は回復傾向を示した。本試験の NOAEL は 100 mg/kg/日と判断された。

### 2.6.6.3.3.3　ラットを用いた 6 ヵ月間吸入毒性試験（2.6.7.7.1 項, [redacted] Study 07-6308, CTD 4.2.3.2-4）

本 GLP 適用試験では、ALIS を 1 群雌雄各 30 匹のラット 3 群に、アミカシン目標用量 10、30 及び 90 mg/kg/日で 1 日 1 回鼻部吸入を介して最大 240 分間、最長 6 ヵ月間投与した。さらに、対照群のラットに 1.5% NaCl を高用量群と同時間、吸入投与した。各群雌雄 10 匹を中間検査群として 3 ヵ月間投与後の中間評価用とし、雌雄各 5 匹を 12 週間の回復期間終了時の評価用とした。雌雄各 12 匹のサテライト群を設け、Day 24 及び Week 13～Week 26 の期間に血清 TK 評価を行った。Week 13～Week 26 の期間及び回復期間後にアミカシンの尿中濃度も測定し、投与 6 ヵ月後及び回復期間終了後に肺中濃度を測定した。被験液エアロゾルは、臨床用ジェットネブライザー（Heart®）を用いて作製した。その他に以下の評価を行った：チャンバー内エアロゾル濃度、生存性、一般状態の観察、体重、摂餌量、眼科学的検査、臨床病理検査、組織重量、剖検及び病理組織学的検査。試験期間にわたるアミカシンの推定投与量（雄／雌）は目標用量と同様であった（各投薬群でそれぞれ 12/13、32/35、89/97 mg/kg/日）。したがって、目標用量を使用して本試験の結果を記述する。すべてのアミカシン群の MMAD の平均値は 3.7 µm 以下であった。

ALIS 吸入によりすべてのラットでアミカシンの全身曝露が確認された。曝露量（$AUC_{last}$）は 30 mg/kg/日の用量では比例的に増加し、90 mg/kg/日では比例的増加を下回った。試験期間中の曝露量は概ね同様であり、曝露量に明らかな性差は認められなかった。投与 6 ヵ月後の血清 $AUC_{last}$ の範囲は、約 2.3 µg•hr/mL（10 mg/kg/日群の雌雄）から 10 µg•hr/mL（90 mg/kg/日群の雄）及び 8 µg•hr/mL（90 mg/kg/日群の雌）であった。尿中アミカシン濃度は、3 ヵ月及び 6 ヵ月の投与後に用量依存的及び概ね用量比例的に増加した。回復期間後、尿中アミカシン濃度は、26 週間投与後の 10 mg/kg/日群では定量下限未満、30 及び 90 mg/kg/日群ではわずかに定量される程度であった（例：90 mg/kg/日群の 4～16 時間検体で 152 µg/mL から 0.3 µg/mL に減少）。6 ヵ月投与後の肺中アミカシン濃度の平均値は用量依存的に増加したが、概ね用量比を下回った（雌雄の合算値は、10、30、90 mg/kg/日群でそれぞれ 1.3、2.5、3 mg/g）。回復期間終了時点での肺中アミカシン濃度の平均値は 0.030、0.036、0.031 mg/g であり、投与中止後に肺からアミカシンが効率的に排泄されたことを示唆する。

本試験で検討したすべての用量で忍容性は概ね良好であった。本試験の曝露期間中に、被験物質との関連性はないと考えられる想定外の死亡が 3 件発生した。10 mg/kg/日群の雌 1 匹が Day 85

に人道的に安楽死（取り扱い中に意図せずに尾膜を切除）、10 mg/kg/日群の瀕死の雄 1 匹を Day 72 に解剖（生存中に後肢の麻痺が観察された）、30 mg/kg/日群の雄 1 匹が Day 172 に死亡した状態で発見された。投与期間終了時に 90 mg/kg/日群の雄の体重が対照群の雄よりも著しく低かった（平均体重が約 600 g に対して約 508 g）。試験期間中にわたりこの群の摂餌量は対照群よりも一貫して少なかった。試験期間中、90 mg/kg/日群では一般状態の変化として、粗毛、立毛、湿性ラ音などが低頻度かつ一過性又は散発的に認められた。6 ヵ月投与後の血液検査値の変化として、30 及び 90 mg/kg/日群の絶対好中球数の増加（投与 3 ヵ月後でも増加）、30 及び 90 mg/kg/日群の雌の血清リンの増加、並びに 90 mg/kg/日群の雄の血清トリグリセリドの低下及び雌の血清グロブリンの低下が挙げられた。3 ヵ月及び 6 ヵ月の投与後、すべての用量で肺重量の増加が認められ、30 及び 90 mg/kg/日群では剖検時に肺の黄褐色／白色の病巣が認められた（後述するマクロファージの集簇を伴う病変）。被験物質に関連した病理組織学的変化は、3 ヵ月及び 6 ヵ月の投与終了後、肺、鼻甲介、喉頭、気管及び腎臓で認められた。肺では、3 ヵ月及び 6 ヵ月投与後にすべての用量で泡沫マクロファージの集簇が認められた（6 ヵ月投与後の 10 mg/kg/日群で軽度、30 mg/kg/日群でほぼ中等度、90 mg/kg/日群ではほぼ重度）。13 週間投与後の 30 及び 90 mg/kg/日群並びに 26 週間投与後のすべての用量群の肺に多巣性の亜急性／慢性炎症が認められた。30 mg/kg/日以上の 2 群では、炎症は肺胞上皮の再生性過形成を伴った。3 ヵ月及び 6 ヵ月投与後の 10、30 及び／又は 90 mg/kg/日群における上気道の所見は、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が認められた。鼻甲介及び気管の変化は、ALIS の 1 日 1 回鼻部吸入による長期投与に伴う局所刺激性と一致し、これに対し喉頭の所見は、ALIS の吸入に対する非特異的な反応と考えられた（Boorman, 1990）。腎臓では、13 週間の投与後、高用量群の複数の雄に軽微な腎症が認められた。26 週間の投与後、高用量群の大多数の雄及び高用量群の雌数匹に軽微～軽度の腎症が認められた。軽微な腎症は、対照群の雌雄数匹及び 10 mg/kg/日群の雄 1 匹にも認められた。腎臓は、アミカシン及び他のアミノグリコシド系抗菌薬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 週間の回復期間後、高用量群の雄に依然として低体重が認められ（投与期間終了後の体重増加は対照群と同等であった）、雌では一部の血液検査値の変化が依然認められた（30 及び 90 mg/kg/日群での血清リンの上昇、90 mg/kg/日群の血清グロブリンの低下）。標的組織の病理組織学的変化は、10 mg/kg/日群ではほぼ完全に回復し、30 及び 90 mg/kg/日群では回復傾向を示した。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。

以上、本試験で認められた所見は、脂質製剤であるアミノグリコシド系抗菌薬の 1 日 1 回 6 ヵ月間の鼻部吸入の試験結果と一致した。すなわち、10 mg/kg/日以上の群において上気道の刺激、10 mg/kg/日以上の群での炎症及び／又は肺胞上皮過形成を伴う肺のマクロファージの集簇、並びに 90 mg/kg/日群での腎臓における腎症が認められた。上気道の変化に対する NOAEL は 10 mg/kg/日未満と判断された。前述のとおり、肺のマクロファージの集簇は ALIS 投与に対して想定される適応性変化であり、毒性所見とは判断されなかった。しかし、マクロファージの浸潤を伴う炎症及び過形成の変化が認められることから、肺の NOAEL は 10 mg/kg/日未満と判断された。腎症

に対する NOAEL は 30 mg/kg/日であった。腎臓はアミノグリコシド系抗菌薬の既知の標的器官である。3 ヵ月の回復期間後、すべての変化は回復又は回復傾向を示した。

### 2.6.6.3.4 イヌを用いた反復投与毒性試験

イヌを用いた 1 ヵ月、3 ヵ月及び 9 ヵ月間の GLP 適用の吸入試験において、目標用量での定常状態におけるアミカシンの $AUC_{last}$ の平均値を表 2.6.6- 4 に要約し、ヒトと比較した。各試験で検討した最高用量（約 30 mg/kg/日）で、投与期間の長期化に伴い、アミカシン $AUC_{last}$ が低下する傾向が認められた（投与 1 ヵ月後、3 ヵ月後、9 ヵ月後の時点でそれぞれ約 20、14、9 µg•hr/mL）。ラットと比較すると、これらの試験でのアミカシン $AUC_{last}$ は高値であった。1 ヵ月間試験では高用量群の $AUC_{last}$ がヒトにおける 590 mg での $AUC_{last}$ と同等であったが、それ以外の長期試験ではヒト 590 mg 投与時の $AUC_{last}$ を下回った（ラットと同等）。イヌでは、アミカシンへの曝露量の顕著な性差は認められなかった。

アミカシンへの全身曝露量と比較して、定常状態の肺曝露量は、表 2.6.6- 5 に示されるとおり、1 用量を除くすべての用量でヒトよりも高値であると推定された。ヒトにおける肺中アミカシン濃度の算出方法の説明は 2.6.6.1 項を参照のこと。

**表 2.6.6- 4　イヌを用いた ALIS の反復吸入投与毒性試験における定常状態のアミカシン全身曝露量平均値のヒトとの比較**

| SPECIES | STUDY | DOSE (mg/kg/day) | $AUC_{last}$ (µg•hr/mL) | MULTIPLE OF HUMAN AUC |
|---|---|---|---|---|
| Human[a] | ALIS clinical development program | 12 (50-kg adult) | 21 | - |
| Dog[b] | 1 month | 50[c] | 20 (Day 30) | 1 |
| Dog[d] | 3 months | 30 | 14 (Day 89) | < 1 |
| Dog[e] | 9 months | 30 | 9 (Day 272) | < 1 |

[a] Module 2.7.2 (Summary of Clinical Pharmacology Studies); in the ALIS development program, the mean daily amikacin AUC at steady state after administration of ALIS at 590 mg in NTM patients is approximately 21 µg•hr/mL.
[b] Study 667574; combined-gender data.
[c] Achieved dose was 31 mg/kg/day.
[d] Study 07-6306; combined-gender data.
[e] Study 11-6400; combined-gender data.

表 2.6.6- 5　イヌを用いた反復吸入投与毒性試験における定常状態の肺中アミカシン濃度平均値とヒトとの比較

| 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[c] | 5 | 0.331 | 1.3 |
| | | 15 | 0.899 | 3.5 |
| | | 50 | 3.166 | 12 |
| Dog[d] | 3 months | 5 | 1.237 | 4.9 |
| | | 10 | 2.659 | 10 |
| | | 30 | 5.223 | 21 |
| Dog[e] | 9 months | 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).
[b] Study No. 667574; combined-gender data.
[c] Achieved doses were 4, 10, and 31 mg/kg/day.
[d] Study No. 07-6306; combined-gender data.
[e] Study No. 11-6400; combined-gender data.
[f] Exclusion of a low outlier value in males of 0.0689 mg/g (compared to values of 2.070, 3.650, and 2.690 mg/g for other males in the 30-mg/kg/day group) results in a mean combined-gender value of 3.059 mg/g of lung; equivalent to 12x that in adults.

### 2.6.6.3.4.1　イヌを用いた 28 日間探索的試験（2.6.7.6 項, [redacted] Study 667637, CTD 4.2.3.2-5）

本 GLP 非適用試験では、1 群雌雄各 2 匹から成るイヌ 2 群に対し、口腔咽頭チューブを装着した密閉型フェイスマスクを使用して、ALIS をアミカシン 5 及び 50 mg/kg/日の目標用量で 1 日 1 回最長 60 分間、連続 28 日間吸入投与した。対照群のイヌには、空リポソームを高用量群と同じ時間、吸入投与した（ELC 群）。被験液エアロゾルは、臨床用のジェットネブライザー（Heart®）を用いて作製した。本試験では以下の評価を行った：チャンバー内エアロゾル濃度、生存性、臨床病理検査、TK（血漿、肺及び尿中濃度）、器官重量（肺及び腎臓）、剖検及び病理組織学的検査（肺及び腎臓）。アミカシンの推定投与量は目標用量と同等であった（6 及び 45 mg/kg/日）ことから、目標用量を用いて本試験の結果を記載する。アミカシン群の MMAD の平均値は 4.43 µm であった。

定常状態のアミカシンの血漿中濃度は、低用量では LLOQ 未満であり、高用量では、投与直後（IPD）で 9～15 µg/mL、投与後 15 分の時点で 9～13 µg/mL の範囲であった。3 時間時点で、すべての検体が LLOQ 未満であった。前述のとおり、低用量及び高用量群において投与後 15 分を超えて定量可能な血漿値が得られなかったことは、LLOQ が 3 µg/mL である Abbott $TD_X$ の分析感度に関連する可能性がある。投与 1 ヵ月後、尿中及び肺中アミカシン濃度は用量依存的及びほぼ用量比例的な増加を示した。

生存中、被験物質投与に関連した毒性所見は認められなかった。剖検後の注目すべき所見として、ELC 群と比較して高用量群での肺重量の増加、ELC 群及び低用量群における巣状肺胞マクロファージの集簇、及び高用量群における大半で軽度のびらん性肺胞泡沫マクロファージの集簇が

認められた。ラットと同様に、マクロファージの集簇は、吸入異物に対する肺の排除反応であり、毒性所見ではないと判断された。腎臓では、高用量群の雄 1 匹に腎臓近位尿細管の再生／変性が認められた。本試験の結果に基づき、イヌを用いた 1 ヵ月間吸入毒性試験の用量に 5、15、50 mg/kg/日を選択した。

### 2.6.6.3.4.2　イヌを用いた 30 日間吸入毒性試験（2.6.7.6 項, [redacted] Study 667574, CTD 4.2.3.2-6）

本 GLP 適用試験では、1 群雌雄各 6 匹から成るイヌ 3 群に対し、口腔咽頭チューブを装着した密閉型フェイスマスクを使用して、ALIS をアミカシン 5、15 及び 50 mg/kg/日の目標用量で 1 日 1 回最長 60 分間 1 ヵ月間吸入投与した。対照群のイヌには、1.5% NaCl 溶液又は空リポソーム（ELC）を高用量群と同時間、吸入投与した。さらに、別の群として、遊離型アミカシン（FA）（50 mg/kg/日）を高用量群と同時間投与した。1 群当たり雌雄各 6 匹のうち各 2 匹を、投与期間終了 1 ヵ月間後にさらに評価した。被験液エアロゾルは、臨床用のジェットネブライザー（Heart®）を用いて作製した。本試験では以下の評価を行った：チャンバー内エアロゾル濃度、生存性、一般状態の観察、体重、摂餌量、眼科学的検査、心電図検査、呼吸系検査、臨床病理検査、TK（血漿、肺中及び尿中濃度）、器官重量、剖検及び病理組織学的検査。試験期間にわたるアミカシンの推定投与量は、目標用量を下回った（FA 群、5、15 及び 50 mg/kg/日群でそれぞれ 38、4、10 及び 31 mg/kg/日）。したがって、推定用量を用いて本試験の結果を記載する。高用量の 31 mg/kg/日は、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った。投薬群の MMAD 値は 4.3 µm 以下であった。

定常状態（Day 30）のアミカシン血漿濃度は、低用量群において、及び、中用量群のほとんどの時点で定量下限（LLOQ）未満であった。Day 30 のアミカシンの平均 $C_{max}$ 及び $AUC_{last}$ は、FA 群及び高用量群で概ね同等であった（20～25 µg•hr/mL の範囲）。前述のとおり、LLOQ 値の数が多かったのは、Abbott $TD_X$ にて定量したことによる可能性が高い。Day 30 の尿中アミカシン濃度は、ALIS 群では用量依存的に増加したが、その程度は用量比を幾分上回っていた。肺中アミカシン濃度の雌雄合算値の平均は、FA 群、低用量、中用量及び高用量群でそれぞれ約 0.2、0.3、0.9 及び 3.2 mg/g であった。このように、本剤を 31 mg/kg/日で投与したイヌの肺では、FA を 38 mg/kg/日で投与したときと比較し、最高 16 倍高いアミカシン濃度が保持された。

本試験では、アミカシンのすべての用量で忍容性は良好であった。本試験の Day 30 に高用量群のイヌ 1 匹が死亡した。消化管の病理組織学的評価により、死因は急性出血性腸炎であることが判明した。このイヌの腸には、クロストリジウム菌様のグラム陽性菌コロニーが異常に多く存在したことから、腸内毒素血症は、クロストリジウムの異常増殖による二次的な症状の可能性が考えられた。この動物は Day 29 に実施した最終生存性確認（確認時を含む）まで毒性所見は観察されなかった。この用量のアミカシンを 1 日 1 回最長 3 ヵ月間（2.6.6.3.4.3 項）又は 9 ヵ月間（2.6.6.3.4.4 項）吸入投与したイヌ 24 匹に死亡は発生しなかった。生存中の所見として、すべての群で投与中及び／又は投与直後の流延（アミカシン群のほうで発現率が高かった）、FA 群の雄及び高用量群の雌雄双方における血清中トリグリセリドの軽微な増加、及び FA 群及び高用量群の雌における血清中リンの軽微な高値が認められた（注：これらの変化のいずれもイヌを用いた ALIS の長期投与試験では発現しなかったため、本試験の投与に対する関連性は不明である）。

ALIS 中用量及び高用量群の肺重量は対照群よりも高値であった。病理組織学的検査では、ALIS を投与したイヌの肺に肺胞及び間質泡沫マクロファージの用量依存的な集簇が認められた。低用量では重症度は軽微であり、中用量及び高用量では軽度～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、高用量群では特に、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。関連する所見として、高用量群に流入気管リンパ節での泡沫マクロファージの増加、中用量及び高用量群で肺の血管周囲／細気管支周囲のリンパ様細胞の浸潤が認められた。また、高用量群のイヌ 2 匹に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。

投与後 1 ヵ月間経過後、生存中にみられた所見及び肺重量の増加は回復し、マクロファージの集簇は回復傾向を示した。

以上、ALIS 投与に関連した主な所見は、ラット及びイヌを用いた本剤の他の試験と一致した、用量に依存した肺の泡沫マクロファージの集簇であり、これは薬剤／脂質製剤からの異物の吸入により引き起こされる肺の正常な排除反応であると考えられた。1 ヵ月間の回復期間により、肺のマクロファージの集簇の回復傾向が確認された。ALIS 群での NOAEL は 31 mg/kg/日と判断された。

### 2.6.6.3.4.3　イヌを用いた 3 ヵ月間吸入毒性試験（2.6.7.7.2 項, [redacted] Study 07-6306, CTD 4.2.3.2-7）

本 GLP 適用試験では、1 群雌雄各 6 匹から成るイヌ 3 群に対し、フェイスマスクを介した吸入により、ALIS をアミカシン 5、10 及び 30 mg/kg/日の目標用量で 1 日 1 回最長 90 分間、3 ヵ月間投与した。対照群のイヌには、1.5% NaCl を高用量群と同様の時間、吸入投与した。また、1 群当たり雄 6 匹中 2 匹及び雌 6 匹中 2 匹を投与終了 2 ヵ月間後にさらに評価した。被験液エアロゾルは臨床用ジェットネブライザー（Heart®）を用いて作製した。本試験で評価した項目は、チャンバー内エアロゾル濃度、生存性、一般状態の観察、体重、摂餌量、眼科学的検査、心電図検査、臨床病理検査、TK（血清、尿及び肺中濃度）、器官重量、剖検及び病理組織学的検査であった。雄／雌に対するアミカシンの推定投与量は、目標用量と同程度であった（各投薬群それぞれ 6/5 mg/kg/日、10/11 mg/kg/日及び 29/30 mg/kg/日）。このため、目標用量を使用して本試験の結果を記述する。試験期間中のすべての群の MMAD の平均値は 3.7 µm 以下であった。

アミカシンの血清中濃度は、すべての投薬群において Day 1 及び Day 89 の規定された時点のすべて（投与直後から投与 4 時間後まで）で概ね定量可能であった。解析には、定量下限を 150 ng/mL とするバリデートされた LC/MS/MS 法を使用した。全身曝露量（$C_{max}$ 及び $AUC_{last}$）は用量依存的に増加した。増加の程度は概ね用量比を下回るか又は用量比例的であった。3 ヵ月間投与後の血清中 $AUC_{last}$ の範囲は、5 mg/kg/日群の約 2.4 µg•hr/mL（雄）及び 2.6 µg•hr/mL（雌）から 30 mg/kg/日群の 15 µg•hr/mL（雄）及び 13 µg•hr/mL（雌）であった。曝露量は、Day 1 と比較して Day 89 の方が大きい傾向（最大 2.6 倍）にあり、明らかな性差は認められなかった。尿中アミカシン濃度は用量依存的及び用量比例的な増加を示した。また、肺中平均アミカシン濃度も用量依存的な増加を示し、ALIS 群での雌雄合算値はそれぞれ約 1、3 及び 5 mg/g であった。投与終了 2 ヵ月間後、尿中及び肺中にアミカシンは依然として定量されたが、投与終了時点で得られた濃度と比較して大幅に低下した（例：30 mg/kg/日群の尿中で約 3%、肺中で約 30%）。

本試験で ALIS のすべての用量の忍容性は良好であり、投与に関連した生存中又は剖検時の肉眼所見は認められなかった。1 ヵ月間試験と同様に、すべての ALIS 群で肺中に泡沫肺胞マクロフ

ァージが認められ、重症度は、5、10、30 mg/kg/日群でそれぞれ軽微～軽度、軽度～中等度、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。泡沫マクロファージは、雄はすべての用量で、雌は 10 mg/kg/日以上で、縦隔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高かった。さらに、30 mg/kg/日群で、イヌ 8 匹中 1 匹に喉頭の潰瘍（ALIS の吸入の二次的変化であったが、げっ歯類と同様に、非特異的な反応と考えらえた）及び近位尿細管の軽微～軽度の好酸球物質の沈着増加が観察された。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。

以上、本試験の所見は、脂質製剤であるアミノグリコシド系抗菌薬の 1 日 1 回 3 ヵ月間の吸入投与（フェイスマスクを使用）と一致した。肺のマクロファージの集簇は、本剤の投与に対する予測される適応性反応と考えられた。したがって、肺及び流入リンパ節における変化に対する 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/日で好酸球物質の沈着増加が認められことに基づき、10 mg/kg/日と判断された。2 ヵ月の回復期間後、すべての変化は回復性又は回復傾向を示した。

### 2.6.6.3.4.4　イヌを用いた 9 ヵ月間吸入毒性試験（2.6.7.7.3 項, [redacted] Study 11-6400, CTD 4.2.3.2-8）

本 GLP 適用試験では、1 群雌雄各 6 匹から成るイヌ 3 群に対し、ALIS をアミカシンとして 5、10 及び 30 mg/kg/日の目標用量で、フェイスマスクを用いて 1 日 1 回最長 90 分 9 ヵ月間吸入投与した。対照群のイヌには、1.5% NaCl 又は ELC を高用量群と同時間吸入投与した。また、1.5% NaCl 群、ELC 群及び高用量群の雄 6 匹中 2 匹及び雌 6 匹中 2 匹を投与終了 3 ヵ月後にさらに評価した。被験液エアロゾルは、臨床用のジェットネブライザー（Heart®）を用いて作製した。本試験では、チャンバー内エアロゾル濃度、生存性、一般状態の観察、体重、摂餌量、眼科学的検査、心電図検査、臨床病理検査、TK（血清及び肺中）、器官重量、剖検及び病理組織学的検査を実施した。雄／雌に対するアミカシンの推定投与量は目標用量と同等であったため（それぞれ本剤の用量で 5.7／5.6、10／11 及び 31／32 mg/kg/日）、目標用量にて本試験の結果を記載する。粒子サイズに関して、試験期間をとおして MMAD の平均値は 5、10 及び 30 mg/kg/日群でそれぞれ 3.6、3.7、3.5 µm であった。ELC 群で相当する値は 3.4 µm であった。

ALIS 投与によりアミカシンへの全身曝露量は用量依存的に増加した。全体的に増加の程度は、用量増加とほぼ同程度（± 30%以内）又はわずかに低かった。明らかな性差は認められなかった。イヌを用いた 3 ヵ月間試験（2.6.6.3.4.3 項）とは異なり、反復投与によるアミカシンの蓄積はみられなかった。血清中 $AUC_{last}$ の範囲は、Day 1 で約 2.0～13.6 µg•hr/mL、投与 6 ヵ月時で 1.8～9.2 µg•hr/mL、投与 9 ヵ月時で 1.8～9.5 µg•hr/mL であった。投与 9 ヵ月後の肺中アミカシン濃度もまた、用量依存的及びほぼ用量比例的な増加（± 30%以内）を示した。雌雄合算した肺中アミカシン濃度の平均値は、約 0.678（5 mg/kg/日群）から 2.685 mg/g（30 mg/kg/日群）の範囲であった。肺中アミカシン濃度について顕著な性差は認められなかった。3 ヵ月間の回復期間後の血清中アミカシン濃度は、LLOQ（150 ng/mL）未満であった。30 mg/kg/日を投与したイヌでは、3 ヵ月の回復期間後に肺中にアミカシン濃度が検出された。しかし、検出された濃度は 9 ヵ月間投与後よりもはるかに低かった（約 0.02～0.8 mg/g）。

本試験において、ALIS のすべての用量で忍容性は良好であった。生存中のいずれの評価項目も被験物質に関連した変化は認められず、本剤の投与に関連した肉眼的所見も認められなかった。

ALIS を投与したイヌにおける病理組織学的変化を以下に示す。

- すべての投与群で泡沫肺胞マクロファージの集簇が認められた。重症度は、5 mg/kg/日群で軽微～軽度、10 mg/kg/日群で軽度～中等度、30 mg/kg/日群で中等度～重度であった。10 mg/kg/日以上の群では、マクロファージの集簇が肺重量の増加を伴った。泡沫マクロファージは、しばしば塩基性顆粒を含んだ細胞質の空砲を特徴とした。泡沫マクロファージの軽微な集簇は ELC 群の大多数のイヌ及び 1.5% NaCl 群の雄 2 匹でも認められた。しかし、空胞は投薬群ほど顕著ではなく、塩基性顆粒を含まなかった。
- 5 mg/kg/日以上の群で、軽微～中等度の呼吸上皮の変性及び鼻甲介の嗅上皮の軽微～軽度な変性が認められた。このような変化は 1.5% NaCL 群又は ELC 群ではみられなかった。
- 10 及び 30 mg/kg/日群（10 mg/kg/日群ではイヌ 1 匹のみ）で、気管分岐部の尖部の上皮細胞に塩基性顆粒が認められた。重症度は主に軽微であった。顆粒は肺の泡沫マクロファージと同様であり、被験物質の沈着及び上皮への取り込みを表す可能性が高いと考えられた。
- すべての用量の雄及び 10 mg/kg/日以上の群の雌において、腎臓の近位尿細管に細胞質内褐色色素の軽微～軽度な増加が認められた。重症度は主として軽微であった。
- ALIS を投与した大多数のイヌの二次的病変として、すべての用量で肺の主な流入リンパ節（縦隔及び気管気管支）に泡沫及び非泡沫マクロファージの増加が認められた。縦隔リンパ節におけるマクロファージの増加は、ELC 群の雌 1 匹でも認められた。

3 ヵ月間の回復期後（1.5% NaCl 群、ELC 群、ALIS 30 mg/kg/日群）、以下の器官の重量及び病理組織学的な変化が観察された：

- ALIS 30 mg/kg/日群の肺重量は増加したままであった。しかし、増加の程度は、投与期間終了時よりもある程度減少した（雄で 25%から 19%、雌で 29%から 21%）。
- ALIS 30 mg/kg/日群のイヌ全匹で泡沫肺胞マクロファージが認められた。しかし、重症度は顕著に低下した（投与期間終了時に中等度～重度であったのが軽微～軽度に）。回復期間後に、泡沫マクロファージ内に軽微～軽度の塩基性顆粒が持続した。ELC 群では、泡沫肺胞マクロファージは完全に回復した。
- ALIS 30 mg/kg/日群で認められた鼻甲介の呼吸上皮の変性は完全に回復した。
- 鼻甲介の嗅上皮の変性は ALIS を投与した雌では完全に回復した。ALIS を投与した雄では、投与期間終了時点での重症度が軽微又は軽度と比較して、回復期後では軽微であったため、回復傾向が認められた。
- 気管分岐部の塩基性顆粒について、投与期間終了時点では 8 匹中 7 匹で認められたのに対し、回復期後に認められたのは 4 匹中 1 匹であった。したがって、この変化はほぼ完全に回復した。
- 腎臓に被験物質に関連した変化は認められなかった。したがって、投与期間終了時にみられた腎臓の近位尿細管細胞質内の褐色色素の増加は完全に回復した。
- ALIS を投与したイヌの肺の流入リンパ節には、マクロファージの増加が依然として認められた。発症率及び重症度の低下が気管気管支リンパ節では認められたが、縦隔リンパ節では認められなかった。

以上、本試験で検討した用量は、イヌを用いた ALIS の 3 ヵ月間試験で検討した用量と同等であり（2.6.6.3.4.3 項）、投与期間を延長しても忍容性は良好であった。イヌを用いた本剤の他の反復投与試験と一致して、肺及び腎臓が標的器官であった。主な所見は、泡沫肺胞マクロファージの集簇及び腎臓の近位尿細管での細胞質内の褐色色素の増加であった。マクロファージの集簇は、アミカシン／リポソーム製剤からの吸入粒子を排除するための肺の適応性変化と考えられた。重要なことは、マクロファージの集簇が、肺組織の壊死、扁平上皮化生又は増殖性／腫瘍性変性を伴っていなかったことであった。肺所見の発現頻度及び重症度は、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。本試験における腎臓の近位尿細管の所見は、3 ヵ月間の反復投与試験と異なるものであった（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）。本試験ではすべての用量で腎臓に所見が認められたが、3 ヵ月試験で腎臓所見がみられたのは 30 mg/kg/日群のみであった。しかし、重症度は両試験で同様（軽微～軽度）であり、解剖学的分布も同様であった。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、鼻甲介の変性及び気管分岐部の塩基性顆粒であった。これらの変化は、本剤を 3 ヵ月間吸入投与（2.6.6.3.4.3 項）したイヌでは認められず、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。

以上、肺におけるマクロファージの集簇は、ALIS 投与に対する適応性反応と考えられた。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。腎臓における変化に対する NOAEL も、変化が非毒性かつ回復可能であったため 30 mg/kg/日と判断された。

## 2.6.6.4 遺伝毒性試験

ALIS の遺伝毒性について、初期及び市販予定の ALIS 製剤を用い、バリデートされた一連の *in vitro* 及び *in vivo* 試験で評価した。一連の試験及び個々の試験デザインの適用範囲は、適用される ICH ガイドラインを遵守した。

また、3 つの不純物が含まれたアミカシン硫酸塩のロットの遺伝毒性について、細菌を用いた復帰突然変異試験（2.6.6.8.6.1 項）において評価した。3.2.S.3.2 項「不純物」も参照のこと。

### 2.6.6.4.1 非哺乳動物細胞系での *In Vitro* 試験

#### 2.6.6.4.1.1 細菌を用いた復帰突然変異試験（2.6.7.8.1 項, [redacted] Study 7522-100, CTD 4.2.3.3.1-1）

本 GLP 適用試験では、ネズミチフス菌（ヒスチジン）試験株 TA98、TA100、TA1535 及び TA1537 並びに大腸菌（トリプトファン）試験株 WP2uvrA を用いて、初期の ALIS 製剤（21.4 mg/mL アミカシン含有）のフレームシフト変異又は塩基対置換変異を誘発する可能性を評価した。これらの試験における溶媒対照は脱イオン水であった。陽性対照についても検討を行った。ネズミチフス菌及び大腸菌試験株を用いて、S9 代謝活性下及び非活性下の双方で被験物質及び対照物質を評価した。アミカシンの処理濃度は、試験株 TA100 及び WP2uvrA を用いた用量設定試験の結果に基づき選択した。最初の試験でのアミカシンの濃度は S9 活性下／非活性下に関わらず、ネズミチフス菌では 1 プレート当たり 0.333～500 µg/plate、WP2uvrA では 0.1～100 µg/plate であった。確認試験でのアミカシンの濃度は、ネズミチフス菌では 0.333～500 µg/plate（S9 活性下）又は 0.333～1000 µg（S9 非活性下）、WP2uvrA では S9 活性下／非活性下に関わらず 0.1～100 µg/plate で実施した。各試験で検討した最高濃度は、細胞毒性を示唆する結果（すなわちバックグラウンドの細菌叢の減少）が示された。

以上の結果、被験物質に変異原性は認められなかった。細胞毒性濃度まで検討した結果、代謝活性の有無にかかわらず、すべての試験株の 1 プレート当たりの復帰突然変異株の平均数に増加は認められなかった。

### 2.6.6.4.2 哺乳動物細胞系での *In Vitro* 試験

#### 2.6.6.4.2.1 マウスリンフォーマ T*k* 試験（2.6.7.8.2 項, [redacted] Study 7522-102, CTD 4.2.3.3.1-2)

本 GLP 適用試験では、マウスリンパ腫 L5178Y 細胞株におけるチミジンキナーゼ試験により、本剤（75 mg/mL アミカシン含有）の遺伝子突然変異誘発性を評価した。溶媒対照（1.5% NaCl）、ELC、FA 及び陽性対照も評価した。S9 活性下及び非活性下の双方で、すべての被験物質及び対照物質を調べた。最大 5000 µg/mL の濃度での用量設定予備試験の結果に基づき、アミカシンの処理濃度を選択した。最初の試験では、本剤をアミカシン濃度として 125 µg/mL～濃度限界値 5000 µg/mL の範囲で 4 時間（S9 代謝活性下及び非活性下の双方）処理した。その結果、S9 非活性下では細胞毒性なし～弱い細胞毒性が認められた。これに対し S9 活性下では細胞毒性は認められなかった。ELC 群及び FA 群は濃度限界の 5000 µg/mL とし同じ条件下で処理した。確認試験では、本剤については最初の試験と同じアミカシン濃度で 4 時間（S9 活性下）及び 24 時間（S9 非活性下）処理し、ELC 群及び FA 群を限界濃度 5000 µg/mL とし同一条件下で処理した。S9 活性下での 4 時間試験では、本剤では細胞毒性なし～弱い細胞毒性が認められた。曝露時間を S9 非

活性下の 24 時間まで延長すると、中等度までの細胞毒性が認められた。被験物質添加群のいずれも、陽性反応の基準を超える突然変異の頻度増加を誘発しなかった。

遺伝子損傷の種類を確認するために、すべての培養物についてコロニーサイズを測定した（大コロニーはチミジンキナーゼ遺伝子のみに影響する遺伝子内突然変異細胞に由来し、小コロニーは細胞増殖及びチミジンキナーゼ遺伝子に影響する、より大きな突然変異による）。その結果、小コロニーおよび大コロニーの分布は、いずれの被験物質の濃度で得られた変異コロニーでも、予測された二峰性分布が認められた。

以上の結果から、すべての被験物質は、活性及び非活性条件下で、マウスリンパ腫細胞 L5178Y のチミジンキナーゼ遺伝子座における突然変異誘発性に対して陰性であることが示された。アミカシン濃度が高いところでは概ね細胞毒性が認められた。

#### 2.6.6.4.2.2　チャイニーズハムスター卵巣細胞を用いた染色体異常試験（2.6.7.8.3 項, [redacted] Study 7522-101, CTD 4.2.3.3.1-3）

本 GLP 適用試験では、培養したチャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞を用いて、初期の ALIS 製剤（21.4 mg/mL アミカシン含有）の染色体異常誘発性を外因性代謝活性（S9）の活性下及び非活性下の双方で評価した。これらの試験の溶媒対照には細胞培養用精製水を使用した。

最初の試験では、S9 活性下又は非活性下で処理時間を 3 時間とし、14.5～2140 µg/mL の範囲のアミカシン濃度で調べた。S9 非活性下の試験では、20.7 µg/mL 以上で処理後及び洗浄前に、並びに 123 µg/mL 以上で培養物の採取前に、被験物質の沈殿が認められた。したがって、S9 非活性下の場合は 14.5～176 µg/mL の範囲で染色体異常について評価した。S9 活性下の試験では、20.7 µg/mL 以上で処理後に、14.5 µg/mL 以上で洗浄後に、及び 60.4 µg/mL 以上で培養物採取後に沈殿が認められた。したがって、14.5～176 µg/mL の範囲で評価した。その結果、両試験において、染色体異常、倍数性又は核内倍加のある細胞の有意な増加は認められなかった。

確認試験では、処理時間は S9 非活性下で約 18 時間、S9 活性下で 3 時間とした。最初の試験の結果に基づき、1.57～100 µg/mL の範囲の濃度を S9 活性下及び非活性下で処理した。S9 非活性下の試験では、18.8 µg/mL 以上で処理後に、及び 75 µg/mL 以上で洗浄前に沈殿が認められた。したがって、18.8～100 µg/mL の範囲で染色体異常について評価した。S9 活性下の試験では、25 µg/mL 以上で処理又は洗浄前に沈殿が認められた。したがって、6.25～50 µg/mL の範囲で評価した。両試験において、染色体異常、倍数性又は核内倍加のある細胞の有意な増加は認められなかった。

以上より、代謝活性下及び非活性下において CHO 細胞では、本剤に構造的な染色体異常誘発性はないと考えられた。

### 2.6.6.4.3　哺乳動物系での *In Vivo* 試験

#### 2.6.6.4.3.1　ラットを用いた小核試験（2.6.7.9 項, [redacted] Study 07-6315, CTD 4.2.3.3.2-1）

本 GLP 適用試験では、ラットの骨髄細胞を用いて、ALIS 製剤（70 mg/mL アミカシン含有）の小核を有する多染性赤血球（MN-PCE）誘発性を評価することを目的に、アミカシンとして 0（1.5% NaCl）、15、45 及び 135 mg/kg/日の目標用量で 1 日 1 回 3 日間吸入投与することにより検討した。高用量は、ラットの短期間試験において許容される最高鼻部曝露時間である 1 日当たり 6 時間に基づき達成可能な最高用量であった。被験液エアロゾルはヒト臨床用ジェットネブライ

ザー（Heart®）を用いて作製した。雄／雌へのアミカシンの推定投与量は目標用量と同様であった（それぞれ 16/17、50/52、138/144 mg/kg/日）。そのため、目標用量を用いて本試験の結果を記載する。試験期間中の投薬群の MMAD の平均値は 3.8 µm であった。本試験では TK 評価は実施しなかった。しかし、本剤のすべての吸入毒性試験において、135 mg/kg/日が本剤の目標最高用量であった。

被験物質に関連した死亡、一般状態及び体重への影響は認められなかった。また、1.5% NaCl を吸入投与した対照群のラットと比較して、生物学的に重要な網状赤血球（PCE）の割合低下も認められなかった。以上より、アミカシンは骨髄毒性を示さなかった。被験物質は MN-PCE の誘発を引き起こさず、本試験において ALIS に遺伝毒性は認められなかった。

### 2.6.6.4.3.2　他の器官

本剤の遺伝毒性の可能性を評価する上で、追加試験の必要性はないと考えた。

## 2.6.6.5 がん原性試験

ALIS のがん原性について、ラットを用いた 2 年間吸入投与がん原性試験により評価した。本試験は GLP の規制及び範囲に従って実施し、試験デザインは、適用される ICH ガイドラインを遵守した。試験実施計画書は FDA の発がん性評価委員会（Carcinogenicity Assessment Committee、CAC）により審査され、ラットを用いた 6 ヵ月間吸入毒性試験に設けられた 3 ヵ月中間評価の成績に基づき、がん原性試験の用量を選択した（2.6.6.3.3.3 項）。6 ヵ月試験では、目標用量として 10、30 及び 90 mg/kg/日を評価した。主として 30 及び 90 mg/kg/日群の喉頭及び肺における所見に基づき、高用量には 2 年間の試験の最大耐用量と考えられる 45 mg/kg/日を選択した。

FDA への相談後、本剤の開発を支持する上で、マウスを用いたがん原性試験が必要ではないことが合意された（注：トービイ®［吸入用トブラマイシン溶液］のがん原性評価もラットのみであった）（TOBI®, 2019）。

群間の腫瘍発生率の差（Group 1［1.5% NaCl 対照群］と Group 3～5［ALIS 群］とを比較）を、腫瘍発生時期と死因を考慮した Peto-Pike による方法（Peto, 1980）により、傾向の片側検定を用いて解析した。また、Group 2（ELC 群）と Group 1 及び ALIS 群との一対比較を実施した。線形傾向は、よくみられる腫瘍及び稀な腫瘍の p 値がそれぞれ 0.005 未満及び 0.025 未満の場合に統計学的に有意とみなした。該当する一対比較の p 値は、それぞれ 0.01 未満及び 0.05 未満であった。よくみられる腫瘍（背景値における発生率 1%超）及び稀な腫瘍（背景値における発生率 1%未満）との区別は、本試験と同じラット系統及び試験対照を用いた試験実施施設での過去 10 試験の成績に基づいた。これらの手順は、がん原性試験における統計的側面についての FDA ガイダンス（Statistical Aspects of the Design, Analysis, and Interpretation of Chronic Rodent Carcinogenicity Studies of Pharmaceuticals [draft]、2001 年）に一致するものである。

### 2.6.6.5.1 長期試験

#### 2.6.6.5.1.1 ラットを用いた 2 年間吸入投与がん原性試験（2.6.7.10 項, [redacted] Study 09-6345, CTD 4.2.3.4.1-1）

本 GLP 適用試験では、1 群雌雄各 60 匹のラットに ALIS をアミカシンとして 5、15 及び 45 mg/kg/日の目標用量で、最長 170 分間の鼻部曝露により最大 24 ヵ月投与した。これらの用量は、ラットの平均体重 0.5 kg、肺重量 1.5 グラム及び肺沈着係数 10%に基づき 1 日の用量が肺 1 g 当たり 0.17 mg、0.50 mg 及び 1.5 mg となるように、又は臨床用量（肺 1 g につき 0.254 mg）の 0.7 倍、2 倍及び 6 倍を上回るように算出した。対照群のラットには、1.5% NaCl 又は ELC を高用量群と同様に 1 日 170 分間 2 年間吸入投与した。さらに、1 群雌雄各 4 匹（対照群）及び雌雄各 12 匹（ALIS 群）を TK 用サテライト群とし、Week 26 期間中に血清 TK 評価を実施した。被験液エアロゾルは臨床用ジェットネブライザー（Heart®）を用いて作製した。本試験では他に、チャンバー内エアロゾル濃度、生存性、一般状態の観察、眼科学的検査、体重、摂餌量、剖検及び病理組織学的検査を実施した。また、試験期間中の感染物質をモニタリングする目的で、センチネルラット群を設置した。雄では、すべての生存動物を 2 年間の投与期間終了時に剖検した。45 mg/kg/日投与群の雌では、生存動物数が減少したため（1 群当たり 20 匹未満に減少）、Week 96 から投与を中止し、1.5% NaCl 対照群の生存動物数が 20 匹付近となった Week 98 に雌のすべての群の生存例を剖検した。試験期間中の雄／雌ラットへのアミカシンの推定投与量は、目標用量と同様であった（投薬群でそれぞれ 5/5、15/16 及び 44/47 mg/kg/日）。したがって、ここでは目標用量を使用する。投薬群の試験期間中の MMAD の平均値は 3.1 μm 以下であった。

投与 6 ヵ月後、血清中アミカシン濃度は、規定されたすべての時点（投与直後～投与後 4 時間の時点）で、5 mg/kg/日群の雄 4 匹中 3 匹及び雌 4 匹中 1 匹を除くラット全匹で定量可能であった。TK 評価により、定常状態のアミカシン全身曝露量（$C_{max}$ 及び $AUC_{last}$）は用量比例的に増加したことが示された。5 及び 15 mg/kg/日群では性差は認められなかったが、45 mg/kg/日群では雌と比較して雄の曝露量が若干の高値を示した。血清 $AUC_{last}$ の平均値は約 1 µg•hr/mL（5 mg/kg/日群の雌雄）から 9 µg•hr/mL（45 mg/kg/日群の雄）及び 7 µg•hr/mL（同用量の雌）の範囲であり、ヒト 590 mg における血清 $AUC_{last}$ 平均値を下回った。以上のデータを表 2.6.6- 6 に示す。本試験では、肺中アミカシン濃度は測定しなかった。

**表 2.6.6- 6　ラットを用いた ALIS 吸入がん原性試験における定常状態のアミカシン全身曝露量の平均値のヒトとの比較**

| SPECIES | STUDY | DOSE (mg/kg/day) | $AUC_{last}$ (µg•hr/mL) | | MULTIPLE OF HUMAN AUC | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Human[a] | ALIS clinical development program | 12 (50-kg adult) | 21 | | - | |
| | | | M | F | M | F |
| Rat[b] | 2-year carcinogenicity | 5 | 1 | 1 | < 1 | < 1 |
| | | 15 | 3 | 3 | < 1 | < 1 |
| | | 45 | 9 | 7 | < 1 | < 1 |

[a] Module 2.7.2 (Summary of Clinical Pharmacology Studies); in the ALIS development program, the mean daily amikacin AUC at steady state after administration of ALIS at 590 mg in NTM patients is approximately 21 µg•hr/mL.
[b] Exposure data based on TK evaluations during Week 26.

本試験では、本剤のすべての用量で忍容性は良好であった。すべての群で死亡が発生したが、被験物質に関連した死亡率の上昇は認められなかった。主な死亡原因は、投薬との関連性はないと考えられる下垂体及び乳腺腫瘍並びに皮膚感染であった。被験物質に関連する最も一貫した一般状態の変化として、45 mg/kg/日群に湿性ラ音が認められた。雌よりも雄に多く認められた。

すべての群における被験物質投与に関連した肉眼的変化は、肺実質の白色／黄褐色の変色のみで、これは病理組織学検査から泡沫肺胞マクロファージの集簇及び炎症によるものであった。本剤の用量に相関して変色の発現頻度の上昇が認められた。ELC 群でのこの所見の発現頻度は高用量群と同様であり、これに対し 1.5% NaCl 群では肺の変色が発現したラットはわずかであった。

本剤の投与に直接関連すると考えられる腫瘍性病変は、45 mg/kg/日投与群の肺に限定されたが、この濃度は肺重量に基づき補正した場合、ヒトで臨床使用される用量の 6 倍高いものであった。高用量群の雌 2 匹に扁平上皮癌が認められた。これらの腫瘍は剖検時に肉眼で明らかであった。扁平上皮癌は SD 系ラットでは極めて稀であり、試験実施施設において自然発生性病変としてこれまでに認められていないことから、本剤との関連性ありと判断された。これらの腫瘍は、ほぼ 2 年間の投与後の剖検時に観察されたため、この 2 匹のラットの死因ではなかった。高用量群の雌 1 匹には角化型肺嚢胞も認められ、雌 2 匹の肺胞上皮に極小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、肺の粒子過負荷に関連することが知られている（Oberdörster, 1995）。

高用量群の雄 1 匹（剖検時に肉眼で明らか）及び雌 1 匹に細気管支／肺胞腺腫が認められたが、これらは [redacted] 社の背景値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。本剤を投与したラットにおける他の腫瘍性病変として、5 mg/kg/日群の雌雄各 1 匹及び 45 mg/kg/日群の雄 1 匹の口蓋の扁平上皮癌（本試験の最終報告書では咽頭組織下と記載されている）が認められ、これらのラットの死因であった。これらの腫瘍の発現頻度は統計学的に有意ではなく、明らかな用量依存性は認められなかった。したがって、ALIS との関連性は不明と判断された。また、45 mg/kg/日群の雄に膵内分泌組織（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。これらの腫瘍の発現頻度は統計学的に有意な増加を示さず、[redacted] 社の背景値の範囲内であった。したがって、これらの腫瘍も ALIS との関連性は不明と判断された。雄及び／又は雌の肺及び膵臓の腫瘍発現頻度データを表 2.6.6- 7 及び表 2.6.6- 8 に示す。

**表 2.6.6- 7　ラットを用いた ALIS 吸入がん原性試験：肺及び膵臓腫瘍の発現状況（雄）**

| **Group** | **1** | **2** | **3** | **4** | **5** |
|---|---|---|---|---|---|
| **Dose (mg/kg/day)** | **0 (1.5% NaCl)** | **0 (ELC)** | **5** | **15** | **45** |
| **Lung** | | | | | |
| No. Examined | 60 | 60 | 60 | 60 | 60 |
| Bronchiolo/Alveolar Adenoma[a] | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| **Pancreas** | | | | | |
| No. Examined | 60 | 59 | 60 | 60 | 60 |
| Islet Cell Adenoma[b] | 1 | 3 | 3 | 1 | 4 |
| Islet Cell Carcinoma[c] | 3 | 1 | 1 | 3 | 6 |
| Total Incidence (combined) | 4 | 4 | 4 | 4 | 10 |

[a] [redacted] historical control data for males is 0-1/60 animals (ie, 0-1.7% vs. 1.7% in males at 15 mg/kg/day).
[b] [redacted] historical control data for males is 1/65-8/100 animals (ie, 1.5-8% vs. 7% in males at 45 mg/kg/day).
[c] [redacted] historical control data for males is 0-7/65 animals (0-11% vs. 10% in males at 45 mg/kg/day).

**表 2.6.6- 8　ラットを用いた ALIS 吸入がん原性試験：肺腫瘍の発現状況（雌）**

| **Group** | **1** | **2** | **3** | **4** | **5** |
|---|---|---|---|---|---|
| **Dose (mg/kg/day)** | **0 (1.5% NaCl)** | **0 (ELC)** | **5** | **15** | **45** |
| **Lung** | | | | | |
| No. Examined | 60 | 60 | 60 | 60 | 60 |
| Squamous Cell Carcinoma | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 |
| Bronchiolo/Alveolar Adenoma[a] | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |

[a] [redacted] historical control data for females is 0-1/60 animals (ie, 0-1.7% vs. 1.7% in females at 45 mg/kg/day).

ALIS 群及び／又は ELC 群における被験物質に関連した非腫瘍性病変は以下のとおりであった：

- 鼻腔：すべての ALIS 群における泡沫細胞質の空胞化による主として軽微～中等度の変性。
- 喉頭：すべての ALIS 群で軽微～軽度な扁平上皮化生及び軽微～軽度な上皮過形成、主として軽微～軽度なびらん／潰瘍（15 mg/kg/日以上の群の雄、45 mg/kg/日群の雌）、すべての ALIS 群でほぼ中等度の炎症。
- 肺：ELC 群及びすべての ALIS 群における軽微～中等度のびまん性泡沫肺胞マクロファージ（発現頻度は ELC 群と比較して ALIS 群で増加）。

- 肺：ELC 群及び ALIS 群の主として軽微～中等度の巣状／多巣性泡沫肺胞マクロファージ、軽微～中等度の肺胞／間質性炎症、及び主として軽微～軽度の肺胞上皮過形成（すべての所見の発現頻度及び／又は重症度は、ELC 群よりも 45 mg/kg/日群で高かった）。
- 縦隔及び気管支リンパ節：ELC 群及び ALIS 群の軽微～軽度の泡沫マクロファージの集簇（発現頻度及び重症度は 45 mg/kg/日群で ELC 群よりも高かった）。1.5% NaCl 群のラット数匹にも軽微な泡沫マクロファージの集簇が認められた。

肺の所見は全体的に、ラットにおける粒子の過負荷と一致した。ラットでは、粒子用量の増加及び投与の長期化により、慢性炎症、増殖性変化、腫瘍形成を伴うことが多い肺の毒性負荷反応を誘発することが報告されている（Mauderly, 1996、Oberdörster, 1995、Renne, 2009）。慢性刺激も、ラットにおける上気道の炎症、過形成及び扁平上皮化生（Renne, 2009）、並びに口腔／咽頭の扁平上皮癌（Lenz, 2005、Madsen, 1989）に関与していることが報告されている。本剤の毒性試験の結果に基づくと、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（2.4 項）。これは Jones（2012）の提唱する毒性発現の閾値である 1 mg/g 肺重量も上回る肺負荷量であった。中用量群の総肺負荷量は 0.8 mg/g 肺重量であり、中用量群において本剤に関連する肺腫瘍の発現頻度の増加は認められなかった。この中用量は、ラットの平均体重 0.5 kg、肺重量 1.5 g 及び肺沈着係数 10%に基づくと、アミカシンとして 0.50 mg/g 肺に相当し、臨床用量の 2 倍（0.254 mg/g 肺）に相当した。

以上より、本剤のラットを用いた試験における肺の粒子負荷量は、提唱されたラットにおける吸入粒子高負荷による毒性反応の閾値と一致すると考えられる（2.6.6.9 項及び 2.4.2.4 項）。

鼻腔、喉頭、リンパ節及び肺の非腫瘍性病変は、マウス、ラット及びイヌを用いた本剤の他の反復投与試験結果と一致した。

以上、ラットを用いた 2 年間吸入試験において本剤の忍容性は概ね良好であったが、高用量群の雌 60 匹中 2 匹に、扁平上皮細胞がんから成る肺腫瘍が認められた。肺の腫瘍性病変は、肺に対して粒子高負荷となる吸入粒子（薬剤／脂質）の長期曝露に起因する変化であり、非げっ歯類と比較してげっ歯類で顕著な事象と考えられる。本剤を投与したラットで認められた腫瘍のヒトへの関連性は不明であるが、肺に対する同等以上の粒子高負荷によりイヌでは肺の毒性変化が認められていないことから、ラット特異的な変化であると考えられた。

### 2.6.6.5.2　短期又は中期試験

短期又は中期試験は実施しなかった。

### 2.6.6.5.3　その他の試験

その他の試験は実施しなかった。

### 2.6.6.6 生殖発生毒性試験

本剤の吸入による生殖発生毒性試験は、以下の理由に基づき必要ではないと判断した（Position Paper, 2009）。

ヒトにおける ALIS 吸入後のアミカシンの $C_{max}$ 及び AUC 値は、ヒトでの静脈内又は筋肉内注射後の $C_{max}$ 及び AUC 値（文献レビューに基づく平均値）よりも 17 倍及び 11 倍低い。

阿久津らは、アミカシンのラットを用いた受胎能及び催奇形性複合試験について報告している（阿久津, 1982）。本試験では、Wistar ラットにアミカシンを 1 日 1 回 60 日間腹腔内注射した。雌ラットには、1 日 1 回アミカシン 0、25、100 又は 200 mg/kg の用量で交配前の 14 日間、交配期間中及び妊娠 Day 0～Day 7 に投与した。雄ラットには、1 日 1 回アミカシン 0、25、100 又は 200 mg/kg の用量で交配前の 60 日間及び交配期間中に投与した。交配、受胎能又は生殖指標に有害な影響はみられなかった。また、アミカシンに催奇形性及び胎児毒性はみられなかった。本試験で報告された所見は、100 及び 200 mg/kg/日投与群の軟便並びに 200 mg/kg/日群の腎機能障害のみであった。

妊娠ラット（妊娠日数 8～14 日）、マウス（妊娠日数 7～13 日）及びウサギ（妊娠日数 8～16 日）に、最大 400 mg/kg（ラット及びマウス）又は 160 mg/kg（ウサギ）の用量でアミカシンを皮下又は筋肉内投与し、発生毒性を評価した（松崎, 1975a、松崎, 1975b）。その結果、これらの用量では、マウス又はウサギの胎児の内臓又は骨格の形成異常を引き起こさなかった。ラットでは、高用量の母体毒性が極めて高く（腎毒性及び死亡が観察された）、この用量での幼若動物の評価の実施を除外した。低用量群のラットでは、胎児の形成異常は認められなかった。子宮内でアミカシンのこれらの用量に曝露したラット及びマウスの出生後の発達は、対照群と大きく異ならなかった。

さらに、患者に本剤を推奨用量で吸入投与した際にアミカシン全身曝露量が高くなる可能性は低いと考えられ、妊娠中の胎盤を介した二次的な胎児曝露の可能性は非常に低いことが想定される。

以上、既存のラット、マウス及びウサギを用いたアミカシンの生殖発生毒性試験結果から、また、本剤の反復投与毒性試験で生殖器官に変化が認められなかったことから、本剤の生殖毒性試験は実施しなかった。

#### 2.6.6.6.1　受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験

上述の理由により、本剤の受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験は実施しなかった。

#### 2.6.6.6.2　胚・胎児発生に関する試験

上述の理由により、本剤の胚・胎児発生に関する試験は実施しなかった。

#### 2.6.6.6.3　出生前及び出生後の発生に関する試験

上述の理由により、本剤の出生前又は出生後の発生に関する試験は実施しなかった。

#### 2.6.6.6.4　幼若動物を用いた試験

将来の小児試験を支持するため、幼若ラットを用いた反復投与毒性試験を実施した。

### 2.6.6.6.4.1　幼若ラットを用いた 28 日間反復吸入投与予備試験（2.6.7.15.1 項, [redacted] Study 14-6480, CTD 4.2.3.5.4-1）

本 GLP 非適用試験では、ALIS を 1 日 1 回鼻部吸入により 28 日間投与した。投与群は、1）1.5% NaCl 群、2）10 mg/kg/日群、3）30 mg/kg/日群、4）60 mg/kg/日群により構成した。アミカシン用量として最大 60 mg/kg/日（最長曝露期間 124 分）で ALIS を鼻部曝露したところ、その忍容性は良好であった。曝露期間の後半をとおして 60 mg/kg/日群のすべてのラットに発現した脱毛症（四肢に限定、非有害と判定）を除き、被験物質に関連した一般状態への影響は認められなかった。体重、摂餌量又は肉眼的評価にも、被験物質に関連した影響はみられなかった。

終了時、肺中アミカシン濃度は用量依存的に増加した（10、30、60 mg/kg/日群の雄／雌でそれぞれ約 360／355、920／770、1665／1575 µg/g）。顕著な性差は認められなかった。

### 2.6.6.6.4.2　幼若ラットを用いた 28 日間反復吸入投与毒性試験（2.6.7.15.2 項, [redacted] Study 14-6002, CTD 4.2.3.5.4-2）

Sprague-Dawley CD®幼若ラット（1 群雌雄各 20 匹）に、本剤を目標用量 0（1.5%塩 NaCl）、0（ELC）、10、30 及び 90 mg/kg/日で 1 日 1 回鼻部曝露により最長 240 分間、生後日数（PND）10～37 までの 28 日間反復投与した。28 日間の投与終了時に 1 群最大雌雄各 10 匹を剖検し、28 日間の回復期間後、1 群最大雌雄各 10 匹を剖検した。サテライト群の動物を同様に曝露し、PND 10（1 群最大雌雄各 18 匹）及び PND 37（1 群最大雌雄各 9 匹）に採血し、血清アミカシン TK 解析を行った。アミカシン TK 評価用の尿検体も PND 36（TK ラット）及び PND 66（回復期ラット）の 1 群最大雌雄 5 匹のラットから採取した。さらに、PND 38 に 1 群雌雄 5 匹の TK ラットの肺中アミカシン濃度を測定した。本試験では以下の評価を行った：生存性、一般状態の観察、眼科学的検査、体重、摂餌量、性成熟、離乳後機能検査（PND 22 ± 1、PND 34 ± 2 及び PND 64 ± 2 日）、臨床病理検査（PND 38 及び PND 67）、器官重量、剖検及び病理組織学的検査。

アミカシンによる全身曝露、尿中アミカシン濃度及び肺中アミカシン濃度は用量依存的に増加した。本試験の所見は、幼若ラットを用いた 28 日間（PND 10～37）の脂質製剤アミノグリコシド系抗菌薬の 1 日 1 回吸入（鼻部のみ）と一致した。注目すべき所見として、30 mg/kg/日以上の群における肺重量の増加、10 mg/kg/日以上の群の泡沫肺胞マクロファージの増加（肺の非毒性の適応性排除反応）、30 mg/kg/日以上の群で喉頭上皮のびらん／潰瘍、慢性炎症、呼吸上皮及び扁平上皮の過形成が認められた。死亡、一般状態の観察、眼科学的検査、自発運動量、オープンフィールド検査、血液検査（血液学的検査、血液生化学的検査、凝固検査パラメータ）、器官重量、大腿骨長及び肉眼的検査に被験物質に関連した有害な影響は認められなかった。したがって、本試験の条件下で、喉頭所見に基づいた NOAEL は 10 mg/kg/日、肺の変化に対する NOAEL は 90 mg/kg/日と判断された。肺及び喉頭におけるすべての変化は、28 日間回復期間後に回復性又は回復傾向を示した。

### 2.6.6.7 局所忍容性

局所忍容性（肺及び上気道）は、ラット及びイヌを用いた反復投与毒性試験において適切に評価した。

## 2.6.6.8 その他の毒性試験

### 2.6.6.8.1 抗原性試験

抗原性は、これまで ALIS の吸入臨床試験において安全性上の問題として認識されていない（2.7.4 項）。本剤は、アミカシン及びアミノ配糖体又は添加物のいずれかに対する過敏症が既知の患者では禁忌とすることが適切と考えられる。科学的及び倫理的観点の双方からのこの情報に基づき、動物を用いた本剤の抗原性試験は必要ないとみなした。

### 2.6.6.8.2 免疫毒性試験

#### 2.6.6.8.2.1 14 日間反復吸入投与による肺マクロファージの機能に関する試験（2.6.7.17.1 項, Transave Report AMIK-BRD-2005-19-TOX, CTD 4.2.3.7.2-1）

本 GLP 非適用試験では、各群 12 匹のラットに ALIS の初期製剤（19.9 mg/mL アミカシン含有）、FA（20.6 mg/mL）、0.9% NaCl（すべての投与群の溶媒）又は ELC を 1 日 1 回（4 時間）14 日間吸入投与した。また、1 群 6 匹の無処置対照群を設定した。被験液エアロゾルは、ヒト臨床用 PARI LC® Star ネブライザーを用いて作製した。14 日間の投与後、各群のラットの半数（6 匹）を評価し、残りのラットは 28 日間の回復期間後（Day 43）に評価した。本試験では以下の評価を行った：体重、臓器重量（肺及び腎臓）、構成的及びリポ多糖類（LPS）誘導性の炎症メディエーターである TNF-α 及び一酸化窒素（硝酸塩として測定）の気管支肺胞洗浄液（BALF）中濃度、BALF 中の細胞分画、肺胞マクロファージの貪食能、並びに、尿中、肺中及び BALF 中アミカシン濃度。

14 日間の投与期間又は 1 ヵ月の回復期間後、ALIS 群では他の群（生理食塩水群を含む）と比較して、肺のマクロファージ数に明らかな増加は認められなかった。しかし、ALIS 群のラットのマクロファージは他の群よりも大型で、空胞化が多く認められた（Day 15 のみ）。Day 15 又は Day 43 に、ALIS 群の肺の多形核白血球細胞（PMN）数に、他の吸入群と比較して有意な増加は認められなかった。マクロファージの貪食能及びその一酸化窒素及び TNF-α を産生する能力は、ALIS 吸入に影響されなかった。ALIS を投与したラットの肺中には、アミカシンが FA 群と比較して高濃度で沈着し、この差は投与終了後 1 ヵ月間持続した（最終投与後；約 5 倍、回復期間終了後；3 倍）。肺中の濃度が高いことと一致して、尿中でのアミカシンの排泄量（Day 0～Day 43 に複数日測定）は FA 群よりも ALIS 群で高値であった。尿の排泄データから、肺においてリポソームからアミカシンが持続的に放出されていることが推察された。

以上、ALIS（19.9 mg/mL アミカシン含有）を 1 日 1 回ラットに吸入投与した場合の忍容性は良好であり、マクロファージの機能に及ぼす影響は認められなかった。

#### 2.6.6.8.2.2 3 サイクル吸入投与による肺胞マクロファージの機能に関する 6 ヵ月間試験（2.6.7.17.1 項, Transave Report AMIK-BIO-2009-16-MAC, CTD 4.2.3.7.2-2）

ALIS が肺胞マクロファージの機能に及ぼす影響を検討する目的で、本 GLP 非適用試験を実施した。本試験では、1 群雌雄各 6 匹の 6 群のラットに 1.5% NaCl（対照群）を、1 群雌雄各 6 匹の 9 群のラットに ALIS（70 mg/mL アミカシン含有）を 90 mg/kg/日の用量で吸入投与し、30 日間の投与期間を 1 サイクルとして 1、2 又は 3 サイクル行い、それぞれのサイクルに 30 日間の回復期間を設けた。各 30 日間の投与期間及び各 30 日間の回復期間終了後、対照群及び投薬群の各群

から雌雄各 6 匹を評価した（被験物質を投与したラットは投与後 24 時間及び 72 時間の双方の時点で評価した）。被験液エアロゾルはヒト臨床用 PARI LC® Star ネブライザーを用いて作製した。本試験では、各 30 日間投与後及び／又は各 30 日間回復期間後に以下の項目を評価した：チャンバー内エアロゾル濃度、器官重量（腎臓）、剖検及び病理組織学的検査（肺のみ）、構成的及び LPS 誘導性の炎症メディエーターである TNF-α 及び一酸化窒素（硝酸塩として測定）の BALF 中濃度、BALF 中の細胞分画、肺胞マクロファージの貪食能及び酵母殺菌能、並びに肺中及び BALF 中アミカシン濃度。

本試験における ALIS の忍容性は良好であり、生存中、投与に関連する所見は認められなかった。各 30 日の投与期間終了後 24 時間及び 72 時間に剖検した ALIS 群のラットの肺における主な病理組織学所見では、主に中等度の大型の泡沫肺胞マクロファージのびまん性の集簇が認められた。各 30 日間の回復期間後、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。最終（3 サイクル目）の 30 日間の投与期間終了後に雄 1 匹に、最終の回復期間終了後に雌 1 匹にマクロファージの集簇を伴う軽微な細気管支肺胞（BA）の過形成が認められた。最終投与期間終了後、雄 2 匹及び雌 1 匹（最終の回復期間終了後に BA の過形成が認められた同一の雌）にマクロファージの集簇を伴う軽微な多巣性の間質性炎症も認められた。対照群の雌 1 匹にも最初の 30 日間の回復期間終了後に軽微な多巣性の間質性炎症が認められた。各 30 日投与期間終了 24 時間及び 72 時間後に収集した BALF では、対照群に比べて ALIS 群ではマクロファージ及び PMN 数が高値であった。各 30 日の回復期間後には、これらの細胞数は対照群の細胞数に近づいた。このことから、本剤は、炎症性サイトカイン及びケモカイン産生に関与せずに（後述するとおり一酸化窒素及び TNF-α の上昇がみられないことに基づく）貪食細胞の浸潤を誘導することが示された。

ALIS 群のラットの BALF 中マクロファージ数は、試験期間を通して対照群の 2 倍以上の高値を示した。3 サイクル目の最終投与から 24 時間以内に採取したマクロファージのナイルレッド染色検査では、1.5% NaCl 群と比較して ALIS 群のラットで細胞内非極性脂質（コレステロール及びコレステロールエステルを示唆）を有するマクロファージが多く認められた。3 サイクル目の回復期間終了後、投薬群のラットにおけるマクロファージのサイズ及び非極性脂質量は、投与後の値と比較して低下した。このマクロファージの所見は組織病理学的観察と一致した（各回復期間終了後、マクロファージの集簇の回復性及び／又は回復傾向は明らかであった）。各 30 日投与期間終了 24 時間及び 72 時間後及び各 30 日回復期間終了後に収集した BALF 中の一酸化窒素及び TNF-α の値は、対照群と同等であった。*ex vivo* 試験から、ALIS 群のラットの肺胞マクロファージは、対照群と同様の貪食能、酵母殺菌能及び LPS に対する反応（一酸化窒素及び TNF-α の上昇）を示した。各 30 日投与期間終了後の肺中アミカシン濃度の平均値は約 3～4 mg/g であった（ALIS のラット 1 ヵ月間及び 6 ヵ月間反復投与毒性試験と同等、2.6.6.3.3.2 項及び 2.6.6.3.3.3 項）。各 30 日回復期間終了後には約 1/10 に低下した（ラット 1 ヵ月間及び 6 ヵ月間反復投与毒性試験と同じ）が、生物学的活性は認められた。対照的に BALF 中アミカシン濃度の平均値は、FA 群の 0.1 mg/mL を下回った。

以上より、ラットでは本剤の 90 mg/kg/日最大 3 サイクルの吸入投与の忍容性は良好であった。各 30 日間の投与期間終了後の肺における主な病理学的所見は、軽度または中等度のびまん性泡沫肺胞マクロファージの集簇であった。各 30 日間の回復期間終了後、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。3 サイクル目の 30 日投与終了後、一部のラットの肺にマクロファージの集簇に伴う軽微な間質性炎症及び／又は細気管支の肺胞過形成（ラットを用い

た反復吸入投与試験の結果で述べたように、ALIS による直接の影響ではないと考えられた）が認められた。組織病理学的所見と一致して、ALIS 群のラットにおいて BALF 中のマクロファージ及び多形核白血球細胞の値の上昇、マクロファージのサイズの大型化、マクロファージの非極性脂質（例：コレステロール、コレステロールエステル）が認められた。ALIS 群のラットの肺胞マクロファージは、適切な刺激により、正常な細胞機能（貪食、酵母殺菌、サイトカイン発現）を示した。以上、ALIS は、30 日投与+30 日休薬を 1 サイクルとして 3 サイクル投与した場合、肺胞マクロファージの正常な細胞機能を阻害せず、変化させなかった。

### 2.6.6.8.3　機序試験

本剤を用いた他の機序試験は実施しなかった。

### 2.6.6.8.4　依存性試験

本剤の薬理学的クラス及び当該クラスの他の薬剤に依存性の問題が認められていないことから、本剤の依存性に関する評価は実施しなかった。

### 2.6.6.8.5　代謝物試験

アミカシンは代謝されないことから（Bodey, 1974）、本剤の代謝試験は実施しなかった。

### 2.6.6.8.6　不純物試験

安全性確認の閾値 0.30%（3.2.S.4.5 項）を上回るアミカシン硫酸塩原薬中の不純物 [redacted] 及び 2 つの不明な不純物の安全性を確認するため、細菌を用いた復帰突然変異試験（[redacted] Study No. HUD0381）を実施した。また、ALIS 製剤に含まれる不純物X*について、その規格値 1.5%の安全性を裏付けるために、ラットを用いた反復投与毒性試験（[redacted] Study No. TQ72SR）を実施した。この 2 試験を除き、アミカシン硫酸塩、ALIS の分解物又は ALIS の添加物（DPPC 及びコレステロール）の分解物の不純物を確認するために特化した試験は、以下の理由により不要と考えた：不純物の量が ICH 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」に記されている定量閾値未満であったこと；反復投与毒性試験において使用したロットに臨床ロットと同等以上の量が含まれていたこと；動物を用いた反復投与試験における用量（mg/g 肺重量及び／又は体表面積に基づいたヒト等価用量）がヒトよりも高値であったこと；不純物が内因性物質（DPPC、コレステロール及び NaCl）であること。

#### 2.6.6.8.6.1　不純物評価のための細菌を用いた復帰突然変異試験（2.6.7.17.2 項, [redacted] Study No. HUD0381, CTD 4.2.3.7.6-1）

本 GLP 試験ではアミカシン硫酸塩 2 ロットを評価した。一方のロット（081001-X）には、不純物 [redacted] 及び [redacted] の未知不純物がそれぞれ約 0.6%含まれた。もう一方のロット（990167 0015 9）には [redacted] の未知不純物が約 0.36%含まれた。各ロットについて、ネズミチフス菌（ヒスチジン）試験株 TA98、TA100、TA1535 及び TA1537 並びに大腸菌（トリプトファン）試験株 WP2*uvr*A を用いて、フレームシフト変異又は塩基対置換変異の誘発性を評価した。これらの試験の溶媒対照は逆浸透膜水であり、陽性対照についても評価した。被験物質及び対照物質は、ネズミチフス菌及び大腸菌の試験株を用い、S9 活性



＊新薬承認情報提供時に置き換え

下／非活性下の双方で検討した。最大 5000 µg/plate（S9 活性下／非活性下）のアミカシン硫酸塩の検査濃度で評価した。

細胞毒性が、ネズミチフス菌では 150 µg/plate 以上で、大腸菌では 50 µg/plate 以上で認められた。最大 5000 µg/plate まで検討した場合、いずれの試験株においても活性下／非活性下を問わず 1 プレート当たりの復帰突然変異体数の平均値は増加しなかった。したがって、アミカシン硫酸塩のいずれのロットも突然変異誘発性を示さなかった。本試験の結果に基づき、アミカシン硫酸塩中の不純物[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考えられた。

### 2.6.6.8.6.2 不純物X*評価のためのラットを用いた 14 日間反復投与毒性試験（2.6.7.17.2 項, [redacted] Study No. TQ72SR, CTD 4.2.3.7.6-2）

本 GLP 適用試験では、1 群雌雄各 10 匹のラット 4 群に対し、ALIS を 0（1.5% NaCl）及び 90 mg/kg/日+不純物X*を低用量、中用量及び高用量（それぞれ 0.04、0.48、1.7 mg/kg/日）の用量で 1 日 1 回鼻部吸入により最長 240 分間 14 日間投与した。さらに、1 群雌雄各 5 匹のラット（1.5% NaCl 群及び高用量 不純物X*群のみ）を 14 日間の回復期間後に評価した。また、1 群雌雄各 3 匹（1.5% NaCl 群）又は 1 群雌雄各 6 匹（ALIS 群）を用いて TK 評価（血清中及び肺中）を行った。本試験では以下の評価を行った：チャンバー内エアロゾル濃度、生存性、一般状態の観察、眼科学的検査、体重、摂餌量、臨床病理検査、器官重量、剖検及び病理組織学的検査。試験期間をとおしたアミカシンの推定投与量は目標用量と同様であった（低用量、中用量、高用量 不純物X* 投薬群でそれぞれ 98、99、102 mg/kg/日）。試験期間中の MMAD の平均値は 3.1 µm 以下であった。

算出した肺重量 1 グラム当たりの不純物X*濃度は、低用量、中用量及び高用量不純物X*群でそれぞれ 0.61、7.20、26.9 µg/g 重量であった。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（表 2.6.6- 9）。

生存中の変化はいずれも ALIS 投与と関連しなかった。すべての ALIS 群の肺重量は、群全体で同様に増加した。2 週間の回復期間後、肺重量の増加の一部に回復性が認められた。ALIS に関連した病理組織学的所見が、すべての ALIS 群での喉頭、鼻甲介、肺及び気管気管支リンパ節で認められた。これらの発現頻度及び／又は重症度はすべての ALIS 群で同様であり、不純物X* の用量の影響を受けなかった。投与後 2 週間の回復期間後、すべての所見は回復又は回復傾向を示した。

本試験においても、ラットを用いた本剤の過去の試験と同様に、上気道（喉頭及び鼻甲介）の刺激性が認められ、ラットを用いた鼻部吸入試験で多くみられる非特異的な局所刺激を反映したものと考えられた。喉頭の変化としては、上皮のびらん／潰瘍、呼吸上皮の扁平上皮化生、炎症性細胞の浸潤の増加、披裂軟骨の扁平上皮の過形成及び繊維症／新生血管形成が認められた。鼻甲介の変化では、炎症性細胞の浸潤、扁平上皮の過形成／角化、呼吸上皮の変性及び粘液細胞過形成がみられた。肺では、本剤投与の結果、肺胞マクロファージが増加した。肺胞マクロファージの増加は、対照群を含むすべての群の雌雄で認められたが、不純物X* 用量に関わらず、対照群と比較して ALIS 群で発現頻度及び重症度が上昇した。気管気管支リンパ節では傍皮質の細胞充実性の増加が認められ、肺のマクロファージの集簇及び被験物質の排除に関連する可能性が極めて高い適応性反応と考えられた。

表 2.6.6- 9　ラットを用いた 2 週間試験における算出した肺 不純物X*濃度のヒトとの比較

| SPECIES | STUDY | 不純物X* DOSE (mg/kg/day) | LUNG 不純物X* LEVEL (µg/g of lung) | MULTIPLE OF HUMAN LUNG 不純物X* LEVEL |
|---|---|---|---|---|
| Human | ALIS development program | 5.18[a] | 4.66[b] | - |
| Rat | 2 weeks | 0.04 | 0.61 | 0.13 |
| | | 0.48 | 7.20 | 1.5 |
| | | 1.7 | 26.9 | 5.8 |

[a] Potential highest 不純物X* dose per kg body weight based on a specification limit of 1.5% for 不純物X* 37 mg/mL DPPC in the ALIS formulation, an ALIS dose volume of 8.4 mL, and a body weight of 60 kg.

b Based on a 1000 g (adult) lung weight and a 0.43 deposition factor.

以上、ALIS 90 mg/kg/日+異なる用量の不純物X*を、ラットに最大 14 日間連続で吸入投与した結果、忍容性は概ね良好であった。さまざまな量の 不純物X*との ALIS 懸濁液の鼻部吸入による 14 日間反復投与は、主として喉頭、鼻甲介、肺及び気管気管支リンパ節の変化と関連したが、これらの変化は不純物X*の量と関連しないと考えられた。したがって、被験物質中の不純物X*の含有量は、ALIS 懸濁液の毒性プロファイルを大幅に変えず、不純物X* の規格値 1.5%は適切と考えられた。

### 2.6.6.8.7　その他の試験

重要な非臨床試験において、添加物ジパルミトイルホスファチジルコリン（DPPC）、コレステロール及び NaCl を評価するために、空リポソーム（DPPC 及びコレステロールを含有した ELC 群）及び／又は 0.9% NaCl を投与した別の対照群を設け、ALIS 試験内でこれらの安全性について評価した。ラットを用いた 4 週間試験（試験番号 667396）では、空気群、ELC 投与群及び 0.9% NaCl 投与群の 3 群の対照群を含めた。空気群、ELC 群及び 0.9% NaCl 群で有害な所見は認められなかった。イヌを用いた 9 ヵ月試験（試験番号 11-6400）では、ELC 群及び 0.9% NaCl 群を対照群として含めた。ラットを用いた 4 週間試験と同様に、この 2 つの対照群においても有害な所見は認められなかった。したがって、添加物である DPPC、コレステロール及び NaCl に対する安全域を、これらの反復投与毒性試験 2 試験から得ることが可能であった。

DPPC については、ラットを用いた 4 週間試験及びイヌを用いた 9 ヵ月間試験に基づき、安全域をそれぞれ 6.1 及び 3.5 とした（表 2.6.6- 10）。同様に、コレステロールについては、ラットを用いた 4 週間試験及びイヌを用いた 9 ヵ月間試験の ELC 群に基づき、安全域をそれぞれ 10 及び 3.3 とした（表 2.6.6- 11）。また、NaCl については、ラット 4 週間試験及びイヌ 9 ヵ月試験に含まれた 0.9% NaCl の用量に基づき、安全域をそれぞれ 5.5 及び 3.3 とした（表 2.6.6- 12）。

表 2.6.6- 10　反復投与毒性試験にて算出された肺中 DPPC 濃度のヒトとの比較

| SPECIES | STUDY | LUNG DPPC LEVEL (mg/g of lung) | MULTIPLE OF HUMAN LUNG DPPC LEVEL |
|---|---|---|---|
| Human | ALIS clinical development program | 0.120[a] | - |
| Rat[b] | 4 weeks | 0.729 | 6.1 |
| Dog[c] | 9 months | 0.414 | 3.5 |

[a] Based on 280 mg DPPD per ALIS vial, a 1000 g (adult) lung weight and a 0.43 deposition factor.
[b] Study 667396 (4-week rat study), ELC group, using a 0.10 deposition factor.
[c] Study 11-6400 (9-month dog study), ELC group, using a 0.25 deposition factor.

表 2.6.6- 11　反復投与毒性試験にて算出された肺中コレステロール濃度のヒトとの比較

| SPECIES | STUDY | LUNG CHOLESTEROL LEVEL (mg/g of lung) | MULTIPLE OF HUMAN LUNG CHOLESTEROL LEVEL |
|---|---|---|---|
| Human | ALIS clinical development program | 0.060[a] | - |
| Rat[b] | 4 weeks | 0.618 | 10 |
| Dog[c] | 9 months | 0.197 | 3.3 |

[a] Based on 140 mg cholesterol per ALIS vial, a 1000 g (adult) lung weight and a 0.43 deposition factor.
[b] Study 667396 (4-week rat study), ELC group, using a 0.10 deposition factor.
[c] Study 11-6400 (9-month dog study), ELC group, using a 0.25 deposition factor.

表 2.6.6- 12　反復投与毒性試験にて算出された肺中 NaCl 濃度のヒトとの比較

| SPECIES | STUDY | LUNG NaCl LEVEL (mg/g of lung) | MULTIPLE OF HUMAN LUNG NaCl LEVEL |
|---|---|---|---|
| Human | ALIS clinical development program | 0.046[a] | - |
| Rat[b] | 4 weeks | 0.252 | 5.5 |
| Dog[c] | 9 months | 0.152 | 3.3 |

[a] Based on 107 mg NaCl per ALIS vial, a 1000 g (adult) lung weight and a 0.43 deposition factor.
[b] Study 667396 (4-week rat study), 0.9% NaCl group, using a 0.10 deposition factor.
[c] Study 11-6400 (9-month dog study), 0.9% NaCl group, using a 0.25 deposition factor.

## 2.6.6.9考察及び結論

非結核性抗酸菌（NTM）症患者を対象とする ALIS の使用を支持するため、一連の非臨床安全性評価試験を実施し、毒性を評価した。

本剤は、抗菌活性を肺で効果的に発揮するよう肺を標的に吸入投与するため、肺及び上気道以外に重要な所見がみられないことを前提に、肺中のアミカシン濃度が本剤の安全性にとって最も重要と考えられる。本剤の主要な反復投与毒性試験で得られた肺中濃度と、本剤 590 mg を投与したヒトの肺中濃度との比較を表 2.6.6- 13 に示す。

**表 2.6.6- 13　ラット及びイヌを用いた主要な反復吸入毒性試験における推定肺中濃度（平均値）のヒトとの比較**

| SPECIES | STUDY | DOSE (mg/kg/day) | LUNG AMIKACIN LEVEL (mg/g of lung) | Exceeds 1 mg/g Lung Weight Threshold[g] | MULTIPLE OF HUMAN LUNG AMIKACIN LEVEL (adult) |
|---|---|---|---|---|---|
| Human[a] | ALIS clinical development program | 12 (50-kg adult) | 0.254 | No | - |
| Rat[b] | 6 months | <u>≤ 10</u> | 1.314 | Yes | 5.2 |
| | | <u>30</u> | 2.451 | Yes | 9.6 |
| | | 90 | 2.959 | Yes | 11.6 |
| Rat[c] | 2 years | 5 | 0.17 | No | 0.67 |
| | | 15 | 0.50 | No | 2.0 |
| | | 45 | 1.5 | Yes | 5.9 |
| Dog[d] | 3 months | 5 | 1.237 | Yes | 4.9 |
| | | <u>10</u> | 2.659 | Yes | 10 |
| | | <u>30</u> | 5.223 | Yes | 21 |
| Dog[e] | 9 months | 5 | 0.678 | No | 2.7 |
| | | 10 | 1.270 | Yes | 5.0 |
| | | <u>30</u> | 2.685[f] | Yes | 11 |

NOAEL doses are underlined.
[a] Lung amikacin concentrations were calculated as follows: 590 mg ALIS dose/1000 g (adult) lung weight × 0.43 (deposition factor).
[b] Study No. 07-6308 (combined-gender data); NOAEL < 10 mg/kg/day (lung) 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
[f] Exclusion of a low outlier value in males of 0.0689 mg/g (compared to values of 2.070, 3.650, and 2.690 mg/g for other males in the 30-mg/kg/day group) results in a mean combined-gender value of 3.059 mg/g of lung).
[g] Total lung burden threshold of 1 mg/g lung weight as established by Jones, 2012. The determination is based on particulate dose based on measured (actual) lung amikacin concentrations only (ie, excluding the liposomal contribution).

ラットを用いた 6 ヵ月間反復投与試験の最高用量である 90 mg/kg/日群における肺中アミカシン濃度は、本剤を 590 mg で投与した成人における濃度よりも 12 倍高いと推定された。イヌを用いた 3 ヵ月間及び 9 ヵ月間試験における最高用量 30 mg/kg/日の肺中アミカシン濃度は、本剤を 590 mg で投与した成人のそれぞれ 21 倍及び 11 倍高いと推定された。本剤の反復投与毒性試験に

おいて検討した最高用量（ラットで 90 mg/kg/日、イヌで 30 mg/kg/日）で得られた血清 $AUC_{last}$ は、予測どおり、ヒトでの 590 mg での血清 $AUC_{last}$ 値以下であった。

ラット及びイヌにおける ALIS に関連した主な所見は、肺の泡沫肺胞マクロファージの集簇であった。すべての試験で、リポソームに封入したアミカシンの曝露が重要な肺胞マクロファージ反応を引き起こしたが、これは哺乳類における吸入粒子に対する適応性の複合的な排除機構の一環と考えられた。しかし、ラットでは、本剤の用量及び／又は投与期間が増加すると、投与による肺の組織病理にマクロファージの集簇を超える明らかな影響が認められ、これは肺での本剤の粒子の高負荷による粒子過負荷を反映したものであった。ラットを用いたがん原性試験では、ELC 群においても泡沫肺胞マクロファージの増加が認められ、有効成分であるアミカシンがない場合のリポソームの影響が示された。

ラットを用いた 6 ヵ月間試験では、ALIS の用量及び／又は投与期間の増加に伴い、粒子過負荷に至る明らかな一連の病理学的影響が認められた。泡沫マクロファージの発現頻度及び重症度は、用量及び投与期間の増加に伴って上昇し、炎症及び過形成の発現頻度及び重症度が高くなった。回復期のデータから、10 mg/kg/日群では肺におけるこれらの変化の大部分の回復が認められたが、30 mg/kg/日群及び 90 mg/kg/日群では完全な回復は認められず、この 2 つの高用量では、粒子過負荷の存在下で極めて緩徐な消失過程を反映して、粒子保持時間の延長及び／又は消失期間の遅延が示された。一方で、3 ヵ月間又は 9 ヵ月間のイヌの試験では、本剤を 1 日 1 回最大 30 mg/kg/日の用量で反復吸入投与したところ、中等度から重度のマクロファージの集簇が認められ、また、ラットを用いた 6 ヵ月試験と同等以上の肺の粒子負荷が認められたにもかかわらず、肺には炎症が認められなかった。

ラットを用いた本剤の吸入によるがん原性試験では、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 ALIS 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 6 倍の用量で発現した。このときの肺用量は 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。この閾値は、Jones（2012）が提唱するラットの肺における粒子負荷による毒性変化の閾値（1 mg/g 肺重量）を上回った。中用量群では、肺用量が肺重量で補正した臨床用量の 2 倍（1.5 mg/kg/日）、肺粒子負荷量が 0.8 mg/g 肺重量であり、同群では ALIS に関連した腫瘍性病変は認められなかった。ラットを用いた本剤のがん原性試験における有害反応に対する肺の吸入粒子負荷量は、提案された閾値と概ね一致すると考えられた。ラットを用いたがん原性試験では、流入リンパ節にも泡沫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（投与期間）に関する考察を裏付けるものであった。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の集簇の発現頻度の上昇は、用量及び投与期間の双方と関連した。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）。重要なことは、ALIS 長期投与により、リンパ節において薬剤に関連する有害な炎症反応が示されなかったことである。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、その頻度は中用量群と同等であった。このことは、ELC 群と中用量群の相対的肺粒子負荷量がほぼ同等（肺用量は ELC 群 2.5 mg/kg に対し中用量群 3 mg/kg、肺負荷量は ELC 群 1 mg/g に対し中用量群 0.8 mg/g）であったことから予想される範疇であった。これらのデータから、観察された肺病変が本剤による直接の影響ではなく、肺の総粒子負荷量に起因するものであることが示唆された。

粒子負荷に誘発された肺の腫瘍形成がラットに特異的な事象であることは文献でも報告されている（Hext, 1994）。イヌ及びサルを用いたエアロゾル長期投与試験では粒子過負荷による毒性変化はみられないが、ラットは他の動物種とは異なり肺の変化が認められたことが報告されている（Snipes, 1996）。粒子負荷により、ラットでは慢性炎症、肺胞中隔線維化、肺胞蛋白症、上皮過形成、扁平上皮化生、及び良性／悪性肺腫瘍等が発現する。マウス及びシリアンハムスターでも粒子排除の障害による低頻度の慢性病変がみられるが、肺腫瘍の発現頻度の増加は認められないことが報告されており（Hahn, 1999）、肺病変がラット特異的であることが支持された。

げっ歯類と、イヌ、サル及びヒトを含む非げっ歯類の肺の構造及び機能にも、重要な解剖学的差異があり、これにより肺負荷に対するラット特異的反応についての説明が可能である（Mauderly, 1996）。げっ歯類では、気管末端から分岐する誘導気道は、肺胞のない（綿毛を有する）最小気道である終末細気管支となる。誘導気道上に沈着した粒子及び肺胞表面上に集簇した粒子を含むマクロファージは、通常、粘膜線毛輸送により肺から排除される。非げっ歯類では、終末細気管支は分岐した肺胞管又は多数の非線毛肺胞及び肺胞嚢を囲む肺胞管となる。ラットの肺胞表面領域は、ヒトを含めた非げっ歯類に比較して非常に小さい。そのため、同じ粒子径及び用量で、ラットは大動物に比較して単位表面積当たりの負荷がはるかに高くなることが予想される（表 2.6.6- 14）。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るが、肺胞群に至る前にさらに細かく分岐し肺胞管となり肺胞管を囲む肺胞数が増加する。動物種間の肺胞は類似しているが、肺胞表面積は、ラットの肺表面積（体重 250 g で 0.39 $m^2$）と比較すると、イヌでは約 230 倍（体重 10 kg で 90 $m^2$）、ヒトでは 210 倍（体重 60 kg で 82 $m^2$）であり、これらの大きな動物種は粒子高負荷に対する効果的な処理が可能であることが示唆される（表 2.6.6- 14）。

大動物種と比較したラットのその他の重要かつ顕著な特徴として、肺容量、肺表面積、肺胞数、並びに肺胞マクロファージの数及びサイズの違いが挙げられ、これらすべてが、粒子負荷に対する反応のタイプ（適応性又は毒性）の重要な決定因子となる（表 2.6.6- 14）。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はるかに大きい（5 倍）（Newton, 2002）。ラットのマクロファージが明らかに小さいこと（イヌ及びヒトの約 1/4）を考慮すると、これらの差異から大動物と比較してラットの粒子排除能力が低い可能性が示唆される。これにより、ラットを用いた本剤の 2 年試験で肺の粒子過負荷により誘発された肺がん原性の影響が認められたこと、イヌでは本剤による同等あるいはそれ以上の肺粒子負荷にもかかわらず、有害な影響がみられなかったことが生物学的及び解剖学的に説明可能と考える。

表 2.6.6- 14　各動物種の肺関連パラメータ [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 | $\mu m^3$ | | 639 | 654 | 2,492 | 3.9 | 3.8 |
| Area patrolled by each AM | $\mu m^2$ | | 140,000 | 13,400 | 22,000 | 0.2 | 1.6 |

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

ラット及びイヌにおけるその他の変化として、上気道の変性及び／又は増殖性変化（本剤の長期投与による局所刺激性と一致する変化）、並びに毒性変化ではない軽度な腎臓の変化が認められた。本剤に関連するいずれの変化も回復期間（3 ヵ月以下）後、回復性又は回復傾向を示した。

標準的な組み合わせの遺伝毒性試験において、本剤の遺伝毒性は認められなかった。したがって、本剤に遺伝毒性リスクはなく、ラットの 2 年間試験で観察されたがん原性反応は後成的変化と考えられる。

ヒトにおける本剤吸入後のアミカシンの全身曝露量は、非経口投与後のアミカシン全身曝露量に比べてはるかに少ないため、ヒトにおける安全性を裏付ける上で、本剤の吸入による生殖発生毒性試験は必要ないと考えた。本剤のラット及びイヌを用いた反復投与吸入毒性試験で、生殖器官において有害な影響が認められなかったこと、並びに非経口アミカシンのラット、マウス及びウサギを用いた催奇形性試験で有害な作用がみられないこと（阿久津, 1982、松崎, 1975a、松崎, 1975b）からも、本剤の生殖発生毒性試験は不要と考えた。

本剤を 90 mg/kg/日の用量でラットに 3 サイクル吸入投与（1 サイクル：1 ヵ月間投与+1 ヵ月間休薬）した結果、本剤の反復投与毒性試験と同様に、肺にマクロファージの集簇が認められた。各サイクルの休薬期間終了後には回復性及び／又は回復傾向が認められた。マクロファージ機能への毒性作用は認められなかった。これらの結果に加えて、本剤の 9 ヵ月間までの反復吸入毒性試験の成績を考慮すると、本剤がヒトマクロファージ機能に影響を及ぼす可能性は低いものと考えられた。

以上、本剤のヒトにおける潜在的リスクを評価するために非臨床安全性試験を実施した結果、本剤の臨床使用を妨げるリスクは確認されなかった。この結論は、本剤のこれまでの臨床試験成績と一致するものであり、想定外の徴候は認められず安全プロファイルは好ましいものである（2.7.4 項）。

## 2.6.6.10 参考文献

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

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.

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

FDA (CDER), NDA Application Number 20-744 (Curosurf®), Pharmacology Review 1997.

Hahn FF. (1999), Carcinogenicity: Testing, predicting, and interpreting chemical effects, New York: Marcel Dekker, 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. 1999:259-292.

Hext PM. Current perspectives on particulate induced pulmonary tumours. Hum Exp Toxicol. 1994;13(10):700–715.

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.

Lenz B, Crameri FM, Eichler DA, Schläppi B, Wiltshire H, Wood J, et al. Modulation of oral squamous cell carcinoma incidence in rats via diet and a novel calcium channel antagonist. Toxicol Pathol. 2005;33:356-364.

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.

Madsen C. Squamous-cell carcinoma and oral, pharyngeal and nasal lesions caused by foreign bodies in feed. Cases from a long-term study in rats. Lab Anim. 1989;23:241-247.

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

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

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

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;2(suppl):311-426.

Renne R, Brix A, Harkema J, Herbert R, Kittel B, Lewis D, et al. Proliferative and nonproliferative lesions of the rat and mouse respiratory tract. Toxicol Pathol. 2009;37:5S-73S.

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.

Transave (Insmed) Position Paper 2009: Appendix 1. End of Phase 2 Briefing Book. Justification for excluding inhalation reproductive toxicology and safety pharmacology studies from the nonclinical development plan for Arikace™.

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.

# 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
## 2.6.7 毒性試験概要表

インスメッド合同会社

# 目次

頁
略号一覧表 3
2.6.7 毒性試験概要表 4
2.6.7.1 毒性試験：一覧表 [a] 4
2.6.7.2 トキシコキネティクス：トキシコキネティクス試験の一覧表 6
2.6.7.3 トキシコキネティクス：トキシコキネティクス試験成績の一覧 [a] 7
2.6.7.4 毒性試験：使用ロット 9
2.6.7.4.1 原薬（バッチ毎）一覧 9
2.6.7.4.2 製剤（バッチ毎）一覧 11
2.6.7.5 単回投与毒性試験 15
2.6.7.6 反復投与毒性試験：重要な試験以外の試験 16
2.6.7.7 反復投与毒性試験：重要な試験 19
2.6.7.7.1 ラットを用いた 6 ヵ月間反復吸入毒性試験 19
2.6.7.7.2 イヌを用いた 3 ヵ月間吸入毒性試験 28
2.6.7.7.3 イヌを用いた 9 ヵ月間吸入毒性試験 33
2.6.7.8 *In Vitro* 遺伝毒性試験 39
2.6.7.8.1 細菌を用いた復帰突然変異試験 39
2.6.7.8.2 マウスリンフォーマ試験 42
2.6.7.8.3 染色体異常試験 45
2.6.7.9 *In Vivo* 遺伝毒性試験 47
2.6.7.10 がん原性試験 48
2.6.7.11 生殖発生毒性試験：重要な試験以外の試験 52
2.6.7.12 生殖発生毒性試験：受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験 53
2.6.7.13 生殖発生毒性試験：胚・胎児発生に関する試験 54
2.6.7.14 生殖発生毒性試験：出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験 55
2.6.7.15 新生児を用いた試験 56
2.6.7.15.1 新生児を用いた試験：重要な試験以外の試験 56
2.6.7.15.2 新生児を用いた試験：重要な試験 57
2.6.7.16 局所刺激性試験 61
2.6.7.17 その他の毒性試験 62
2.6.7.17.1 免疫毒性試験 62
2.6.7.17.2 不純物の毒性試験 64

## 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 |
| BALF | bronchoalveolar lavage fluid：気管支肺胞洗浄液 |
| BLQ | below limit of quantification：定量限界未満 |
| CHO | Chinese Hamster Ovary：チャイニーズハムスター卵巣 |
| 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 |
| 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） |
| 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 |
| LOQ | limit of quantitation：定量限界 |
| MPCE | micronucleated polychromatic erythrocyte：小核含有多染性赤血球 |
| MTD | maximum tolerated dose：最大耐量 |
| NOAEL | no observed adverse effect level：無毒性量 |
| PCE | polychromatic erythrocyte：多染性赤血球 |
| PND | postnatal day：生後日数 |
| TK | toxicokinetics：トキシコキネティクス |

# 2.6.7 毒性試験概要表

## 2.6.7.1 毒性試験：一覧表 [a]

Test Article: ALIS

| Study type | Species and strain | Method of administration | Duration of dosing | Doses (mg/kg/day) [b] | GLP compliance | Testing facility | Study or report number | CTD Location |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Single-dose toxicity studies: | No single-dose studies were conducted with ALIS. Data from the first day of dosing in repeat-dose inhalation toxicity studies in mice, rats, and dogs demonstrated that ALIS was well tolerated following a single dose. | | | | | | | |
| Repeat-dose toxicity studies: | Mouse/CD-1 | Inhalation | 13 weeks | 0, 10, 30, 90 | Yes | [redacted] USA | 07-6307 | 4.2.3.2-1 |
| | RatCD®IGS Crl:CD(SD) | Inhalation | 28 days | 0, 10, 100 | No | [redacted] UK | 667621 | 4.2.3.2-2 |
| | RatCD®IGS Crl:CD(SD) | Inhalation | 30 days | 0, ELC, 10, 30, 100 + (Free Amikacin Control: 100) | Yes | [redacted] UK | 667396 | 4.2.3.2-3 |
| | Rat/CD®IGS Crl:CD(SD) | Inhalation | 6 months | 0, 10, 30, 90 [c] | Yes | [redacted] USA | 07-6308 | 4.2.3.2-4 |
| | Dog/Beagle | Inhalation | 28 days | 0, 5, 50 | No | [redacted] UK | 667637 | 4.2.3.2-5 |
| | Dog/Beagle | Inhalation | 30 days | 0, ELC, 5, 15, 50 + (Free Amikacin Control: 50) | Yes | [redacted] UK | 667574 | 4.2.3.2-6 |
| | Dog/Beagle | Inhalation | 3 months | 0, 5, 10, 30 [c] | Yes | [redacted] USA | 07-6306 | 4.2.3.2-7 |
| | Dog/Beagle | Inhalation | 9 months | 0, ELC, 5, 10, 30 | Yes | [redacted] USA | 11-6400 | 4.2.3.2-8 |
| Genotoxicity studies - *In vitro* | *Salmonella typhimurium* TA98, 100, 1535, 1537 *Escherichia coli* WP2*uvrA* | Incubation | 52 ± 4h | 0.333 to 500/1000 µg/plate (± S9) 0.001 to 100 µg/plate (± S9) | Yes | [redacted] USA | 7522-100 | 4.2.3.3.1-1 |
| | Mouse/lymphoma L5178Y cell line | Incubation | 4 and 24 h 4 h | 125-5000 µg/mL (− S9) 125-5000 µg/mL (+ S9) | Yes | [redacted] USA | 7522-102 | 4.2.3.3.1-2 |
| | Chinese hamster ovary cells | Incubation | 3 h 3 h 18 h | 14.5-2140 µg/mL (± S9) 1.57-100 µg/mL (+ S9) 1.57-100 µg/mL (− S9) | Yes | [redacted] USA | 7522-101 | 4.2.3.3.1-3 |
| Genotoxicity study - *In vivo* | Rat/CD® IGS Crl:CD(SD) | Inhalation | 3 days | 0, 15, 45, 135 | Yes | [redacted] USA/UK | 07-6315 | 4.2.3.3.2-1 |

## 2.6.7.1 毒性試験：一覧表[a]（続き）

Test Article: ALIS

| Study type | Species and strain | Method of administration | Duration of dosing | Doses (mg/kg/day)[b] | GLP compliance | Testing facility | Study or report number | CTD Location |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Carcinogenicity | Rat/CD®IGS Crl:CD(SD) | Inhalation | 2 years | 0, ELC, 5, 15, 45 | Yes | [redacted] USA | 09-6345 | 4.2.3.4.1-1 |
| Reproductive and developmental toxicity studies | Juvenile Rat/CD®IGS Crl:CD(SD) | Inhalation | 28 days (PND 10-37) | 0, 10, 30, 60 | No | [redacted] USA | 14-6480 | 4.2.3.5.4-1 |
| | Juvenile Rat/CD®IGS Crl:CD(SD) | Inhalation | 28 days (PND 10-37) | 0, 10, 30, 90[e] | Yes | [redacted] USA | 14-6002 | 4.2.3.5.4-2 |
| Other toxicity studies: | | | | | | | | |
| Immunotoxicity | Rats/CD®IGS Crl:CD(SD) | Inhalation | 14 days | Not specified; Empty Liposomes and Free Amikacin also tested. | No | [redacted] USA | AMIK-BRD-2005-19-TOX (Report No.) | 4.2.3.7.2-1 |
| | Rats/CD®IGS Crl:CD(SD) | Inhalation | 6 months | 90 (3 cycles of 1-month on drug, 1-month off drug) | No | [redacted] USA | AMIK-BIO-2009-16-MAC, Rev 1 (Report No.) | 4.2.3.7.2-2 |
| Mechanistic Studies | No studies were conducted. | | | | | | | |
| Dependence | No studies were conducted. | | | | | | | |
| Metabolites | No studies were conducted. | | | | | | | |
| Impurities | Incubation<br>*S typhimurium*<br>TA98, 100, 1535, 1537<br>*E coli* WP2*uvrA* | *In vitro* | ~72 h | ≤ 5000 µg/plate (± S9) | Yes | [redacted] UK | HUD0381 | 4.2.3.7.6-1 |
| | Rat/CD®IGS Crl:CD(SD) | Inhalation | 14 days | 0 (group 1), 90 mg/kg/day ALIS (groups 2-4)<br>ALIS groups contained (0.09%), (1.0%), and (3.6%) 不純物X* | Yes | [redacted] USA | TQ72SR | 4.2.3.7.6-2 |

ELC = Empty Liposomes Control; GLP = Good Laboratory Practice; PND = Postnatal Day;不純物X*= [redacted]

[a] Amikacin Liposome Inhalation Suspension is referred to as ALIS herein. Because it was formerly named Arikace™, SLIT™ Amikacin, and Liposomal Amikacin for Inhalation (LAI) some study titles retain these or similar names.

[b] Nominal doses are shown. For pivotal repeat-dose toxicity studies, the highest No-Observed-Adverse-Effect Level (NOAEL) is underlined.

[c] NOAELs (mg/kg/day): 30 (rats) and 10 (dogs) for kidneys and < 10 (rats) and 30 (dogs) for lung.

[d] Formerly known as [redacted] USA.

[e] The NOAEL is 10 mg/kg/day based on laryngeal findings; the NOAEL for lung changes is 90 mg/kg/day.



＊新薬承認情報提供時に置き換え

## 2.6.7.2 トキシコキネティクス：トキシコキネティクス試験の一覧表

Test Article: ALIS

| Type of Study | Test System | Method of Administration | Dose (mg/kg/day) | GLP Compliance | Study/Report Number |
|---|---|---|---|---|---|
| 13-Week Inhalation Range-Finding Study | Mouse | Inhalation | 0, 10, 30, 90 | Yes | 07-6307 |
| 26-Week Inhalation Toxicity Study with a 13-Week Interim Evaluation and a 12-Week Recovery Period | Rat | Inhalation | 0, 10, 30, 90 | Yes | 07-6308 |
| 3-Month Inhalation Toxicity Study Followed by a 2-Month Recovery Period | Dog | Inhalation | 0, 5, 10, 30 | Yes | 07-6306 |
| 9-Month Inhalation Toxicity Study with a 3-Month Recovery Period | Dog | Inhalation | 0, 5, 10, 30 | Yes | 11-6400 |
| 2-Year Inhalation Carcinogenicity Study | Rat | Inhalation | 0, 5, 15, 45 | Yes | 09-6345 |
| Juvenile 28-Day Inhalation Study with a 28-Day Recovery Period | Juvenile Rat | Inhalation | 0, 10, 30, 90 | Yes | 14-6002 |

GLP = Good Laboratory Practice

## 2.6.7.3 トキシコキネティクス：トキシコキネティクス試験成績の一覧 [a]

Test Article: ALIS

Amikacin: steady-state $AUC_{last}$ (ng•h/mL)

| Route | Nominal Dose (mg/kg/day) | Sampling Period | Mouse | | Rat | | Dog | | Study Number |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | M | F | M | F | M | F | |
| Inhalation | 5 | Day 89 | | | | | 2380 | 2640 | 07-6306 |
| | | Month 6 | | | 1340 | 1240 | | | 09-6345 |
| | | | | | | | 2100 | 1810 | 11-6400 |
| | | Month 9 | | | | | 2490 | 1750 | 11-6400 |
| | 10 | PND 37 | | | 420 | 1090 | | | 14-6002 |
| | | Day 24 | | | 1030 | 1530 | | | 07-6308 |
| | | Day 86 | | | 1850 | 2140 | | | 07-6308 |
| | | Day 89 | | | | | 3640 | 6300 | 07-6306 |
| | | Day 91 | 1590 | 1140 | | | | | 07-6307 |
| | | Day 177 | | | 2290 | 2280 | | | 07-6308 |
| | | Month 6 | | | | | 4470 | 3140 | 11-6400 |
| | | Month 9 | | | | | 5340 | 3590 | 11-6400 |
| | 15 | Month 6 | | | 2770 | 2760 | | | 09-6345 |
| | 30 | PND 10 | | | 4150 | 4030 | | | 14-6002 |
| | | PND 37 | | | 2850 | 3220 | | | 14-6002 |
| | | Day 24 | | | 3510 | 4130 | | | 07-6308 |
| | | Day 86 | | | 5000 | 5070 | | | 07-6308 |
| | | Day 89 | | | | | 14900 | 13200 | 07-6306 |
| | | Day 91 | 4580 | 3920 | | | | | 07-6307 |
| | | Day 177 | | | 5380 | 5460 | | | 07-6308 |
| | | Month 6 | | | | | 9160 | 9220 | 11-6400 |
| | | Month 9 | | | | | 9530 | 9250 | 11-6400 |
| | 45 | Month 6 | | | 8500 | 6770 | | | 09-6345 |
| | 50 | Day 15 | | | | | 19600 | 21700 | 667574 |
| | | Day 30 | | | | | 20700 | 19900 | 667574 |

## 2.6.7.3 トキシコキネティクス：トキシコキネティクス試験成績の一覧[a]（続き）

Test Article: ALIS

Amikacin: steady-state $AUC_{last}$ (ng•h/mL)

| Route | Nominal Dose (mg/kg) | Sampling Period | Mouse | | Rat | | Dog | | Study Number |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | M | F | M | F | M | F | |
| Inhalation | 90 | PND 10 | | | 7030 | 8820 | | | 14-6002 |
| | | PND 37 | | | 8590 | 7640 | | | 14-6002 |
| | | Day 24 | | | 5900 | 6980 | | | 07-6308 |
| | | Day 86 | | | 8730 | 11000 | | | 07-6308 |
| | | Day 91 | 16700 | 16800 | | | | | 07-6307 |
| | | Day 177 | | | 9680 | 7900 | | | 07-6308 |
| | 100 | Day 15 | | | NC[b] | 10400 | | | 667396 |
| | | Day 30 | | | NC[b] | 6900 | | | 667396 |

AUC = Area Under the Concentration-Time Curve; NC = Not Calculated; PND = Postnatal Day.

[a] Mean serum AUC in humans at 590 mg is 17000 ng•h/mL (Module 2.7.2); this is the highest steady-state mean value for amikacin in humans.

[b] Not able to be calculated due to lack of sufficient data.

## 2.6.7.4 毒性試験：使用ロット

### 2.6.7.4.1 原薬（バッチ毎）一覧

| Batch Number | Potency (µg/mg) [a] | Impurity Method | Specified Impurities and Proposed Limits (%) | | | | | | | | | | | Study No. | Type of Study |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | Imp I | Imp F | 1,3" di-HABA | Imp B | Imp C | Imp D | Imp A | Imp H | Unk. RRT~0.43 (MW 586) | Unk. RRT~0.45 (MW 424) | Total | | |
| | | | ≤ 0.30 | ≤ 0.30 | ≤ 0.15 | ≤ 0.30 | ≤ 0.15 | ≤ 0.30 | ≤ 0.30 | ≤ 0.50 | ≤ 0.50 | ≤ 0.50 | ≤ 1.5 | | |
| 990151 0010 3 | 762 | NA | -[b] | -[b] | -[b] | -[b] | -[b] | -[b] | -[b] | -[b] | -[b] | -[b] | -[b] | 7522-100<br>7522-101 | Ames study<br>Chromosomal aberration |
| 050805-X | 758 | A | -[b] | -[b] | -[b] | -[b] | -[b] | -[b] | ND | 0.83 | -[b] | -[b] | 0.83 | 667396<br>667574<br>7522-102 | 1-month rat<br>1-month dog<br>Mouse lymphoma |
| 051106-X | 771 | A | -[b] | -[b] | -[b] | -[b] | -[b] | -[b] | ND | 0.77 | -[b] | -[b] | 0.77 | 667396<br>667574<br>7522-102 | 1-month rat<br>1-month dog<br>Mouse lymphoma |
| 060707-X | 749 | A | -[b] | -[b] | -[b] | -[b] | -[b] | -[b] | ND | 0.85 | -[b] | -[b] | 0.85 | 07-6307<br>07-6308 | 3-month mouse<br>6-month rat |
| 070302-X | 726 | A | -[b] | -[b] | -[b] | -[b] | -[b] | -[b] | ND | 0.87 | -[b] | -[b] | 0.87 | 07-6307<br>07-6308<br>07-6306<br>07-6315<br>09-6345 | 3-month mouse<br>6-month rat<br>3-month dog<br>Rat Micronucleus<br>2-year rat |
| 070403-X | 761 | A | -[b] | -[b] | -[b] | -[b] | -[b] | -[b] | ND | 0.87 | -[b] | -[b] | 0.96 | 07-6306<br>07-6308<br>09-6345 | 3-month dog<br>6-month rat<br>2-year rat |
| | | B | < 0.1 | < 0.1 | < 0.1 | < 0.1 | < 0.1 | < 0.1 | < 0.1 | 0.60 | 0.11 | 0.47 | 1.19 | | |
| 070404-X | 774 | A | -[b] | -[b] | -[b] | -[b] | -[b] | -[b] | ND | 0.87 | -[b] | -[b] | 0.87 | 09-6345 | 2-year rat |
| | | B | < 0.1 | < 0.1 | < 0.1 | < 0.1 | < 0.1 | < 0.1 | < 0.1 | 0.65 | 0.12 | 0.60 | 1.38 | | |

## 2.6.7.4.1 原薬（バッチ毎）一覧（続き）

| Batch Number | Potency (µg/mg) [a] | Impurity Method | Specified Impurities and Proposed Limits (%) | | | | | | | | | | Study No. | Type of Study |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | Imp I | Imp F | 1,3" di-HABA | Imp B | Imp C | Imp D | Imp A | Imp H | Unk. RRT~ 0.43 (MW 586) | Unk. RRT~ 0.45 (MW 424) | Total | |
| | | | ≤ 0.30 | ≤ 0.30 | ≤ 0.15 | ≤ 0.30 | ≤ 0.15 | ≤ 0.30 | ≤ 0.30 | ≤ 0.50 | ≤ 0.50 | ≤ 0.50 | ≤ 1.5 | |
| 080102-X | 736 | A | -[b] | -[b] | -[b] | -[b] | -[b] | -[b] | ND | 0.87 | -[b] | -[b] | 0.87 | 09-6345 | 2-year rat |
| | | B | < 0.1 | < 0.1 | < 0.1 | < 0.1 | < 0.1 | < 0.1 | < 0.1 | 0.67 | 0.13 | 0.64 | 1.54[c] | | |
| 080203-X | 748 | A | -[b] | -[b] | -[b] | -[b] | -[b] | -[b] | ND | 0.90 | -[b] | -[b] | 0.90 | 09-6345 | 2-year rat |
| 080204-X | 751 | A | -[b] | -[b] | -[b] | -[b] | -[b] | -[b] | ND | 0.89 | -[b] | -[b] | 0.89 | 11-6400 | 9-month dog |
| | | B | < 0.1 | < 0.1 | < 0.1 | < 0.1 | < 0.1 | < 0.1 | < 0.1 | 0.61 | < 0.1 | 0.66 | 1.45[d] | 09-6345 | 2-year rat |
| 081001-X | 747 | A | -[b] | -[b] | -[b] | -[b] | -[b] | -[b] | ND | 0.91 | -[b] | -[b] | 0.91 | 09-6345 | 2-year rat |
| | | B | < 0.1 | < 0.1 | < 0.1 | < 0.1 | < 0.1 | < 0.1 | < 0.1 | 0.59 | 0.21 | 0.62 | 1.55[e] | HUD0381 | Ames study |
| 990167 0015 9 | 749 | A | -[b] | 0.2 | ND | -[b] | ND | ND | 0.01 | 0.2 | -[b] | -[b] | 0.6 | 09-6345 | 2-year rat |
| | | B | < 0.1 | 0.12 | < 0.1 | < 0.1 | < 0.1 | < 0.1 | < 0.1 | 0.23 | 0.36 | 0.31 | 1.01 | HUD0381 | Ames study |
| E100301-X | 749 | A | -[b] | -[b] | -[b] | -[b] | -[b] | -[b] | ND | 0.37 | -[b] | -[b] | 0.37 | 09-6345 | 2-year rat |
| E100302-X | 743 | A | -[b] | -[b] | -[b] | -[b] | -[b] | -[b] | ND | 0.36 | -[b] | -[b] | 0.36 | 09-6345 | 2-year rat |
| E100303-X | 741 | A | -[b] | -[b] | -[b] | -[b] | -[b] | -[b] | ND | 0.35 | -[b] | -[b] | 0.35 | 11-6400 | 9-month dog |
| | | | | | | | | | | | | | | 09-6345 | 2-year rat |
| 990167 0001 1 | 750 | A | -[b] | 0.29 | < 0.04 | -[b] | < 0.04 | < 0.04 | < 0.04 | 0.26 | -[b] | -[b] | 0.7 | 11-6400 | 9-month dog |
| | | B | < 0.1 | < 0.1 | < 0.1 | < 0.1 | < 0.1 | < 0.1 | < 0.1 | 0.26 | 0.25 | 0.23 | 0.73 | | |
| 990167 0009 1 | 757 | A | -[b] | 0.29 | < 0.04 | -[b] | < 0.04 | < 0.04 | < 0.04 | 0.32 | -[b] | -[b] | 0.8 | 11-6400 | 9-month dog |
| | | B | < 0.1 | 0.12 | < 0.1 | < 0.1 | < 0.1 | < 0.1 | < 0.1 | 0.27 | 0.29 | 0.28 | 0.96 | | |

GLP = Good Laboratory Practice.; NA = Not applicable; ND = None detected (A disregard limit of 0.1% was used).
Method A: Derivatization with 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid and gradient HPLC with UV detection (previous Ph. Eur. method)
Method B: Gradient HPLC with amperometric detection (current Ph. Eur. method).

[a] As amikacin on a dried basis. Amikacin potency in amikacin sulfate is 674 to 786 µg/mg.
[b] No data available.
[c] An unspecified impurity at RRT ~ 0.49 was observed in this batch at approximately 0.10% and is included in the Total.
[d] An unspecified impurity at RRT ~ 0.49 was observed in this batch at approximately 0.18% and is included in the Total.
[e] An unspecified impurity at RRT ~ 0.79 was observed in this batch at approximately 0.13% and is included in the Total.

## 2.6.7.4.2 製剤（バッチ毎）一覧

| ALIS Batch Number | Amikacin Concentration | Specified Degradation Products, Impurities and Proposed Limits (%) | | | | | Study No. | Type of Study |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | MW 424[a] | Kanamycin[a] | Impurity H (Amikacin B)[a] | 不純物X* [b] | Cholesterol Degradation Products[c] | | |
| | | ≤ 0.50 | ≤ 0.20 | ≤ 0.50 | ≤ 1.5 | ≤ 0.20 | | |
| CL-AMIK-UT-02 | 21.4 mg/mL | No data available | No data available | No data available | No data available | No data available | 7522-100<br>7522-101 | Ames study<br>Chromosomal aberration |
| PCL-AMIK-075-125L-009 and/or 009A | 78 and 76 mg/mL | No data available | No data available | No data available | No data available | No data available | 7522-102<br>667396<br>667574 | Mouse lymphoma<br>1-month rat<br>1-month dog |
| 205-012-001 | 63 mg/mL | 0.15 | 0.022 | 1.0 | ND [d] | ND [d] | 07-6308 | 6-month rat |
| 205-012-004 | 71 mg/mL | 0.13 | 0.017 | 1.0 | ND [d] | ND [d] | 07-6307<br>07-6308 | 3-month mouse<br>6-month rat |
| 205-012-005 | 69 mg/mL | 0.16 | 0.40 | 1.1 | ND [d] | ND [d] | 07-6307<br>07-6308 | 3-month mouse<br>6-month rat |
| 205-012-007 | 66 mg/mL | 0.097 | 0.022 | 1.0 | ND [d] | ND [d] | 07-6307<br>07-6308 | 3-month mouse<br>6-month rat |
| 205-012-008 | 72 mg/mL | 0.17 | 0.038 | 1.0 | ND [d] | ND [d] | 07-6307<br>07-6308 | 3-month mouse<br>6-month rat |
| 205-012-009 | 67 mg/mL | 0.17 | 0.047 | 1.0 | ND [d] | ND [d] | 07-6306<br>07-6307<br>07-6308 | 3-month dog<br>3-month mouse<br>6-month rat |
| 205-012-010 | 67 mg/mL | 0.18 | 0.047 | 1.0 | ND [d] | ND [d] | 07-6306<br>07-6308 | 3-month dog<br>6-month rat |
| 232-012-001 | 67 mg/mL | 0.18 | 0.046 | 1.0 | ND [d] | ND [d] | 07-6306<br>07-6308 | 3-month dog<br>6-month rat |



＊新薬承認情報提供時に置き換え

## 2.6.7.4.2 製剤（バッチ毎）一覧（続き）

| ALIS Batch Number | Amikacin Concentration | Specified Degradation Products, Impurities and Proposed Limits (%) | | | | | Study No. | Type of Study |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | MW 424[a] | Kanamycin[a] | Impurity H (Amikacin B)[a] | 不純物X*[b] | Cholesterol Degradation Products[c] | | |
| | | ≤ 0.50 | ≤ 0.20 | ≤ 0.50 | ≤ 1.5 | ≤ 0.20 | | |
| 232-012-002 | 71 mg/mL | 0.17 | 0.045 | 1.0 | ND [d] | ND [d] | 07-6306<br>07-6308<br>07-6315 | 3-month dog<br>6-month rat<br>Micronucleus assay in rats |
| 232-012-004 | 73 mg/mL | 0.085 | 0.016 | 0.85 | ND [d] | ND [d] | 07-6306<br>07-6308<br>09-6345 | 3-month dog<br>6-month rat<br>2-year rat |
| 232-012-005 | 73 mg/mL | 0.073 | 0.018 | 0.91 | ND [d] | ND [d] | 09-6345 | 2-year rat |
| 232-012-009 | 69 mg/mL | 0.15 | 0.075 | 1.0 | ND [d] | ND [d] | 09-6345 | 2-year rat |
| 232-012-010 | 72 mg/mL | 0.15 | 0.039 | 0.96 | ND [d] | ND [d] | 09-6345 | 2-year rat |
| 232-012-011 | 74 mg/mL | 0.15 | 0.13 | 0.93 | ND [d] | ND [d] | 09-6345 | 2-year rat |
| 232-012-012 | 66 mg/mL | 0.077 | 0.055 | 0.89 | ND [d] | ND [d] | 09-6345 | 2-year rat |
| 232-012-013 | 71 mg/mL | 0.14 | 0.051 | 0.81 | ND [d] | ND [d] | 09-6345 | 2-year rat |
| 232-012-015 | 67 mg/mL | 0.19 | 0.056 | 0.96 | ND [d] | ND [d] | 09-6345 | 2-year rat |
| 3-NFF-0087 | 64 mg/mL | 0.14 | ND (< 0.03) | 0.86 | ND (< 0.2) | ND (< 0.4) | 09-6345 | 2-year rat |
| 3-NFF-0091 | 70 mg/mL | 0.10 | ND (< 0.03) | 1.0 | ND (< 0.2) | ND (< 0.4) | 09-6345 | 2-year rat |
| 3-NFF-0094 | 78 mg/mL | 0.14 | ND (< 0.03) | 1.4 | ND (< 0.2) | ND (< 0.4) | 09-6345 | 2-year rat |
| 3-NFF-0095 | 65 mg/mL | 0.12 | ND (< 0.03) | 0.93 | ND (< 0.2) | ND (< 0.4) | 09-6345 | 2-year rat |
| A-500-002 | 70 mg/mL | 0.09 | ND (< 0.03) | 1.3 | ND (< 0.2) | ND (< 0.4) | 09-6345 | 2-year rat |
| A-500-005 | 61 mg/mL | 0.15 | ND (< 0.03) | 1.1 | ND (< 0.2) | ND (< 0.4) | 09-6345 | 2-year rat |
| A-500-007 | 73 mg/mL | 0.14 | ND (< 0.03) | 1.1 | ND (< 0.2) | ND (< 0.4) | 09-6345 | 2-year rat |
| A-500-010 | 67 mg/mL | 0.15 | ND (< 0.03) | 1.1 | ND (< 0.2) | ND (< 0.4) | 09-6345 | 2-year rat |
| A-500-011 | 69 mg/mL | 0.10 | ND (< 0.03) | 1.1 | ND (< 0.2) | ND (< 0.4) | 09-6345 | 2-year rat |
| A-500-013 | 64 mg/mL | 0.09 | ND (< 0.03) | 1.1 | ND (< 0.2) | ND (< 0.4) | 09-6345 | 2-year rat |
| A-500-016 | 70 mg/mL | ND (< 0.03) | ND (< 0.03) | 1.1 | ND (< 0.2) | ND (< 0.4) | 09-6345 | 2-year rat |
| A-500-017 | 72 mg/mL | 0.08 | ND (< 0.03) | 1.0 | ND (< 0.2) | ND (< 0.4) | 09-6345 | 2-year rat |
| A-500-019 | 68 mg/mL | < LOQ (< 0.06) | ND (< 0.03) | 0.41 | ND (< 0.2) | ND (< 0.4) | 09-6345 | 2-year rat |



＊新薬承認情報提供時に置き換え

## 2.6.7.4.2 製剤（バッチ毎）一覧（続き）

| ALIS Batch Number | Amikacin Concentration | Specified Degradation Products, Impurities and Proposed Limits (%) | | | | | Study No. | Type of Study |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | MW 424[a] | Kanamycin[a] | Impurity H (Amikacin B)[a] | 不純物X*[b] | Cholesterol Degradation Products[c] | | |
| | | ≤ 0.50 | ≤ 0.20 | ≤ 0.50 | ≤ 1.5 | ≤ 0.20 | | |
| A-500-020 | 68 mg/mL | 0.10 | ND (< 0.03) | 1.1 | ND (< 0.2) | ND (< 0.4) | 09-6345 | 2-year rat |
| A-500-021 | 71 mg/mL | 0.13 | ND (< 0.03) | 1.1 | ND (< 0.2) | ND (< 0.4) | 09-6345 | 2-year rat |
| A-500-023 | 66 mg/mL | 0.13 | ND (< 0.03) | 1.0 | ND (<0.2) | ND (< 0.4) | 09-6345 | 2-year rat |
| A-500-024 | 69 mg/mL | 0.16 | ND (< 0.03) | 1.1 | ND (< 0.2) | ND (< 0.4)[e] | 09-6345 | 2-year rat |
| A-500-025 | 72 mg/mL | < LOQ (< 0.06) | ND (< 0.03) | 0.47 | ND (< 0.2) | ND (< 0.4)[e] | 11-6400<br>09-6345 | 9-month dog<br>2-year rat |
| A-500-027 | 67 mg/mL | ND (< 0.03) | ND (< 0.03) | 0.47 | ND (< 0.2) | ND (< 0.4)[e] | 09-6345 | 2-year rat |
| A-500-028 | 63 mg/mL | ND (< 0.03) | ND (< 0.03) | 0.54 | ND (< 0.2) | ND (< 0.4)[e] | 09-6345 | 2-year rat |
| A-500-029 | 68 mg/mL | 0.21 | ND (< 0.03) | 1.3 | ND (< 0.2) | ND (< 0.4)[e] | 09-6345 | 2-year rat |
| A-500-031 | 77 mg/mL | 0.13 | ND (< 0.03) | 1.3 | 0.10 | ND (< 0.4)[e, f] | 09-6345 | 2-year rat |
| A-500-032 | 79 mg/mL | 0.12 | ND (< 0.03) | 1.2 | ND (< 0.2) | ND (< 0.4)[e, f] | 11-6400<br>09-6345 | 9-month dog<br>2-year rat |
| A-500-035 | 69 mg/mL | 0.17 | ND (< 0.03) | 1.1 | < LOQ (0.3) | ND (< 0.4) | 11-6400 | 9-month dog |
| 3-NFF-0184 | 71.4 mg/mL | ND (< 0.03) | ND (< 0.03) | Not reported | ND (< 0.03) | ND (< 0.05) | 11-6400 | 9-month dog |
| 3-NFF-0185 | 69.3 mg/mL | ND (< 0.03) | ND (< 0.03) | Not reported | ND (< 0.03) | ND (< 0.05) | 11-6400 | 9-month dog |
| 3-NFF-0188 | 70.8 mg/mL | 0.08 | < LOQ (< 0.06) | Not reported | < LOQ (< 0.08) | ND (< 0.05) | 11-6400 | 9-month dog |
| 3-NFF-0193 | 68.9 mg/mL | 0.07 | ND (< 0.03) | Not reported | ND (< 0.03) | ND (< 0.05) | 11-6400 | 9-month dog |
| 3-NFF-0194 | 74.8 mg/mL | 0.08 | ND (< 0.03) | Not reported | < LOQ (< 0.08) | < LOQ (< 0.16) | 11-6400 | 9-month dog |
| 3-NFF-0204 | 68.9 mg/mL | 0.09 | ND (< 0.03) | Not reported | ND (< 0.03) | ND (< 0.05) | 11-6400 | 9-month dog |
| 3-NFF-0269 | 65.5 mg/mL | 0.10 | < LOQ (0.06) | Not reported | 0.22% | ND (< 0.05) | 14-6002 | 28-day juvenile rat |
| 18053 | 69 mg/mL | <LOQ | ND | Not reported | 0.09% | ND | TQ72SR | 2-week rat |
| ENG1505 | 74 mg/mL | 0.13 | ND | Not reported | 1.0% | ND | TQ72SR | 2-week rat |
| 16081 | 71 mg/mL | 0.16 | 0.11 | Not reported | 3.6% | 10.5 | TQ72SR | 2-week rat |



＊新薬承認情報提供時に置き換え

## 2.6.7.4.2 製剤（バッチ毎）一覧（続き）

| ALIS Batch Number | Amikacin Concentration | Specified Degradation Products, Impurities and Proposed Limits (%) | | | | | Study No. | Type of Study |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | MW 424[a] | Kanamycin[a] | Impurity H (Amikacin B)[a] | 不純物X*[b] | Cholesterol Degradation Products[c] | | |
| | | ≤ 0.50 | ≤ 0.20 | ≤ 0.50 | ≤ 1.5 | ≤ 0.20 | | |

GLP = Good Laboratory Practice; ND = None detected; LOQ = Limit of quantitation.

[a] Percent amikacin degradation products and impurities are relative to nominal amikacin content.

[b] Percent不純物X* is relative to nominal DPPC content.

[c] Percent cholesterol degradation products is relative to nominal cholesterol content.

[d] The reported limit of detection of 0.0016 mg/mL (equivalent to 1.7% for 不純物X*and 3.3% for cholesterol degradation products) was inadequate to determine meaningful levels of any degradation products.

[e] For these batches an impurity was reported which was later identified as desmosterol, a process impurity which is not a degradation product. This impurity ranged from 0.26% to 0.43%. Desmosterol is present in all cholesterol batches (primary component of other sterols) and therefore is present in all drug product batches.

[f] For these batches palmitic acid was reported as an individual degradation product and included with the desmosterol in the total lipid degradation products reported on the certificates of analysis. Palmitic acid forms stoichiometrically with 不純物X*when DPPC hydrolyzes, so it is not routinely reported.



＊新薬承認情報提供時に置き換え

### 2.6.7.5　　単回投与毒性試験

単回投与毒性試験は実施せず、反復投与毒性試験にて評価した。

## 2.6.7.6 反復投与毒性試験：重要な試験以外の試験

Test Article: ALIS

| Species/Strain | Method of Administration (Vehicle/ Formulation) | Duration of Dosing | Doses (mg/kg) | Gender and No. per Group | NOAEL (mg/kg) | Noteworthy Findings | Study Number |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Mouse/CD-1 | Inhalation/ALIS (Liposomal Suspension in 1.5% NaCl) | 13 weeks<br><br>Formulations administered up to 90 minutes per day (66-72 mg Amikacin/mL) | 0 (1.5% NaCl), 10, 30, 90<br><br>Achieved Doses (M/F) of 11/12, 31/32, 92/95 | 46M/46F (36M/36F for TK) | 30 (lung)<br>10 (upper respiratory tract irritation) | ≥ 10 mg/kg: Dose-related increases in systemic exposure and lung levels (amikacin). Dose-related increase in number of alveolar foamy macrophages (adaptive response).<br>≥ 30 mg/kg: Degenerative changes in the olfactory epithelium of the nasal turbinates; squamous metaplasia and inflammation of the laryngeal epithelium.<br>90 mg/kg: Decreased body weights/body weight gain and reduced food consumption; transient increases (mostly in males) in clinical observations (unthrifty coat, piloerection, hunched appearance, labored breathing, and dry rales); increased lung weights; foci of subacute/chronic inflammation in the lung (accompanied by minimal regenerative hyperplasia of the alveolar epithelium in 1 female); and squamous metaplasia and degenerative changes in respiratory epithelium of the nasal turbinates. | 07-6307 |

## 2.6.7.6 反復投与毒性試験：重要な試験以外の試験（続き）

Test Article: ALIS

| Species/Strain | Method of Administration (Vehicle/ Formulation) | Duration of Dosing | Doses (mg/kg) | Gender and No. per Group | NOAEL (mg/kg) | Noteworthy Findings | Study Number |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Rat/Crl:CD® (SD)BR | Inhalation/ALIS (Liposomal Suspension in 1.5% NaCl) | 28 days<br><br>Formulations administered up to 200 minutes per day (75 mg Amikacin/mL) | 0 (ELC), 10, 100 Achieved Doses of 11 and 118 mg/kg/ day | 4M/4F | 100 | ELC and 10 mg/kg: Multifocal alveolar macrophage accumulation in the lungs.<br>≥ 10 mg/kg: Well tolerated; no noteworthy in-life findings. Dose-related increases in urine and lung amikacin concentrations.<br>100 mg/kg: Quantifiable plasma concentrations of amikacin at 0.25 h post dose on Days 1 and 28. Diffuse alveolar foamy macrophage accumulation in the lungs (adaptive response) accompanied by multifocal interstitial inflammation in 2 females. In the kidneys in males, mild proximal tubule regeneration/ degeneration and/or hyaline droplet formation. | 667621 |
| Rat/Crl:CD® (SD)BR | Inhalation/ALIS (Liposomal Suspension in 1.5% NaCl) | 30 days<br><br>Formulations administered up to 140 minutes per day (75 mg Amikacin/mL) | 0 (air), 0 (1.5% NaCl), 0 (ELC),10, 30, 100 (ALIS), 100 (Free Amikacin; FA)<br><br>Achieved Doses of 11, 25, and 89 for ALIS and 98 for FA | 10M/10F (air)<br><br>20M/20F (1.5% NaCl, ELC, FA, and ALIS groups)<br><br>9M/9F (TK; FA and ALIS groups) | 100 (ALIS and FA) | ELC: Minimal/mild focal alveolar foamy macrophage accumulation.<br>All amikacin doses: Well tolerated; no noteworthy in-life findings. Increases in amikacin urine and lung levels (dose-related in ALIS groups). In the lungs, minimal to moderate diffuse alveolar foamy macrophage accumulation (adaptive response; dose-related in ALIS groups); Clara cell hypertrophy was an associated finding.<br>10 mg/kg: Minimal laryngeal squamous metaplasia and tracheal mucosal hypertrophy.<br>30 & 100 mg/kg (ALIS) and 100 mg/kg (FA): Increases in lung weight. Minimal to mild transitional cell hyperplasia with associated rhinitis (ALIS and FA at 100 mg/kg) of the nasal cavity, minimal to mild laryngeal squamous metaplasia and associated ulcerative laryngitis, and minimal to mild tracheal mucosal hypertrophy.<br>100 mg/kg (ALIS and FA): Quantifiable plasma levels on Day 15 (FA) and 30 (ALIS and FA).<br>Recovery: All findings reversible/showed evidence of reversibility. | 667396 |

## 2.6.7.6 反復投与毒性試験：重要な試験以外の試験（続き）

Test Article: ALIS

| Species/Strain | Method of Administration (Vehicle/ Formulation) | Duration of Dosing | Doses (mg/kg) | Gender and No. per Group | NOAEL (mg/kg) | Noteworthy Findings | Study Number |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Dog/Beagle | Inhalation/ALIS (Liposomal Suspension in 1.5% NaCl) | 28 days<br><br>Formulations administered up to 60 minutes per day (75 mg Amikacin/mL) | 0 (ELC), 5, 50<br>Achieved doses of 6 and 45 | 2M/2F | 50 | All groups: No adverse in-life findings.<br>ALIS groups: Dose-proportional increases in urine and lung amikacin concentrations.<br>ELC and ALIS 5 mg/kg: Focal alveolar macrophage accumulation.<br>50 mg/kg: Increased lung weights. Diffuse alveolar foamy macrophage accumulation (considered an adaptive response to inhaled material). In kidney, minimal renal proximal tubule regeneration/degeneration in 1 male. | 667637 |
| Dog/Beagle | Inhalation/ALIS (Liposomal Suspension in 1.5% NaCl) | 30 days<br><br>Formulations administered up to 60 minutes per day (75 mg Amikacin/mL) | 0 (1.5% NaCl); 0 (ELC); 50 (FA); 5, 15, 50 (ALIS)<br>Achieved Doses 38 (FA) and 4, 10, and 31 for ALIS | 6M/6F | 50 | All amikacin doses: Well tolerated; no noteworthy in-life findings. Increases in urine and lung amikacin levels (dose related in ALIS groups).<br>≥ 5 mg/kg (ALIS): Dose-related alveolar and interstitial foamy macrophage accumulation in the lungs (adaptive response).<br>≥ 15 mg/kg (ALIS) and 50 mg/kg (FA): Quantifiable plasma levels of amikacin. Increased lung weights. Increased perivascular/ peribronchiolar lymphoid cell infiltration in the lung (ALIS only).<br>50 mg/kg (ALIS): One male found dead on day 30; not considered drug related. Increased foamy macrophages in bronchial lymph nodes.<br>Recovery: All findings reversible or showed evidence of reversibility. | 667574 |

ELC = Empty Liposomes Control; F = Females; FA = Free Amikacin; M = Male; NaCl = Sodium Chloride; TK = Toxicokinetic.

## 2.6.7.7 反復投与毒性試験：重要な試験

## 2.6.7.7.1 ラットを用いた 6 ヵ月間反復吸入毒性試験

**Title:** Arikace™: a 26-week inhalation toxicity study in rats with a 13-week interim evaluation and a 12-week recovery period

**Test Article:** ALIS

**Species/Strain:** Rat/Crl:CD®(SD)BR

**Duration of Dosing:** 26 weeks (formulations administered up to 240 minutes per day with 63 to 73 mg Amikacin/mL)

**Study No.:** 07-6308

**Initial Age:** Approx. 6.5 weeks

**Duration of Postdose:** 12 weeks

**Location in CTD:** 4.2.3.2-4

**Date of First Dose:** September 18, 2007

**Method of Administration:** Inhalation

**Testing Facility:** [redacted] USA

**Vehicle/Formulation:** Liposomal Suspension in 1.5% NaCl

**GLP Compliance:** Yes

**Special Features:** Urine amikacin levels determined during weeks 13 and 26. Lung amikacin levels determined after 26 weeks of dosing and at the end of the recovery period. Interim Evaluation: 13 weeks

**No-Observed-Adverse-Effect Level:** <10 mg/kg for lung and upper respiratory tract; 30 mg/kg for kidneys.

**Special Notes:** Histopathology findings from multiple anatomical locations of the nasal turbinates (Sections 1 through 4) were included in the study report; data presented in this table represent findings only for the most severely affected regions, except where noted. Both sections of the larynx are represented in this table (ie, ventral seromucous gland and ventral diverticulum). Also, representative lesions in the upper respiratory tract (nasal turbinates, larynx and trachea) are included in this table. Organ weight and pathology data are not included for unscheduled deaths (ie, one male and one female (10 mg/kg) prior to the interim sacrifice and one male (30 mg/kg) prior to the terminal sacrifice).

| Daily Dose (mg/kg/day) | | 0 (1.5% NaCl) | | 10 | | 30 | | 90 | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Number of Animals | Main | M: 15 | F: 15 | M: 15 | F: 15 | M: 15 | F: 15 | M: 15 | F: 15 |
| | Interim necropsy | M: 10 | F: 10 | M: 10 | F: 10 | M: 10 | F: 10 | M: 10 | F: 10 |
| | Recovery | M: 5 | F: 5 | M: 5 | F: 5 | M: 5 | F: 5 | M: 5 | F: 5 |
| Toxicokinetics | | | | | | | | | |
| Serum Amikacin $AUC_{last}$ (ng•h/mL) | Day 24 | ♦ | ♦ | 1030 | 1530 | 3510 | 4130 | 5900 | 6980 |
| | Week 13 (Day 86) | ♦ | ♦ | 1850 | 2140 | 5000 | 5070 | 8730 | 11000 |
| | Week 26 (Day 177) | ♦ | ♦ | 2290 | 2280 | 5380 | 5460 | 9680 | 7900 |
| Urine Amikacin (ng/mL) | Week 13 (Interim) | BLQ | | 18930 | | 62067 | | 214170 | |
| | Week 26 (End of Dose Period) | BLQ | | 34670 | | 89289 | | 151656 | |
| | End of Recovery Period | BLQ | | BLQ | | 202 | | 319 | |
| Lung Amikacin (µg/g) | Week 26 (End of Dose Period) | ♦ | | 1314 | | 2451 | | 2958 | |
| | End of Recovery Period | ♦ | | 29 | | 36 | | 31 | |

## 2.6.7.7.1 ラットを用いた 6 ヵ月間反復吸入毒性試験（続き）

**Test Article:** ALIS

**Title:** Arikace™: a 26-week inhalation toxicity study in rats with a 13-week interim evaluation and a 12-week recovery period

**Study No.:** 07-6308

| Daily Dose (mg/kg) | | 0 (1.5% NaCl) | | 10 | | 30 | | 90 | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Number of Animals | Main | M: 15 | F: 15 | M: 15 | F: 15 | M: 15 | F: 15 | M: 15 | F: 15 |
| | Interim necropsy | M: 10 | F: 10 | M: 10 | F: 10 | M: 10 | F: 10 | M: 10 | F: 10 |
| | Recovery | M: 5 | F: 5 | M: 5 | F: 5 | M: 5 | F: 5 | M: 5 | F: 5 |
| Noteworthy Findings | | | | | | | | | |
| Died or Sacrificed Moribund | | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| Body Weight (g) [a] | Interim (Week 13); n = 30 | 485.3 | 278.6 | -4.5% | +0.9% | -0.6% | +1.7% | -10.1%** | -3.3% |
| | Termination (Week 26); n = 20 | 601.9 | 335.4 | -3.3% | +1.2% | -4.0% | +2.8% | -15.5%** | -1.3% |
| | Recovery (Week 12); n = 5 | 759.7 | 359.4 | -8.1% | +13.6% | +8.0% | +12.8% | -11.8% | +19.6% |
| Food Consumption (g/day) [a] | Interim (Week 13); n = 29 to 30 | 29.2 | 20.1 | -9.6% | -0.5% | -0.7% | +6.0% | -9.2%* | +6.0% |
| | Termination (Week 26); n = 17 to 20 | 30.5 | 22.3 | -3.9% | -3.6% | -4.6% | +4.9% | -11.5%** | -3.6% |
| | Recovery (Week 12); n = 5 | 36.7 | 25.4 | -9.0% | -1.2% | -9.5% | -16.9% | -13.1% | +2.4% |
| Water Consumption (g/day) | | ♦ | ♦ | ♦ | ♦ | ♦ | ♦ | ♦ | ♦ |
| Clinical Observations (cumulative total from daily observations during the dosing period) | | | | | | | | | |
| Unthrifty coat | | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 7 | 4 |
| Piloerection | | 0 | 0 | 30 [b] | 30 [b] | 4 | 0 | 2 | 5 |
| Moist rales | | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 19 | 4 |
| Ophthalmoscopy | | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- |
| Hematology | | | | | | | | | |
| Absolute neutrophil count ( × 10^3/μL) | | | | | | | | | |
| Interim (Week 13); n = 20 | | 1.73 | 0.98 | 1.66 | 0.95 | 2.24** | 1.16 | 2.57** | 1.68** |
| Termination (Week 26); n = 10 | | 1.64 | 0.64 | 1.76 | 0.79 | 2.09 | 0.96* | 2.72** | 1.31** |
| Recovery (Week 12); n = 5 | | 2.19 | 0.92 | 1.52 | 0.71 | 1.65 | 0.91 | 1.87 | 1.21 |

## 2.6.7.7.1 ラットを用いた 6 ヵ月間反復吸入毒性試験（続き）

**Test Article:** ALIS

**Title:** Arikace™: a 26-week inhalation toxicity study in rats with a 13-week interim evaluation and a 12-week recovery period

**Study No.:** 07-6308

| Daily Dose (mg/kg) | | 0 (1.5% NaCl) | | 10 | | 30 | | 90 | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Number of Animals | Main | M: 15 | F: 15 | M: 15 | F: 15 | M: 15 | F: 15 | M: 15 | F: 15 |
| | Interim necropsy | M: 10 | F: 10 | M: 10 | F: 10 | M: 10 | F: 10 | M: 10 | F: 10 |
| | Recovery | M: 5 | F: 5 | M: 5 | F: 5 | M: 5 | F: 5 | M: 5 | F: 5 |
| Serum Chemistry | | | | | | | | | |
| Phosphorus (mg/dL) | | | | | | | | | |
| Interim (Week 13); n = 20 | | 6.0 | 4.9 | 6.1 | 5.6* | 5.8 | 5.5* | 6.6** | 5.7** |
| Termination (Week 26); n = 10 | | 6.2 | 4.9 | 6.3 | 5.1 | 6.2 | 5.9** | 6.5 | 6.2** |
| Recovery (Week 12); n = 5 | | 5.4 | 3.6 | 5.4 | 4.3 | 5.2 | 4.6** | 5.6 | 4.7** |
| Triglycerides (mg/dL) | | | | | | | | | |
| Interim (Week 13); n = 20 | | 45 | 29 | 35 | 31 | 55 | 34 | 35* | 28 |
| Termination (Week 26); n = 10 | | 63 | 52 | 54 | 46 | 75 | 55 | 41* | 44 |
| Recovery (Week 12); n = 5 | | 145 | 135 | 127 | 74 | 127 | 116 | 134 | 112 |
| Globulins (g/dL) | | | | | | | | | |
| Interim (Week 13); n=20 | | 2.7 | 2.8 | 2.5 | 2.6* | 2.6 | 2.6* | 2.5** | 2.5** |
| Termination (Week 26); n=10 | | 2.8 | 2.9 | 2.7 | 2.7 | 2.7 | 2.8 | 2.7 | 2.6* |
| Recovery (Week 12); n=5 | | 3.1 | 3.3 | 3.2 | 3.3 | 3.1 | 3.2 | 3.3 | 3.0* |
| Urinalysis | | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- |
| Organ Weights | | | | | | | | | |
| Lungs[c] | | | | | | | | | |
| Interim Sacrifice (Number of Animals Evaluated) | | 10 | 10 | 10 | 9 | 10 | 10 | 10 | 10 |
| Absolute weight (g) | | 1.7267 | 1.2079 | +6.3% | +21.6%* | +33.4%** | +37.0%** | +28.9%** | +73.0%** |
| Relative weight (% body weight) | | 0.3748 | 0.4547 | 0.4326* | 0.5415 | 0.4934** | 0.6299** | 0.5969** | 0.8021** |
| Terminal Sacrifice (Number of Animals Evaluated) | | 15 | 15 | 14 | 15 | 14 | 15 | 15 | 15 |
| Absolute weight (g) | | 1.7881 | 1.4149 | +21.1%** | +12.3%* | +33.3%** | +34.0%** | +54.9%** | +65.8%** |
| Relative weight (% body weight) | | 0.3209 | 0.4442 | 0.3929** | 0.5072** | 0.4320** | 0.5877** | 0.5989** | 0.7395** |

## 2.6.7.7.1 ラットを用いた 6 ヵ月間反復吸入毒性試験（続き）

**Test Article:** ALIS

**Title:** Arikace™: a 26-week inhalation toxicity study in rats with a 13-week interim evaluation and a 12-week recovery period

**Study No.:** 07-6308

| Daily Dose (mg/kg) | | 0 (1.5% NaCl) | | 10 | | 30 | | 90 | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Number of Animals | Main | M: 15 | F: 15 | M: 15 | F: 15 | M: 15 | F: 15 | M: 15 | F: 15 |
| | Interim necropsy | M: 10 | F: 10 | M: 10 | F: 10 | M: 10 | F: 10 | M: 10 | F: 10 |
| | Recovery | M: 5 | F: 5 | M: 5 | F: 5 | M: 5 | F: 5 | M: 5 | F: 5 |
| Recovery Sacrifice (Number of Animals Evaluated) | | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 |
| Absolute weight (g) | | 1.9950 | 1.4824 | -0.1% | -0.6% | +6.2% | +9.6% | +7.5% | +15.4% |
| Relative weight (% body weight) | | 0.2781 | 0.4197 | 0.3004 | 0.3837 | 0.3258 | 0.4232 | 0.3323 | 0.4159 |
| Gross Pathology | | | | | | | | | |
| Lungs; discoloration, tan/white foci | | | | | | | | | |
| Interim Sacrifice | | 1/10 | 0/10 | 0/10 | 0/9 | 2/10 | 6/10 | 8/10 | 10/10 |
| Terminal Sacrifice | | 2/15 | 3/15 | 7/14 | 6/15 | 10/14 | 11/15 | 14/15 | 14/15 |
| Recovery Sacrifice | | 1/5 | 0/5 | 1/5 | 0/5 | 1/5 | 2/5 | 4/5 | 5/5 |
| Histopathology [d] | | | | | | | | | |
| Lungs | | | | | | | | | |
| Foamy macrophage accumulation | | | | | | | | | |
| Interim Sacrifice | | 0/10 | 0/10 | 10/10 | 9/9 | 10/10 | 10/10 | 10/10 | 10/10 |
| Slight | | 0 | 0 | 10 | 9 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Moderate | | 0 | 0 | 0 | 0 | 10 | 10 | 3 | 4 |
| Marked | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 7 | 6 |
| Terminal Sacrifice | | 0/15 | 0/15 | 14/14 | 15/15 | 14/14 | 15/15 | 15/15 | 15/15 |
| Slight | | 0 | 0 | 14 | 15 | 3 | 1 | 0 | 0 |
| Moderate | | 0 | 0 | 0 | 0 | 10 | 14 | 4 | 2 |
| Marked | | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 10 | 12 |
| Severe | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| Recovery Sacrifice (Minimal-Slight) | | 0/5 | 0/5 | 1/5 | 1/5 | 1/5 | 3/5 | 5/5 | 5/5 |

## 2.6.7.7.1 ラットを用いた 6 ヵ月間反復吸入毒性試験（続き）

**Test Article:** ALIS

**Title:** Arikace™: a 26-week inhalation toxicity study in rats with a 13-week interim evaluation and a 12-week recovery period

**Study No.:** 07-6308

| Daily Dose (mg/kg) | | 0 (1.5% NaCl) | | 10 | | 30 | | 90 | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Number of Animals | Main | M: 15 | F: 15 | M: 15 | F: 15 | M: 15 | F: 15 | M: 15 | F: 15 |
| | Interim necropsy | M: 10 | F: 10 | M: 10 | F: 10 | M: 10 | F: 10 | M: 10 | F: 10 |
| | Recovery | M: 5 | F: 5 | M: 5 | F: 5 | M: 5 | F: 5 | M: 5 | F: 5 |
| Foci of subacute/chronic inflammation | | | | | | | | | |
| Interim Sacrifice | | 0/10 | 0/10 | 0/10 | 0/9 | 2/10 | 5/10 | 9/10 | 10/10 |
| Minimal | | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 3 | 4 | 2 |
| Slight | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 5 | 8 |
| Terminal Sacrifice | | 0/15 | 1/15 | 2/14 | 2/15 | 10/14 | 10/15 | 14/15 | 14/15 |
| Minimal | | 0 | 1 | 2 | 2 | 7 | 6 | 3 | 4 |
| Slight | | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 3 | 8 | 6 |
| Moderate | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 3 | 4 |
| Recovery Sacrifice (Minimal-Slight) | | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 1/5 | 0/5 | 3/5 | 5/5 | 5/5 |
| Regenerative hyperplasia of alveolar epithelium | | | | | | | | | |
| Interim Sacrifice (Minimal) | | 0/10 | 0/10 | 0/10 | 0/9 | 1/10 | 2/10 | 6/10 | 7/10 |
| Terminal Sacrifice | | 0/15 | 0/15 | 0/14 | 0/15 | 7/14 | 5/15 | 11/15 | 13/15 |
| Minimal | | 0 | 0 | 0 | 0 | 7 | 4 | 2 | 7 |
| Slight | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 7 | 5 |
| Moderate | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 1 |
| Recovery Sacrifice (Minimal) | | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 1/5 | 1/5 | 5/5 | 5/5 |
| Cholesterol clefts associated with syncytial macrophages | | | | | | | | | |
| Interim Sacrifice | | 0/10 | 0/10 | 0/10 | 0/9 | 0/10 | 0/10 | 0/10 | 0/10 |
| Terminal Sacrifice | | 0/15 | 0/15 | 0/14 | 0/15 | 2/14 | 3/15 | 8/15 | 10/15 |
| Minimal | | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 3 | 8 | 8 |
| Slight | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 |
| Recovery Sacrifice (Minimal) | | 0/5 | 0/5 | 1/5 | 0/5 | 1/5 | 3/5 | 5/5 | 5/5 |

## 2.6.7.7.1 ラットを用いた 6 ヵ月間反復吸入毒性試験（続き）

**Test Article:** ALIS

**Title:** Arikace™: a 26-week inhalation toxicity study in rats with a 13-week interim evaluation and a 12-week recovery period

**Study No.:** 07-6308

| Daily Dose (mg/kg) | | 0 (1.5% NaCl) | | 10 | | 30 | | 90 | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Number of Animals | Main | M: 15 | F: 15 | M: 15 | F: 15 | M: 15 | F: 15 | M: 15 | F: 15 |
| | Interim necropsy | M: 10 | F: 10 | M: 10 | F: 10 | M: 10 | F: 10 | M: 10 | F: 10 |
| | Recovery | M: 5 | F: 5 | M: 5 | F: 5 | M: 5 | F: 5 | M: 5 | F: 5 |
| Alveolar fibrosis | | | | | | | | | |
| Interim Sacrifice | | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- |
| Terminal Sacrifice | | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- |
| Recovery Sacrifice (Minimal) | | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 2/5 |
| Visceral pleura/capsule; subacute/chronic inflammation/fibrosis | | | | | | | | | |
| Interim Sacrifice | | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- |
| Terminal Sacrifice | | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- |
| Recovery Sacrifice (Minimal) | | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 2/5 | 2/5 |
| Nasal turbinates | | | | | | | | | |
| Nasal mucosa (respiratory); degenerative change (section 2) | | | | | | | | | |
| Interim Sacrifice | | 0/10 | 0/10 | 0/11 | 0/10 | 5/10 | 2/10 | 7/10 | 7/10 |
| Minimal | | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 2 | 2 | 3 |
| Slight | | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 5 | 4 |
| Terminal Sacrifice | | 0/15 | 0/15 | 3/14 | 1/15 | 8/14 | 11/15 | 9/15 | 13/15 |
| Minimal | | 0 | 0 | 3 | 1 | 6 | 3 | 0 | 1 |
| Slight | | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 8 | 7 | 12 |
| Moderate | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 |
| Recovery Sacrifice (Minimal-Slight) | | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 2/5 | 2/5 | 5/5 | 4/5 |

## 2.6.7.7.1 ラットを用いた 6 ヵ月間反復吸入毒性試験（続き）

**Test Article:** ALIS

**Title:** Arikace™: a 26-week inhalation toxicity study in rats with a 13-week interim evaluation and a 12-week recovery period

**Study No.:** 07-6308

| Daily Dose (mg/kg) | | 0 (1.5% NaCl) | | 10 | | 30 | | 90 | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Number of Animals | Main | M: 15 | F: 15 | M: 15 | F: 15 | M: 15 | F: 15 | M: 15 | F: 15 |
| | Interim necropsy | M: 10 | F: 10 | M: 10 | F: 10 | M: 10 | F: 10 | M: 10 | F: 10 |
| | Recovery | M: 5 | F: 5 | M: 5 | F: 5 | M: 5 | F: 5 | M: 5 | F: 5 |
| Nasal mucosa (olfactory); degenerative change (section 4) | | | | | | | | | |
| Interim Sacrifice | | 0/10 | 0/10 | 0/11 | 0/10 | 8/10 | 10/10 | 10/10 | 10/10 |
| Minimal | | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 4 | 1 | 0 |
| Slight | | 0 | 0 | 0 | 0 | 4 | 5 | 1 | 2 |
| Moderate | | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 8 | 8 |
| Terminal Sacrifice | | 0/15 | 0/15 | 5/14 | 5/15 | 14/14 | 15/15 | 15/15 | 15/15 |
| Minimal | | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Slight | | 0 | 0 | 5 | 1 | 4 | 7 | 0 | 0 |
| Moderate | | 0 | 0 | 0 | 2 | 8 | 8 | 2 | 2 |
| Marked | | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 9 | 6 |
| Severe | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 4 | 7 |
| Recovery Sacrifice (Slight-Moderate) | | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 1/5 | 3/5 | 4/5 | 5/5 |
| Nasal mucosa (olfactory); epithelium-cyst(s) (all sections) | | | | | | | | | |
| Interim Sacrifice | | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- |
| Terminal Sacrifice (Minimal-Slight) | | 2/15 | 2/15 | 1/14 | 2/15 | 3/14 | 3/15 | 8/15 | 9/15 |
| Recovery Sacrifice (Minimal-Slight) | | 0/5 | 1/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 2/5 | 4/5 | 5/5 |

## 2.6.7.7.1 ラットを用いた 6 ヵ月間反復吸入毒性試験（続き）

**Test Article:** ALIS

**Title:** Arikace™: a 26-week inhalation toxicity study in rats with a 13-week interim evaluation and a 12-week recovery period

**Study No.:** 07-6308

| Daily Dose (mg/kg) | | 0 (1.5% NaCl) | | 10 | | 30 | | 90 | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Number of Animals | Main | M: 15 | F: 15 | M: 15 | F: 15 | M: 15 | F: 15 | M: 15 | F: 15 |
| | Interim necropsy | M: 10 | F: 10 | M: 10 | F: 10 | M: 10 | F: 10 | M: 10 | F: 10 |
| | Recovery | M: 5 | F: 5 | M: 5 | F: 5 | M: 5 | F: 5 | M: 5 | F: 5 |
| Kidneys; nephropathy | | | | | | | | | |
| Interim Sacrifice (Minimal) | | 0/10 | 0/10 | 0/10 | 0/9 | 0/10 | 0/10 | 4/10 | 0/10 |
| Terminal Sacrifice | | 2/15 | 2/15 | 0/14 | 0/15 | 1/14 | 0/15 | 11/15 | 6/15 |
| Minimal | | 2 | 2 | 0 | 0 | 1 | 0 | 5 | 6 |
| Slight | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 6 | 0 |
| Recovery Sacrifice (Minimal) | | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 1/5 | 1/5 |
| Larynx (combined ventral seromucous gland and ventral diverticulum areas) Mucosa; increased number of mixed inflammatory cells | | | | | | | | | |
| Interim Sacrifice | | 2/10 | 1/10 | 1/11 | 2/10 | 4/10 | 3/10 | 9/10 | 7/10 |
| Terminal Sacrifice | | 1/15 | 1/15 | 3/14 | 3/15 | 6/15 | 7/15 | 11/15 | 8/15 |
| Recovery Sacrifice | | 0/5 | 0/5 | 1/5 | 0/5 | 1/5 | 0/5 | 1/5 | 1/5 |
| Pseudostratified columnar epithelium; squamous metaplasia/hyperplasia | | | | | | | | | |
| Interim Sacrifice (Minimal-Moderate) | | 0/10 | 0/10 | 0/10 | 0/9 | 3/10 | 2/10 | 5/10 | 4/10 |
| Terminal Sacrifice (Minimal-Moderate) | | 1/15 | 0/15 | 10/14 | 14/15 | 14/14 | 14/15 | 14/15 | 14/15 |
| Recovery Sacrifice (Minimal-Slight) | | 0/5 | 0/5 | 1/5 | 0/5 | 0/5 | 1/5 | 2/5 | 2/5 |
| Squamous Epithelium (normal); hyperplasia | | | | | | | | | |
| Interim Sacrifice (Minimal-Moderate) | | 0/10 | 0/10 | 1/10 | 0/9 | 9/10 | 9/10 | 9/10 | 10/10 |
| Terminal Sacrifice (Minimal-Moderate) | | 0/15 | 0/15 | 13/14 | 5/15 | 13/14 | 14/15 | 14/15 | 15/15 |
| Recovery Sacrifice (Minimal-Moderate) | | 0/5 | 0/5 | 1/5 | 0/5 | 0/5 | 2/5 | 4/5 | 3/5 |

## 2.6.7.7.1 ラットを用いた 6 ヵ月間反復吸入毒性試験（続き）

**Test Article:** ALIS

**Title:** Arikace™: a 26-week inhalation toxicity study in rats with a 13-week interim evaluation and a 12-week recovery period

**Study No.:** 07-6308

| Daily Dose (mg/kg) | | 0 (1.5% NaCl) | | 10 | | 30 | | 90 | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Number of Animals | Main | M: 15 | F: 15 | M: 15 | F: 15 | M: 15 | F: 15 | M: 15 | F: 15 |
| | Interim necropsy | M: 10 | F: 10 | M: 10 | F: 10 | M: 10 | F: 10 | M: 10 | F: 10 |
| | Recovery | M: 5 | F: 5 | M: 5 | F: 5 | M: 5 | F: 5 | M: 5 | F: 5 |
| Squamous Epithelium (normal); keratinized | | | | | | | | | |
| Interim Sacrifice (Minimal-Moderate) | | 0/10 | 0/10 | 0/10 | 0/9 | 8/10 | 9/10 | 7/10 | 9/10 |
| Terminal Sacrifice (Minimal-Moderate) | | 0/15 | 0/15 | 4/14 | 5/15 | 9/14 | 10/15 | 11/15 | 14/15 |
| Recovery Sacrifice (Minimal-Slight) | | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 2/5 | 3/5 | 2/5 |
| Trachea (proximal section) | | | | | | | | | |
| Mucosa; epithelium degenerative change | | | | | | | | | |
| Interim Sacrifice | | 0/10 | 0/10 | 0/10 | 0/9 | 7/10 | 2/10 | 5/10 | 8/10 |
| Minimal | | 0 | 0 | 0 | 0 | 4 | 2 | 1 | 2 |
| Slight | | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 2 | 4 | 6 |
| Terminal Sacrifice | | 0/15 | 0/15 | 2/14 | 4/15 | 7/14 | 10/15 | 10/15 | 6/15 |
| Minimal | | 0 | 0 | 1 | 3 | 5 | 5 | 3 | 3 |
| Slight | | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 5 | 7 | 3 |
| Recovery Sacrifice (Minimal) | | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 2/5 | 1/5 | 0/5 |

-- = No noteworthy findings. ♦ = Not assessed. * = p<0.05 **=p < 0.01

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

[b] Finding present in 30 males & 30 females at 2 h post-dose but not evident at 4 h post-dose.

[c] Includes percent difference (vs. control) for absolute organ weights.

[d] For Histopathology; # / # = number of animals affected/number of animals examined.

## 2.6.7.7.2 イヌを用いた３ヵ月間吸入毒性試験

**Title:** Arikace™: a 3-month inhalation toxicity study in dogs followed by a 2-month recovery period

**Test Article:** ALIS

**Species/Strain:** Dog/Beagle

**Initial Age:** 6 to 7 months

**Date of First Dose:** 3 January 2008

**Duration of Dosing:** 3 months (formulations administered up to 90 minutes per day with 67 to 73 mg Amikacin/mL)

**Duration of Postdose:** 2 months

**Method of Administration:** Inhalation

**Vehicle/Formulation:** Liposomal Suspension in 1.5% NaCl

**Study No.:** 07-6306

**Location in CTD:** 4.2.3.2-7

**Testing Facility:** [redacted] USA

**GLP Compliance:** Yes

**Special Features:** Urine levels of amikacin were determined on Day 1, Day 89, and recovery Days 29 and 54 [Data for Day 89 (n=12) and recovery Day 54 (n=4) are shown below]. Lung levels of amikacin were determined at the end of the dosing (n=8) and recovery (n=4) periods.
**No-Observed-Adverse-Effect Level:** 30 mg/kg for lung and lymph node changes; 10 mg/kg for kidney changes.

| Daily Dose (mg/kg/day) | | 0 (1.5% NaCl) | | 5 | | 10 | | 30 | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Number of Animals | Main | M: 4 | F: 4 | M: 4 | F: 4 | M: 4 | F: 4 | M: 4 | F: 4 |
| | Recovery | M: 2 | F: 2 | M: 2 | F: 2 | M: 2 | F: 2 | M: 2 | F: 2 |
| Toxicokinetics | | | | | | | | | |
| Serum Amikacin $AUC_{all}$ (ng•h/mL) | Day 1 | ♦ | ♦ | 1120 | 978 | 1960 | 2230 | 11200 | 9720 |
| | End of Dose (Day 89) | ♦ | ♦ | 2470 | 2820 | 3640 | 6300 | 14900 | 13200 |
| Urine Amikacin (ng/mL) | End of Dose (Day 89) | BLQ | | 63,983 | | 116,450 | | 336,583 | |
| | End of Recovery (Day 54) | BLQ | | 554 | | 3730 | | 10,418 | |
| Lung Amikacin (µg/g) | End of Dose (Day 89) | BLQ | | 1237 | | 2659 | | 5222 | |
| | End of Recovery (Day 54) | BLQ | | 57 | | 320 | | 1622 | |
| Noteworthy Findings: | | | | | | | | | |
| Died or Sacrificed Moribund: | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Body Weight: | | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- |
| Food Consumption: | | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- |
| Clinical Observations: | | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- |

## 2.6.7.7.2 イヌを用いた３ヵ月間吸入毒性試験（続き）

**Test Article:** ALIS

**Title:** Arikace™: a 3-month inhalation toxicity study in dogs followed by a 2-month recovery period

**Study No.:** 07-6306

| Daily Dose (mg/kg) | | 0 (1.5% NaCl) | | 5 | | 10 | | 30 | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Number of Animals | Main | M: 4 | F: 4 | M: 4 | F: 4 | M: 4 | F: 4 | M: 4 | F: 4 |
| | Recovery | M: 2 | F: 2 | M: 2 | F: 2 | M: 2 | F: 2 | M: 2 | F: 2 |
| Ophthalmoscopy: | | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- |
| Electrocardiography: | | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- |
| Hematology: | | | | | | | | | |
| Total White Cell Count ( $\times 10^3/\mu L$) | | | | | | | | | |
| Pretest (n = 6) | | 12.52 | 11.98 | 10.22 | 12.24 | 12.82 | 11.50 | 12.03 | 10.24 |
| Month 3 (n = 6) | | 8.9 | 10.82 | 7.53 | 10.43 | 11.27* | 9.21 | 10.66* | 9.76 |
| Recovery (n = 2) | | 9.97 | 9.49 | 8.12 | 10.38 | 10.69 | 11.38 | 9.76 | 7.57 |
| Neutrophil Count ( $\times 10^3/\mu L$) | | | | | | | | | |
| Pretest (n = 6) | | 8.08 | 7.49 | 5.82 | 7.52 | 7.36 | 7.35 | 7.29 | 6.14 |
| Month 3 (n = 6) | | 4.99 | 6.31 | 3.86 | 6.02 | 6.17 | 5.37 | 6.36* | 5.44 |
| Recovery (n = 2) | | 5.47 | 5.18 | 4.57 | 5.93 | 6.42 | 7.37 | 6.21 | 4.09 |
| Platelet Count ( $\times 10^3/\mu L$) | | | | | | | | | |
| Pretest (n = 6) | | 350 | 355 | 367 | 321 | 351 | 408 | 325 | 376 |
| Month 3 (n=6) | | 354 | 320 | 292** | 289 | 302** | 349 | 305** | 328 |
| Recovery (n=2) | | 290 | 306 | 257 | 314 | 284 | 308 | 251 | 287 |
| Coagulation Parameters | | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- |
| Serum Chemistry: | | | | | | | | | |
| Cholesterol (mg/dL) | | | | | | | | | |
| Pretest (n = 6) | | 159 | 134 | 155 | 139 | 133 | 156 | 162 | 135 |
| Month 3 (n = 6) | | 193 | 160 | 187 | 192 | 177 | 202* | 192 | 199* |
| Recovery (n = 2) | | 184 | 251 | 202 | 231 | 165 | 217 | 187 | 246 |
| Urinalysis: | | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- |

## 2.6.7.7.2 イヌを用いた３ヵ月間吸入毒性試験（続き）

**Test Article:** ALIS

**Title:** Arikace™: a 3-month inhalation toxicity study in dogs followed by a 2-month recovery period

**Study No.:** 07-6306

| Daily Dose (mg/kg) | | 0 (1.5% NaCl) | | 5 | | 10 | | 30 | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Number of Animals | Main | M: 4 | F: 4 | M: 4 | F: 4 | M: 4 | F: 4 | M: 4 | F: 4 |
| | Recovery | M: 2 | F: 2 | M: 2 | F: 2 | M: 2 | F: 2 | M: 2 | F: 2 |
| Organ Weights: | | | | | | | | | |
| Lungs | | | | | | | | | |
| Terminal Sacrifice (Number of Animals Evaluated): | | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 |
| Absolute weight [a] (g) | | 83.43 | 71.58 | +15.2% | +5.6% | +12.5% | +10.2% | +32.1%* | +29.8% |
| Relative weight (% body weight) | | 0.912 | 0.998 | 0.983 | 1.03 | 1.031 | 1.132 | 1.241** | 1.183* |
| Recovery Sacrifice (Number of Animals Evaluated): | | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| Absolute weight [a] (g) | | 80.54 | 66.87 | 82.50 | 76.84 | 84.08 | 75.96 | 97.08 | 66.67 |
| Relative weight (% body weight) | | 0.873 | 0.833 | 0.951 | 0.950 | 0.892 | 0.959 | 0.944 | 0.915 |
| Gross Pathology: | | | | | | | | | |
| Mediastinal lymph nodes, discolored | | | | | | | | | |
| Terminal Sacrifice | | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 1/4 | 0/4 | 0/4 | 1/4 | 1/4 |
| Recovery Sacrifice | | 1/2 | 0/2 | 1/2 | 0/2 | 1/2 | 1/2 | 0/2 | 0/2 |
| Histopathology | | | | | | | | | |
| Kidneys; increased accumulation of eosinophilic droplets | | | | | | | | | |
| Terminal Sacrifice | | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 2/4 | 2/4 |
| Minimal | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| Slight | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| Recovery Sacrifice | | 0/2 | 0/2 | ♦ | ♦ | 0/1 | ♦ | 0/2 | 0/2 |

## 2.6.7.7.2 イヌを用いた３ヵ月間吸入毒性試験（続き）

**Test Article:** ALIS

**Title:** Arikace™: a 3-month inhalation toxicity study in dogs followed by a 2-month recovery period

**Study No.:** 07-6306

| Daily Dose (mg/kg) | | 0 (1.5% NaCl) | | 5 | | 10 | | 30 | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Number of Animals | Main | M: 4 | F: 4 | M: 4 | F: 4 | M: 4 | F: 4 | M: 4 | F: 4 |
| | Recovery | M: 2 | F: 2 | M: 2 | F: 2 | M: 2 | F: 2 | M: 2 | F: 2 |
| Lungs; increased alveolar foamy macrophages | | | | | | | | | |
| Terminal Sacrifice | | 0/4 | 0/4 | 4/4 | 4/4 | 4/4 | 4/4 | 4/4 | 4/4 |
| Minimal | | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Slight | | 0 | 0 | 4 | 3 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| Moderate | | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 4 | 0 | 0 |
| Marked | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 4 | 4 |
| Recovery Sacrifice | | 0/2 | 0/2 | 2/2 | 2/2 | 2/2 | 2/2 | 2/2 | 2/2 |
| Minimal | | 0 | 0 | 2 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| Slight | | 0 | 0 | 0 | 1 | 2 | 1 | 0 | 0 |
| Moderate | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 2 |
| Lymph Nodes; increased macrophages | | | | | | | | | |
| Terminal Sacrifice | | 0/4 | 0/4 | 1/4 | 0/4 | 1/4 | 1/4 | 4/4 | 3/4 |
| Minimal | | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 3 | 2 |
| Slight | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| Recovery Sacrifice | | 0/2 | 0/2 | 0/2 | 0/2 | 0/2 | 0/2 | 0/2 | 0/2 |
| Tracheobronchia | | | | | | | | | |
| Terminal Sacrifice | | 0/4 | 0/4 | 2/4 | 0/4 | 3/4 | 2/4 | 4/4 | 3/4 |
| Minimal | | 0 | 0 | 2 | 0 | 3 | 2 | 1 | 1 |
| Slight | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 2 |
| Recovery Sacrifice | | 0/2 | 0/2 | 0/2 | 0/2 | 0/2 | 0/2 | 0/2 | 0/2 |

## 2.6.7.7.2 イヌを用いた３ヵ月間吸入毒性試験（続き）

**Test Article:** ALIS

**Title:** Arikace™: a 3-month inhalation toxicity study in dogs followed by a 2-month recovery period

**Study No.:** 07-6306

| Daily Dose (mg/kg) | | 0 (1.5% NaCl) | | 5 | | 10 | | 30 | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Number of Animals | Main | M: 4 | F: 4 | M: 4 | F: 4 | M: 4 | F: 4 | M: 4 | F: 4 |
| | Recovery | M: 2 | F: 2 | M: 2 | F: 2 | M: 2 | F: 2 | M: 2 | F: 2 |
| Larynx; foci of slight ulceration | | | | | | | | | |
| Terminal Sacrifice | | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 1/4 |
| Recovery Sacrifice | | 0/2 | 0/2 | ♦ | ♦ | ♦ | ♦ | 0/2 | 0/2 |

-- = No noteworthy findings. * = p<0.05. ** = p<0.01. ♦ = Not assessed or examined.
[a] At the end of dosing and recovery periods; values for each group are % change from control (1.5% NaCl) values.

## 2.6.7.7.3 イヌを用いた 9 ヵ月間吸入毒性試験

**Title:** Arikace™: a 9-month inhalation toxicity study in dogs with a 3-month recovery period

**Test Article:** ALIS

**Species/Strain:** Dog/Beagle

**Duration of Dosing:** 9 months (formulations administered up to 90 minutes per day with 68.9 to 79 mg Amikacin/mL)

**Study No.:** 11-6400

**Initial Age:** 5 to 6 months
**Date of First Dose:** 25 April 2012 (males)
26 April 2012 (females)

**Duration of Postdose:** 3 months
**Method of Administration:** Inhalation
**Vehicle/Formulation:** Liposomal Suspension in 1.5% NaCl

**Location in CTD:** 4.2.3.2-8
**Testing Facility:** [redacted] USA
**GLP Compliance:** Yes

**Special Features:** An additional control group that consisted of 6 males and 6 females was administered empty liposomes in order to differentiate liposomal effects from those associated with ALIS. Lung levels of amikacin were determined at the end of the dosing (n=4) and recovery (n=2) periods.
**No-Observed-Adverse-Effect Level:** 30 mg/kg/day

| Daily Dose (mg/kg/day) | | 0 (1.5% NaCl) | | 0 (ELC) | | 5 | | 10 | | 30 | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Number of Animals | Main | M: 4 | F: 4 | M: 4 | F: 4 | M: 4 | F: 4 | M: 4 | F: 4 | M: 4 | F: 4 |
| | Recovery | M: 2 | F: 2 | M: 2 | F: 2 | M: 0 | F: 0 | M: 0 | F: 0 | M: 2 | F: 2 |
| Toxicokinetics: | | | | | | | | | | | |
| Plasma Amikacin; $AUC_{last}$ (ng•h/mL) | | | | | | | | | | | |
| Day 1 | | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ | 2010 | 2210 | 4180 | 3430 | 11900 | 13600 |
| Month 6 | | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ | 2100 | 1810 | 4470 | 3140 | 9160 | 9220 |
| Month 9 | | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ | 2490 | 1750 | 5340 | 3590 | 9530 | 9250 |
| Lung Amikacin (µg/g) | | | | | | | | | | | |
| Month 9 | | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ | 660 | 696 | 1320 | 1220 | 2120 | 3250 |
| End of Recovery | | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ | ♦ | ♦ | ♦ | ♦ | 117 | 468 |
| Noteworthy Findings | | | | | | | | | | | |
| Died or Sacrificed Moribund | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Body Weight (kg) | | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- |
| Food Consumption | | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- |
| Water Consumption | | ♦ | ♦ | ♦ | ♦ | ♦ | ♦ | ♦ | ♦ | ♦ | ♦ |
| Clinical Observations | | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- |

## 2.6.7.7.3 イヌを用いた９ヵ月間吸入毒性試験（続き）

**Test Article:** ALIS

**Title:** Arikace™: a 9-month inhalation toxicity study in dogs with a 3-month recovery period

**Study No.:** 11-6400

| Daily Dose (mg/kg/day) | | 0 (1.5% NaCl) | | 0 (ELC) | | 5 | | 10 | | 30 | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Number of Animals | Main | M: 4 | F: 4 | M: 4 | F: 4 | M: 4 | F: 4 | M: 4 | F: 4 | M: 4 | F: 4 |
| | Recovery | M: 2 | F: 2 | M: 2 | F: 2 | M: 0 | F: 0 | M: 0 | F: 0 | M: 2 | F: 2 |
| Ophthalmoscopy: | | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- |
| Electrocardiography: | | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- |
| Hematology: | | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- |
| Coagulation: | | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- |
| Clinical Chemistry: | | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- |
| Urinalysis: | | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- |
| Organ Weights: | | | | | | | | | | | |
| Lungs | | | | | | | | | | | |
| Terminal Sacrifice (Number of Animals Evaluated) | | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 |
| Absolute weight [a] (g) | | 109.600 | 90.057 | -0.05% | +1% | +2% | +3% | +18% | +23% | +25%* | +29%* |
| Relative weight (% body weight) | | 0.995 | 0.941 | +12% | +9% | +3% | +5% | +24%* | +19% | +35%*** | +39%** |
| Recovery Sacrifice (Number of Animals Evaluated) | | 2 | 2 | 2 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 2 |
| Absolute weight [a] (g) | | 97.447 | 82.364 | -5% | +7% | ♦ | ♦ | ♦ | ♦ | +19% | +21% |
| Relative weight (% body weight) | | 0.824 | 0.889 | +6% | +2% | ♦ | ♦ | ♦ | ♦ | +33% | +21% |
| Gross Pathology: | | | | | | | | | | | |
| Terminal Sacrifice | | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- |
| Recovery Sacrifice | | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- |

## 2.6.7.7.3 イヌを用いた９ヵ月間吸入毒性試験（続き）

**Test Article:** ALIS

**Title:** Arikace™: a 9-month inhalation toxicity study in dogs with a 3-month recovery period

**Study No.:** 11-6400

| Daily Dose (mg/kg/day) | | 0 (1.5% NaCl) | | 0 (ELC) | | 5 | | 10 | | 30 | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Number of Animals | Main | M: 4 | F: 4 | M: 4 | F: 4 | M: 4 | F: 4 | M: 4 | F: 4 | M: 4 | F: 4 |
| | Recovery | M: 2 | F: 2 | M: 2 | F: 2 | M: 0 | F: 0 | M: 0 | F: 0 | M: 2 | F: 2 |
| Histopathology: | | | | | | | | | | | |
| Lungs<br>alveolar foamy macrophages (with minimal-slight intracytoplasmic basophilic granules in all ALIS-treated dogs at both terminal and recovery sacrifices) | | | | | | | | | | | |
| Terminal Sacrifice | | 2/4 | 0/4 | 3/4 | 3/4 | 4/4 | 4/4 | 4/4 | 4/4 | 4/4 | 4/4 |
| Minimal | | 2 | 0 | 3 | 3 | 1 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Slight | | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 2 | 1 | 1 | 0 | 0 |
| Moderate | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 3 | 3 | 0 |
| Severe | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 4 |
| Recovery Sacrifice | | 0/2 | 0/2 | 0/2 | 0/2 | ♦ | ♦ | ♦ | ♦ | 2/2 | 2/2 |
| Minimal | | 0 | 0 | 0 | 0 | ♦ | ♦ | ♦ | ♦ | 2 | 1 |
| Slight | | 0 | 0 | 0 | 0 | ♦ | ♦ | ♦ | ♦ | 0 | 1 |
| Nasal Turbinates | | | | | | | | | | | |
| Respiratory epithelium, degeneration | | | | | | | | | | | |
| Terminal Sacrifice | | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 3/4 | 1/4 | 4/4 | 3/4 | 4/4 | 4/4 |
| Minimal | | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 1 | 3 | 3 | 1 | 0 |
| Slight | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 3 |
| Moderate | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 1 |
| Recovery Sacrifice | | 0/2 | 0/2 | 0/2 | 0/2 | ♦ | ♦ | ♦ | ♦ | 0/2 | 0/2 |

## 2.6.7.7.3 イヌを用いた９ヵ月間吸入毒性試験（続き）

**Test Article:** ALIS

**Title:** Arikace™: a 9-month inhalation toxicity study in dogs with a 3-month recovery period

**Study No.:** 11-6400

| Daily Dose (mg/kg/day) | | 0 (1.5% NaCl) | | 0 (ELC) | | 5 | | 10 | | 30 | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Number of Animals | Main | M: 4 | F: 4 | M: 4 | F: 4 | M: 4 | F: 4 | M: 4 | F: 4 | M: 4 | F: 4 |
| | Recovery | M: 2 | F: 2 | M: 2 | F: 2 | M: 0 | F: 0 | M: 0 | F: 0 | M: 2 | F: 2 |
| Olfactory epithelium, degeneration | | | | | | | | | | | |
| Terminal Sacrifice | | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 1/4 | 1/4 | 1/4 | 1/4 | 4/4 | 4/4 |
| Minimal | | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 2 | 1 |
| Slight | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 3 |
| Recovery Sacrifice: | | 0/2 | 0/2 | 0/2 | 0/2 | ♦ | ♦ | ♦ | ♦ | 2/2 | 0/2 |
| Minimal | | 0 | 0 | 0 | 0 | ♦ | ♦ | ♦ | ♦ | 2 | 0 |
| Tracheal | | | | | | | | | | | |
| Bifurcation/Trachea Epithelium; basophilic granules | | | | | | | | | | | |
| Terminal Sacrifice | | 0/3 | 0/3 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 1/4 | 0/4 | 3/4 | 4/4 |
| Minimal | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 2 | 4 |
| Slight | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| Recovery Sacrifice | | 0/2 | 0/2 | 0/2 | 0/2 | ♦ | ♦ | ♦ | ♦ | 1/2 | 0/2 |
| Minimal | | 0 | 0 | 0 | 0 | ♦ | ♦ | ♦ | ♦ | 1 | 0 |
| Kidneys | | | | | | | | | | | |
| Cortex, proximal tubules, increased brown pigment | | | | | | | | | | | |
| Terminal Sacrifice | | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 2/4 | 0/4 | 3/4 | 3/4 | 3/4 | 1/4 |
| Minimal | | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 2 | 3 | 2 | 1 |
| Slight | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 |
| Recovery Sacrifice | | 0/2 | 0/2 | 0/2 | 0/2 | ♦ | ♦ | ♦ | ♦ | 0/2 | 0/2 |

## 2.6.7.7.3 イヌを用いた９ヵ月間吸入毒性試験（続き）

**Test Article:** ALIS

**Title:** Arikace™: a 9-month inhalation toxicity study in dogs with a 3-month recovery period

**Study No.:** 11-6400

| Daily Dose (mg/kg/day) | | 0 (1.5% NaCl) | | 0 (ELC) | | 5 | | 10 | | 30 | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Number of Animals | Main | M: 4 | F: 4 | M: 4 | F: 4 | M: 4 | F: 4 | M: 4 | F: 4 | M: 4 | F: 4 |
| | Recovery | M: 2 | F: 2 | M: 2 | F: 2 | M: 0 | F: 0 | M: 0 | F: 0 | M: 2 | F: 2 |
| Mediastinal Lymph Nodes (LN); | | | | | | | | | | | |
| Increased macrophages | | | | | | | | | | | |
| Terminal Sacrifice | | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 1/4 | 4/4 | 4/4 | 4/4 | 3/4 | 4/4 | 3/4 |
| Minimal | | 0 | 0 | 0 | 1 | 2 | 2 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| Slight | | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 2 | 3 | 2 | 1 | 0 |
| Moderate | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 3 | 3 |
| Recovery Sacrifice | | 0/2 | 0/2 | 0/2 | 0/2 | ♦ | ♦ | ♦ | ♦ | 2/2 | 2/2 |
| Minimal | | 0 | 0 | 0 | 0 | ♦ | ♦ | ♦ | ♦ | 0 | 1 |
| Slight | | 0 | 0 | 0 | 0 | ♦ | ♦ | ♦ | ♦ | 2 | 0 |
| Moderate | | 0 | 0 | 0 | 0 | ♦ | ♦ | ♦ | ♦ | 0 | 1 |
| Foamy macrophages with intra-cytoplasmic basophilic granules | | | | | | | | | | | |
| Terminal Sacrifice | | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 1/4 | 3/4 | 4/4 | 3/4 | 4/4 | 3/4 |
| Minimal | | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 3 | 3 | 2 | 1 | 1 |
| Slight | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 2 | 1 |
| Moderate | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| Recovery Sacrifice | | 0/2 | 0/2 | 0/2 | 0/2 | ♦ | ♦ | ♦ | ♦ | 1/2 | 2/2 |
| Minimal | | 0 | 0 | 0 | 0 | ♦ | ♦ | ♦ | ♦ | 1 | 1 |
| Slight | | 0 | 0 | 0 | 0 | ♦ | ♦ | ♦ | ♦ | 0 | 1 |

## 2.6.7.7.3 イヌを用いた９ヵ月間吸入毒性試験（続き）

**Test Article:** ALIS

**Title:** Arikace™: a 9-month inhalation toxicity study in dogs with a 3-month recovery period

**Study No.:** 11-6400

| Daily Dose (mg/kg/day) | | 0 (1.5% NaCl) | | 0 (ELC) | | 5 | | 10 | | 30 | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Number of Animals | Main | M: 4 | F: 4 | M: 4 | F: 4 | M: 4 | F: 4 | M: 4 | F: 4 | M: 4 | F: 4 |
| | Recovery | M: 2 | F: 2 | M: 2 | F: 2 | M: 0 | F: 0 | M: 0 | F: 0 | M: 2 | F: 2 |
| Tracheobronchial Lymph Node | | | | | | | | | | | |
| Increased macrophages | | | | | | | | | | | |
| Terminal Sacrifice: | | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 4/4 | 1/4 | 4/4 | 4/4 | 4/4 | 4/4 |
| Minimal | | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 |
| Slight | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 2 | 1 | 1 |
| Moderate | | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 2 | 1 | 3 | 3 |
| Recovery Sacrifice | | 0/2 | 0/2 | 1/2 | 0/2 | ♦ | ♦ | ♦ | ♦ | 0/2 | 1/2 |
| Minimal | | 0 | 0 | 1 | 0 | ♦ | ♦ | ♦ | ♦ | 0 | 0 |
| Moderate | | 0 | 0 | 0 | 0 | ♦ | ♦ | ♦ | ♦ | 0 | 1 |
| Foamy macrophages with intra-cytoplasmic basophilic granules | | | | | | | | | | | |
| Terminal Sacrifice | | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 2/4 | 1/4 | 3/4 | 3/4 | 4/4 | 4/4 |
| Minimal | | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 1 | 0 | 2 | 0 | 1 |
| Slight | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 1 | 3 | 2 |
| Moderate | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| Recovery Sacrifice | | 0/2 | 0/2 | 0/2 | 0/2 | ♦ | ♦ | ♦ | ♦ | 0/2 | 2/2 |
| Minimal | | 0 | 0 | 0 | 0 | ♦ | ♦ | ♦ | ♦ | 0 | 1 |
| Slight | | 0 | 0 | 0 | 0 | ♦ | ♦ | ♦ | ♦ | 0 | 1 |

-- = No noteworthy findings; * = p<0.05, ** = p<0.01, *** = p<0.001; ♦ = Not assessed or examined.

[a] At the end of dosing and recovery periods; values for each group are % change from control (1.5% NaCl) values.

## 2.6.7.8 *In Vitro* 遺伝毒性試験

### 2.6.7.8.1 細菌を用いた復帰突然変異試験

**Title:** *Salmonella-Escherichia coli*/mammalian-microsome reverse mutation assay with a confirmatory assay with TR02 (SLIT™ Amikacin)

**Test Article:** ALIS

**Test for Induction of:** Reverse mutation in bacterial cells

**No. of Independent Assays:** 2

**Study Number:** 7522-100

**Strains:** *S typhimurium* and *E coli*

**No. of Replicate Cultures:** 3

**Location in CTD:** 4.2.3.3.1-1

**Metabolizing System:** Aroclor 1254-induced rat liver S9, 10%

**No. of Cells Analyzed/Culture:** -

**Testing Facility:** [redacted] Laboratories

**Vehicles:** For Test Article and Positive Controls: Deionized Water

**GLP Compliance:** Yes

**Treatment:** 20-min pre-incubation with and without activation followed by 48-h colony formation.

**Date of Treatment:** 22 Jan, 30 Jan, and 06 Feb 2004

**Cytotoxic Effects:** S. typhimurium TA100 at ≥ 250 µg/plate with S-9 & ≥ 100 µg/plate without S-9; E. coli at ≥ 500 µg/plate without S-9

**Genotoxic Effects:** None

| Metabolic Activation | Test Article | Dose Level (µg/plate) | Revertant Colony Counts (Mean ± SD) | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | TA98 | TA100 | TA1535 | TA1537 | WP2uvrA |
| The initial mutagenicity assay | | | | | | | |
| with activation (+S9) | Deionized Water | 50 µl/plate | 21 ± 3 | 125 ± 5 | 14 ± 6 | 9 ± 3 | 18 ± 4 |
| | ALIS | 0.100 | NT | NT | NT | NT | 19 ± 3 |
| | | 0.333 | 19 ± 7 | 105 ± 7 | 10 ± 3 | 8 ± 1 | 16 ± 1 |
| | | 1.00 | 28 ± 2 | 101 ± 16 | 10 ± 2 | 10 ± 2 | 12 ± 4 |
| | | 3.33 | 23 ± 1 | 111 ± 14 | 8 ± 4 | 6 ± 2 | 22 ± 1 |
| | | 10.0 | 22 ± 2 | 125 ± 12 | 14 ± 3 | 5 ± 2 | 12 ± 6 |
| | | 33.3 | 32 ± 2 | 107 ± 14 | 8 ± 3 | 6 ± 2 | 12 ± 1[a] |
| | | 100 | 32 ± 2 | 86 ± 17 | 8 ± 1 | 5 ± 2 | 5 ± 1[a] |
| | | 500 [a] | 2 ± 1 | 12 ± 9 | 1 ± 1 | 2 ± 2 | NT |
| | Positive Controls | | | | | | |
| | Benzo(A)pyrene | 2.5 | 385 ± 28 | NA | NA | NA | NA |
| | 2-Aminoanthracene | 2.5 | NA | 794 ± 18 | 103 ± 8 | 119 ± 3 | NA |
| | 2-Aminoanthracene | 25 | NA | NA | NA | NA | 419 ± 106 |

## 2.6.7.8.1 細菌を用いた復帰突然変異試験（続き）

**Test Article:** ALIS

| Metabolic Activation | Test Article | Dose Level (μg/plate) | Revertant Colony Counts (Mean ± SD) | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | TA98 | TA100 | TA1535 | TA1537 | WP2uvrA |
| The initial mutagenicity assay | | | | | | | |
| without activation (-S9) | Water | 50 μl/plate | 12 ± 2 | 80 ± 5 | 14 ± 3 | 5 ± 3 | 14± 3 |
| | ALIS | 0.100 | NT | NT | NT | NT | 18 ± 2 |
| | | 0.333 | 11 ±4 | 90 ± 12 | 10 ± 3 | 3 ± 1 | 19 ± 5 |
| | | 1.00 | 10 ± 4 | 98 ± 17 | 11 ± 2 | 4 ± 1 | 13 ± 3 |
| | | 3.33 | 11 ± 3 | 94 ± 9 | 12 ± 0 | 6 ± 2 | 14 ± 10 |
| | | 10.0 | 15 ± 3 | 103 ± 4 | 10 ± 2 | 6 ± 2 | 16 ± 6 |
| | | 33.3 | 13 ± 3 | 93 ± 13 | 11 ± 2 | 4 ± 2 | 17 ± 5 [a] |
| | | 100 | 15 ± 1 | 95 ± 18 | 10 ± 3 | 4 ± 1 | 5 ± 2 [a] |
| | | 500 [a] | 11 ± 3 | 53 ± 17 | 8 ± 4 | 3 ± 1 | NT |
| | Positive Controls | | | | | | |
| | 2-Nitrofluorene | 1.0 | 301 ± 30 | NA | NA | NA | NA |
| | Sodium Azide | 2.0 | NA | 1041 ± 56 | 758 ± 120 | NA | NA |
| | ICR-191 | 2.0 | NA | NA | NA | 664 ± 157 | NA |
| | 4-nitroquinoline-N-oxide | 1.0 | NA | NA | NA | NA | 190 ± 3 |
| The confirmatory mutagenicity assay | | | | | | | |
| with activation (+S9) | Water | 50 μl/plate | 15 ± 5 | 110 ± 11 | 8 ± 2 | 10 ± 5 | 17 ± 3 |
| | ALIS | 0.100 | NT | NT | NT | NT | 18 ± 5 |
| | | 0.333 | 14 ± 3 | 90 ± 12 | 8 ± 3 | 8 ± 5 | 19 ± 6 |
| | | 1.00 | 19 ± 3 | 76 ± 9 | 7 ± 4 | 5 ± 5 | 13 ± 4 |
| | | 3.33 | 16 ± 6 | 97 ± 13 | 11 ± 6 | 4 ± 2 | 15 ± 5 |
| | | 10.0 | 18 ± 4 | 87 ± 7 | 9 ± 5 | 6 ± 2 | 11 ± 3 |
| | | 33.3 | 15 ± 3 | 91 ± 5 | 10 ± 2 | 6 ± 1 | 8 ± 7 |
| | | 100 | 17 ± 10 | 60 ± 12 | 8 ± 3 | 7 ± 1 | 4 ± 1 |
| | | 500 [a] | 5 ± 4 | 16 ± 4 | 4 ± 2 | 3 ± 2 | NT |
| | Positive Controls | | | | | | |
| | Benzo(a)pyrene | 2.5 | 257 ± 23 | NA | NA | NA | NA |
| | 2-Aminoanthracene | 2.5 | NA | 583 ± 162 | 65 ± 21 | 53 ± 8 | NA |
| | 2-Aminoanthracene | 25.0 | NA | NA | NA | NA | 451 ± 63 |

## 2.6.7.8.1 細菌を用いた復帰突然変異試験（続き）

**Test Article:** ALIS

| Metabolic Activation | Test Article | Dose Level (μg/plate) | Revertant Colony Counts (Mean ± SD) | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | TA98 | TA100 | TA1535 | TA1537 | WP2uvrA |
| The confirmatory mutagenicity assay (cont.) | | | | | | | |
| without activation (-S9) | Water | 50 μl/plate | 8 ± 1 | 83 ± 4 | 11 ± 2 | 6 ± 3 | 19 ± 2 |
| | ALIS | 0.100 | NT | NT | NT | NT | 23 ± 1 |
| | | 0.333 | 8 ± 3 | 73 ± 3 | 11 ± 2 | 8 ± 2 | 14 ± 4 |
| | | 1.00 | 7 ± 2 | 67 ± 7 | 7 ± 4 | 5 ± 2 | 10 ± 3 |
| | | 3.33 | 10 ± 4 | 74 ± 15 | 7 ± 4 | 7 ± 2 | 9 ± 4 |
| | | 10.0 | 14 ± 5 | 73 ± 6 | 9 ± 3 | 7 ± 4 | 22 ± 6 |
| | | 33.3 | 6 ± 3 | 77 ± 14 | 10 ± 4 | 2 ± 2 | 11 ± 6 |
| | | 100 | 10 ± 3 | 73 ± 6 | 8 ± 2 | 3 ± 2 | 6 ± 3 [a] |
| | | 500 | 10 ± 2 | 43 ± 2 [a] | 7 ± 2 | 5 ± 1 | NT |
| | | 1000 [a] | 1 ± 1 | 18 ± 2 | 5 ± 3 | 4 ± 2 | NT |
| | 2-Nitrofluorene | 1.0 | 208 ± 99 | NA | NA | NA | NA |
| | Sodium Azide | 2.0 | NA | 779 ± 86 | 664 ± 36 | NA | NA |
| | ICR-191 | 2.0 | NA | NA | NA | 573 ± 91 | NA |
| | 4-nitroquinoline-N-oxide | 1.0 | NA | NA | NA | NA | 355 ± 110 |

[a] Background Lawn Reduced. NT = Strain not evaluated at this concentration. NA = Not applicable.

## 2.6.7.8.2 マウスリンフォーマ試験

**Title:** L5178Y TK+/- mouse lymphoma forward mutation assay with a confirmatory assay

**Test Article:** ALIS

**Test for Induction of:** Mutation

**No. of Independent Assays:** 1

**Study Number:** 7522-102

**Strains:** L5178Y TK+/-cells

**No. of Replicate Cultures:** 1 or 3

**Location in CTD:** 4.2.3.3.1-2

**Metabolizing System:** Aroclor™ 1254-induced rat liver S9

**No. of Cells Analyzed/Culture:** $3 \times 10^6$ cell/mL

**GLP Compliance:** Yes

**Vehicles:** For Test Article: 1.5% NaCl

**Date of Treatment:** 02 Jan, 23 Jan, 30 Jan 2007

**Treatment:** Pulse treatment for 4 h with and without S9 and 24 h without S9.

**Cytotoxic Effects:** None

**Genotoxic Effects:** None

| Metabolic Activation | Test Article | Concentration (µg/mL) | Cloning Efficiency (%) | Relative Growth (%) | Mutant Frequency ( × $10^{-6}$) | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | Total | Small Cell Colony | Large Cell Colony |
| Initial Mutation Assay: 4 hours | | | | | | | |
| without activation (-S9) | Vehicle (1.5% NaCl) [a] | 10% | 124.4 | 99.8 | 34.1 | 12.0 | 22.0 |
| | Empty Liposomes | 5000 | 95.9 | 90.6 | 34.3 | 14.4 | 20.0 |
| | Free Amikacin | 5000 | 110.7 | 97.5 | 30.4 | 9.0 | 21.5 |
| | ALIS | 125 | 77.0 | 81.4 | 39.2 | 14.0 | 25.2 |
| | | 250 | 86.4 | 83.5 | 28.9 | 11.1 | 17.8 |
| | | 500 | 80.5 | 84.0 | 32.9 | 10.7 | 22.2 |
| | | 1000 | 77.0 | 82.0 | 39.6 | 12.8 | 26.8 |
| | | 2000 | 82.5 | 98.3 | 24.3 | 9.7 | 14.6 |
| | | 3000 | 91.3 | 82.3 | 29.3 | 12.1 | 17.2 |
| | | 4000 | 72.7 | 73.5 | 27.1 | 8.1 | 19.1 |
| | | 5000 | 83.4 | 69.1 | 30.6 | 11.4 | 19.2 |
| | MMS [b] | 6.5 | 75.4 | 54.6 | 225.4 | 128.9 | 96.4 |
| | MMS [b] | 13 | 61.7 | 30.4 | 364.6 | 179.5 | 185.1 |

## 2.6.7.8.2 マウスリンフォーマ試験（続き）

Test Article: ALIS

| Metabolic Activation | Test Article | Concentration (µg/mL) | Cloning Efficiency (%) | Relative Growth (%) | Mutant Frequency ( × $10^{-6}$) | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | Total | Small Cell Colony | Large Cell Colony |
| Initial Mutation Assay: 4 hours | | | | | | | |
| with activation (+S9) | Vehicle (1.5% NaCl) [a] | 10% | 92.8 | 99.8 | 38.7 | 21.5 | 17.1 |
| | Empty Liposomes | 5000 | 83.4 | 81.4 | 35.2 | 15.2 | 20.0 |
| | Free Amikacin | 5000 | 78.2 | 79.7 | 46.1 | 20.8 | 25.3 |

## 2.6.7.8.2 マウスリンフォーマ試験（続き）

Test Article: ALIS

| Metabolic Activation | Test Article | Concentration (μg/mL) | Cloning Efficiency (%) | Relative Growth (%) | Mutant Frequency ( × $10^{-6}$) | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | Total | Small Cell Colony | Large Cell Colony |
| | ALIS | 125 | 102.4 | 103.4 | 25.5 | 10.1 | 15.5 |
| | | 250 | 92.3 | 95.3 | 45.9 | 17.6 | 28.3 |
| | | 500 | 88.7 | 90.0 | 42.0 | 17.9 | 24.1 |
| | | 1000 | 97.7 | 97.8 | 43.0 | 21.1 | 21.9 |
| | | 2000 | 89.5 | 106.3 | 50.9 | 24.8 | 26.1 |
| | | 3000 | 97.5 | 100.5 | 32.5 | 14.2 | 18.3 |
| | | 4000 | 99.6 | 99.5 | 27.8 | 15.1 | 12.7 |
| | | 5000 | 108.2 | 84.6 | 39.2 | 15.8 | 23.4 |
| | MCA [b] | 2.5 | 62.4 | 21.3 | 367.0 | 168.3 | 198.7 |
| | MCA [b] | 5 | 40.6 | 8.6 | 496.9 | 205.9 | 290.7 |
| Confirmatory Mutation Assay: 24 hours | | | | | | | |
| without activation (-S9) | Vehicle (1.5% NaCl) [a] | 10% | 94.6 | 99.6 | 35.8 | 13.2 | 22.6 |
| | Empty Liposomes | 5000 | 98.6 | 111.1 | 34.1 | 14.5 | 19.7 |
| | Free Amikacin | 5000 | 76.5 | 38.8 | 53.9 | 26.4 | 27.5 |
| | ALIS | 125 | 92.7 | 83.1 | 32.1 | 14.4 | 17.6 |
| | | 250 | 91.1 | 87.4 | 38.2 | 12.9 | 25.3 |
| | | 500 | 113.0 | 101.6 | 32.6 | 10.4 | 22.2 |
| | | 1000 | 106.6 | 85.9 | 39.3 | 19.3 | 20.0 |
| | | 2000 | 93.2 | 55.7 | 39.6 | 14.8 | 24.7 |
| | | 3000 | 126.9 | 90.3 | 25.4 | 8.6 | 16.8 |
| | | 4000 | 98.0 | 48.6 | 35.5 | 16.7 | 18.8 |
| | | 5000 | 108.4 | 44.5 | 33.6 | 16.2 | 17.4 |
| | MMS [b] | 6.5 | 42.8 | 16.4 | 510.2 | 444.4 | 65.7 |
| | MMS [b] | 6.5 | 46.7 | 18.2 | 477.1 | 434.7 | 42.4 |

## 2.6.7.8.2 マウスリンフォーマ試験（続き）

Test Article: ALIS

| Metabolic Activation | Test Article | Concentration (μg/mL) | Cloning Efficiency (%) | Relative Growth (%) | Mutant Frequency ( × $10^{-6}$) | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | Total | Small Cell Colony | Large Cell Colony |
| Confirmatory Mutation Assay: 4 hours | | | | | | | |
| with activation (+S9) | Vehicle (1.5% NaCl) [a] | 10% | 95.1 | 105.6 | 41.8 | 16.9 | 24.9 |
| | Empty Liposomes | 5000 | 96.7 | 103.0 | 39.8 | 15.6 | 24.2 |
| | Free Amikacin | 5000 | 102.2 | 134.9 | 37.2 | 13.2 | 24.0 |
| | ALIS | 125 | 97.7 | 104.3 | 30.8 | 15.0 | 15.8 |
| | | 250 | 96.7 | 107.0 | 41.4 | 13.1 | 28.3 |
| | | 500 | 102.0 | 110.0 | 19.4 | 5.8 | 13.6 |

## 2.6.7.8.2 マウスリンフォーマ試験（続き）

Test Article: ALIS

| Metabolic Activation | Test Article | Concentration (µg/mL) | Cloning Efficiency (%) | Relative Growth (%) | Mutant Frequency ( × $10^{-6}$) | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | Total | Small Cell Colony | Large Cell Colony |
| | | 1000 | 98.4 | 107.8 | 35.4 | 13.7 | 21.7 |
| | | 2000 | 86.0 | 88.6 | 30.9 | 12.4 | 18.4 |
| | | 3000 | 102.2 | 92.2 | 41.5 | 15.5 | 26.0 |
| | | 4000 | 91.7 | 99.2 | 34.1 | 13.4 | 20.7 |
| | | 5000 | 95.9 | 72.7 | 24.8 | 10.3 | 14.5 |
| | MCA [b] | 2.5 | 47.9 | 17.8 | 424.8 | 176.0 | 248.8 |
| | MCA [b] | 5 | 42.2 | 8.7 | 400.9 | 198.1 | 202.8 |

[a] Parameter values are the average of three vehicle (1.5% NaCl) cultures.
[b] Positive controls: MMS = methyl methanesulfonate; MCA = methylcholanthrene

## 2.6.7.8.3 染色体異常試験

**Title:** Chromosomal Aberrations in Chinese Hamster Ovary (CHO) Cells

**Test Article:** ALIS

**Test for Induction of:** Chromosome aberrations
**Strains:** Chinese Hamster Ovary Cells
**Metabolizing System:** Aroclor TM 1254-induced rat S9
**Vehicles:** For Test Article: Cell culture grade water. For Positive Controls: Sterile water

**No. of Independent Assays:** 2
**No. of Replicate Cultures:** 2
**No. of Cells Analyzed/Culture:** 50 or 100

**Study Number:** 7522-101
**Location in CTD:** 4.2.3.3.1-3
**Testing Facility:** [redacted]
**GLP Compliance:** Yes
**Date of Treatment:** Jan. 8 & Feb. 4, 2004

**Treatment:** Initial assay; 3 h without and with S9 metabolic activation (14.5-2140 µg/mL). Confirmatory assay; 18 h without S9 metabolic activation or 3 h with S9 activation (1.57-100 µg/mL); cells harvested approximately 20 h after initiation of treatment. Only data for concentrations assessed for polyploidy, endoreduplication, and chromosomal aberrations are presented.
**Cytotoxic Effects:** None
**Genotoxic Effects:** None

| Metabolic Activation | Test Article | Concentration (µg/ml) | % Mitotic Index Reduction [a] | Average Percentage of Cells [b] | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | Polyploidy | Endoreduplication | Chromosome Aberrations |
| Initial Assay | | | | | | |
| Without Activation (-S9) | McCoy's 5a (Negative Control) | | ND | 0 | 0 | 0 |
| | CCGW (Vehicle Control) | 100 µL/mL | 0 | 0 | 0 | 0.5 |
| | ALIS | 14.5 | 0 | 0 | 0.5 | 0.5 |
| | | 20.7 | 6 | 0 | 0.5 | 0.5 |
| | | 60.4 | ND | 0 | 0 | 0.5 |
| | | 176 | ND | 0 | 0 | 0.5 |
| | Mitomycin C (Positive Control) | 0.75 | ND | 0 | 0 | 58.0 |

## 2.6.7.8.3 染色体異常試験（続き）

Test Article: ALIS

| Metabolic Activation | Test Article | Concentration (μg/ml) | % Mitotic Index Reduction [a] | Average Percentage of Cells [b] | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | Polyploidy | Endoreduplication | Chromosome Aberrations |
| Initial Assay (cont.) | | | | | | |
| With Activation (+S9) | McCoy's 5a (Negative Control) | 100 μL/mL | ND | 0.5 | 0.5 | 0 |
| | CCGW (Vehicle Control) | 100 μL/mL | 0 | 0.5 | 0 | 2.0 |
| | ALIS | 14.5 | 0 | 0 | 0 | 0.5 |
| | | 20.7 | ND | 0 | 0.5 | 0 |
| | | 60.4 | ND | 0 | 0 | 0.5 |
| | | 176 | ND | 0.5 | 0 | 0.5 |
| | Cyclophosphamide (Positive Control) | 7.50 | ND | 0 | 0 | 52.0 |
| Confirmatory Assay | | | | | | |
| Without Activation (-S9) | McCoy's 5a (Negative Control) | | ND | 5.0 | 0 | 0 |
| | CCGW (Vehicle Control) | 100 μL/mL | 0 | 6.5 | 0 | 0.5 |
| | ALIS | 18.8 | 4 | 5.5 | 0 | 0 |
| | | 37.5 | 17 | 4.5 | 0 | 0 |
| | | 50.0 | 8 | 4.0 | 0 | 0.5 |
| | | 100 | 17 | 7.5 | 0 | 0 |
| | Mitomycin C (Positive Control) | 0.200 | ND | 3.5 | 0 | 39.0 |
| With Activation (+S9) | McCoy's 5a (Negative Control) | | ND | 6.0 | 1.5 | 0 |
| | CCGW (Vehicle Control) | 100 μL/mL | 0 | 2.5 | 0 | 0.5 |
| | ALIS | 6.25 | 14 | 5.0 | 0 | 0 |
| | | 12.5 | 17 | 3.0 | 0.5 | 1.0 |
| | | 25.0 | 9 | 4.5 | 0 | 0.5 |
| | | 50.0 | 0 | 7.0 | 0.5 | 0 |
| | Cyclophosphamide (Positive Control) | 7.5 | ND | 2.0 | 2.0 | 46.0 |

CCGW = Cell culture grade water
[a] % Mitotic index reductions as compared to vehicle control.
[b] Average % of cells with chromosome aberrations.
ND = Not determined at this concentration.

## 2.6.7.9 *In Vivo* 遺伝毒性試験

**Title:** ARIKACE™: a 3-day inhalation toxicity study in rats with a micronucleus evaluation

**Test Article:** ALIS

**Test for Induction of:** Bone-marrow micronuclei
**Species/Strain:** Rat/ Crl:CD® (SD)BR
**Age:** Approximately 9 weeks
**Cells Evaluated:** Polychromatic erythrocytes (PCEs)
**No. of Cells Analyzed/Animal:** 2000 PCEs
**Toxic/Cytotoxic Effects:** None
**Genotoxic Effects:** None

**Treatment Schedule:** Three consecutive daily doses (formulations administered up to 6 hours per day with 71 mg Amikacin/mL)
**Sampling Time:** 24 h after last dose
**Method of Administration:** inhalation
**Vehicle/Formulation:** Liposomal Suspension in 1.5% NaCl

**Study Number:** 07-6315
**Location in CTD:** 4.2.3.3.2-1
**Testing Facility:** [redacted] UK
**GLP Compliance:** Yes
**Date of Dosing:** February 22 to 24, 2008

**Evidence of Exposure:** None in this study, but exposure in Crl:CD®(SD)BR rats has been documented in repeat-dose inhalation studies with ALIS.
**No-observed-effect level:** 135 mg/kg

| Test Article | Dose (mg/kg/day) [a] | No. of Animals | Proportion of PCE (%) | Mean Incidence of MPCEs (%) |
|---|---|---|---|---|
| Control (1.5% NaCl) | 0 | 5M | 53.0 | 2.8 |
| | | 5F | 47.5 | 0.6 |
| ALIS | 15 | 5M | 46.4 | 2.0 |
| | | 5F | 39.2** | 0.8 |
| | 45 | 5M | 48.5 | 2.2 |
| | | 5F | 45.9 | 0.6 |
| | 135 | 5M | 47.2 | 1.8 |
| | | 5F | 40.7** | 2.0 |
| Cyclophosphamide | 20 | 5M | 44.6 | 54.2** |
| | | 5F | 39.2** | 19.8** |

** $p < 0.01$, appropriate nonparametric method of analysis.
[a] Based on the dose of amikacin, the active ingredient in ALIS.
MPCE = Number of micronucleated PCEs observed per 2000 PCEs examined for each animal.

## 2.6.7.10 がん原性試験

**Title:** ARIKACE™: 2-year inhalation carcinogenicity study in rats

**Test Article:** ALIS

**Species/Strain:** Rats/Crl:CD®(SD)
**Initial Age:** Approximately 6 weeks
**Date of First Dose:** 17-18 Mar 2009
**Treatment of Controls:** Control Groups received 1.5% NaCl or empty liposomes (ELC)
**Duration of Dosing:** 2 years (24 months in males and 22 months in females) (formulations administered up to 170 minutes per day with 61 to 79 mg Amikacin/mL)
**Method of Administration:** Inhalation (nose only) for up to 170 min/day for up to 24 months
**Formulation:** ALIS
**Study No.**: 09-6345
**TK Study No**.: Included in 09-6345
**Location in CTD:** 4.2.3.4.1-1
**GLP Compliance:** Yes

**Basis for High-Dose selection:** Doses selected for this study (5, 15, and 45 mg/kg/day) were based on findings and TK data from a 6-month inhalation study with ALIS in rats (Study No. 07-6308). The dose of 45 mg/kg/day was considered the MTD for chronic administration in rats.

**Special Features:** Four male and 4 females from the control groups (1.5% saline and empty liposomes), and 12 male and 12 females from each amikacin-treated group were used for TK evaluation. Sentinel rats were included to monitor for the presence of infectious agents during the study. All surviving males were terminated during Week 105. Dosing was discontinued in females given 45 mg/kg/day beginning at Week 96 due to decreased survival and terminal sacrifice for all females began during Week 98.

| Daily Dose (mg/kg) | 0 (1.5% NaCl) | | 0 (ELC) | | 5 | | 15 | | 45 | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Number of Toxicity Animals at Start of Study: | M: 60 | F: 60 | M: 60 | F: 60 | M: 60 | F: 60 | M: 60 | F: 60 | M: 60 | F: 60 |
| Number of Toxicokinetic Animals: | M: 4 | F: 4 | M: 4 | F: 4 | M: 12 | F: 12 | M: 12 | F: 12 | M: 12 | F: 12 |
| Toxicokinetics (Month 6): $AUC_{last}$ (ng•h/mL) | ♦ | ♦ | ♦ | ♦ | 1340 | 1240 | 2770 | 2760 | 8500 | 6770 |
| Noteworthy Finding: | | | | | | | | | | |
| No. of pre-term deaths: | 30 | 40 | 30 | 37 | 35 | 38 | 36 | 38 | 29 | 42 |
| No. of survivors: | 30 | 20 | 30 | 23 | 25 | 22 | 24 | 22 | 31 | 18 |
| % mortality: | 50 | 67 | 50 | 62 | 58 | 63 | 60 | 63 | 48 | 70 |
| Cause of death: | | | | | | | | | | |
| Pituitary gland neoplasm (%) | 14 (47) | 21 (53) | 8 (27) | 16 (43) | 13 (37) | 22 (58) | 14 (39) | 19 (50) | 12 (41) | 23 (55) |
| Mammary gland neoplasm (%) | 0 (0) | 8 (20) | 0 (0) | 6 (16) | 0 (0) | 7 (18) | 0 (0) | 5 (13) | 0 (0) | 6 (14) |
| Skin infection (%) | 3 (10) | 5 (13) | 0 (0) | 3 (8) | 4 (11) | 1 (3) | 1 (3) | 3 (8) | 3 (10) | 4 (10) |
| Not Known (%) | 7 (23) | 2 (5) | 11 (37) | 5 (14) | 7 (20) | 4 (11) | 10 (28) | 5 (13) | 10 (35) | 5 (12) |

## 2.6.7.10 がん原性試験（続き）

Test Article: ALIS

| Daily Dose (mg/kg) | 0 (1.5% NaCl) | | 0 (ELC) | | 5 | | 15 | | 45 | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Number of Animals at Start of Study | M: 60 | F: 60 | M: 60 | F: 60 | M: 60 | F: 60 | M: 60 | F: 60 | M: 60 | F: 60 |
| Number examined | 60 | 60 | 60 | 60 | 60 | 60 | 60 | 60 | 60 | 60 |
| Body Weight (%) [a]: | 663.6 g | 421.8 g | +4.3% | +8.4% | +0.8% | +3.7% | +1.0% | +8.1% | -3.3% | +20.8%* |
| Food Consumption (%) [b]: | 27.2 | 21.1 | +1.8% | +11.4% | 0% | +8.1% | +0.7% | +15.2%* | -1.5% | +22.3%** |
| Clinical Observations: | | | | | | | | | | |
| Moist Rales [c] | 16/4 | 8/4 | 2/2 | 2/2 | 8/2 | 4/1 | 87/17 | 4/2 | 4843/53 | 354/27 |
| Ophthalmology: | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Gross Pathology: | | | | | | | | | | |
| Number examined | 60 | 60 | 60 | 60 | 60 | 60 | 60 | 60 | 60 | 60 |
| Lungs | | | | | | | | | | |
| Discoloration of parenchyma; tan/white | 7 | 7 | 56 | 59 | 17 | 18 | 54 | 45 | 58 | 59 |
| Histopathology - Neoplastic Lesions: | | | | | | | | | | |
| Lungs | | | | | | | | | | |
| Squamous metaplasia; minimal | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 |
| Squamous cell carcinoma | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 |
| Bronchiolo/alveolar adenoma | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| Keratinizing pulmonary cyst | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| Hyperplasia of alveolar epithelium | 1 | 0 | 20 | 17 | 4 | 5 | 17 | 22 | 45 | 51 |
| Minimal | 1 | 0 | 17 | 16 | 4 | 5 | 15 | 18 | 28 | 17 |
| Slight | 0 | 0 | 3 | 1 | 0 | 0 | 2 | 4 | 17 | 29 |
| Moderate | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 5 |
| Number examined | 60 | 60 | 60 | 59 | 60 | 60 | 60 | 60 | 60 | 60 |
| Pancreas, Islet cells | | | | | | | | | | |
| Combined adenomas and carcinomas | 4 | 1 | 4 | 1 | 4 | 2 | 4 | 2 | 10 | 1 |
| Adenoma | 1 | 0 | 3 | 1 | 3 | 0 | 1 | 1 | 4 | 0 |
| Carcinoma | 3 | 1 | 1 | 0 | 1 | 2 | 3 | 1 | 6 | 1 |
| Palate | | | | | | | | | | |
| Squamous cell carcinoma | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| Histopathology - Non-neoplastic Lesions: | | | | | | | | | | |
| Number examined | 60 | 60 | 60 | 60 | 60 | 60 | 58 | 60 | 60 | 60 |
| Nasal cavity | | | | | | | | | | |
| Olfactory mucosal epithelium, degenerative changes | 1 | 2 | 1 | 1 | 35 | 31 | 56 | 54 | 59 | 58 |
| Minimal | 0 | 1 | 0 | 1 | 35 | 28 | 22 | 32 | 3 | 13 |
| Slight | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 3 | 31 | 22 | 33 | 33 |
| Moderate | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 0 | 23 | 11 |
| Marked | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| Olfactory glands, cystic dilation | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 3 | 5 | 15 | 39 | 40 |
| Minimal | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 3 | 5 | 14 | 27 | 32 |
| Slight | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 12 | 8 |

## 2.6.7.10 がん原性試験（続き）

Test Article: ALIS

| Daily Dose (mg/kg) | 0 (1.5% NaCl) | | 0 (ELC) | | 5 | | 15 | | 45 | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Number of Animals at Start of Study | M: 60 | F: 60 | M: 60 | F: 60 | M: 60 | F: 60 | M: 60 | F: 60 | M: 60 | F: 60 |
| Respiratory mucosal epithelium degenerative changes | 0 | 0 | 0 | 0 | 29 | 20 | 52 | 48 | 59 | 56 |
| Minimal | 0 | 0 | 0 | 0 | 28 | 18 | 27 | 32 | 17 | 21 |
| Slight | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 2 | 25 | 16 | 41 | 35 |
| Moderate | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| Number examined | 58 | 60 | 60 | 60 | 60 | 59 | 59 | 59 | 60 | 60 |
| Larynx | | | | | | | | | | |
| Squamous metaplasia; cuboidal/ columnar epithelium | 2 | 5 | 2 | 2 | 22 | 16 | 51 | 44 | 57 | 55 |
| Minimal | 2 | 3 | 2 | 2 | 22 | 14 | 37 | 26 | 14 | 13 |
| Slight | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 2 | 14 | 18 | 41 | 41 |
| Moderate | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 1 |
| Hyperplasia; Squamous epithelium | 1 | 1 | 1 | 2 | 5 | 9 | 35 | 36 | 45 | 41 |
| Minimal | 1 | 1 | 1 | 2 | 4 | 6 | 22 | 22 | 22 | 21 |
| Slight | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 3 | 13 | 14 | 23 | 20 |
| Cuboidal/columnar epithelium | 0 | 0 | 0 | 0 | 4 | 2 | 15 | 4 | 17 | 2 |
| Minimal | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 2 | 12 | 4 | 12 | 2 |
| Slight | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 3 | 0 | 5 | 0 |
| Erosions/ulcers, mucosal epithelium | 1 | 2 | 0 | 1 | 1 | 0 | 6 | 1 | 6 | 5 |
| Minimal | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Slight | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 4 | 0 | 3 | 4 |
| Moderate | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 2 | 0 |
| Inflammation, mucosa | 0 | 4 | 0 | 2 | 5 | 2 | 16 | 12 | 28 | 31 |
| Moderate | 0 | 4 | 0 | 2 | 5 | 2 | 16 | 12 | 27 | 31 |
| Marked | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| Number examined | 60 | 60 | 60 | 60 | 60 | 60 | 60 | 60 | 60 | 60 |
| Lungs | | | | | | | | | | |
| Diffuse foamy alveolar macrophages | 0 | 0 | 11 | 16 | 55 | 58 | 54 | 60 | 57 | 56 |
| Minimal | 0 | 0 | 7 | 11 | 42 | 47 | 14 | 21 | 3 | 12 |
| Slight | 0 | 0 | 3 | 3 | 12 | 11 | 31 | 36 | 24 | 21 |
| Moderate | 0 | 0 | 1 | 2 | 1 | 0 | 9 | 3 | 30 | 23 |
| Focal/multifocal foamy alveolar macrophages | 8 | 7 | 58 | 57 | 19 | 25 | 53 | 49 | 59 | 60 |
| Minimal | 8 | 7 | 3 | 4 | 16 | 19 | 18 | 18 | 1 | 1 |
| Slight | 0 | 0 | 24 | 37 | 3 | 6 | 30 | 24 | 13 | 12 |
| Moderate | 0 | 0 | 31 | 16 | 0 | 0 | 5 | 7 | 37 | 40 |
| Marked | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 8 | 7 |
| Interstitial/alveolar inflammation | 9 | 7 | 56 | 52 | 16 | 19 | 47 | 46 | 58 | 59 |
| Minimal | 9 | 7 | 17 | 20 | 15 | 17 | 27 | 31 | 3 | 9 |
| Slight | 0 | 0 | 39 | 31 | 1 | 2 | 20 | 14 | 35 | 38 |

## 2.6.7.10 がん原性試験（続き）

Test Article: ALIS

| Daily Dose (mg/kg) | 0 (1.5% NaCl) | | 0 (ELC) | | 5 | | 15 | | 45 | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Number of Animals at Start of Study | M: 60 | F: 60 | M: 60 | F: 60 | M: 60 | F: 60 | M: 60 | F: 60 | M: 60 | F: 60 |
| Moderate | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 20 | 12 |
| Number examined | 57 | 56 | 60 | 59 | 57 | 57 | 57 | 59 | 60 | 60 |
| Mediastinal lymph nodes | | | | | | | | | | |
| Foamy macrophages | 5 | 2 | 21 | 7 | 8 | 7 | 15 | 8 | 30 | 25 |
| Minimal | 5 | 2 | 20 | 4 | 8 | 6 | 11 | 6 | 17 | 13 |
| Slight | 0 | 0 | 1 | 3 | 0 | 1 | 4 | 2 | 13 | 12 |
| Number examined | 35 | 32 | 28 | 30 | 30 | 40 | 29 | 29 | 32 | 32 |
| Bronchial lymph nodes | | | | | | | | | | |
| Foamy macrophages | 5 | 0 | 13 | 4 | 6 | 3 | 12 | 8 | 18 | 20 |
| Minimal | 5 | 0 | 8 | 4 | 6 | 2 | 10 | 6 | 8 | 9 |
| Slight | 0 | 0 | 5 | 0 | 0 | 1 | 2 | 2 | 10 | 11 |

* = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$.

[a] Towards the end of the dosing period (Week 102 for males and Week 98 for females), group means for the 1.5% NaCl control group are shown. For other groups (including ELC), percent differences from the 1.5% NaCl controls are shown. Statistical significance is based on the actual data (not on percent differences).

[b] Towards the end of the dosing period (Week 101 for males and Week 97 for females), group means for the 1.5% NaCl control group are shown. For other groups (including ELC), percent differences from the 1.5% NaCl controls are shown. Statistical significance is based on the actual data (not on percent differences).

[c] The total number of occurrences of moist rales/the total number of animals in which moist rales were observed.

### 2.6.7.11　生殖発生毒性試験：重要な試験以外の試験

ALIS 吸入投与による生殖発生毒性試験は実施しなかった。

### 2.6.7.12　生殖発生毒性試験：受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験

ALIS 吸入投与による生殖発生毒性試験は実施しなかった。

### 2.6.7.13　生殖発生毒性試験：胚・胎児発生に関する試験

ALIS 吸入投与による生殖発生毒性試験は実施しなかった。

### 2.6.7.14　生殖発生毒性試験：出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験

ALIS 吸入投与による生殖発生毒性試験は実施しなかった。

## 2.6.7.15 新生児を用いた試験

### 2.6.7.15.1 新生児を用いた試験：重要な試験以外の試験

Test Article: ALIS

| Study Species/Strain | Method of Administration (Vehicle/ Formulation) | Duration of Dosing | Doses (mg/kg) | Gender and No. per Group | MTD or NOAEL (mg/kg) | Noteworthy Findings | Study Number |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Preliminary Toxicity Study in the Juvenile rat / Crl:CD® (SD)BR | Inhalation/ALIS (Liposomal Suspension in 1.5% NaCl)<br><br>Formulations were administered up to 124 minutes per day with 62.1 mg Amikacin/mL) | 28 days [Postnatal day (PND) 10 to PND 37] | 0 (1.5% NaCl), 10, 30, 60 (ALIS) | 5M/5F (1.5% NaCl and ALIS groups) | Maximum Tolerated Dose (MTD): 60 | All ALIS doses: Well tolerated. Dose-related increase in amikacin lung levels. No test-article related effects on body weight, food consumption, or macroscopic evaluations.<br>60 mg/kg/day: alopecia (limited to limbs). | 14-6480 |

## 2.6.7.15.2 新生児を用いた試験：重要な試験

**Title:** Arikace™: 28-day inhalation (nose only) toxicity study in neonatal/juvenile rats followed by a 28-day recovery period

**Test Article:** ALIS

**Species/Strain:** Sprague-Dawley CD® rats
**Initial Age:** postnatal day (PND) 10
**Date of First Dose:** 14 July 2015

**Duration of Dosing:** 28 days (Postnatal Day (PND) 10 through PND 37) (formulations administered up to 240 minutes per day with 70 mg Amikacin/mL)
**Duration of Postdose:** 28 days [PND 38 through PND 67]
**Method of Administration:** Inhalation
**Vehicle/Formulation:** Liposomal Suspension in 1.5% NaCl

**Study No.:** 14-6002
**Location in CTD:** 4.2.3.5.4-2
**Testing Facility:** [redacted]
**GLP Compliance:** Yes

**Special Features:** Juvenile Toxicity Study.
**No-Observed-Adverse-Effect Level:** The No-Observed-Adverse-Effect Level (NOAEL) is considered 10 mg/kg/day Arikace™ based on the laryngeal findings; the NOAEL for lung changes is 90 mg/kg/day.

| Daily Target Dose (mg/kg/day) | | 0 (Control) [a] | | 0 [a] | | 10 | | 30 | | 90 | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Achieved Delivered Dose (mg/kg/day) | | 0 | | 0 | | 9.8 | | 29.1 | | 86.8 | |
| Number of Animals | Main | M: 10 | F: 10 | M: 10 | F: 10 | M: 10 | F: 10 | M: 10 | F: 10 | M: 10 | F: 10 |
| | Recovery | M: 10 | F: 10 | M: 10 | F: 10 | M: 10 | F: 10 | M: 10 | F: 10 | M: 10 | F: 10 |
| Toxicokinetics | | | | | | | | | | | |
| Serum | | | | | | | | | | | |
| AUC (µg.h/mL) | | | | | | | | | | | |
| Day 10 | | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ | NC | NC | 4.15 | 4.03 | 7.03 | 8.82 |
| Day 37 | | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ | 0.420 | 1.09 | 2.85 | 3.22 | 8.59 | 7.64 |
| $C_{max}$ (µg/mL) | | | | | | | | | | | |
| Day 10 | | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ | 0.167 | 0.168 | 1.34 | 1.57 | 4.09 | 6.99 |
| Day 37 | | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ | 0.617 | 0.543 | 1.47 | 1.8 | 4.74 | 5.56 |
| Urine Concentration (µg/mL) | | | | | | | | | | | |
| PND 36 | | | | | | | | | | | |
| 0 – 4 hours | | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ | 29.7 | 17.2 | 62.0 | 73.4 | 311 | 240 |
| 4 – 16 hours | | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ | 8.22 | 2.13 | 3.88 | 21.6 | 59.0 | 17.8 |
| PND 66 | | | | | | | | | | | |
| 0 – 4 hours | | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ | 0.494 | 0.299 |
| 4 – 16 hours | | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ | 0.220 | 0.297 | 0.453 |
| Lung Amikacin (µg/g) | | | | | | | | | | | |
| Day 38 | | BLQ | BLQ | BLQ | BLQ | 151 | 186 | 442 | 317 | 1250 | 1330 |

## 2.6.7.15.2 新生児を用いた試験：重要な試験（続き）

Test Article: ALIS

| Daily Target Dose (mg/kg/day) | | 0 (Control) [a] | | 0 [a] | | 10 | | 30 | | 90 | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Achieved Delivered Dose (mg/kg/day) | | 0 | | 0 | | 9.8 | | 29.1 | | 86.8 | |
| Number of Animals | Main | M: 10 | F: 10 | M: 10 | F: 10 | M: 10 | F: 10 | M: 10 | F: 10 | M: 10 | F: 10 |
| | Recovery | M: 10 | F: 10 | M: 10 | F: 10 | M: 10 | F: 10 | M: 10 | F: 10 | M: 10 | F: 10 |
| Noteworthy Findings | | | | | | | | | | | |
| Died or Sacrificed Moribund: | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1[b] | 0 | 0 | 1[b],1[c] | 1[b] |
| Body Weight (%) [d]: | | 125.0 g | 107.6 g | +4.3 | +2.3 | +6.0 | +6.4 | +5.6 | +5.2 | +7.4 | +9.0** |
| Food Consumption (%) [d]: | | 17.3 g/day | 13.1 g/day | +2.3 | +3.8 | +2.3 | +6.9 | +1.2 | +7.6 | +8.1 | +10.7* |
| Clinical Observations: | | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Ophthalmoscopy: | | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Preputial separation | | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Vaginal opening | | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Motor Activity: | | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Open Field: | | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Hematology: | | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Serum Chemistry: | | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Coagulation: | | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Femur Lengths (mm) | | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Organ Weights: | | | | | | | | | | | |
| Lungs (vs Group 1) | Absolute Weight (%) [d] | 0.7192 g | 0.7216 g | +10 | +10* | +13* | +5 | +20** | +8 | +28** | +21** |
| | Organ to Body Weight Ratio (%) | 0.672 | 0.686 | 0.661 | 0.751* | 0.687 | 0.687 | 0.671 | 0.758* | 0.731* | 0.818** |
| | Organ to Brain Weight Ratio (%) | 42.8 | 42.9 | 45.9 | 47.6* | 47.2 | 45.3 | 49.3** | 47.3* | 53.8** | 54.2** |

## 2.6.7.15.2 新生児を用いた試験：重要な試験（続き）

Test Article: ALIS

| Daily Target Dose (mg/kg/day) | | 0 (Control) [a] | | 0 [a] | | 10 | | 30 | | 90 | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Achieved Delivered Dose (mg/kg/day) | | 0 | | 0 | | 9.8 | | 29.1 | | 86.8 | |
| Number of Animals | Main | M: 10 | F: 10 | M: 10 | F: 10 | M: 10 | F: 10 | M: 10 | F: 10 | M: 10 | F: 10 |
| | Recovery | M: 10 | F: 10 | M: 10 | F: 10 | M: 10 | F: 10 | M: 10 | F: 10 | M: 10 | F: 10 |
| Macroscopic Findings: | | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Microscopic Findings: | | | | | | | | | | | |
| Number Examined | | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 9 |
| Lungs | | | | | | | | | | | |
| Alveolar Macrophages, Foamy Cytoplasm | | | | | | | | | | | |
| Minimal | | 0 | 1 | 1 | 1 | 9 | 8 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Slight | | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 2 | 9 | 9 | 2 | 2 |
| Moderate | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 8 | 6 |
| Marked | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| Alveolar Macrophages, Foamy Cytoplasm. | | | | | | | | | | | |
| Intracytoplasmic Basophilic Granules | | | | | | | | | | | |
| Minimal | | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 3 | 6 | 7 | 9 | 8 |
| Larynx | | | | | | | | | | | |
| Erosion/Ulcer, Respiratory Epithelium | | | | | | | | | | | |
| Minimal | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 |
| Slight | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 2 |
| Moderate | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 2 |
| Marked | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| Inflammation, Respiratory Epithelium | | | | | | | | | | | |
| Slight | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 3 |
| Moderate | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 3 |
| Hyperplasia, Respiratory Epithelium | | | | | | | | | | | |
| Minimal | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 5 | 3 | 3 | 4 |
| Slight | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 4 |
| Hyperplasia, Squamous Epithelium | | | | | | | | | | | |
| Minimal | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 |
| Slight | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 |
| Metaplasia, Squamous Cell, Respiratory Epithelium | | | | | | | | | | | |
| Minimal | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 4 | 0 |
| Slight | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| Inflammatory Cell Infiltrates, Prominent | | | | | | | | | | | |
| Slight | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 2 | 2 |
| Degeneration, Respiratory Epithelium | | | | | | | | | | | |
| Slight | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| Noteworthy Findings- Recovery | | | | | | | | | | | |
| Died or Sacrificed Moribund: | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Body Weight (%) [d]: | | - | 188.7 g | - | +5.2 | - | +9.4 | - | +10.7* | - | +9.9* |

## 2.6.7.15.2 新生児を用いた試験：重要な試験（続き）

Test Article: ALIS

| Daily Target Dose (mg/kg/day) | | 0 (Control) [a] | | 0 [a] | | 10 | | 30 | | 90 | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Achieved Delivered Dose (mg/kg/day) | | 0 | | 0 | | 9.8 | | 29.1 | | 86.8 | |
| Number of Animals | Main | M: 10 | F: 10 | M: 10 | F: 10 | M: 10 | F: 10 | M: 10 | F: 10 | M: 10 | F: 10 |
| | Recovery | M: 10 | F: 10 | M: 10 | F: 10 | M: 10 | F: 10 | M: 10 | F: 10 | M: 10 | F: 10 |
| Food Consumption: | | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Organ Weights: | | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Lungs (vs Group 1) | | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Microscopic Findings: | | | | | | | | | | | |
| Number Examined | | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 9 | 10 | 10 | 8 | 10 |
| Lungs | | | | | | | | | | | |
| Alveolar Macrophages, Foamy Cytoplasm | | | | | | | | | | | |
| Minimal | | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 5 | 2 | 5 | 4 |
| Alveolar Macrophages, Foamy Cytoplasm. | | | | | | | | | | | |
| Intracytoplasmic Basophilic Granules | | | | | | | | | | | |
| Minimal | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 |

- = No noteworthy findings, BLQ = Below limit of quantification; NC = not calculable

* = $p<0.05$ vs Group 1; ** = $p<0.01$ vs Group 1

[a] Group 1 animals were administered 1.5% sodium chloride and Group 2 animals were administered empty liposomes.

[b] Not test article related, animal was found dead during treatment and the cause of death was considered to be accidental asphyxiation.

[c] Not test article related, animal was electively euthanized on PND 21 (misidentified as a female).

[d] At end of dosing/recovery period. For controls, group means (grams) are shown. For treated groups, percent differences from Group 1 controls are shown. Statistical significance is based on actual data (not on the percent differences).

### 2.6.7.16　局所刺激性試験

ALIS の、肺と上気道に対する局所刺激性については、マウス、ラット及びイヌの反復吸入投与毒性試験にて評価した。

## 2.6.7.17 その他の毒性試験

### 2.6.7.17.1 免疫毒性試験

Test Article: Amikacin sulfate

| Study Species/Strain | Method of Administration | Duration of Dosing | Concentrations or Doses | Gender and No. per Group | Noteworthy Findings | GLP Compliance | Study Number |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Alveolar Macrophage Function Rat/ Crl:CD® (SD)BR | Inhalation (formulations administered up to 4 hours per day 19.9 mg Amikacin/mL) | 2 weeks with a 1-month recovery period | 0 (no treatment); 0 (1.5% NaCl); 0 (ELC); ALIS (19.9 mg/mL amikacin); Free Amikacin (FA, 20.1 mg/mL) | 6 (0; no treatment; 12 (all other groups);Females | In both amikacin groups, normal cellular function of alveolar macrophages was demonstrated based on the following: concentrations of nitric oxide (nitrates) and TNF-α in bronchoalveolar lung fluid (BALF) and phagocytic function as measured by the uptake of opsonized fluorescent microspheres were comparable to controls on Days 15 and 43. In addition, macrophages responded normally when stimulated by endotoxins (i.e., appropriate levels of nitrates and TNF-α were produced). Lung levels of amikacin were higher in the ALIS group compared to the FA group. | No | AMIK-BRD-2005-19-TOX (report no.) |

## 2.6.7.17.1 免疫毒性試験（続き）

Test Article: ALIS

| Study Species/Strain | Method of Administration | Duration of Dosing | Concentrations or Doses | Gender and No. per Group | Noteworthy Findings | GLP Compliance | Study Number |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Alveolar Macrophage Function Rat/ Crl:CD® (SD)BR | Inhalation (formulations administered up to 96-154 minutes per day with 70 mg Amikacin/mL) | 6 months (1-month on drug, 1-month off drug paradigm) | 0 (1.5% NaCl); 90 mg/kg (ALIS) | 36M, 36F (1.5% NaCl); 54M, 54F (ALIS) After each 1-month dosing period and each 30-day recovery period, 6M, 6F from each group were evaluated | ALIS was well tolerated during the study and there were no drug-related in-life changes. Diffuse infiltration of foamy alveolar macrophages evident following each 1-month dosing period was substantively reduced following each 1-month recovery period. As in the 2-week study described above, alveolar macrophages from ALIS-treated rats showed normal cellular function: concentrations of nitric oxide (nitrates) and TNF-α in BALF and phagocytic function as measured by the uptake of opsonized fluorescent microspheres were comparable to controls. In addition, macrophages responded normally when stimulated *ex vivo* by lipopolysaccharide and exhibited normal yeast killing ability. Mean lung concentrations of amikacin in the ALIS groups ranged from ca. 3 to 4.5 mg/g following each dosing cycle and decreased ca. 10-fold following each recovery period (ie, 0.37 to 0.41 mg/g); the residual level remained bactericidal. In conclusion, ALIS (or FA) did not impair the normal cellular functions of alveolar macrophages. | No | AMIK-BIO-2009-16-MAC, Revision 1 (Report No.) |

## 2.6.7.17.2 不純物の毒性試験

Test Article: Amikacin sulfate

| Study Species/Strain | Method of Administration | Duration of Dosing | Concentrations or Doses | Gender and No. per Group | Noteworthy Findings | GLP Compliance | Study Number |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Ames Reverse Mutation Assay | *In vitro* | ~72 h | ≤ 5000 µg amikacin sulfate/plate (+/- S9) | NA | Two lots of amikacin sulfate were evaluated for mutagenic potential in *S typhimurium* strains TA1535, TA1537, TA98 and TA100 and *E coli* strain *WP2*uvrA. Lot 081001-X contained Impurity H and an unknown impurity at RRT ~0.45 (MW 424) at ~0.6% each and Lot 990167 0015 9 contained an unknown impurity at RRT ~0.43 (MW 586) at ~0.36%. Cytotoxicity was observed at ≥ 50 µg/plate. No evidence of mutagenicity was seen at any concentration for either lot of amikacin sulfate. | Yes | HUD0381 |
| Rat/CD®IGS Crl:CD(SD) | Inhalation | 14 days | 0 (group 1), 90 mg/kg/day ALIS (groups 2-4) ALIS groups contained (0.09%), (1.0%), and (3.6%) 不純物X* | 18M, 18F (1.5% NaCl); 16M, 16F (ALIS with 0.04 or 0.48 mg/kg/day 不純物X* groups); 21M, 21F (ALIS with 1.7 mg/kg/day 不純物X*) | ALIS with various levels of 不純物X*was well tolerated Histopathology findings were observed in the larynx, nasal turbinates, lungs and tracheobronchial lymph node. The changes were not considered related to the level of 不純物X* | Yes | TQ72SR |