
リドカイン/プロピトカイン エムラクリーム

C T D

第 2 部（モジュール 2）：
C T D の概要（サマリー）

2. 4 非臨床試験の概括評価

佐藤製薬株式会社

略号一覧表

略号	英語	日本語 (省略されていない名称・定義)
ALT	Alanine aminotransferase	アラニン・アミノトランスフェラーゼ
AUC	Area under the blood concentration-time curve	血漿中濃度 - 時間曲線下面積
BLQ	Below the lower limits of quantification	定量下限値未満
CHO	Chinese hamster ovary	チャイニーズハムスター卵巣
CTD	Common Technical Document	コモン・テクニカル・ドキュメント
C _{max}	Maximum drug concentration	最高血漿中濃度
CP	Cyclophosphamide	シクロホスファミド
CYP	Cytochrome P450	チトクローム P450
DMSO	Dimethyl sulfoxide	ジメチルスルホキシド
DRL	Discrete reinforcement of low rates of responding	低反応率分化強化学習試験
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
GX	Glycinexylidide	リドカインの N-脱エチル化代謝物
LD ₅₀	Lethal dose 50%	50%致死用量
MEGX	Monoethylglycinexylidide	リドカインの N-脱エチル化代謝物
MMS	Methyl methanesulfonate	メチルメタンスルホネート
MNCE	Micronucleated normochromatic erythrocytes	小核を有する正染性赤血球
MPCE	Micronucleated polychromatic erythrocyte	小核を有する多染性赤血球
NA	Not applicable	該当せず
NC	Not calculated	算出せず
NCE	Normochromatic erythrocytes	正染性赤血球
ND	Not determined	測定せず
PCE	Polychromatic erythrocyte	多染性赤血球
S9 mix	Mixture of S9 fraction	薬物代謝酵素誘導剤で処理した肝臓を 9000×g で遠心分離した上清
SCE	Sister chromatid exchange	姉妹染色分体交換
SKA-01	-	有効成分であるリドカインとプロピトカインの等量共融混合物
TK	Toxicokinetics	トキシコキネティクス
T _{max}	Maximum drug concentration time	最高血漿中濃度到達時間

単位換算

一部 mol 表記の報告書については、以下の換算表に従って、グラム表記換算値を算出し、併記した。

単位換算表

	報告書記載値 の単位	換算後 参考値 の単位	報告書記載値に乘じる値			
			リドカイン	プロピトカイン	2,6-xylidine	<i>o</i> -toluidine
投与量	mol/kg	g/kg	234.3	220.3	121.2	107.2
血中濃度	mol/mL	g/mL	234.3	220.3	121.2	107.2
	mol/L	g/mL	0.2343	0.2203	0.1212	0.1072

mol 単位から重量単位に変換する場合には、mol 単位の数値に表内の定数を乗じる。

また、5%SKA-01 クリームの比重は 1.05 であるため、試験報告書にて mL 表記されているものについて、g 表記とした箇所がある。

塩基/塩酸塩投与量換算

塩酸塩で行った試験については、以下の換算表に従って塩基（フリー体）換算量を計算し、併記した。

投与量換算表

	報告書記載値（塩酸塩）に乘ずる値
リドカイン塩酸塩→リドカイン（塩基）	0.8113
プロピトカイン塩酸塩→プロピトカイン（塩基）	0.8600

塩酸塩化合物から塩基化合物（フリー体）に変換する場合には、塩酸塩としての数値に表内の定数を乗じる。

有効成分含量の記載

本 CTD において SKA-01 の濃度（「5%」等）は、有効成分含量の重量の合計値で記載した。

目 次

2.4.1 非臨床試験計画概略	1
2.4.1.1 背景及び非臨床試験パッケージの方針	1
2.4.1.2 薬理試験	4
2.4.1.3 薬物動態試験	5
2.4.1.4 毒性試験	6
2.4.2 薬理試験	8
2.4.2.1 効力を裏付ける試験	8
2.4.2.2 副次的薬理試験	8
2.4.2.3 安全性薬理試験	9
2.4.3 薬物動態試験	11
2.4.3.1 吸収	11
2.4.3.2 分布	12
2.4.3.3 代謝	13
2.4.3.4 排泄	16
2.4.3.5 薬物動態学的薬物相互作用	16
2.4.4 毒性試験	17
2.4.4.1 単回投与毒性試験	17
2.4.4.2 反復投与毒性試験	19
2.4.4.3 遺伝毒性試験	20
2.4.4.4 がん原性試験	20
2.4.4.5 生殖発生毒性試験	21
2.4.4.6 局所刺激性試験	22
2.4.4.7 その他の毒性試験	23
2.4.5 総括及び結論	25
2.4.5.1 薬理試験	25
2.4.5.2 薬物動態試験	25
2.4.5.3 毒性試験	25
2.4.5.4 総合評価	26
2.4.5.5 結論	37
2.4.6 参考文献	38

2.4 非臨床試験の概括評価

2.4.1 非臨床試験計画概略

2.4.1.1 背景及び非臨床試験パッケージの方針

2.4.1.1.1 背景

SKA-01 クリームの有効成分はリドカインのフリー体（以下、塩基）とプロピトカインであるが、後者は本邦では新有効成分に該当する。リドカインとプロピトカインにはいずれも塩酸塩と塩基があり、本概要文にも両化合物を使用しており、塩酸塩については「リドカイン塩酸塩」、「プロピトカイン塩酸塩」と表記し、塩基については単に「リドカイン」、「プロピトカイン」と表記した。

本剤の有効成分であるリドカイン及びプロピトカインは代表的なアミド系局所麻酔薬で、1960年代より臨床での使用経験も豊富であり、ヒトにおけるこれらの薬理学的特性については多くの情報がある。また本申請に係るリドカイン/プロピトカイン共融混合物（SKA-01 クリーム）も EMLA[®] クリームとして 1984 年以来、世界約 70 ヶ国で広く使用されている。

SKA-01 クリームの非臨床試験においては、原則として本邦における臨床試験開始前に外国において実施されていた試験成績によったが、プロピトカインとプロピトカイン塩酸塩の動態（吸収）の類似性についての試験（ラット及びイヌ皮下投与）及び不純物・分解物の毒性試験を追加実施した。

2.4.1.1.2 プロピトカインについての評価

プロピトカインは、本邦で新有効成分であるが、プロピトカイン塩酸塩については既承認である。プロピトカイン塩酸塩とプロピトカインの薬物動態（吸収）について検討した結果、ラット及びイヌの皮下投与において、塩酸塩と塩基の間で C_{max} に有意差がなく、吸収（投与部位から全身循環への移行）に大きな差異はないと判断された（2.4.3.1）。

また吸収後の両化合物のイオン化状態（プロピトカイン⁺）は同じであると考えられること（2.4.1.1.3）から、プロピトカインについての一部の非臨床試験については改めて実施する必要がないと判断し、厚生労働省審査管理課長通知（薬食審発第 0331009 号）も考慮して、薬理試験、薬物動態試験（分布、代謝、排泄）、毒性試験の一部については実施しなかったが、参考資料・参考文献から考察し記載した。

なおリドカインについては、外用剤として既承認成分であり、外国で実施された過去の試験成績及び参考資料について記載した。

2.4.1.1.3 塩酸塩の試験成績による評価の妥当性

SKA-01 クリームの pH は ■■■～■■■ であるため、リドカインとプロピトカインは塩基型で存在する（共に $pK_a7.9$ ）。これらの塩基型は脂肪親和性で皮膚を容易に浸透するが、真皮または血漿中（ $pH7.4$ ）でただちに約 70 %がイオン化してリドカイン⁺及びプロピトカイン⁺に変化する¹⁾。

塩酸塩の場合には、溶液には既にリドカイン⁺/プロピトカイン⁺が含まれているが、投与後に

体内において経皮吸収後と同様に約 70 %がイオン化する。つまり塩基及び塩酸塩のいずれを投与した場合でも、体内でのリドカイン/プロピトカインの形状は常に同じ、すなわち主にリドカイン⁺/プロピトカイン⁺である。(図 2.4.1.1.3-1)

従って、塗布後にリドカイン/プロピトカインが皮膚に浸透しても、あるいはリドカイン塩酸塩/プロピトカイン塩酸塩が皮下または静脈内注射されても、リドカイン/プロピトカインの薬理的/毒性学的な活性型は同じ(リドカイン⁺/プロピトカイン⁺)であり、また吸収後の分布・代謝・排泄等の体内動態も同様の経過を示すものと考えられる。

リドカイン/プロピトカインは難水溶性であり、十分な曝露量を担保するだけの投与が困難であることから、一定の曝露量・期間が必要な試験については塩酸塩によるデータによる評価が妥当かつ合理的であると判断し、過去に海外で行われた塩酸塩による試験成績をもって評価した。

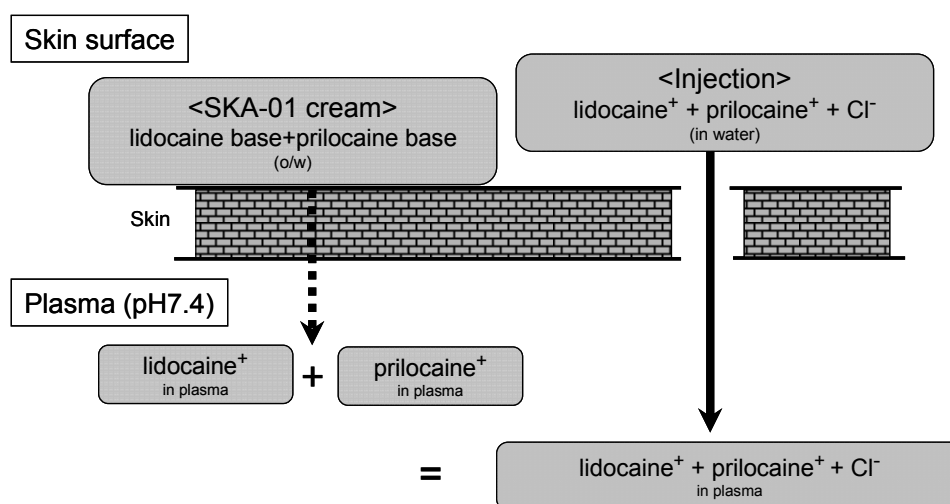


図 2.4.1.1.3-1 塩酸塩と塩基の体内吸収後の関係

2.4.1.1.4 プロピトカイン塩酸塩と塩基の吸収類似性の比較

既承認であるプロピトカイン塩酸塩と本申請に係るプロピトカインの吸収類似性を示す試験を皮下投与により実施した(2.4.3.1)。

本検討における投与経路としては、SKA-01 の臨床投与経路である経皮投与が当然に考えられる。しかし、プロピトカイン塩酸塩は、固体としても溶液としても、有意な程度の皮膚浸透が得られないので、プロピトカイン塩酸塩の皮膚塗布を用いて妥当な吸収類似性試験を実施することは困難と考えられた。

そこで投与経路として、外用剤の毒性試験において経皮投与の代替経路として一般的に選択される皮下投与を選択し、ラット及びイヌにおいて局所から全身への移行性(吸収)を検討した。

2.4.1.1.5 安全性薬理試験について

本剤の経皮投与により予想される最高血中濃度は既知の毒性作用濃度より十分に低いと考えら

れること、リドカイン、プロピトカインともに薬物動態が類似する塩酸塩について薬理作用に関する十分な情報があり、臨床での過剰投与の際に薬理作用により起こりうる副作用は十分に明らかにされていることを考慮すると、平成 13 年 6 月 21 日 医薬審発第 902 号「安全性薬理試験ガイドライン」「2.9 試験が不必要な条件」に該当する局所適用剤でありかつ追加的除外例に該当する新規塩化合物であると考えられることから、改めて動物における安全性薬理試験を実施する必要はないと判断した。

従って「安全性薬理試験ガイドライン」（平成 13 年 6 月 21 日 医薬審発第 902 号）に準拠した非臨床安全性薬理試験は特に実施していないが、毒性試験結果に基づいて安全性薬理に関連する成績を検証した。

2.4.1.2 薬理試験

SKA-01 の効力を裏付ける試験として、モルモット背部の正常皮膚及び角質層剥離皮膚において局所麻酔作用を検討した。SKA-01 の安全性薬理試験は、安全性薬理試験ガイドライン（医薬審発第 902 号、平成 13 年 6 月 21 日）の「2.9 試験が不必要な条件」に基づき、全身曝露もしくは他の器官、組織への分布が低いことが認められている局所適用剤として、実施しなかったが、単回及び反復投与毒性試験成績に基づき検討した。

プロピトカインの薬理試験に関しては、プロピトカインはプロピトカイン塩酸塩と吸収（投与部位から全身循環への移行）に大きな差異はないことが示されており（2.4.3.1.1）、また吸収後の両化合物のイオン化状態は同じであると考えられる（2.4.1.1.3）ことから、厚労省審査管理課長通知（薬食審査発第 0331009 号、平成 17 年 3 月 31 日）を考慮し、効力を裏付ける試験、副次的薬理・安全性薬理に関する資料を省略した。

実施した薬理試験を表 2.4.1.2-1 に示す。

なおリドカイン塩基については、外用剤として既承認成分であることから、新たな試験は実施しなかったが、外国で実施された過去の試験成績及び参考資料について記載した。

表 2.4.1.2-1 薬理試験一覧

試験の種類	動物種	投与経路 / 投与期間	投与物質
<u>効力を裏付ける試験</u>			
正常皮膚における経皮局所麻酔作用	モルモット	経皮 / 単回	SKA-01（乳剤） リドカイン（乳剤） プロピトカイン（乳剤）
角質層剥離皮膚における経皮局所麻酔作用	モルモット	経皮 / 単回	SKA-01（乳剤） リドカイン（乳剤） プロピトカイン（乳剤）
<u>安全性薬理試験（毒性試験）</u>			
中枢神経系に及ぼす影響	ウサギ	経皮 / 単回	SKA-01（クリーム）
呼吸器系に及ぼす影響	ミニブタ	経皮 / 単回	SKA-01（クリーム）
心血管系に及ぼす影響	イヌ	直腸内 / 2 週間反復 ^{a)} 及び 3 週間反復	SKA-01（クリーム） SKA-01（クリーム）劣化製剤 ^{a)}
経口投与したリドカイン塩酸塩或いはプロピトカイン塩酸塩が及ぼす影響	ラット	経口 / 単回	リドカイン塩酸塩 プロピトカイン塩酸塩（参考資料）

a: 不純物として

類縁物質 A、類縁物質 B、類縁物質 C[※]

及び未同定物質を含む。

2.4.1.3 薬物動態試験

既承認であるプロピトカイン塩酸塩とプロピトカインの吸収類似性に関する検討をラット及びイヌで行った。SKA-01 の経皮投与部位からの吸収試験として、単回投与後の血中濃度推移に関する検討をミニプタで行い、反復直腸内投与後の血中濃度推移に関する検討をイヌで行った。SKA-01 の皮内分布は、正常皮膚モルモット及び角質層剥離モルモットを用いて評価した。また、ラットに ^{14}C -リドカインを単回静脈内投与したときの組織内分布試験を行った。尿糞中排泄については、 ^{14}C -リドカインを単回静脈内投与したときの検討をラットで行った。なお、代謝試験、胆汁中及び乳汁中への排泄試験、薬物動態学的薬物相互作用試験は実施していない。

実施した薬物動態試験を表 2.4.1.3-1 に示す。

表 2.4.1.3-1 薬物動態試験一覧

試験の種類	動物種	投与経路 / 投与期間	投与物質
<u>吸収</u>			
単回投与時の血中濃度	ラット	皮下 / 単回	プロピトカイン塩酸塩
	イヌ	経皮 / 単回	プロピトカイン
反復投与時の血中濃度	ミニプタ	直腸内 / 3 週間反復	SKA-01 (クリーム)
<u>分布</u>			
単回投与時の皮内濃度	モルモット	経皮 / 単回 (正常皮膚、 角質層剥離皮膚)	^3H -SKA-01 (クリーム) ^3H -リドカイン (クリーム) ^3H -プロピトカイン (クリーム) ^3H -リドカイン (軟膏)
単回投与時の組織分布	ラット	静脈内 / 単回	^{14}C -リドカイン
<u>代謝</u>			
該当資料なし			
<u>排泄</u>			
単回投与時の尿糞中排泄	ラット	静脈内 / 単回	^{14}C -リドカイン

2.4.1.4 毒性試験

単回投与毒性試験にはマウス、ラット、ウサギ及びミニブタを、反復投与毒性試験にはラット、イヌ及びサルを、遺伝毒性試験には細菌 (*S.typhimurium* 及び *E.coli*)、ヒトリンパ球細胞及びマウス (*in vivo*) を用いた。生殖発生毒性試験にはラットを、局所刺激性試験にはウサギ、イヌ及びミニブタを用いた。がん原性試験は実施しなかった。

一部試験では、試験物質の経皮吸収後の曝露を考慮して皮下投与又は静脈内投与による試験も実施した。実施した毒性試験を表 2.4.1.4-1 に示す。これら毒性試験の GLP 基準適用の有無については、2.6.7.1 に記載した。

表 2.4.1.4-1 毒性試験一覧

試験の種類	動物種 /菌種	投与経路 /投与形式	投与物質
<u>単回投与毒性試験</u>			
単回投与毒性試験	ウサギ ミニブタ	経皮	SKA-01 (クリーム)
	マウス ラット	静脈内	リドカイン塩酸塩、プロピトカイン塩酸塩、 リドカイン塩酸塩・プロピトカイン塩酸塩混 合物
	ラット	皮下	リドカイン (乳剤)、 プロピトカイン (乳剤)、 SKA-01 (乳剤)
	ラット	経口	リドカイン塩酸塩 プロピトカイン塩酸塩
<u>反復投与毒性試験</u>			
1 ヶ月間反復毒性試験	イヌ	直腸内	SKA-01 (クリーム)
5 週間反復毒性試験	サル	皮下 ^a	リドカイン塩酸塩、 プロピトカイン塩酸塩 (参考資料)
7 週間反復毒性試験	ラット	皮下 ^a	リドカイン塩酸塩、 プロピトカイン塩酸塩 (参考資料)
<u>遺伝毒性試験</u>			
細菌を用いる復帰突然変異 試験	<i>S.typhimurium</i>	<i>In vitro</i>	リドカイン塩酸塩 プロピトカイン塩酸塩
ほ乳類培養細胞を用いる染 色体異常試験	初代培養 ヒトリンパ球	<i>In vitro</i>	リドカイン塩酸塩 プロピトカイン塩酸塩
小核試験	マウス	皮下	リドカイン塩酸塩 プロピトカイン塩酸塩

a: GLP 非適合試験 (参考資料)

表 2.4.1.4-1 毒性試験一覧（続き）

試験の種類	動物種 /菌種	投与経路 /投与形式	投与物質
生殖発生毒性試験			
胚及び胎児発生に関する試験	ラット	皮下 ^a	リドカイン塩酸塩・プロピトカイン塩酸塩混合物（予備試験：参考資料）
	ラット	皮下	リドカイン塩酸塩・プロピトカイン塩酸塩混合物（本試験）
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	ラット	皮下 ^a	リドカイン塩酸塩（参考資料）
		筋肉内 ^a	リドカイン塩酸塩（参考資料）
		皮下	プロピトカイン塩酸塩（参考資料）
局所刺激性試験			
単回皮膚刺激性試験	ウサギ	経皮	SKA-01（乳剤）
	ミニブタ	経皮 ^a	SKA-01（クリーム）（参考資料）
反復皮膚刺激性試験 （20日間）	ウサギ	経皮	SKA-01（クリーム及び乳剤） リドカイン（クリーム）
腫刺激性試験 （20日間）	イヌ	腫内	SKA-01（クリーム）
眼刺激性試験	ウサギ	点眼	SKA-01（乳剤）
その他の毒性試験			
2週間反復毒性試験	イヌ	直腸内	SKA-01（クリーム） SKA-01 劣化製剤 ^b （クリーム）
細菌を用いる復帰突然変異試験	<i>S. typhimurium</i> <i>E.coli</i>	<i>In vitro</i>	プロピトカイン塩酸塩＋分解生成物 ^c
ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験	初代培養 ヒトリンパ球	<i>In vitro</i>	プロピトカイン塩酸塩＋分解生成物 ^c
局所刺激性試験	ミニブタ	経皮	SKA-01（クリーム） SKA-01+不純物 ^d （クリーム）

a: GLP 非適合試験（参考資料）

b: 不純物として

類縁物質 A、類縁物質 B、類縁物質 C 及び^{**}

未同定物質を含む。

c: 類縁物質 A 及び類縁物質 B^{**}

d: 不純物として

類縁物質 A、類縁物質 B 及び類縁物質 C^{**}

を含む

遺伝毒性試験については、リドカイン塩酸塩またはプロピトカイン塩酸塩による試験を実施し、配合剤としての遺伝毒性試験は実施しなかった。

一方の化合物の存在により、他の化合物の代謝や毒性が変化する場合は、配合剤として化合物の組み合わせを評価する必要があると考えられるが、動物あるいはヒトのいずれでも、代謝における相互作用の可能性は低いと推察されていること（2.6.4.9）、毒性試験で相乗作用は示されなかったことから（2.6.6.9.4）、個別の試験成績でこれら化合物の配合剤における遺伝毒性を考察するのに十分であると考えられた。

また、上記「2.4.1.1.3 塩酸塩の試験成績による評価の妥当性」で記載したように、塩基及び塩酸塩いずれも緩衝液中では同様のイオン型の割合に変化すること、塩基が難水溶性で動物及び細胞培養系のいずれにおいても曝露量が極めて制限されることを考慮すると、十分な化合物量及びそれにもなう代謝物を曝露させることができる塩酸塩による評価のほうが、SKA-01 の遺伝毒性の可能性について適切に評価できると考えられる。

2.4.2 薬理試験

2.4.2.1 効力を裏付ける試験

リドカインは中間時間作用型のアミド系局所麻酔薬であり、電位依存性 Na^+ チャンネルに結合し、 Na^+ の透過を阻害して活動電位を不活性化することにより神経伝達を遮断する。他の局所麻酔薬と同様に、 Na^+ チャンネルの α サブユニット内IVドメインのセグメント 6 に存在する特定のアミノ酸と相互作用し、 Na^+ の通過を阻害する^{2,3)}。

リドカインとプロピトカインは、摘出したカエルの坐骨神経に対し、いずれも活動電位を抑制した⁴⁾。ウサギの角膜に対する麻酔の持続時間は、同投与量において同じであり、プロピトカインの投与量をリドカインの2倍量にして比較すると、プロピトカインのほう約2倍長くなった⁵⁾。また、モルモットの皮下⁶⁾、及びラットの坐骨神経⁴⁾に両薬剤をそれぞれ投与したところ、同程度の麻酔効果が得られた。

上記の通り、両薬剤の薬効薬理は十分に知られていると考えられることから、効力を裏付ける試験として両剤の配合意義を示すことを目的とし、SKA-01 乳剤の効力を単剤のリドカイン乳剤或いはプロピトカイン乳剤の効力と比較検討した。

(1) モルモットの正常皮膚における SKA-01 乳剤の局所麻酔作用

0.55～10%SKA-01 乳剤、10%リドカイン乳剤、又は10%プロピトカイン乳剤を、モルモット背部正常皮膚に60分間塗布した後の局所麻酔効果をピンプリック法で評価した。SKA-01 乳剤の局所麻酔効果は濃度依存的に増強し、2.5、5及び10%SKA-01 乳剤の局所麻酔効果は単剤の10%リドカイン乳剤及び10%プロピトカイン乳剤の局所麻酔効果よりも有意に強かった（報告書番号802-10A 135-02）。

(2) モルモットの角質層剥離皮膚における SKA-01 乳剤の局所麻酔作用

0.55～10%SKA-01 乳剤、1～10%リドカイン乳剤、又は1～10%プロピトカイン乳剤を、モルモット背部角質層剥離皮膚に60分間塗布した後、25分間の局所麻酔効果をピンプリック法で評価した。2.5及び5%SKA-01 乳剤の局所麻酔効果は、同濃度の各単剤乳剤の局所麻酔効果よりも有意に強かった（報告書番号802-10A 137-02）。

以上の結果より、モルモットにおいて、リドカインとプロピトカインを配合したSKA-01 乳剤の局所麻酔効果は、それぞれの各単剤乳剤の効果より増強されることから、リドカインとプロピトカインとの配合意義の科学的合理性が示された。

2.4.2.2 副次的薬理試験

該当する試験は実施していない。

2.4.2.3 安全性薬理試験

「安全性薬理試験ガイドライン」（平成 13 年 6 月 21 日 医薬審発第 902 号）に準拠した非臨床安全性薬理試験は特に実施していないが（2.4.1.1.5）、毒性試験結果に基づいて安全性薬理に関連する成績を検証した。中枢神経系及び呼吸器系に及ぼす影響を単回経皮投与毒性試験結果に基づいて、また、心循環器系に対する作用を反復投与毒性試験結果に基づいて検証し、記載した。なお、リドカインの有害作用は一定の血中濃度を超えると発現すると報告されている⁷⁻¹²⁾ため、TK 試験結果に基づき $C_{\max}$ を記載し、有害作用との関連性を検証した。

2.4.2.3.1 中枢神経系に及ぼす影響

(1) ウサギ単回経皮投与毒性試験

雌雄各 3 匹のウサギに、43%SKA-01 クリームをリドカイン 600 mg/kg /プロピトカイン 600 mg/kg の用量で 24 時間単回経皮投与し、投与開始から投与 48 時間後まで一般症状を観察した。一般症状の観察において、SKA-01 に起因すると見られる機能不全の兆候は認められなかった。個々の動物の $C_{\max}$ は投与開始 3～25 時間後に認められ、リドカイン及びプロピトカインの $C_{\max}$ の範囲は、それぞれ 1.13～2.23 $\mu\text{g/mL}$ 、0.54～1.52 $\mu\text{g/mL}$ であった（報告書番号 802-10 T1373）。

2.4.2.3.2 呼吸器系に及ぼす影響

(1) ミニブタ単回経皮投与毒性試験

雌性 6 匹のミニブタに、5%SKA-01 クリーム 120 g（40 g×3 回、リドカイン 3 g/プロピトカイン 3 g）を 24 時間（8 時間×3 回）単回経皮投与し、一般症状（外観、移動行動様式、皮膚の状態、眼及び粘膜、呼吸及び排泄物の変化）を投与中及びその 4 時間後まで観察した。すべての動物の投与部位に蒼白化と紅斑が認められたが、それ以外には呼吸も含め、一般症状の変化は認められなかった。リドカイン及びプロピトカインの $C_{\max}$ は、それぞれ $434 \pm 134 \text{ nmol/L}$ （ $0.102 \pm 0.0314 \mu\text{g/mL}$ ）、 $172 \pm 103 \text{ nmol/L}$ （ $0.0379 \pm 0.0227 \mu\text{g/mL}$ ）（平均±標準偏差）であった（報告書番号 0014LW）。

2.4.2.3.3 心血管系に及ぼす影響

(1) イヌ直腸内 2 週間反復投与毒性試験

1 群雌雄各 3 匹のイヌの直腸内に、5%SKA-01 クリームを 0.6 mL/kg/日（リドカイン 15 mg/kg/日 /プロピトカイン 15 mg/kg/日）、5%SKA-01 クリーム劣化製剤（リドカイン/プロピトカイン及びその分解物を含む）又はプラセボクリームを 0.6 mL/kg/日、2 週間反復投与した。心電図検査を投与開始前、第 2 週の投与の 2 及び 24 時間後に実施し、心拍数及び心電図パラメータ（P、PR、QRS、ST、QT、QTc）を計測した。試験期間中の心電図検査で得られた心電図波形の観察結果及び計測値（心拍数及び各心電図パラメータ）において、SKA-01 に起因する影響は認められなかった。リドカイン及びプロピトカインの初回投与後の $C_{\max}$ （平均値±標準偏差）は、リドカインが $0.87 \pm 0.21 \mu\text{mol/L}$ （ $0.204 \pm 0.049 \mu\text{g/mL}$ ）（雄）、 $1.7 \pm 2.5 \mu\text{mol/L}$ （ $0.398 \pm 0.586 \mu\text{g/mL}$ ）（雌）、プロピトカインが $0.37 \pm 0.067 \mu\text{mol/L}$ （ $0.082 \pm 0.015 \mu\text{g/mL}$ ）（雄）、 $0.27 \pm 0.32 \mu\text{mol/L}$ （ $0.059 \pm$

0.070 µg/mL) (雌) であった (報告書番号 VKS/0057)。

(2) イヌ直腸内 1 ヶ月間反復投与毒性試験

1 群雌雄各 3 匹のイヌの直腸内に、2%SKA-01 クリームをリドカイン 2.5 mg/kg/日 /プロピトカイン 2.5 mg/kg/日、又はリドカイン 6 mg/kg/日 /プロピトカイン 6 mg/kg/日の用量で、5%SKA-01 クリームをリドカイン 6.25 mg/kg/日 /プロピトカイン 6.25 mg/kg/日の用量で 1 ヶ月間投与して全身毒性を検討した。また、対照として無処置及びプラセボクリームを設定した。心電図検査 (lead I、II、III、aVR、aVF、aVL、CR5、CR6L 及び CR6U) を投与開始直前並びに投与開始日及び 22 日目或いは 24 日目の投与 1、3、24 時間後に実施し、心拍数及び各心電図パラメータを計測した。心電図検査値 (心拍数及び各心電図パラメータ) において、SKA-01 に起因する影響は認められなかった。SKA-01 クリームをリドカイン 2.5 mg/kg/日 /プロピトカイン 2.5 mg/kg/日、リドカイン 6 mg/kg/日 /プロピトカイン 6 mg/kg/日及びリドカイン 6.25 mg/kg/日 /プロピトカイン 6.25 mg/kg/日として初回投与後のリドカイン及びプロピトカインの C_{max} の範囲は、それぞれ、リドカインが 0.064~0.244、0.209~0.287、0.114~0.238 µg/mL (雄) 及び 0.043~0.614、0.148~0.173、0.089~0.178 µg/mL (雌)、プロピトカインが <0.010、0.056~0.102、0.031~0.088 µg/mL (雄) 及び 0.050~0.265、0.038~0.063、0.044~0.060 µg/mL (雌) であった (報告書番号 802-10 T1608、802-10 AF42-1)。

以上の毒性試験結果に基づいて安全性薬理に関連する情報を検証すると、SKA-01 の経皮投与及び直腸内投与は、中枢神経系、呼吸器系及び心循環器系に対して影響を与えなかった。

また、検証した毒性試験のうち、ウサギ単回経皮投与毒性試験におけるリドカイン及びプロピトカインの C_{max} が最も高く、それぞれ、1.13~2.23 µg/mL、0.54~1.52 µg/mL であった。一方、リドカインが中枢性有害作用を示す血中濃度は、ネコで 4.5~7 µg/mL⁷⁾、ヒトで 5 µg/mL⁸⁻¹⁰⁾と報告されており、ウサギ単回経皮投与毒性試験で得られたリドカインの C_{max} より 2 倍以上、高値である。また、プロピトカインが中枢性の有害作用を示す血中濃度は報告されていないが、

①局所麻酔薬の中枢神経系及び心血管系に対する作用強度と局所麻酔作用強度は相関すること¹⁰⁻¹⁶⁾、②リドカインとプロピトカインはラット⁴⁾、ウサギ⁵⁾において同等の局所麻酔作用を示すことから、両者は同程度の有害作用を示すと考えられ、プロピトカインはリドカインと同様の血中濃度で有害作用を発現するものと推察される。

従って、SKA-01 クリームを経皮投与及び直腸内投与した毒性試験では、リドカイン及びプロピトカインの血中濃度は、両者の有害作用発現濃度には達していないため、有害作用が発現しなかったと考えられる。以上のように、SKA-01 クリームを経皮投与及び直腸内投与した毒性試験では、生命維持に係わる生理機能に影響を与えるほどの両成分の全身的な曝露は生じず、リドカイン及びプロピトカインの経口投与或いは静脈内投与時に認められるような臨床的に問題となると予測される有害作用は認められなかった。

2.4.3 薬物動態試験

プロピトカイン塩酸塩とプロピトカインの吸収性についてラットとイヌを用いて比較したところ、塩酸塩と塩基の吸収性に大きな差がなく、また吸収後の両化合物のイオン化状態が同じであることから、厚労省医薬品食品局審査管理課長通知（薬食審査発第 0331009 号、平成 17 年 3 月 31 日）を考慮し、プロピトカイン塩基の分布・代謝・排泄に関する試験は実施する必要がないと判断したが、リドカイン及びプロピトカインの薬物動態について、参考資料・参考文献より補助的な情報を記載した。

また、SKA-01 クリームを塗布後の血中濃度推移について、単回投与はミニブタを用いて、反復投与ではイヌを用いて検討した。SKA-01 クリーム経皮投与後のリドカインとプロピトカイン皮内分布についてモルモットを用いて評価した。リドカインの組織分布、排泄に関してラットを用いて評価した。

2.4.3.1 吸収

2.4.3.1.1 プロピトカイン塩酸塩とプロピトカイン

(1) ラット単回皮下投与

ラット背部皮下にプロピトカイン塩酸塩又はプロピトカインをそれぞれ等モル単回投与したときの血中プロピトカイン濃度を測定した。血中濃度が最大値を示した 0.5 時間における個体差が大きいものの、吸収過程である 0.17、0.33 時間においてプロピトカイン塩酸塩とプロピトカイン群の数値は近似していたことから、両物質の吸収性は類似していると考えられた。投与 1.5 時間後に有意差が認められたが、その前後を含むその他の測定時間で両群間に有意差が認められないことから、消失過程にも大きな差は認められないと判断した。（報告書番号 Y0923-PK-01-TR）。

(2) イヌ単回皮下投与

イヌ背部にプロピトカイン塩酸塩又はプロピトカインをそれぞれ等モル単回皮下投与したときの血中プロピトカイン濃度を測定した。AUC においてプロピトカインのほうがプロピトカイン塩酸塩よりも有意に小さかった（ $P=0.0482$ 、Student's *t*-test）。しかし、両群いずれも個体差が大きいこと、さらに C_{max} には有意差が認められなかったことから、両薬剤の吸収の程度に大きな差異はないと推察された（報告書番号 FBM 04-4469）。

2.4.3.1.2 SKA-01 クリーム

(1) ミニブタ単回経皮投与

ミニブタ側腹部に 5%SKA-01 クリーム 40 g を 8 時間毎に 3 回、計 120 g（リドカイン 3 g/プロピトカイン 3 g）の 24 時間持続経皮投与したところ、リドカイン及びプロピトカインの最高血漿中濃度（ C_{max} ）はいずれも塗布終了時から 2 時間以内に得られ、塗布終了後 8 時間まで速やかに消失し、それ以降の消失は緩やかであった。リドカインの血中濃度は投与後常にプロピトカインの血中濃度よりも高かった。リドカインの代謝物である 2,6-xyldine 濃度は、塗布中断的に上昇し、塗布終了後速やか消失した。プロピトカインの代謝物である *o*-toluidine の血中濃度は、常に

プロピトカイン濃度よりも高く、消失はプロピトカインよりも緩やかであった（報告書番号 0014LW）。

(2) イヌ反復直腸内投与

イヌ直腸内に 2%又は 5%SKA-01 クリームを反復塗布したときの薬物動態パラメータを検討した。2%SKA-01 クリームをリドカイン 2.5 mg/kg/日 /プロピトカイン 2.5 mg/kg/日、又はリドカイン 6 mg/kg/日 /プロピトカイン 6 mg/kg/日として、5%SKA-01 クリームをリドカイン 6.25 mg/kg/日 /プロピトカイン 6.25 mg/kg/日として、1 日 1 回 22 日間（雌）/ 24 日間（雄）反復塗布したところ、初回及び最終塗布時のリドカイン及びプロピトカイン濃度の C_{max} は概ね塗布開始後 0.5～1 時間に得られ、その後すべての用量群で両有効成分は血中から速やかに消失した。反復塗布により T_{max} は変化せず、最終投与時の C_{max} 及び AUC が初回投与時よりも著しく上昇することはなかった。リドカイン及びプロピトカインのいずれも C_{max} 及び AUC の用量相関性は認められなかったが、雌雄いずれの用量群とも、血漿中プロピトカイン濃度はリドカインより低い値を呈した（報告書番号 802-10 AF 42-1）。

2.4.3.2 分布

2.4.3.2.1 皮内濃度

(1) モルモット単回背部正常皮膚塗布及び背部角質層剥離皮膚塗布（SKA-01 クリーム、リドカインクリーム、プロピトカインクリーム、リドカイン軟膏）

モルモット背部除毛皮膚に ^3H -SKA-01 クリーム、 ^3H -リドカインクリーム又は ^3H -プロピトカインクリームを塗布したところ、 ^3H -SKA-01 クリームは各単剤クリームよりもそれぞれ有意に高い皮内放射能濃度を呈し、2.4.2.1 に示した SKA-01 乳剤が両有効成分の単剤の局所麻酔効果よりも強いという薬理試験結果と一致した（ $P<0.05$ 、Student's t -test）。

角質層剥離皮膚においても正常皮膚と同様の結果が得られた。また、角質層剥離皮膚における皮内放射能濃度は正常皮膚よりも高かったことから、リドカイン及びプロピトカインの経皮吸収には角質層の有無が影響することが示された。これは 2.4.2.1 で、角質層が SKA-01 乳剤及びそれぞれの単剤の局所麻酔効果の程度に影響を与えた薬理試験結果と一致する。

SKA-01 クリーム塗布後の ^3H -標識した両成分としては、プロピトカインのほうがリドカインよりも有意に皮内放射能濃度が高かったが（ $P<0.05$ 、Student's t -test）、SKA-01 クリーム塗布後の両成分の血中濃度はいずれの種においてもプロピトカインよりもリドカインのほうが高い（2.4.2.3 参照）。これはリドカインよりもプロピトカインの分布容積が大きいことに因ると考えられる^{17, 18)}。また、リドカイン軟膏は、正常皮膚及び角質層剥離皮膚のいずれにおいても、リドカインの皮内濃度が同濃度のクリームに比べて著しく小さかった（報告書番号 802-10 AF 3-1-02）。

2.4.3.2.2 組織分布

(1) 有色ラット単回静脈内投与（リドカイン）

有色ラットに ^{14}C -リドカイン単回静脈内投与後 15 分に最も高い放射能濃度を示した臓器は腎

臓であり、次いで肝臓及び眼球であった。メラニン組織（眼球及び有色皮膚）において放射能の消失に遅延が認められたことから、 ^{14}C -リドカイン由来の化合物（未変化体又は代謝物）とメラニンとの結合性が推察された（報告書番号 802-501-LF-0121-01）。

組織分布

ラットに ^{14}C -リドカイン塩酸塩又は ^{14}C -プロピトカイン塩酸塩を単回筋肉内投与したところ、両物質とも肺、腎臓、脾臓、脳、心臓で高い放射能濃度が得られた。肺及び脳では ^{14}C -リドカイン塩酸塩よりも ^{14}C -プロピトカイン塩酸塩の放射能濃度が有意に高く（肺： $P<0.001$ 、脳： $P<0.05$ ）、特に肺では投与 2 時間後において、なおも高値であった¹⁹⁾。

モルモットに ^{14}C -プロピトカイン塩酸塩及び ^{14}C -リドカイン塩酸塩の等モルを急速静脈内投与したところ、両物質とも投与 0.5 分後に肺、腎臓、中枢神経系及び心臓に高い放射能濃度が認められ、投与 30 分後では、ほとんどの臓器の放射能濃度は血清中濃度と同程度となった²⁰⁾。

蛋白結合と血球への分布

リドカイン及びプロピトカインは、他の局所麻酔薬と同様にアルブミン及び α_1 -酸性蛋白質に結合する^{21, 22)}。蛋白結合率は薬剤の血中濃度の上昇と pH の低下に伴い低下する²¹⁾。薬剤の血中濃度の上昇に伴う蛋白結合率の低下は、リドカイン²³⁾よりもプロピトカイン²⁴⁾の方が小さく、ヒト血漿におけるプロピトカインの蛋白結合率は $0.5\sim 16\text{ }\mu\text{g/mL}$ において約 30 % であり、濃度に関わらずほぼ一定であった²⁴⁾。リドカイン及びプロピトカインの血液/血漿中濃度比はそれぞれ 0.8 と 1.1 であり、血球への分布は少ないと考えられている²⁵⁾。

胎盤通過性

妊娠中のモルモットにリドカイン塩酸塩を静脈内投与したところ、迅速な胎盤通過性が示され、比較的高濃度のリドカインが胎児の肝臓、心臓及び脳で検出された。母動物よりも胎児で高濃度を呈した臓器は肝臓のみであった²⁶⁾。

妊娠ラットに ^{14}C -プロピトカイン塩酸塩を静脈内投与し、放射能濃度において血液/胎盤比、血液/胎児比、及び胎盤/胎児比を求めたところ、血液/胎盤比と血液/胎児比はいずれも投与 1 分後が最も高く、0.26、0.31 であったが、投与 5、15 分及び 1 時間後では有意に（ $P<0.05$ ）低下した。胎盤/胎児比は、全観察時点で 1.18～1.33 とほぼ一定であった²⁷⁾。

2.4.3.3 代謝

リドカインのラット、モルモット、イヌ及びヒトにおける推定代謝経路を図 2.4.3.3-1 に、プロピトカインのヒト及びラットにおける推定代謝経路を図 2.4.3.3-2 に示す。

代謝物分析

ラット、モルモット、イヌ、ヒトにリドカイン塩酸塩を単回経口投与し、投与 24 時間後までの尿中の代謝物において、投与量に対する尿中排泄率が高かったのは、ラットでは 3 位水酸化体

(3-hydroxylidocaine、3-hydroxy-MEGX) で、モルモット、イヌ、ヒトでは 2,6-xylidine とその 4 位水酸化体 (4-hydroxy-2,6-xylidine) であった²⁸⁾。ヒトにプロピトカインを単回皮下投与したところ、血中及び尿中のプロピトカインの代謝物として、*o*-toluidine、6-hydroxy-*o*-toluidine、4-hydroxy-*o*-toluidine が検出された²⁹⁾。

In vitro 代謝試験

ヒト肝ミクロソームとリドカインを反応させたところ、リドカインの脱エチル化産物である MEGX がリドカインの消失量依存的に認められた。また、脱エチル化反応はミダゾラムの添加または CYP3A4 の抗体の添加により阻害されたことから、リドカインから MEGX への代謝において CYP3A4 が必要であることが明らかである³⁰⁾。ヒト精製 CYP1A2 とリドカインを反応させたところ、リドカインの 3 位水酸化体である 3-hydroxylidocaine が検出されることから、3-hydroxylidocaine への代謝において CYP1A2 が必要であることが明らかである³¹⁾。ラット肝臓組織スライスと ¹⁴C-プロピトカイン塩酸塩を反応させたところ、アミダーゼによる加水分解産物の *o*-toluidine と N-propylalanine に代謝された¹⁹⁾。単離されたラットの肺及び肝臓を用いてプロピトカイン塩酸塩の代謝能を比較したところ、肺のクリアランス値は肝臓の約 20 % であり、プロピトカインは主に肝臓で代謝されることが示唆された³²⁾。

酵素阻害

CYP 阻害剤を投与したマウスに ¹⁴C-リドカイン塩酸塩又は ¹⁴C-プロピトカイン塩酸塩を腹腔内投与したところ、リドカインの代謝は大きく阻害されたが、プロピトカインの代謝はほとんど阻害を受けなかったことから、リドカインの代謝過程にのみ CYP は関与することが示された¹⁹⁾。

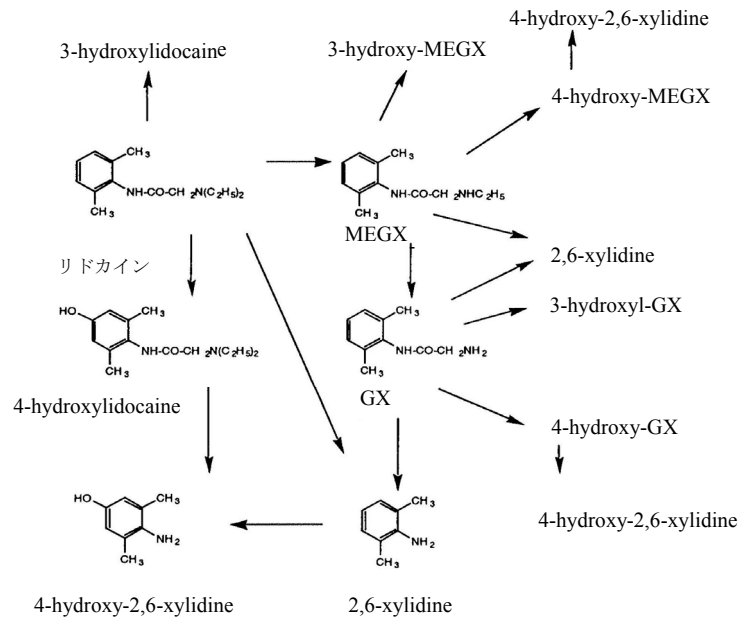


図 2.4.3.3-1 リドカインの推定代謝経路 (4.3-(22) 図 7、4.3-(28) 図 1 の改変)

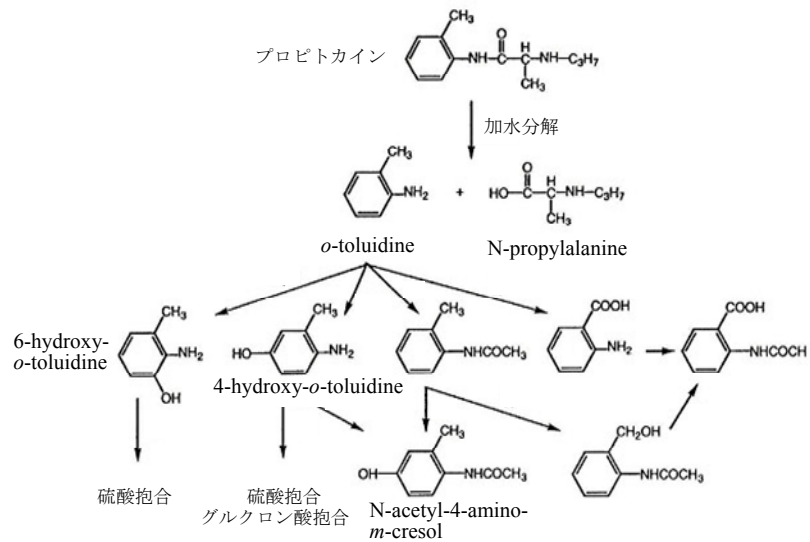


図 2.4.3.3-2 プロピトカインの推定代謝経路 (4.3-(33) p. 43 の図、4.3-(34) 図 4 の改変)

2.4.3.4 排泄

(1) 有色ラット単回静脈内投与（リドカイン）

有色ラットに ^{14}C -リドカインを単回静脈内投与したとき、投与後 24 時間までに投与放射能の 68～72 %が尿中に、13～18 %が糞中に排泄された。主排泄経路は尿中であり、投与放射能の体外への排泄は速やかであった（報告書番号 802-501-LF-0121-01）。

排泄

ラットに ^{14}C -プロピトカイン塩酸塩を単回皮下投与したところ、投与 54 時間までに投与放射能の 23.0 %が尿中に、5.0 %が $^{14}\text{CO}_2$ として呼気中に排泄された³³⁾。また、ラットに *o*-[methyl- ^{14}C] toluidine を単回皮下投与したところ、投与 48 時間後までに投与放射能の 74.1～83.0 %が尿中に、1.9～3.5 %が糞中に、0.18～1.46 %が呼気中に排泄されたことから、プロピトカインの代謝物は大部分が尿中に排泄されと考えられる³⁴⁾。

胆汁排泄

モルモットに ^{14}C -リドカイン塩酸塩又は ^{14}C -プロピトカイン塩酸塩を静脈内投与したところ、両物質とも投与 10 分後から胆汁排泄が始まり、30 分後まで高値を維持した²⁰⁾。

2.4.3.5 薬物動態学的薬物相互作用

該当する試験は実施していない。これはリドカインとプロピトカインの作用機序が本質的に同一で、作用点が同一であることから、両薬剤を併用した場合には、局所麻酔薬の分子数が単純に増えた場合と同様の作用が生じ、薬力学的相互作用は生じないと考えられる為、当該試験が不要と判断した。

2.4.4 毒性試験

(1) 毒性試験資料について

リドカイン（塩酸塩・塩基）、プロピトカイン（塩酸塩）については、各種麻酔を目的として、臨床において長年広く使用されている。従って、毒性試験プログラムにおいては、SKA-01 クリーム（配合剤）としての毒性を検討した試験を評価資料として採用して記載するとともに、リドカイン及びプロピトカイン単剤の毒性については、過去に海外において実施された塩酸塩の試験報告書及び公表文献、成書より引用して記載した。

古い資料については、現在の基準を完全に満たしているとはいえないが、両成分とも 1960 年代から長期の臨床経験があることから、これらの資料を総合的に評価することにより、両化合物の安全性を裏づけるには十分な資料と考えられた。

(2) 毒性試験の反復投与試験における投与経路について

SKA-01 クリームの反復投与毒性試験は以下の点を考慮し、直腸内投与を選択した。

SKA-01 クリームの臨床投与経路は経皮であるが、経皮投与の反復投与においては、試験上の技術的な問題（塗布面積及び皮膚透過性の限度）により、反復投与毒性試験における意味のある全身曝露、すなわちヒト臨床使用における血中濃度を越える曝露を得ることは困難であると考えられる。また経口投与は、臨床使用と関連性が低いこと、一次通過代謝が高くアミド系局所麻酔薬の生物学的利用能が低いために¹⁾、不適切であると考えられた。さらに SKA-01 乳剤として皮下投与は、局所刺激性（投与部位の壊死）が避けられないため（2.6.6.2.5）、反復投与試験の投与経路としては不適切であると考えられた。

そこで、経皮投与に準ずる投与経路として直腸投与による検討が行われた。これにより、十分な全身曝露を担保しつつ（2.6.6.9.1）、SKA-01 クリームとしての反復投与毒性を行うことが可能であった。従って、SKA-01 クリームの反復投与試験の投与経路としては妥当と考える。

2.4.4.1 単回投与毒性試験

リドカイン/プロピトカイン配合（SKA-01）又は混合

ウサギに 43%SKA-01 クリーム 10 g（リドカイン 2.15 g/プロピトカインとして 2.15 g）を 24 時間、ミニブタに 5%SKA-01 クリーム 120 g（リドカイン 3 g /プロピトカインとして 3 g）を 24 時間（8 時間×3 回）それぞれ経皮塗布したとき、いずれも塗布部位に軽度の紅斑が認められたが、死亡例及び全身的影響は認められなかった。概略の致死量はウサギで約 1000 mg/kg（リドカイン 500 mg/kg /プロピトカイン 500 mg/kg）以上、ミニブタで約 300 mg/kg（リドカイン 150 mg/kg /プロピトカイン 150 mg/kg）以上と推定された（報告書番号 802-10 T1373、0014LW）。

マウス及びラットに、リドカイン塩酸塩、プロピトカイン塩酸塩又はリドカイン塩酸塩・プロピトカイン塩酸塩混合液を静脈内投与した結果、自発運動低下、不動、嗜眠及び努力性呼吸が認められ、呼吸困難とチアノーゼに関連した意識減退や痙攣が認められた。

マウス及びラットにおける概略の致死量は、リドカイン塩酸塩は 60 mg/kg 及び 18 mg/kg（リドカインとして 48.7 mg/kg 及び 14.6 mg/kg）、プロピトカイン塩酸塩は 80 mg/kg 及び 35 mg/kg（プロ

ロピトカインとして 68.8 mg/kg 及び 30.1 mg/kg)、リドカイン塩酸塩・プロピトカイン塩酸塩混合物は 60 mg/kg 及び 29 mg/kg (リドカイン 24.3 mg/kg/プロピトカイン 25.8 mg/kg 及びリドカイン 11.7mg/kg /プロピトカイン 12.5 mg/kg の混合物) であった (報告書番号 802-10 T1349、802-10 T1330)。

ラットに、10%リドカイン乳剤、10%プロピトカイン乳剤又は 10%SKA-01 乳剤を皮下投与した結果、顕著な自発運動低下、呼吸困難、流涙、体温低下及び強直性痙攣が認められた。プロピトカイン乳剤投与群は他の被験物質投与群と比べ毒性反応の発現が少なかった。また、被験物質投与群の全例の投与部位に壊死が発現した。

概略の致死量は、リドカインは 810 mg/kg、プロピトカインは 925 mg/kg、SKA-01 は 720 mg/kg と推定された (報告書番号 802-10 T1372)。

またこれらのマウス及びラットの静脈内投与試験の概略の致死量及びラット皮下投与試験の死亡動物数並びに毒性所見により、一方の薬物が他方の薬物の毒性を増強しないことが示唆された (表 2.4.4.1-1、2.4.4.1-2)。

リドカイン/プロピトカイン単剤

(1) リドカイン (塩酸塩)

ラットに、リドカイン塩酸塩 350～2700 $\mu\text{mol/kg}$ (リドカインとして 80～630 mg/kg) を経口単回投与した結果、雌雄共に自発運動の低下及び運動失調、さらに用量増加につれて呼吸障害、半眼、眼周囲の汚れ、立毛、流涎、円背位、痙攣、正向反射の消失が認められた。概略の致死量は、雄が 2700 $\mu\text{mol/kg}$ (リドカインとして 630 mg/kg)、雌が 1700 $\mu\text{mol/kg}$ (リドカインとして 400 mg/kg) であった。最大非致死量は雄が 1700 $\mu\text{mol/kg}$ (リドカインとして 400 mg/kg)、雌が 850 $\mu\text{mol/kg}$ (リドカインとして 200 mg/kg) であった (報告書番号 SR00609-01)。

(2) プロピトカイン (塩酸塩)

ラットに、プロピトカイン塩酸塩 1000～6000 $\mu\text{mol/kg}$ (プロピトカインとして 220～1300 mg/kg) を経口単回投与した結果、雌雄両方に自発運動の低下及び運動失調、さらに用量増加につれて呼吸障害、半眼、立毛、流涎、円背位、攣縮、痙攣、正向反射の消失が認められ、最高用量では雌雄両方に投与直後の痙攣が認められた。概略の致死量は雄では 6000 $\mu\text{mol/kg}$ 以上 (プロピトカインとして 1300 mg/kg 以上) 雌が 6000 $\mu\text{mol/kg}$ (プロピトカインとして 1300 mg/kg) であった。最大非致死量は、雄が 6000 $\mu\text{mol/kg}$ (プロピトカインとして 1300 mg/kg)、雌が 4000 $\mu\text{mol/kg}$ (プロピトカインとして 880 mg/kg) であった (報告書番号 SR01048-01)。

表 2.4.4.1-1 リドカイン・プロピトカイン混合物と各単剤との毒性比較

(4.2.3.1.3、4.2.3.1.4 本文 Results 表を引用)

動物種	投与方法	被験物質	概略の致死量: (mg/kg) (mg 塩基/kg)
NMRI マウス	静脈内	リドカイン塩酸塩	60 (48.7)
		プロピトカイン塩酸塩	80 (68.8)
		リドカイン塩酸塩・プロピトカイン塩酸塩混合物	60 (50.1 ^a)
SD ラット	静脈内	リドカイン塩酸塩	18 (14.6)
		プロピトカイン塩酸塩	35 (30.1)
		リドカイン塩酸塩・プロピトカイン塩酸塩混合物	29 (24.2 ^b)

a: リドカイン 24.3 / プロピトカイン 25.8

b: リドカイン 11.7 / プロピトカイン 12.5

表 2.4.4.1-2 SKA-01 と各単剤との毒性比較

(4.2.3.1.5 本文 Results 表を引用)

動物種	投与方法	被験物質	概略の致死量 (mg/kg)
SD ラット	皮下	リドカイン (乳剤)	810
		プロピトカイン (乳剤)	925
		SKA-01 (乳剤)	720 ^a

a: リドカイン 360 mg/kg / プロピトカイン 360 mg/kg

2.4.4.2 反復投与毒性試験

リドカイン/プロピトカイン配合 (SKA-01) 又は混合

イヌに、2%SKA-01 クリーム 0.25 又は 0.6 mL/kg/日 (リドカイン 2.5 mg/kg/日 /プロピトカイン 2.5 mg/kg/日、又はリドカイン 6 mg/kg/日 /プロピトカイン 6 mg/kg/日)、5%クリーム 0.25 mL/kg/日 (リドカイン 6.25 mg/kg/日 /プロピトカイン 6.25 mg/kg/日) を直腸内に 1 ヶ月間反復投与した結果、被験物質に起因すると考えられる毒性所見は認められなかった。無毒性量は 12.5 mg/kg/日 (リドカイン 6.25 mg/kg/日 /プロピトカイン 6.25 mg/kg/日) と推察された (報告書番号 802-01 T1608)。

イヌに、5%SKA-01 クリーム 0.6 mL/kg/日 (リドカイン 15 mg/kg/日 /プロピトカイン 15 mg/kg/日) を直腸内に 2 週間投与した結果、異常は認められず、無毒性量は 30 mg/kg/日 (リドカイン 15 mg/kg/日/プロピトカイン 15 mg/kg/日) と推定された (報告書番号 VKS/0057、2.6.6.8.1.1 に記載)。

リドカイン/プロピトカイン単剤 (塩酸塩)

ラットに、リドカイン塩酸塩の 10、30 mg/kg (リドカインとして 8.1、24 mg/kg) 又はプロピトカイン塩酸塩の 20、60 mg/kg (プロピトカインとして 17、51 mg/kg) を 7 週間皮下投与した結果、リドカイン塩酸塩 30 mg/kg 及びプロピトカイン塩酸塩 60 mg/kg 投与群の投与直後に自発運動の低下が見られたが、数時間後に回復した。また、被験物質投与部位に壊死が見られたが、全例が

治癒した。本試験におけるリドカイン塩酸塩の無毒性量は 10 mg/kg/日（リドカインとして 8.1 mg/kg/日）、プロピトカイン塩酸塩の無毒性量は 20 mg/kg/日（プロピトカインとして 17 mg/kg/日）と推定された（報告書番号 CTT-92 参考資料）。

アカゲザルに、リドカイン塩酸塩 20 mg/kg（リドカインとして 16 mg/kg）又はプロピトカイン塩酸塩の 10、20、40 mg/kg（プロピトカインとして 8.6、17、34 mg/kg）を 5 週間皮下投与した結果、リドカイン塩酸塩 20 mg/kg 投与群の 4 例中雌 1 例が投与 23 日目に死亡したが、投与開始前より肝機能低下が認められた個体であり、被験物質投与によるものではないと考察された。

また病理組織学的所見でプロピトカイン塩酸塩 40 mg/kg 投与群の雄の肝臓の細胞の変性及び壊死が観察された。

以上よりアカゲザル皮下投与におけるリドカイン塩酸塩及びプロピトカイン塩酸塩の無毒性量は 20 mg/kg/日（リドカインとして 16 mg/kg/日）、プロピトカイン塩酸塩の無毒性量は 20 mg/kg/日（プロピトカインとして 17 mg/kg/日）と推定された（報告書番号 CTT-95 参考資料）。

2.4.4.3 遺伝毒性試験

リドカイン/プロピトカイン配合（SKA-01）又は混合

該当する試験は実施していない。

リドカイン/プロピトカイン単剤

(1) リドカイン（塩酸塩）

S.typhimurium を用いた復帰突然変異試験において、リドカイン塩酸塩は代謝活性化の有無にかかわらず、8810 µg/plate の用量まで復帰変異コロニーの増加を引き起こさず、細菌に変異原性を示さなかった（報告書番号 802-01 T2355）。また、初代培養ヒトリンパ球を用いた染色体異常試験において、リドカイン塩酸塩は 10.0 mmol/L (2888 µg/mL) の用量まで染色体異常を誘発しなかった（報告書番号 802-01 T2376）。更に、小核試験において、リドカイン塩酸塩をマウスに 519 µmol/kg (150 mg/kg) の用量まで皮下投与しても、マウス骨髄細胞に小核を誘発せず、骨髄抑制作用も示さなかった（報告書番号 802-01 T2362）。

以上の試験結果から、リドカイン塩酸塩は遺伝毒性を有していないと考えられた。

(2) プロピトカイン（塩酸塩）

S.typhimurium を用いた復帰突然変異試験において、プロピトカイン塩酸塩は代謝活性化の有無にかかわらず、7310 µg/plate の用量まで復帰変異コロニーの増加を引き起こさず、細菌に変異原性を示さなかった（報告書番号 802-02 T1929）。初代培養ヒトリンパ球を用いた染色体異常試験において、プロピトカイン塩酸塩は 10.6 mmol/L（プロピトカインとして 2330 µg/mL）まで染色体異常を誘発しなかった（報告書番号 0021YX）。また、小核試験において、プロピトカイン塩酸塩をマウスに 1558 µmol/kg (400 mg/kg) の用量まで皮下投与しても、マウス骨髄細胞に小核を誘発せず、骨髄抑制作用も示さなかった（報告書番号 802-02 T1968）。以上の試験結果から、プロピトカイン塩酸塩は遺伝毒性を有していないと考えられた。

2.4.4.4 がん原性試験

がん原性試験については遺伝毒性が認められなかったこと、臨床における使用が単回であることから実施しなかった。

なお、リドカイン及びプロピトカインの主要代謝物である 2,6-xylylidine 及び *o*-toluidine のがん原性について、「2.6.6.6.8.2 代謝物の毒性試験」に参考文献より記載した。

2.4.4.5 生殖発生毒性試験

実施した生殖発生毒性試験を表 2.4.4.5-1 に示す。

表 2.4.4.5-1 生殖発生毒性試験一覧

試験物質	試験	動物種 (系統)	投与 経路	投与量 (mg/kg)	投与期間
リドカイン塩酸塩 ・プロピトカイン塩酸塩混 合物	III (用量設定)	SD ラット 1 群 6 匹	皮下 ^b	10+10, 20+20, 30+30, 40+40	妊娠 6～15 日
	III (本試験)	SD ラット 1 群 23 匹	皮下	10+10, 20+20, 40+40	妊娠 6～15 日
リドカイン塩酸塩	II	SD ラット 1 群 20 匹	皮下 ^{a, b}	2, 10, 50	妊娠 15 日～ 分娩後 20 日
	II	SD ラット 1 群 12 匹	筋肉内 ^{a, b}	6	妊娠 10～11 日
プロピトカイン塩酸塩	II	SD ラット 1 群 25 匹	皮下 ^b	25, 40, 60	妊娠 6 日～ 離乳

II：出生前及び出生後の発生ならびに母体の機能に関する試験

III：胚・胎児発生に関する試験

a: GLP 非適合試験 b: 参考資料

2.4.4.5.1 受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験

該当する試験は実施していない。

2.4.4.5.2 胚・胎児発生に関する試験

リドカイン/プロピトカイン配合 (SKA-01) 又は混合

ラットの妊娠 6～15 日にリドカイン塩酸塩・プロピトカイン塩酸塩の混合物 10+10、20+20、30+30、40+40 mg/kg (リドカインとプロピトカインの混合物として 8.1+8.6、16+17、24+26、32+34 mg/kg) を皮下投与し、胚・胎児発生に関する影響を検討する用量設定試験を実施した。被験物質群では用量依存的に投与部位の壊死が認められた。40+40 mg/kg 投与群では平均体重は溶媒投与群に比べ、わずかに低値であり、投与部位に創傷が見られたが、機能障害は認められなかった。着床前死亡数、死亡胎児数、同腹児総体重、平均胎児体重及び平均胎盤重量は群間で同様であり、いずれの群でも胎児の外表奇形は認められなかった。投与部位に壊死が認められたことより、本試験系における最高用量は 40+40 mg/kg (32+34 mg/kg) とした (報告書番号 802-40 T2412)。

上記予備試験結果を元にリドカイン塩酸塩・プロピトカイン塩酸塩混合物の胚・胎児発生に関する影響を検討する本試験を実施した。ラットの妊娠 6～15 日にリドカイン塩酸塩・プロピトカイン塩酸塩混合物 10+10、20+20、40+40 mg/kg (リドカインとプロピトカインの混合物として

8.1+8.6、16+17、32+34 mg/kg) を皮下投与した結果、被験物質では投与部位に用量依存性の刺激症状及び壊死がみられたが、機能障害は認められなかった。40+40 mg/kg (32+34 mg/kg) 投与群では母動物の平均体重は溶媒投与群に比べわずかに低値であったが、平均体重の増加率は各群で類似しており、摂餌量も各群で同様であった。胎児検査においては、骨格異常、同腹児総体重、着床前死亡率、着床後死亡率、平均胎児体重及び平均胎盤重量も各群間で同様であり、外表及び内臓奇形は認められなかった。

以上より、リドカイン塩酸塩・プロピトカイン塩酸塩混合物のラット皮下投与では、40+40 mg/kg (32+34 mg/kg) の用量までは母動物及び胚・胎児発生に関して影響を及ぼさないと考えられた (報告書番号 802-40 T2413)。

2.4.4.5.3 出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験

リドカイン/プロピトカイン配合 (SKA-01) 又は混合

該当する試験は実施していない。

リドカイン/プロピトカイン単剤

(1) リドカイン (塩酸塩)

リドカイン塩酸塩単剤について、ラットの妊娠 15 日～分娩後 20 日に皮下投与した結果、新生児の死亡率が 50 mg/kg (リドカインとして 41 mg/kg) 投与群で溶媒対照群と比較して有意に高かったが、母動物の哺育行動障害との関連性によるものと示唆された (報告書番号 802-01 T1756 参考資料)。

また、妊娠 10～11 日にリドカイン塩酸塩 6 mg/kg (リドカインとして 4.9 mg/kg) を筋肉内投与した結果、雌雄出生児の行動能及び認知能の発達には何ら影響を及ぼさないことが示された。(報告書番号 802-01 T1781 参考資料)

(2) プロピトカイン (塩酸塩)

プロピトカイン塩酸塩単剤について、ラットの妊娠 6 日～離乳まで皮下投与した結果、60 mg/kg (プロピトカインとして 52 mg/kg) の用量まで、周産期及び出産後の発生への重大な影響は認められなかった (報告書番号 0677WR 参考資料)。

2.4.4.6 局所刺激性試験

リドカイン/プロピトカイン配合 (SKA-01) 又は混合

5%SKA-01 及び 10%SKA-01 乳剤 0.4 mL のウサギへの 24 時間閉塞塗布において、いずれも紅斑が認められた。多くは発現から投与終了 24 時間後には消失し、浮腫は認められなかった (報告書番号 802-10 T1017)。

2.5%及び 5%SKA-01 クリーム 0.2 mL 又は 5%SKA-01 乳剤 0.3 mL をウサギ皮膚に 20 日間、1 日 1 時間閉塞塗布した結果、正常皮膚、擦過皮膚ともにプラセボクリームと同程度の弱い紅斑が認められた。浮腫は認められなかった。5%SKA-01 クリームとの塗布群間に紅斑スコアに有意差は認められなかった (報告書番号 802-10 T1128)。

ミニブタに 5%SKA-01 クリームを 1 回あたり最大 20 mL を経皮塗布したところ、紅斑が認められたが、投与終了 1～2 日後には消失した（報告書番号 0015KW 参考資料）以上より、本剤は軽度の皮膚刺激性を示した。

イヌの膺内に 5%SKA-01 クリーム約 1 mL を 20 日間反復投与した結果、ごく軽度の紅斑を発現したが、膺紅斑スコアにプラセボクリームと有意差は認められなかった（報告書番号 802-10 T1163）。

5%及び 10%SKA-01 乳剤のウサギ眼粘膜刺激試験では、結膜充血、眼瞼腫脹、角膜損傷等の重度かつ持続性のある刺激反応が認められたことから、眼への投与は禁忌であると考えられた（報告書番号 802-10 T1018）。

2.4.4.7 その他の毒性試験

(1) 不純物の毒性試験

5%SKA-01 クリーム劣化製剤 0.6 mL/kg/日（不純物として類縁物質 A と類縁物質 B の合計が※ 0.59 %（0.0885 mg/kg/日）、その他類縁物質 C※ 0.13 %、未同定物質 0.11 %を含む）を直腸内に 2 週間投与した結果、全身性の異常は認められず、類縁物質 A＋類縁物質 B※ の全身作用における無毒性量は 0.0885 mg/kg/日と推察された（報告書番号 VKS/0057）。局所作用として粘膜の糜爛が認められた。

S.typhimurium 及び *E.coli* を用いた復帰突然変異試験において、類縁物質 A と類縁物質 B の合計※を約 0.4 %含有するプロピトカイン塩酸塩は、代謝活性化の有無にかかわらず、5110 µg/plate の濃度まで復帰変異コロニーの増加を引き起こさず、細菌に変異原性を示さなかった（報告書番号 0760BV）。

また、初代培養ヒトリンパ球を用いた染色体異常試験において、類縁物質 A と類縁物質 B の合計※を約 0.5 %含有するプロピトカイン塩酸塩は、5.0 mmol/L（プロピトカインとして 1100 µg/mL）の用量まで染色体異常を誘発しなかった（報告書番号 0051YX）。

以上の試験結果から、類縁物質 A 及び類縁物質 B※ 含有プロピトカイン塩酸塩は遺伝毒性を有していないと考えられた。

不純物含有 SKA-01 クリーム（0.14%類縁物質 A※ 、0.83%類縁物質 B※ 及び 0.48%類縁物質 C※ 含有）5 g

（5 mL）を、ミニブタ側腹部皮膚に 24 時間閉塞塗布したところ、非常にわずかな紅斑が SKA-01 クリーム及び不純物含有 SKA-01 クリームの塗布部位に認められたが、組織変化はいずれの処置においても認められず、不純物含有 SKA-01 クリームは、不純物を含まない SKA-01 クリームと同程度の忍容性を示した。

(2) 代謝物の毒性試験

1) 2,6-xylydine（リドカイン代謝物）

雄性 CF-1 マウスに経口投与したとき、LD₅₀ は 710 mg/kg、雄性 SD ラットに経口投与したとき LD₅₀ は 1230 mg/kg³⁵⁾、雄性 Fischer 344 ラットに経口投与したとき、LD₅₀ は 630 mg/kg（溶媒なし）

※ 新薬承認情報提供時に置き換えた。

であった³⁶⁾。コーン油を溶媒として経口投与したときの LD₅₀ は、雌性 Fischer 344 ラットで 1160 mg/kg³⁷⁾であり、雌雄 CD ラットで 1270～1310 mg/kg と推察された³⁸⁾。

S.typhimurim における変異原性試験において、代謝の有無に関わらず変異原性は認められなかった又は弱い変異原性が認められた³⁹⁻⁴¹⁾。チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞においては遺伝毒性が認められた⁴²⁾。ICR マウス小核試験において、遺伝毒性は認められなかった^{43,44)}。

ラットに、2,6-xylydine 約 15、50、150 mg/kg/日相当を 2 年間混餌投与した結果、150 mg/kg/日投与群において雌雄ラットの鼻腔にがん及び腺腫が発現した。50 mg/kg/日投与群では対照群に比べて鼻腔のがん及び腺腫の発現頻度に著しい増加は認められなかった。15 mg/kg/日投与群及び対照群では鼻腔の腫瘍は認められなかった^{37,38)}。

2) *o*-toluidine (プロピトカイン代謝物)

雄性 SD ラット経口投与において、LD₅₀ は 900 mg/kg、ウサギ経皮投与において、LD₅₀ は 3250 mg/kg という報告がある^{45,46)}。ウサギ局所投与において軽度の皮膚刺激性及び強い眼刺激性を有する⁴⁶⁾。

遺伝毒性については、相反する数多くの報告があり、国際がん研究機関 (IARC) による評価が作成されている⁴⁷⁾。

細菌 (*S.typhimurium*, *E.coli*) の復帰突然変異性試験において陰性⁴⁸⁻⁵²⁾であったが、S9 mix 添加条件下では、陽性の報告⁵³⁾がある。ほ乳類細胞 (CHO 細胞) の *in vitro* 姉妹染色分体交換 (SCE) 試験及び染色体損傷試験において、陰性^{54,55)}及び陽性⁵⁶⁾の報告がある。遺伝子突然変異誘発試験 (L5178Ytk⁺) において陰性⁵⁷⁾、S9 mix 添加条件下において陽性であった⁵⁸⁾。ヒトリンフォーマ細胞の小核試験で代謝活性化有無に関わらず陽性であった⁵⁹⁾。

ラット肝細胞不定期 DNA 合成 (UDS) 試験において陰性であった^{48,60,61)}。Hela 細胞 UDS 試験において、S9 mix 添加条件下で、陽性であった⁶²⁾。ラット肝細胞⁶³⁾、CHO 細胞⁵⁴⁾の DNA 単鎖切断試験において陽性であった。

また *in vivo* 試験 (マウス) では小核試験で陰性⁶⁴⁻⁶⁶⁾、SCE 及び DNA 切断試験で陽性であった^{66,67)}。

雌雄 B6C3F1 マウスに、*o*-toluidine 塩酸塩を 102～103 週間混餌 (1000 又は 3000 ppm 含有、約 170 mg/kg/日及び 500 mg/kg/日に相当) にて投与した。その結果、雌雄共に、投与量依存的に種々の腫瘍が誘導されたが、雄では血管肉腫の、雌では肝細胞がん及び肝細胞腺腫の発現頻度が有意に高かった⁶⁸⁾。

雌雄 Fischer 344 ラットに、*o*-toluidine 塩酸塩を 101～104 週間混餌 (3000 ppm 及び 6000 ppm、約 150 mg/kg/日及び 300 mg/kg/日に相当) 投与した。その結果、雌雄共に、投与量依存的に多くの臓器で肉腫、線維肉腫、血管肉腫及び骨肉腫の有意な増加が認められた。また雄で腹腔・陰囊中皮腫及び皮下線維腫、雌で移行性の膀胱がん、乳腺の線維腺腫及び腺腫の有意な増加が認められた⁶⁸⁾。もっとも頻度が高かった悪性腫瘍は膀胱の移行上皮がんであった。

(3) メトヘモグロビン血症

ネコにおいて、リドカイン 47 mg/kg 及び 2,6-xylydine 30 mg/kg の静脈内投与において、メトヘ

モグロビン血症が認められている^{69,70)}

ネコにプロピトカイン塩酸塩及び *o*-toluidine 塩酸塩の筋肉内投与において、プロピトカイン塩酸塩 7.5 mg/kg 超及び *o*-toluidine 塩酸塩 5.0 mg/kg 超の用量でメトヘモグロビン生成が認められている。一方、リドカイン及び代謝物である 2,6-xylylidine の筋肉内投与ではメトヘモグロビン生成が認められなかった⁷¹⁾。

(4) 耳毒性

モルモットの外耳に 5%SKA-01 クリームを注入したところ、中耳、又は内耳の形態変化は見られなかったが⁷²⁾、ラット及びモルモットの鼓膜、中耳及び内耳に投与した場合、投与部位の形態的な変化が生じることが観察されている^{73,74)}

2.4.5 総括及び結論

2.4.5.1 薬理試験

効力を裏付ける試験：

SKA-01 乳剤は、正常皮膚及び角質層剥離皮膚のいずれにおいても、濃度依存的な局所麻酔効果を示し、対応する濃度のリドカイン乳剤あるいはプロピトカイン乳剤の局所麻酔効果より強い局所麻酔効果を示した。さらに、モルモットの背部皮膚角質層を剥離すると、SKA-01 乳剤の局所麻酔効果は増大した。すなわち、リドカインとプロピトカインを配合した SKA-01 乳剤の局所麻酔効果はそれぞれ単剤の局所麻酔効果より強く、その配合意義の科学的合理性が示唆された。

安全性薬理試験：

SKA-01 クリームを経皮塗布及び直腸内投与した毒性試験では、生命維持に係わる生理機能に影響を与えるほどの両成分の全身的な曝露は生じず、リドカイン及びプロピトカインの静脈内投与時に報告されているような臨床的に問題となると予測される薬理作用は認められなかった。

2.4.5.2 薬物動態試験

プロピトカイン塩酸塩とプロピトカインの吸収性は、ラット及びイヌを用いた皮下投与試験により大きな差異がないと判断された。

SKA-01 クリームの経皮吸収は、モルモットを用いた試験により、両有効成分が速やかに皮内に取り込まれることが示された。経皮投与後の皮膚浸透性は、各単剤クリームよりも SKA-01 クリームのほうが優れており、配合意義が示された局所麻酔効果の結果が裏付けられた。

SKA-01 クリームの経皮投与後の吸収は速やかであり、血中の両有効成分は代謝され速やかに消失すると考えられた。

2.4.5.3 毒性試験

リドカイン及びプロピトカインの共融混合物である SKA-01、又はリドカイン（塩酸塩）及びプロピトカイン（塩酸塩）の毒性に関し以下の結論が得られた。

- 1) 単回投与毒性試験の結果、SKA-01 乳剤、リドカイン塩酸塩・プロピトカイン塩酸塩混合物投与において、一方の試験物質が他方の毒性を増強しないことが示唆された。
- 2) 反復投与毒性試験の結果、SKA-01 クリーム投与による異常は認められなかった。
- 3) 遺伝毒性試験の結果、単体のリドカイン塩酸塩及びプロピトカイン塩酸塩にはいずれも遺伝毒性は認められなかった。
- 4) 生殖発生毒性試験の結果、リドカイン塩酸塩・プロピトカイン塩酸塩混合物投与により胚・胎児発生に影響を及ぼさなかった。
- 5) 皮膚刺激性試験の結果、SKA-01 クリームの投与部位に紅斑の発現がみられ、軽度の刺激性を示したが、持続性は認められなかった。
- 6) 眼粘膜刺激性試験の結果、強い刺激性が認められた。
- 7) 製剤中の分解生成物として類縁物質 A 及び類縁物質 B[※] が存在するが、反復投与毒性試験において異常所見は認められず、遺伝毒性も認められなかった。

2.4.5.4 総合評価

2.4.5.4.1 毒性作用の相乗的発現の可能性

マウス及びラットに、リドカイン塩酸塩、プロピトカイン塩酸塩又はリドカイン塩酸塩・プロピトカイン塩酸塩混合物を静脈内投与した際の毒性所見（自発運動低下、不動、嗜眠、努力性呼吸、呼吸困難とチアノーゼに関連した意識減退や痙攣）及び概略の致死量（リドカイン塩酸塩は 60 mg/kg 及び 18 mg/kg、プロピトカイン塩酸塩は 80 mg/kg 及び 35 mg/kg、リドカイン塩酸塩・プロピトカイン塩酸塩混合物は 60 mg/kg 及び 29 mg/kg (リドカイン 24.3 mg/kg /プロピトカイン 25.8 mg/kg 及びリドカイン 11.7 mg/kg /プロピトカイン 12.5 mg/kg)）、さらにラットに、10%リドカイン乳剤、10%プロピトカイン乳剤又は 10%SKA-01 乳剤を皮下投与した際の毒性所見（顕著な自発運動低下、呼吸困難、流涙、体温低下及び強直性痙攣）及び死亡動物数より、一方の薬物が他方の薬物の毒性を増強しないことが示唆された。

また薬物動態における相互作用の可能性は低いと推察されていることから（2.6.4.9）、本剤における両成分の毒性作用の相乗的発現の可能性は極めて低いと考えられる。

2.4.5.4.2 全身性作用の可能性について

単回投与毒性試験及び反復投与毒性試験の高用量投与群において、自発運動低下、不動、嗜眠、努力性呼吸、呼吸困難とチアノーゼに関連した意識減退や痙攣等が認められた。リドカイン及びプロピトカインはアミド系局所麻酔薬として、全身性の血管作用及び神経作用を有し、これらの毒性症状もアミド系局所麻酔薬のものとして既知の作用・症状である⁷⁻¹²⁾。したがって、上記試験で認められた全身性作用は、リドカイン及びプロピトカインの薬理作用に伴う症状であると考えられる。

ヒトにおいてこれらの有害作用は血中濃度に比例すること及びこれらの作用が生ずる血中濃度は詳細な報告がある^{1, 8-10, 25, 75-77)}。

リドカインはヒトにおいて約 5 µg/mL の血中濃度で中枢神経系に対する毒性作用（ふらつき、

耳鳴等)が発現し始め、さらに血中濃度が上昇した場合、10 µg/mL 以上で中枢興奮による痙攣を生じ、20 µg/mL 以上になると、呼吸抑制による呼吸停止により死亡する^{1, 8-10, 25, 75-77)}。動物においても同様の血中濃度で毒性が発現することが知られている^{7,12)}。

プロピトカインの毒性作用が発現し始める血中濃度はリドカインと同程度と考えられること^{7,77)}、またリドカイン及びプロピトカインの毒性試験結果から、一方が他方の毒性を増強しないことを考慮すると (2.4.5.4.1)、両局所麻酔薬の血漿中濃度の和が約 5 µg/mL 以上になると全身的な毒性が発現すると考えられる^{1, 8-10, 25, 75-77)}。

本邦の SKA-01 臨床試験において、ヒト顔面 100 cm² に 5%SKA-01 クリーム 10 g を投与した場合のリドカイン及びプロピトカインの C_{max} の和は平均 0.159 µg/mL (最高 0.2037 µg/mL) であり、全身作用発現濃度 (約 5 µg/mL) よりも、十分に低いものであった (2.7.2.2.2 国内第 I 相薬物動態試験の項参照)。

さらに外国での臨床試験で腿の内側に大量 (60 g) の SKA-01 クリームを 400 cm² に 3 時間または 24 時間塗布した場合のリドカイン及びプロピトカインの C_{max} の和はそれぞれ 0.187 µg/mL 及び 0.421 µg/mL であった (2.7.2.2.7 塗布時間別の薬物動態試験の項参照)。またアトピー性皮膚炎のような損傷皮膚に塗布された場合 (10 g/100 cm²) でも、血中濃度は 0.5 µg/mL を越えなかった⁷⁸⁾。皮膚移植において、極度の広範囲 (1000 cm²) に 5%SKA-01 クリームを適用した場合、リドカイン及びプロピトカインの血中濃度がそれぞれ 1.1 µg/mL 及び 0.2 µg/mL まで上昇した報告があるもの⁷⁹⁾、全身作用発現濃度 (約 5 µg/mL) よりなお十分に低く、いずれの試験、報告においても全身的作用は認められなかった。

よって、本剤の臨床使用条件において、リドカイン/プロピトカインが有害作用を生ずる血中濃度まで、上昇することはないと考えられる。したがって、SKA-01 クリームの臨床使用において、これらの症状が発現する可能性は極めて低く、問題とならないと考えられる。

2.4.5.4.3 代謝物のがん原性について

リドカイン・プロピトカインの発がん性を示した報告はないが、リドカイン代謝物である 2,6-xylylidine については、国際がん研究機関 (IARC) において Group2B に分類されている。またプロピトカインの代謝物である *o*-toluidine については、Group1 に分類され、ヒト膀胱がんとの関連が示されている⁴⁷⁾。そこで本剤の臨床使用における発がんの可能性について以下に考察した。

1. 2,6-xylylidine

雌雄 CD ラットに、リドカインの代謝物である 2,6-xylylidine を 2 年間混餌投与した結果、3000 ppm (150 mg/kg) 投与群では雌雄ラットの鼻腔にがん及び腺腫が発現した。この鼻腔腫瘍の発生率を指標とした場合の生涯余剰発がん率は 6.43×10^{-7} であり、 10^{-5} を十分に下回るものであった⁸⁰⁾。

2. *o*-toluidine

本剤の臨床使用における *o*-toluidine による発がんリスクについて、United States Environmental Protection Agency のガイドライン (Guidelines for Carcinogen Risk Assessment, U.S.EPA 2005)⁸¹⁾

の手順に沿って検討した。

I. 有害性の確認

(1) ヒトでの研究

o-toluidine は染色液、ゴム製品の製造工程において広く使用されている。これらの製造工程に従事する従業員について、*o*-toluidine の職業曝露による発がん性を検討したコホート研究が実施されている。

Stasik は、*o*-toluidine を含む 4 つの単環アミンを使用していたドイツの化学工場の作業員 116 名について、膀胱がんの標準化罹患比 (Standardized Incidence Ratio: SIR) は 72.7 (95% 信頼区間 [confidence interval: CI] = 31.4 - 143.3 ; 8 例) であったことを報告している⁸²⁾。

Ward らは米国の化学工場では *o*-toluidine 及びアニリンに曝露された作業員の膀胱がんについて報告している。全従業員 1749 名のうちでの 13 例の膀胱がんが確認され、SIR は 3.6 (95% CI = 1.9 - 6.2) であった。

o-toluidine に「確実に曝露された」、「おそらく曝露された」及び「おそらく曝露されていない」各群の膀胱がん SIR は、それぞれ 6.5 (95% CI = 2.06 - 13.3 ; 7 例)、3.7 (95% CI = 1.0 - 9.4 ; 4 例)、及び 1.4 (95% CI = 0.2 - 5.0 ; 2 例) であった。

膀胱がんのリスクは曝露期間と最初の曝露以後の時間と共に増大した。これらの化学物質に 5 年未満、5 年以上 10 年未満、及び 10 年以上「確実に曝露された」作業員の膀胱がんの SIR は、それぞれ 0 (0 例)、8.8 (90% CI = 0.45 - 41.7 ; 1 例)、及び 27.2 (90% CI = 11.8 - 53.7 ; 6 例) であった。また、その工場の「確実に曝露された」部門で最初に勤務してから 10 年未満、10~20 年、及び 20 年を超えている作業員の膀胱がんの SIR は、それぞれ 0 (0 例)、2.03 (90% CI = 0.10 - 9.64 ; 1 例)、及び 16.4 (90% CI = 7.13 - 32.3 ; 6 例) であった⁸³⁾。

また米国の化学工場では *o*-toluidine 及びアニリンに混合曝露されている可能性のある作業員の尿中の *o*-toluidine 及び血中ヘモグロビン付加物が測定されており、*o*-toluidine の曝露量はアニリンより多いこと、また血中のヘモグロビン付加物の量は既知の膀胱がん誘発物質である 4-アミノビフェニルの曝露よりはるかに多いことが確認されている⁸⁴⁾。

Sorahan らは、英国のゴム工場では *o*-toluidine を含む 4 つの芳香族アミンに曝露した作業員 2160 人の膀胱がんについて報告している。このうち 53 人が *o*-toluidine に曝露し、うち 3 人が膀胱がんにより死亡しており、標準化死亡比 (Standardized Mortality Ratio: SMR) は 15.9 (95% CI = 3.3 - 46.4) であった。また、*o*-toluidine 曝露期間と膀胱がん相対危険度 (Relative Risk: RR) の間に有意な相関が認められている (1~4 年、2 例、RR 6.7; 95% CI = 1.6 - 28.4、5 年以上、1 例 RR 7.7; 95% CI = 1.0 - 56.9)⁸⁵⁾。

(2) 動物実験

マウス (2 試験)、ラット (4 試験) 及びハムスター (1 試験) の長期発がん性試験が行われている。以下にその試験の概略を示す。(カッコ内の *P* 値は特に記載がない場合、Fisher exact test における対照群に対する *P* 値を示す。)

(i) マウス National Cancer Institute (NCI), 1979⁶⁸⁾

B6C3F1 マウス雌雄各 50 匹に、*o*-toluidine 塩酸塩を混餌により 1,000 又は 3,000 ppm (約 110 又は 340 mg/kg/day) を 102~103 週間投与した。対照群は雌雄各 20 匹であった。肝細胞腺腫及び肝細胞がん(雌)の発生率は、対照群、低用量群及び高用量群でそれぞれ、0/20、4/49、13/50 ($P<0.007$ 、Cochran-Armitage 傾向検定 $P=0.001$)、血管腫及び血管肉腫(雄)の発生率は、1/19、2/50、12/50 ($P<0.002$ 、Cochran-Armitage 傾向検定)で有意に増加した。

(ii) マウス Weisburger ら, 1978⁸⁶⁾

雌雄各群それぞれ 25 匹の Swiss CD-1 マウスに、*o*-toluidine 塩酸塩を混餌により 16,000 又は 32,000 ppm (約 1,800 又は 3,600 mg/kg/day) を 3 ヶ月間投与した。過度の毒性のため、濃度を 8,000 と 16,000 ppm (約 400 又は 800 mg/kg/day) に減らし、さらに 15 ヶ月間投与してから、3 ヶ月間の観察・回復期間が設定された。腹部の血管肉腫及び血管腫の発生率は、対照群、プールドコントロール群、低用量群、及び高用量群において、それぞれ、雄では 0/14、5/99、5/14 (対照群及びプールドコントロール群の両群に対し $P<0.025$)、及び 9/11 (対照群及びプールドコントロール群の両群に対し $P<0.025$)、雌では 0/15、9/102、5/18 (対照群及びプールドコントロール群の両群に対し $P<0.05$)、及び 9/21 (対照群及びプールドコントロール群の両群に対し $P<0.025$) であった。

(iii) ラット National Cancer Institute (NCI), 1979⁶⁸⁾

F344 ラット雌雄各 50 匹に、*o*-toluidine 塩酸塩を混餌により 3,000 又は 6,000 ppm を 101~104 週間投与した (約 150 又は 300 mg/kg/day)。対照群は雌雄各 20 匹であった。

対照、低用量、及び高用量群で、腎臓での肉腫、血管肉腫及び骨肉腫を合わせた発生率は、雌ではそれぞれ 0/20、9/49 ($P = 0.36$)、及び 12/49 ($P = 0.01$ 、Cochran-Armitage 傾向検定 $P<0.001$)であり、雄ではそれぞれ 0/20、8/49、及び 4/42 であった。

多くの器官(特定されていない)における肉腫、線維肉腫、血管肉腫及び骨肉腫を合わせた発生率は、対照、低用量及び高用量群に対して、それぞれ、雌では 0/20、3/50、及び 21/49 ($P<0.001$ 、Cochran-Armitage 傾向検定 $P<0.001$)であり、雄では 0/20、15/50 ($P = 0.003$)、及び 37/49 ($P<0.001$ 、Cochran-Armitage 傾向検定 $P<0.001$)であった。

雌ラットでは、対照、低用量、及び高用量群で、膀胱の移行上皮がんの発生率は対照群、3,000 又は 6,000 ppm 群でそれぞれ 0/20、9/45 ($p = 0.028$)、及び 22/47 ($P<0.001$ 、Cochran-Armitage 傾向検定 $P<0.001$)であったが、雄ラットではそれぞれ、0/20、3/50、0/44 で発生率は用量依存的ではなかった。精巣の漿膜(腹膜)の悪性中皮腫の発生率は、対照、低用量、及び高用量群で、それぞれ 0/20、10/50 及び 6/49 であった。対照ラットでは認められなかったが、*o*-toluidine 投与群では脾臓線維腫が見られた。しかし、その発生率は低用量群の雄だけに有意に増加していた(10/49、 $P = 0.024$)。

対照、低用量、及び高用量群の雄で皮膚線維腫の発生率は、それぞれ 0/20、28/50 ($P<0.001$)、及び 27/49 ($P<0.001$)であり、雌で乳腺線維腺腫発生率は、それぞれ 6/20、20/50、及び 35/49 ($P = 0.002$ 、Cochran-Armitage 傾向検定 $P<0.001$)であった。

(iv) ラット Hecht ら 1982⁸⁷⁾

雄F344 ラット30 匹に、*o*-toluidine塩酸塩を混餌により4,000 ppm (約140 mg/kg/day)、72 週間

投与した。投与後16 週間の回復期間を設けた。対照群は雄30匹であった。

o-toluidine 投与は生存率を低下させた（生存ラットは曝露群で6/30、対照群で18/30）。対照群と *o*-toluidine 塩酸塩投与群の各腫瘍発生率は、それぞれ、皮膚線維腫で1/27、25/30（ $P<0.001$ ）、脾臓線維腫で0/27、10/30（ $P<0.001$ ）、乳腺線維腺腫で0/27、11/30（ $P<0.001$ ）、腹膜腫瘍で0/27、9/30（ $P<0.01$ ）であった。

(v) ラット Weisburger ら 1978⁸⁶⁾

各群 25 匹の雄 Charles River CD ラットに、*o*-toluidine 塩酸塩を混餌により 8,000 及び 16,000 ppm を 3 ヶ月間投与した（約 800 又は 1,600 mg/kg/day）。過度の毒性のため、投与濃度を 4,000 及び 8,000 ppm（約 400 又は 800 mg/kg）に減らして、さらに 15 ヶ月間投与してから、6 ヶ月の観察・回復期間が設定された。

o-toluidine に曝露されたラットでは、皮下線維腫及び線維肉腫の発生率是对應對照群、プールドコントロール群、低用量群及び高用量群で、それぞれ 0/16、18/111、18/23（ $P<0.025$ ）及び 21/24（ $P<0.025$ ）であり、統計的に有意に増加していた。

膀胱の移行上皮がんの発生率は、對應對照群、プールドコントロール群、低用量群及び高用量群において、それぞれ 0/16、5/111、3/23 及び 4/24 であり有意な増加は認められなかった。

(vi) ラット NTP 1996⁸⁸⁾

F344/N ラット雄各群 20 匹に、*o*-toluidine 塩酸塩を混餌により 5,000 ppm を投与した。グループ 1 は 13 週間投与後、グループ 2 は 13 週間投与後 13 週間の回復期間経過後、グループ 3 は 26 週間投与後に剖検を行った。各グループの平均投与量は、それぞれ 301、304、285 mg/kg/day であった。膀胱移行上皮の過形成が発生し、対照群、グループ 1、グループ 2、グループ 3 でそれぞれ、0/10、10/20（ $P<0.01$ ）、0/20、17/20（ $P<0.01$ ）であった。また、グループ 2 では対照群、グループ 1 及び 3 では認められなかった中皮腫の発生が認められた（2/20）。

(vii) ハムスター（皮下投与）Hecht ら 1983⁸⁹⁾

シリアンゴールデンハムスター雌雄各群 15 匹に、ピーナツ油に溶解した *o*-toluidine（塩基）2 mg/kg を週 1 回、52 週間皮下投与した。対照群はピーナツ油のみ投与した。*o*-toluidine 投与群の生存日数は、雄では 61.3 週、雌では 57.8 週と対照群の 75.5 週、68.7 週と比べて短縮した。また、腫瘍発生率は対照群と *o*-toluidine 投与群で有意な差は認められなかった。

(3) その他メカニズム等の研究

① *o*-toluidine の代謝

o-toluidine は吸収後、芳香環の水酸化、*N*-酸化、*N*-アセチル化などの反応を受け、種々の代謝物を生ずる。代謝物の大半は硫酸及びグルクロン酸抱合を受けて尿中に排泄される。主たる代謝経路は芳香環の水酸化及び *N*-アセチル化であり、4-hydroxy-*o*-toluidine（4-アミノ-5-メチルフェノール）及び 6-hydroxy-*o*-toluidine（2-アミノ-3-メチルフェノール）、*N*-acetyl-*o*-toluidine が生じる³⁴⁾。

雄 F344 ラットに *o*-toluidine 塩酸塩を 400 mg/kg 皮下投与したとき、24 及び 48 時間後の尿中に放射活性の 56.4 % 及び 79.2 % が排泄された。24 時間以内尿中排泄量は、4-hydroxy-*o*-toluidine（4-アミノ-5-メチルフェノール）の硫酸抱合体 27.8 % 及びグルクロン酸抱合体 2.6 %、6-hydroxy

-*o*-toluidine (2-アミノ-3-メチルフェノール) の硫酸抱合体 2.1 %、*N*-アセチル-4-アミノ-5-メチルフェノールの硫酸抱合体 8.5 %及びグルクロン酸抱合体 2.8 %であった。*o*-ニトロソトルエンは 0.1 %以下であった³⁴⁾。雄 F344 ラットに *o*-toluidine 塩酸塩を 88 mg/kg 皮下投与したとき、6 時間以内の尿中に *N*-hydroxy-*o*-toluidine 0.11 %が排泄された⁹⁰⁾。

ヒトでは、プロピトカインを 20 mg/kg 皮下投与したとき、24 時間以内の尿中に 4-hydroxy-*o*-toluidine 34.2 %、6-hydroxy-*o*-toluidine 2.7 %が排泄されたという報告がある²⁹⁾。

なお *o*-toluidine を代謝する酵素は現在のところ同定されていない。*o*-toluidine の酸化酵素としては CYP2A6 及び CYP2E1 の関与が示唆されているが⁴⁷⁾、*o*-toluidine の *N*-酸化におけるこれらの酵素の関与の有無については報告がない。

② 変異原性 (mutagenicity)

細菌を用いたほとんどの試験では陰性の報告がなされている^{47, 91)}。しかし一部の菌株において代謝活性化後の試験で陽性の報告がある^{53, 92)}。*o*-toluidine とその一連の代謝物の変異原性を検討した試験において、*o*-toluidine は陰性であったが、代謝物のうち、*N*-hydroxy-*o*-toluidine 及び 2-メチルニトロソベンゼン (*o*-ニトロソトルエン) は代謝活性下において、強い変異原性を示すことが報告されている⁹²⁾。

③ DNA との相互作用

In vitro 及び *in vivo* 試験において、*o*-toluidine DNA 付加物 (DNA-adduct) の生成が認められている。*In vitro* 代謝条件下で、ウシ胸腺 DNA との結合が認められている。またラットに *o*-toluidine を経口投与したとき、肝臓 DNA への結合が認められている⁹³⁾。ラットに投与したとき、小核を有する網状赤血球の発現増加が認められている⁹⁴⁾。DNA と結合するのは *o*-toluidine の *N*-酸化代謝物であることが示されており⁹⁵⁾、*N*-acetoxo-*o*-toluidine (及びそのカチオン体) が DNA と結合すると推定される⁹⁶⁾。

④ DNA 鎖損傷

ラット肝細胞、ヒト由来初代培養細胞及び細胞株 (MCL-5) において、非代謝活性化下で DNA 鎖切断 (コメットアッセイ) が認められている⁹⁷⁾。ラット肝細胞不定期 DNA 合成 (unscheduled DNA synthesis; UDS) 試験において、陰性の報告があるが^{60, 61)}、Hela 細胞を用いた UDS 試験において、S9 mix 存在下において陽性⁶²⁾、ラット肝細胞及びチャイニーズハムスター卵巣細胞 (CHO 細胞) の DNA 単鎖切断試験において陽性の報告がある^{54, 63)}。

In vivo 試験では、マウスで胃、膀胱、肺、肝臓、脳において DNA 単鎖切断の増加が認められた⁶⁷⁾。

⑤ ヘモグロビン及びアルブミンとの結合

ラットに腹腔内投与したとき、血中で toluidine ヘモグロビン付加物及び toluidine アルブミン付加物の増加が認められている⁹⁸⁾。toluidine ヘモグロビン付加物の濃度は *o*-toluidine 投与量に比例

し、半減期は約 11 日であった^{98,99)}。ヒトにおいても *o*-toluidine に曝露した血中においてヘモグロビン付加物が認められている⁸⁴⁾。プロピトカイン (*o*-toluidine に代謝される) を皮下投与されたヒトの 24 時間後の血中において、ヘモグロビン付加物濃度が上昇していることが報告されている。このときプロピトカイン投与量の約 0.034 % の *o*-toluidine がヘモグロビンに結合していると推定されている¹⁰⁰⁾。

⑥ 構造活性相関

一般的に芳香族アミンはヘモグロビン結合性を有し、その中でも発がん性及びその可能性が疑われている化合物が複数存在する。一般的にオルト位がアルキル化された芳香族アミンは、他の部位 (メタ位、パラ位) がアルキル化されたものより、遺伝毒性、がん原性が強まる傾向が認められている^{101, 102)}。

(4) 総合評価

以上より、*o*-toluidine は、ヒトにおいて職業的に大量の曝露を受けたと思われるグループに発がん性が認められ、その標的臓器は膀胱である。作用機序として *N*-酸化代謝物である *N*-acetoxy-*o*-toluidine (及びそのカチオン体) の DNA との結合が推定される。

II. 用量反応評価

(1) 用量反応性

発がんをエンドポイントとした場合、ヒトで曝露期間と膀胱がんの相関が報告されているが、曝露量は測定されておらず、曝露経路も確定されていないため (吸入及び経皮と考えられている)、厳密な用量反応性は不明である。しかし、Ward らの結果から推定すると、曝露量及び曝露時間に依存すると推定できる。

動物においては、マウス及びラットを用いた複数の試験で良性又は悪性腫瘍の用量依存的な発生増加が認められている。なお、無毒性量 (NOAEL) が求められている試験はない。

(2) 用量反応性の外挿方法の選択

o-toluidine は、DNA との結合及び DNA 鎖切断作用を示すことが報告されている。また、遺伝毒性について、閾値の存在を示す明らかな報告もない。したがって、発がん性については閾値がないものと仮定し、保守的な用量反応性の外挿方法として、線形マルチステージモデル (Linear multistage model)¹⁰³⁾ またはベンチマーク ドーズモデル⁸¹⁾ を選択することが妥当と考えられる。

動物試験において認められた悪性腫瘍の中で最も発現頻度が高く、用量反応性が認められたのはラット膀胱がんである。また膀胱がんはヒトにおいて *o*-toluidine 曝露との関係が示されているがん腫である。したがって、低用量外挿の根拠として最も適切であると考えられる。これに加え良性腫瘍で最も発現頻度が高かった皮下線維腫についても評価を実施した。

① ラット膀胱がんを指標とした低用量外挿

(i) 線形マルチステージモデル (Linearized multi-stage model)

NCI (1979) の結果に、線形マルチステージモデルを適用すると、非調整スロープファクターは 1.81×10^{-3} である¹⁰⁴⁾。この非調整値 (unadjusted q1) を、動物試験における試験期間及びヒトと動物の体重比により調整したヒトでのスロープファクター (q_{human}) は 6.81×10^{-3} となる。なおヒト体重は 50 kg とし、ヒトスロープファクター (q_{human}) = 非調整 q1 $\times$ (生涯期間 / 試験期間)³ $\times$ (ヒト体重/動物体重)^{1/4} として計算した。

(ii) ベンチマークドーズモデル (Benchmark Dose model)

NCI (1979) の結果に、10% 発がんリスクの 95%信頼下限値を元にしたベンチマークドーズモデルを適用すると、非調整スロープファクターは 3.03×10^{-3} であり、上記式により調整したヒトスロープファクターは 1.25×10^{-2} である。なおスロープファクターの計算には BMDS version 2.1.2 (U.S.EPA 2010) を用いた。

② ラット皮下線維腫を指標とした低用量外挿

NCI の結果及び Weisburger らの結果にベンチマークドーズモデルを適用すると、非調整スロープファクターはそれぞれ、 5.76×10^{-3} 及び 1.12×10^{-2} であり、上記式により調整したヒトスロープファクターは、NCI の結果によれば 2.10×10^{-2} 、Weisburger らの結果によれば 3.77×10^{-2} である。これらラット 2 試験の皮下線維腫を指標としたスロープファクターの幾何平均値は、 2.81×10^{-2} となる。

III. 有害性評価

上記の有害性確認及び用量反応評価に基づく、*o*-toluidine は、ヒトにおいて発がん性が認められ、その標的臓器は膀胱である。発がんをエンドポイントとした場合、Ward らの結果から推定すると、曝露量及び曝露時間に依存すると推定できる。しかし、曝露量は測定されておらず、曝露経路も確定されていないためヒトにおける厳密な用量反応性は不明である。

マウス及びラットにおいて発がん性が認められ、用量反応性が認められている。DNA 結合性が認められており、ヒト膀胱がん誘発の主要な作用機序について、遺伝毒性機序の関与を否定できない。DNA 結合には、代謝による活性化 (アミノ基の酸化: *N*-酸化) が重要であることが示唆されており、*o*-toluidine の最終 *N*-酸化代謝物である *N*-acetoxy-*o*-toluidine (及びそれらのカチオン体) が発がんを直接誘発する代謝物と推定される。

IV. 曝露評価

SKA-01 クリーム顔面投与時 (10 g/100 cm²、2 時間) のプロピトカインの生物学的利用率は $8 \pm 4\%$ であり (n=10)、最大で 16% であった (2.7.1.2.1 塗布部位の BA に及ぼす影響の項参照) (なお 95%信頼区間: 4.8% - 11.4%、99%信頼区間: 3.3% - 12.9% である)。本剤の臨床最大用量は 10 g/100 cm² に最長 120 分まで密封塗布である。また生涯最大曝露回数は 10 回が想定される。

以上の条件における *o*-toluidine の曝露評価は以下の通りである。

10% が吸収され、かつその全量が *o*-toluidine に代謝されると仮定すると 12.2 mg が生成され、体重 50 kg のヒトの場合、*o*-toluidine の曝露量は 0.24 mg/kg となる。従って、5% SKA-01 クリー

ム 10 g を生涯で 10 回投与された場合、累積曝露量は 2.4 mg/kg となり、生涯曝露は 0.094 $\mu\text{g/kg/day}$ となる。

最大である 16 % が吸収され、かつその全量が *o*-toluidine に代謝されると仮定すると 19.5 mg が生成され、体重 50 kg のヒトの場合、*o*-toluidine の曝露量は 0.39 mg/kg となる。従って、5% SKA-01 クリーム 10 g を生涯で 10 回投与された場合、累積曝露量は 3.9 mg/kg となり、生涯曝露は 0.153 $\mu\text{g/kg/day}$ となる。

また皮膚局所での曝露について、プロピトカインを *o*-toluidine に代謝するカルボキシエステラーゼは皮膚に発現していることが知られているが、そのタンパク量あたりの活性は代表的な代謝器官である肝臓と比べて 10 % 以下である¹⁰⁵⁾。全身体表面積を 15,000 cm^2 とすると 100 cm^2 の塗布面積は 1/150 であり、従ってプロピトカインは表皮を透過する過程、すなわち皮膚において *o*-toluidine に代謝されうるが、その量はわずかであり、また表皮を通過した *o*-toluidine は速やかに全身血に移行すると考えられるため、*o*-toluidine が皮膚における高濃度の分布が維持されるということは考えにくい。さらに、ヒト職業曝露では *o*-toluidine の経皮吸収の可能性が示唆されているが、アニリン系の化合物に対する職業曝露においては、膀胱がんのみが増加し、皮膚、肺、消化器にはがんが発生しないことが知られており¹⁰⁶⁾、また疫学調査において皮膚がんによる死亡率は増加していないことから⁸⁵⁾、皮膚においてこれらの代謝物が、がん誘発を考慮しなければならぬほど代謝、生成していないことが考えられる。がん原性試験においては、経皮投与は実施されていないが、ハムスターに 52 週間皮下投与した実験では、皮膚及び皮下の発がんは認められていないという報告がある⁸⁹⁾。また皮膚の上皮性の腫瘍 (epithelial carcinoma) はいずれの試験においても認められていないことから、*o*-toluidine に対して皮膚の発がん感受性が特に高いということはないと考えられる。

したがって、*o*-toluidine のヒト発がん性リスク評価における曝露評価は上述の累積曝露量 2.4 mg/kg 及び生涯曝露量 0.094 $\mu\text{g/kg/day}$ (平均値)、または経皮吸収最大値を考慮した累積曝露量 3.9 mg/kg 及び生涯曝露量 0.153 $\mu\text{g/kg/day}$ (最大値) を用いることが妥当である。

V. リスク判定

本剤投与による生涯の過剰発がん率は以下ようになる。

(1) 用量反応性に基づく評価

① ラット経口投与における膀胱がん発生率による低用量外挿計算

(i) 線形マルチステージモデル(linearized multi-stage model)

このときのスロープファクターは 6.81×10^{-3} である。したがって、生涯過剰発がん率は、平均値で 6.40×10^{-7} 、最大値では 1.04×10^{-6} となる。このときの「 10^{-5} 」を許容リスクとした場合の実質安全量は、それぞれ 5%SKA-01 クリームとして、1,563 g 及び 962 g となる。

(ii) ベンチマークドーズモデル(Benchmark Dose model) (EPA 2005)

このときのスロープファクターは 1.25×10^{-2} である。したがって、生涯過剰発がん率は、平均値で 1.12×10^{-6} 、最大値では 1.91×10^{-6} となる。このときの「 10^{-5} 」を許容リスクとした場合の実質安全量は、それぞれ 5%SKA-01 クリームとして、893 g 及び 524 g となる。

② ラット経口投与における皮下線維腫発生率による低用量外挿計算

このときのスロープファクターは、 2.81×10^2 となる。したがって、生涯過剰発がん率は、平均 10 % 吸収時で 2.64×10^{-6} 、最大 16 % 吸収時では 4.30×10^{-6} となる。

このときの「 10^{-5} 」を許容リスクとした場合の実質安全量は、それぞれ、379 g 及び 233 g となる。

(2) 職業曝露との比較

各コホート研究における *o*-toluidine 曝露量が不明であるため、本邦における職業曝露許容値 1 ppm (4.4 mg/m^3)、1 日 8 時間の肉体的に激しくない労働強度における呼吸量は 10 m^3 として以下算出した^{107, 108)}。このとき体重 50 kg とした場合の 1 日あたりの曝露量は、0.88 mg/kg となる。

SKA-01 クリーム 10 g を塗布した場合に、プロピトカインが最大である 16 % 吸収され（試験報告書番号 802-10AC061-1、2.7.1.2.1 塗布部位の BA に及ぼす影響の項参照）、かつその全量が *o*-toluidine に代謝されると仮定すると 19.5 mg が生成され、体重 50 kg のヒトの場合、本剤塗布時 1 回あたりの *o*-toluidine の曝露量は 0.39 mg/kg となる。

以上より、本剤塗布時 1 回あたりの *o*-toluidine の最大推定曝露量は職業曝露 1 日あたりの許容値の 0.44 倍であることから、職業曝露 1 日量を上回ることではない。

(3) 市販後安全性調査、毒性データベース、公表論文の調査

① 市販後安全性調査（1984 年 11 月～2010 年 3 月）

SKA-01 クリーム及びパッチは 1984 年の発売以来 30 年弱にわたり使用されており、本邦申請用量 $10 \text{ g}/100 \text{ cm}^2$ を上回る $60 \text{ g}/600 \text{ cm}^2$ までの用法用量が諸外国において承認されている（M1.6.3 中核データシート）。しかしこれまで SKA-01 クリーム使用による膀胱がん及び皮膚がんを含むがんの発生は報告されていない。静脈穿刺及び血管腫等の処置の際は、SKA-01 クリーム（又はパッチ）を同一部位に数回適用することになるが、当該塗布部位にがんが誘発されたという報告も現在までなされていない（市販後安全性調査：対照期間 1984 年 11 月～2010 年 3 月）。アストラゼネカ社のプロピトカインに関するデータベースには、プロピトカイン投与との関連で 5 件の腫瘍の事例報告が存在した。しかし、3 例は既にがんを有していた患者であり、2 例は良性腫瘍であった。プロピトカイン投与とがん誘発の関連性はないと判断されている。

② Registry of Toxic Effects of Chemical Substances（RTECS）検索結果

プロピトカイン塩酸塩は、化学物質毒性データベースである RTECS に登録され（RTECS No. UG5775000）、毒性情報が蓄積されているが、発がん性に関する情報は現在のところ登録されていない（2010.10 月更新版）。なおプロピトカイン塩基は RTECS に登録がないため、検索を行うことができなかった。その他 TOXNET（Toxicology Data Network, U.S. National Library of Medicine）にプロピトカイン及びプロピトカイン塩酸塩の発がん性に関する情報は存在しなかった。また IRIS（Integrated Risk Information System, U.S.EPA）にはともに登録がなされていなかった。

③ PubMed 検索の結果

プロピトカイン（及びその同義語）及び発がん性（その他がん及びその同義語）について、検索を実施したが、プロピトカインと発がん性の関連を示唆する文献は公表されていなかった（2011年1月14日時点）。

(4) リスク判定

ヒトにおける誘発が示されている膀胱がん及び動物において最も発現頻度の高かった皮下線維腫を指標とした場合の生涯余剰発がん率は、いずれも 10^{-5} 未満であった。また職業曝露許容基準に対して、十分低値である。SKA-01 クリームは外国において上市されてすでに 30 年弱が経過しているが、上述のとおり、膀胱がん及び皮膚がんを含めたがん誘発についての報告は無い。これらを合わせて考察すると本剤使用による過剰発がんリスクは許容範囲（「 10^{-5} 」未満）と考えられる。

3. 2,6-xylylidine と *o*-toluidine の混合によるがん原性

同じ標的臓器を有する複数の発がん性物質を同時投与又は連続投与した場合、発がん性の相加効果を示すことが知られているが¹⁰⁹⁻¹¹¹⁾、ともに過剰発がん率は十分に低いため、この場合でも本剤使用による過剰発がんリスクは許容範囲と考えられる。

2.4.5.4.4 メトヘモグロビン血症について

ネコ静脈内投与において、リドカイン 47 mg/kg 及び 2,6-xylylidine 30 mg/kg 投与でメトヘモグロビン血症が認められた^{69, 70)}。

ネコにプロピトカイン塩酸塩及び代謝物である *o*-toluidine 塩酸塩を筋肉内投与したところ、プロピトカイン塩酸塩 7.5 mg/kg 超及び *o*-toluidine 塩酸塩 5.0 mg/kg 超の用量でメトヘモグロビンの生成が認められている。一方、リドカイン及び代謝物である 2,6-xylylidine の筋肉内投与ではメトヘモグロビンの生成が認められなかった⁷¹⁾。

ヒトにおいては、50 例にプロピトカイン塩酸塩 200～1600 mg（4～32 mg/kg）を硬膜外投与したところ、生成メトヘモグロビン濃度はほぼ投与量に比例し、濃度-時間推移は約 4 時間後に最高濃度に到達後は徐々に低下し、24 時間後には無投与時レベルまで低下した。1200 mg を投与した 1 例はメトヘモグロビン濃度が全ヘモグロビン濃度の 21.6 %に達し、当該被験者は軽度のチアノーゼを発現した。プロピトカイン塩酸塩の投与量が 10 mg/kg 未満の場合は、生成メトヘモグロビン濃度は全ヘモグロビン濃度の 10 %未満であることから、ヒトにおいて安全性上許容できるプロピトカイン塩酸塩の投与量の上限は 10 mg/kg と考えられた⁷¹⁾。プロピトカインの皮下投与により投与量の 34 %は 4-hydroxy-*o*-toluidine として尿中から検出され、血漿中 4-hydroxy-*o*-toluidine 濃度と生成メトヘモグロビン量との間には強い関連性が認められている²⁹⁾。

5%SKA-01 クリームの最高投与量（10 g）におけるリドカイン/プロピトカイン量は 250 mg /250 mg であり、10 mg/kg（体重 50 kg として）相当の投与量となるが、経皮投与におけるバイオアベイラビリティは約 10 %であり（2.7.1.2.1 塗布部位の BA に及ぼす影響の項参照）、メト

ヘモグロビン血症が生ずる投与量よりはるかに低いと考えられる。

しかし、メトヘモグロビン血症誘発性薬剤の投与を受けている患者に対する使用については、注意喚起が必要と考えられる。先天性メトヘモグロビン血症患者に対する使用は禁忌である。

2.4.5.4.5 局所過敏反応について

皮膚感作性試験、抗原性試験は行わなかった。アミド系局所麻酔薬によるアレルギー反応はまれであると考えられており^{8,9,12)}、また外国における本剤のヒト遅延型反応検討試験においてもアレルギー反応は認められていない(2.7.2.2.5 遅延型反応検討試験の項参照)。

しかしアミド系局所麻酔薬に対する過敏症の既往歴を有する患者には、使用しない旨の注意喚起が必要と考えられる。

2.4.5.5 結論

SKA-01 はリドカイン及びプロピトカインを含有した外用局所麻酔製剤であり、これら共融混合物の有効成分が効果的な局所麻酔作用を発揮する。

SKA-01 の薬理試験において、リドカインとプロピトカインを配合した SKA-01 の局所麻酔効果及びリドカインとプロピトカインの配合意義の科学的合理性が示唆され、動態試験及び毒性試験において、配合による毒性の増強及び新たな有害事象の発現も認められなかったことから、本剤の臨床使用における有用性及び安全性が示された。

2.4.6 参考文献

- 1) Tucker GT, Mather LE. Properties, absorption, and disposition of local anesthetic agents. In: Cousins MJ, Bridenbaugh PO, eds. *Neural Blockade in Clinical Anesthesia and Management of Pain*, 3rd edition. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia. 1998;55-95.
- 2) Ragsdale DS, McPhee JC, Scheuer T, Catterall WA. Molecular determinants of state-dependent block of Na⁺ channels by local anesthetics. *Science*. 1994;265:1724-1728.
- 3) Lipkind GM, Fozzard HA. Molecular modeling of local anesthetic drug binding by voltage-gated sodium channels. *Mol Pharmacol*. 2005;68:1611-1622.
- 4) Åström A, Persson NH. Some pharmacological properties of *o*-methyl- α -propylaminopropionanilide, a new local anaesthetic. *Brit J Pharmacol*. 1961;16:32-44.
- 5) Wiedling S. Studies on alpha-n-propylamino-2-methylpropionanilide - a new local anesthetic. *Acta Pharmacol et Toxicol*. 1960;17:233-244.
- 6) Åkerman B. On felypressin (Octapressin®) as an adjunct to lidocaine and prilocaine-an experimental study in animals. *Acta Pharmacol et Toxicol*. 1966;24:377-388.
- 7) Covino BG. Toxicity and systemic effects of local anesthetic agents. In: Stichartz GR, ed. *Local Anesthetics. Handbook of Experimental Pharmacology*. Vol.81. Springer-Verlag, Berlin. 1987;187-212.
- 8) Reynolds ADF. Local anaesthetics. In: Martindale. *The Extra Pharmacopoeia*, 29th edition. The Pharmaceutical Press, London. 1989;1205-1227.
- 9) 高折修二, 福田英臣, 赤池昭紀, 石井邦雄 (監訳). *グッドマン・ギルマン薬理書 (第11版) - 薬物治療の基礎と臨床 -*. 第14章 局所麻酔薬. 廣川書店. 2007;453-474.
- 10) Mather LE, Cousins MJ. Local anaesthetics and their current clinical use. *Drugs*. 1979;18:185-205.
- 11) Astra Läkemedel, Medical Department, Sweden. Summary of pharmacological data. 802-10 AF 6-1. 社内資料. 1982.
- 12) Feldman HS. Toxicity of local anesthetic agents. In: Rice SA, Fish KJ, eds. *Anesthetic Toxicity*. Raven Press, Ltd., New York. 1994;107-133.
- 13) Feldman HS, Covino BM, Sage DJ. Direct chronotropic and inotropic effects of local anesthetic agents in isolated guinea pig atria. *Reg Anesth*. 1982;7:149-156.
- 14) Tanz RD, Heskett T, Loehning RW, Fairfax CA. Comparative cardiotoxicity of bupivacaine and lidocaine in the isolated perfused mammalian heart. *Anesth Analg*. 1984;63:549-556.
- 15) Block A, Covino BG. Effect of local anesthetic agents on cardiac conduction and contractility. *Reg Anesth*. 1981;6:55-61.
- 16) Beutner R, Calesnick B. The essential characteristics of local anesthetic. *Anesthesiology*. 1942;3:673-682.
- 17) Simon MA, Vree TB, Gielen MJ, Booij LH. Comparison of the disposition kinetics of lidocaine and (+/-) prilocaine in 20 patients undergoing intravenous regional anaesthesia during day case surgery. *J Clin Pharm Ther*. 1997;22:141-146.

- 18) Arthur GR. Pharmacokinetics of local anesthetics. In: Stichartz GR, ed. Local Anesthetics. Handbook of Experimental Pharmacology, Vol.81. Springer-Verlag, Berline. 1987;165-186.
- 19) Åkerman B, Aström A, Ross S, Telč A. Studies on the absorption, distribution and metabolism of labelled prilocaine and lidocaine in some animal species. Acta pharmacol et Toxicol. 1966;24:389-403.
- 20) Hansen D, Ohnesorge FK, Palisaar R. Die Verteilung von ^{14}C -markiertem lidocain und prilocain nach intravenöser applikation beim meerschweinchen. Der Anaesthesist. 1968;17:168-173.
- 21) 西村 清司, 浜井 玲子, 北村 恵津子, 藤森 貢. 局所麻酔剤の蛋白結合に関する研究. 麻酔. 1975;24:245-252.
- 22) Arthur GR, Covino BG. Pharmacokinetics of local anaesthetics. Baillieres Clin Anaesthesiol. 1991;5:635-658.
- 23) Tucker GT, Boyes RN, Bridenbaugh PO, Moore DC. Binding of anilide-type local anesthetics in human plasma: II. Implications *in vivo*, with special reference to transplacental distribution. Anesthesiology. 1970;33:304-314.
- 24) Bachmann B, Biscopig J, Sinning E, Hempelmann G. Protein binding of prilocaine in human plasma: influence of concentration, pH and temperature. Acta Anaesthesiol Scand. 1990;34:311-314.
- 25) Burm AGL. Clinical pharmacokinetics of epidural and spinal anaesthesia. Clin Pharmacokinet. 1989;16:283-311.
- 26) Finster M, Morishima HO, Boyes RN, Covino BG. The placental transfer of lidocaine and its uptake by fetal tissues. Anesthesiology. 1972;36:159-163.
- 27) Katz J. An autoradiographic study of placental transmission of labelled prilocaine (Citanest) in the rat. Br J Anaes. 1969;41:929-932.
- 28) Keenaghan JB, Boyes RN. The tissue distribution, metabolism and excretion of lidocaine in rats, guinea pigs, dogs and man. J Pharmacol Exp Ther. 1972, 180: 454-463.
- 29) Hjelm M, Ragnarsson B, Wistrand P. Biochemical effects of aromatic compounds-III Ferrihaemoglobinaemia and the presence of *p*-hydroxy-*o*-toluidine in human blood after the administration of prilocaine. Biochem Pharmacol. 1972;21:2825-2834.
- 30) Bargetzi MJ, Aoyama T, Gonzalez FJ, Meyer UA. Lidocaine metabolism in human liver microsomes by cytochrome P450III A4. Clin Pharmacol Ther. 1989;46:521-527.
- 31) Imaoka S, Enomoto K, Oda Y, Asada A, Fujimori M, Shimada T. Lidocaine metabolism by human cytochrome P-450s purified from hepatic microsomes: Comparison of those with rat hepatic cytochrome P-450s. J Pharmacol Exp Ther. 1990;255:1385-1391.
- 32) Geng WP, Ebke M, Foth H. Prilocaine elimination by isolated perfused rat lung and liver. Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol. 1995;351:93-98.
- 33) Geddes IC. Studies of the metabolism of citanest C^{14} . Acta anaesth Scandinav. 1965; Supple XVI: 37-44.
- 34) Son OS, Everett DW, Fiala ES. Metabolism of *o*-[methyl- ^{14}C] toluidine in the F344 rat. Xenobiotica.

- 1980;10:457-468.
- 35) Vernot EH, MacEwen JD, Haun CC, Kinkead ER. Acute toxicity and skin corrosion data for some organic and inorganic compounds and aqueous solutions. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1977;42:417-423.
 - 36) Short CR, King C, Sistrunk PW, Kerr KM. Subacute toxicity of several ring-substituted dialkylanilines in the rat. *Fundam Appl Toxicol.* 1983;3:285-292.
 - 37) NTP (National Toxicology Program). Toxicology and carcinogenesis studies of 2,6-xylylidine (2,6-dimethylaniline) (CASNo.87-62-7) in Charles River CD rats (feed studies). Technical Report Series No.278. 1990.
 - 38) IARC (International Agency for Research on Cancer). 2,6-Dimethylaniline (2,6-Xylylidine). Occupational exposures of hairdressers and barbers and personal use of hair colourants; some hair dyes, cosmetic colourants, industrial dyestuffs and aromatic amines. IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. 1993;57:323-335.
 - 39) Florin I, Rutberg L, Curvall M, Enzell CR. Screening of tobacco smoke constituents for mutagenicity using the Ames' test. *Toxicology.* 1980;18:219-232.
 - 40) Zeiger E, Anderson B, Haworth S, Lawlor T, Mortelmans K. Salmonella mutagenicity tests: IV. Results from the testing of 300 chemicals. *Environ Mol Mutagen.* 1988;11 Suppl 12:1-158.
 - 41) Zimmer D, Mazurek J, Petzold G, Bhuyan BK. Bacterial mutagenicity and mammalian cell DNA damage by several substituted anilines. *Mutat Res.* 1980;77:317-326.
 - 42) Galloway SM, Armstrong MJ, Reuben C, Colman S, Brown B, Cannon C, Bloom AD, Nakamura F, Ahmed M, Duk S, *et al.* Chromosome aberrations and sister chromatid exchanges in Chinese hamster ovary cells: evaluations of 108 chemicals. *Environ Mol Mutagen.* 1987;10 Suppl 10:1-175.
 - 43) Parton JW, Probst GS, Garriott ML. The in vivo effect of 2,6-xylylidine on induction of micronuclei in mouse bone marrow cells. *Mutat Res.* 1988;206:281-283.
 - 44) Parton JW, Beyers JE, Garriott ML, Tamura RN. The evaluation of a multiple dosing protocol for the mouse bone-marrow micronucleus assay using benzidine and 2,6-xylylidine. *Mutat Res.* 1990;234:165-168.
 - 45) Jacobson KH. Acute oral toxicity of mono- and di-alkyl ring-substituted derivatives of aniline. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1972;22:153-154.
 - 46) Smyth HF Jr, Carpenter CP, Weil CS, Pozzani UC, Striegel JA. Range-finding toxicity data: List VI. *Am Ind Hyg Assoc J.* 1962;23:95-107.
 - 47) IARC (International Agency for Research on Cancer). IARC Monographs on the Evaluation of carcinogenic risks to humans. Some Aromatic Amines, Organic Dyes, and Related Exposures. 2010;99:395-457.
 - 48) Thompson CZ, Hill LE, Epp JK, Probst GS. The induction of bacterial mutation and hepatocyte unscheduled DNA synthesis by monosubstituted anilines. *Environ Mutagen.* 1983;5:803-811.
 - 49) Falck K, Partanen P, Sorsa M, Suovaniemi O, Vainio H. Mutascreen[®], an automated bacterial mutagenicity assay. *Mutat Res.* 1985;150:119-125.

- 50) Baker RSU, Bonin AM. Tests with the Salmonella plate-incorporation assay. In: Ashby J, de Serres FJ, Draper M, Ishidate M Jr, Margolin BH, Matter BE, Shedly MD, eds. Evaluation of Short-Term Tests for Carcinogens. Progress in Mutation Research. vol.5. Elsevier Science Publishers, Amsterdam. 1985;177-180.
- 51) Matsushima T, Muramatsu M, Haresaku M. Mutation tests on *Salmonella typhimurium* by the preincubation method. In: Ashby J, de Serres FJ, Draper M, Ishidate M Jr, Margolin BH, Matter BE, Shedly MD, eds. Evaluation of Short-Term Tests for Carcinogens. Progress in Mutation Research. vol.5. Elsevier Science Publishers, Amsterdam. 1985;181-186.
- 52) Rexroat MA, Probst GS. Mutation tests with Salmonella using the plate-incorporation assay. In: Ashby J, de Serres FJ, Draper M, Ishidate M Jr, Margolin BH, Matter BE, Shedly MD, eds. Evaluation of Short-Term Tests for Carcinogens. Progress in Mutation Research. vol.5. Elsevier Science Publishers, Amsterdam. 1985;201-212.
- 53) Zeiger E, Haworth S. Tests with preincubation modification of the Salmonella/microsome assay. In: Ashby J, de Serres FJ, Draper M, Ishidate M Jr, Margolin BH, Matter BE, Shedly MD, eds. Evaluation of Short-Term Tests for Carcinogens. Progress in Mutation Research. vol.5. Elsevier Science Publishers, Amsterdam. 1985;187-199.
- 54) Douglas GR, Blakey DH, Liu-Lee VW, Bell RDL, Bayley JM. Alkaline sucrose sedimentation, sister-chromatid exchange and micronucleus assays in CHO cells. In: Ashby J, de Serres FJ, Draper M, Ishidate M Jr, Margolin BH, Matter BE, Shedly MD, eds. Evaluation of Short-Term Tests for Carcinogens. Progress in Mutation Research. vol.5. Elsevier Science Publishers, Amsterdam. 1985;359-366.
- 55) Natarajan AT, Bussmann CJM, Van Kesteren-Van Leeuwen AC, Meijers M, Van Rijn JLS. Tests for chromosome aberrations and sister-chromatid exchanges in Chinese hamster ovary (CHO) cells in culture. In: Ashby J, de Serres FJ, Draper M, Ishidate M Jr, Margolin BH, Matter BE, Shedly MD, eds. Evaluation of Short-Term Tests for Carcinogens. Progress in Mutation Research. vol.5. Elsevier Science Publishers, Amsterdam. 1985;433-437.
- 56) Gulati DK, Sabharwal PS, Shelby MD. Tests for the induction of chromosomal aberrations and sister chromatid exchanges in cultured Chinese hamster ovary (CHO) cells. In: Ashby J, de Serres FJ, Draper M, Ishidate M Jr, Margolin BH, Matter BE, Shedly MD, eds. Evaluation of Short-Term Tests for Carcinogens. Progress in Mutation Research. vol.5. Elsevier Science Publishers, Amsterdam. 1985;413-426.
- 57) Oberly TJ, Hoffman WP, Garriott ML. An evaluation of the twofold rule for assessing a positive response in the L5178Y TK^{+/+} mouse lymphoma assay. Mutat Res. 1996;369:221-232.
- 58) Garner RC, Campbell J. Tests for the induction of mutations to ouabain or 6-thioguanine resistance in mouse lymphoma L5178Y cells. In: Ashby J, de Serres FJ, Draper M, Ishidate M Jr, Margolin BH, Matter BE, Shedly MD, eds. Evaluation of Short-Term Tests for Carcinogens. Progress in Mutation Research. vol.5. Elsevier Science Publishers, Amsterdam. 1985;525-529.

-
- 59) Vian L, Bichet N, Gouy D. The in vitro micronucleus test on isolated human lymphocytes. *Mutat Res.* 1993;291:93-102.
 - 60) Williams GM, Mori H, McQueen CA. Structure-activity relationships in the rat hepatocyte DNA-repair test for 300 chemicals. *Mutat Res.* 1989;221:263-286.
 - 61) Probst GS, Hill LE. Tests for the induction of DNA-repair synthesis in primary cultures of adult rat hepatocytes. In: Ashby J, de Serres FJ, Draper M, Ishidate M Jr, Margolin BH, Matter BE, Shedly MD, eds. *Evaluation of Short-Term Tests for Carcinogens. Progress in Mutation Research.* vol.5. Elsevier Science Publishers, Amsterdam. 1985;381-386.
 - 62) Martin CN, Campbell J. Tests for the induction of unscheduled DNA repair synthesis in HeLa cells. In: Ashby J, de Serres FJ, Draper M, Ishidate M Jr, Margolin BH, Matter BE, Shedly MD, eds. *Evaluation of Short-Term Tests for Carcinogens. Progress in Mutation Research.* vol.5. Elsevier Science Publishers, Amsterdam. 1985;375-379.
 - 63) Bradley MO. Measurement of DNA single-strand breaks by alkaline elution in rat hepatocytes. In: Ashby J, de Serres FJ, Draper M, Ishidate M Jr, Margolin BH, Matter BE, Shedly MD, eds. *Evaluation of Short-Term Tests for Carcinogens. Progress in Mutation Research.* vol.5. Elsevier Science Publishers, Amsterdam. 1985;353-357.
 - 64) Salamone MF, Heddle JA, Katz M. Mutagenic activity of 41 compounds in the in vivo micronucleus Assay. In Ashby J, de Serres FJ, eds. *Evaluation of short-term tests for carcinogens. Progress in Mutation Research.* vol.1. Elsevier Science Publishers, Amsterdam. 1981;686-697.
 - 65) Tsuchimoto T, Matter BE. Activity of coded compounds in the micronucleus test. In Ashby J, de Serres FJ, eds. *Progress in Mutation Research* vol.1. *Evaluation of short-term tests for carcinogens.* Elsevier Science Publishers, Amsterdam. 1981;705-711.
 - 66) McFee AF, Jauhar PP, Lowe KW, MacGregor JT, Wehr CM. Assays of three carcinogen/non-carcinogen chemical pairs for in vivo induction of chromosome aberrations, sister chromatid exchanges and micronuclei. *Environ Mol Mutagenesis.* 1989;14:207-220.
 - 67) Sasaki YF, Fujikawa K, Ishida K, Kawamura N, Nishikawa Y, Ohta S, Satoh M, Madarame H, Ueno S, Susa N, *et al.* The alkaline single cell gel electrophoresis assay with mouse multiple organs: results with 30 aromatic amines evaluated by the IARC and U.S. NTP. *Mut Res* 1999;440:1-18.
 - 68) National Cancer Institute. Bioassay of *o*-toluidine hydrochloride for possible carcinogenicity. Technical Report Series No.153. 1979.
 - 69) McLean S, Murphy BP, Starmer GA, Thomas J. Methaemoglobin formation induced by aromatic amines and amides. *J Pharm Pharmac.* 1967;19:146-154.
 - 70) McLean S, Starmer GA, Thomas J. Methaemoglobin formation by aromatic amines. *J Pharm Pharmac.* 1969;21:441-450.
 - 71) Onji Y, Tyuma I. Methemoglobin formation by a local anesthetic and some related compounds. *Acta Anaesth Scandinav; Supplementum XVI.* 1965; 151-159.
 - 72) Anniko M, Schmidt SH. The ototoxic potential of EMLA. *Acta Otolaryngol.* 1988;105:255-265.
-

- 73) Schmidt SH, Hellström S, Anniko M. Structural effects of the topical lidocaine-prilocaine anesthetic Emla on the tympanic membrane. *Arch Otorhinolaryngol*. 1988; 245:136-141
- 74) Schmidt SH, Anniko M, Hellström S. Electrophysiological effects of the clinically used local anesthetics lidocaine, lidocaine-prilocaine and phenol on the rat's inner ear. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 1990;248:87-94.
- 75) Tucker GT, Mather LE. Clinical pharmacokinetics of local anaesthetics. *Clin pharmacokinet* 1979;4:241-278.
- 76) Covino BG, Wildsmith JAW. Clinical pharmacology of local anesthetics agents. In: Cousins MJ, Bridenbaugh PO, eds. *Neural Blockade in Clinical Anesthesia and Management of Pain*, 3rd edition. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia. 1998;97-128.
- 77) 立川茂樹. 局所麻酔薬中毒の臨床 C.臨床症状と治療. 浅田章, 西川精宣(編). 局所麻酔薬中毒・アレルギー. 克誠堂出版. 2008;185-188.
- 78) Juhlin L, Häggglund G, Evers H. Absorption of lidocaine and prilocaine after application of a eutectic mixture of local anesthetics (EMLA[®]) on normal and diseased skin. *Acta Derm Venereol (Stockh)*. 1989;69:18-22.
- 79) Ohlsén L, Engleson S, Evers H. An anaesthetic lidocaine/prilocaine cream (EMLA) for epicutaneous application tested for cutting split skin grafts. *Scand J Plast Reconstr Surg*. 1985;19:201-209.
- 80) California Environment Protection Agency, Office of Environmental Health Hazard Assessment. No significant risk level (NSRL) for the proposition 65. Carcinogen 2,6-xylydine. 2002
- 81) U.S.Environmental Protection Agency (U.S.EPA). Guidelines for carcinogen risk assessment. 2005.
- 82) Stasik MJ. Carcinomas of the urinary bladder in a 4-chloro-o-toluidine cohort. *Int Arch Occup Environ Health*. 1988;60:21-24.
- 83) Ward E, Carpenter A, Markowitz S, Roberts D, Halperin W. Excess number of bladder cancers in workers exposed to ortho-toluidine and aniline. *J Natl Cancer Inst*. 1991;83:501-506.
- 84) Ward EM, Sabbioni G, DeBord DG, Teass AW, Brown KK, Talaska GG, Roberts DR, Ruder AM, Streicher RP. Monitoring of aromatic amine exposures in workers at a chemical plant with a known bladder cancer excess. *J Natl Cancer Inst*. 1996;88:1046-1052.
- 85) Sorahan T, Hamilton L, Jackson JR. A further cohort study of workers employed at a factory manufacturing chemicals for the rubber industry, with special reference to the chemicals 2-mercaptobenzothiazole (MBT), aniline, phenyl-beta-naphthylamine and o-toluidine. *Occup Environ Med*. 2000;57:106-115.
- 86) Weisburger EK, Russfield AB, Homburger F, Weisburger JH, Boger E, Van Dongen CG, Chu KC. Testing of twenty-one environmental aromatic amines or derivatives for long-term toxicity or carcinogenicity. *J Environ Pathol Toxicol*. 1978;2:325-356.
- 87) Hecht SS, El-Bayoumy K, Rivenson A, Fiala E. Comparative carcinogenicity of o-toluidine hydrochloride and o-nitrosotoluene in F-344 rats. *Cancer Lett*. 1982;16:103-108.
- 88) NTP 1996 National Toxicology Program. NTP comparative toxicity and carcinogenicity studies of

- o-nitrotoluene and o-toluidine hydrochloride (CAS Nos. 88-72-2 and 636-21-5) administered in feed to male F344/N rats. Toxic Rep Ser. 2000;44:1-C8.
- 89) Hecht SS, El-Bayoumy K, Rivenson A, Fiala ES. Bioassay for carcinogenicity of 3,2'-dimethyl-4-nitrosobiphenyl, O-nitrosotoluene, nitrosobenzene and the corresponding amines in Syrian golden hamsters. Cancer Lett. 1983;20:349-354.
- 90) Kulkarni B, Fiala ES, Weisburger JH Estimation of N-hydroxy-o-toluidine, a urinary metabolite of o-toluidine and o-nitrosotoluene, by high performance liquid chromatography with electrochemical detection. Carcinogenesis. 1983;4:1275-1279.
- 91) Danford N. The genetic toxicology of ortho-toluidine. Mutat Res. 1991;258:207-236.
- 92) Gupta RL, Gupta AK, Pathak DP, Juneja TR. Mutagenic studies of ortho-toluidine and its potential metabolites. Indian J Exp Biol. 1987;9:618-622.
- 93) Jones CR, Sabbioni G. Identification of DNA adducts using HPLC/MS/MS following in vitro and in vivo experiments with arylamines and nitroarenes. Chem Res Toxicol. 2003;10:1251-1263.
- 94) Suzuki H, Ikeda N, Kobayashi K, Terashima Y, Shimada Y, Suzuki T, Hagiwara T, Hatakeyama S, Nagaoka K, Yoshida J, Saito Y, Tanaka J, Hayashi M. Evaluation of liver and peripheral blood micronucleus assays with 9 chemicals using young rats. A study by the Collaborative Study Group for the Micronucleus Test (CSGMT)/Japanese Environmental Mutagen Society (JEMS)-Mammalian Mutagenicity Study Group (MMS). Mutat Res. 2005;583:133-145.
- 95) Marques MM, Mourato LL, Amorim MT, Santos MA, Melchior WB Jr, Beland FA. Effect of substitution site upon the oxidation potentials of alkylanilines, the mutagenicities of N-hydroxyalkylanilines, and the conformations of alkylaniline-DNA adducts. Chem Res Toxicol. 1997;10:1266-1274.
- 96) IARC (International Agency for Research on Cancer). *ortho*-toluidine. IARC Monographs on the Evaluation of carcinogenic risks to humans. Some industrial chemicals. 2000;77:267-322.
- 97) Martin FL, Cole KJ, Orme MH, Grover PL, Phillips DH, Venitt S. The DNA repair inhibitors hydroxyurea and cytosine arabinoside enhance the sensitivity of the alkaline single-cell gel electrophoresis ('comet') assay in metabolically-competent MCL-5 cells. Mutat Res. 1999;445:21-43.
- 98) Cheever KL, DeBord DG, Swearengen TF, Booth-Jones AD. *ortho*-toluidine blood protein adducts: HPLC analysis with fluorescence detection after a single dose in the adult male rat. Fundam Appl Toxicol. 1992;18:522-531.
- 99) DeBord DG, Swearengen TF, Cheever KL, Booth-Jones AD, Wissinger LA. Binding characteristics of *ortho*-toluidine to rat hemoglobin and albumin. Arch Toxicol. 1992;66(4):231-236.
- 100) Gaber K, Harr  s UA, Matthias C, Kleinsasser NH, Richter E. Hemoglobin adducts of the human bladder carcinogen o-toluidine after treatment with the local anesthetic prilocaine. Toxicology. 2007;229:157-164.
- 101) El-Bayoumy K, LaVoie EJ, Tulley-Freiler L, Hecht SS. Effects of ortho-methyl substituents on the mutagenicity of aminobiphenyls and aminonaphthalenes. Mutat Res, 1981; 90:345-354.

- 102) Nussbaum M, Fiala ES, Kulkarni B, El-Bayoumy K, Weisburger JH. In vivo metabolism of 3,2'-dimethyl-4-aminobiphenyl (DMAB) bearing on its organotropism in the Syrian golden hamster and the F344 rat. *Environ Health Perspect*. 1983;49:223-231.
- 103) Crump KS. An improved procedure for low-dose carcinogenic risk assessment from animal data. *J Environ Pathol Toxicol Oncol*. 1984;5:339-348.
- 104) AstraZeneca Safety Assessment Södertälje, Sweden. Risk assessment of the carcinogenic potential OraqixTM Periodontal Gel 5% and EMLA[®] Cream 5%. 社内資料. 2004.
- 105) Oesch F, Fabian E, Oesch-Bartlomowicz B, Werner C, Landsiedel R. Drug-metabolizing enzymes in the skin of man, rat, and pig. *Drug Metab Rev*. 2007;39:659-698.
- 106) Boyland E. The biochemistry of cancer of the bladder. *Br Med Bull*. 1958;14:153-158.
- 107) 厚生労働省（検討会）. 平成 19 年度化学物質による労働者の健康障害防止に係るリスク評価検討会報告書. 2008.
- 108) 日本産業衛生学会. 許容濃度等の勧告（2010 年度）. 2010;52:221-247.
- 109) Schmähl D. Combination effects in chemical carcinogenesis. *Arch Toxicol*. 1980;Suppl 4:29-40.
- 110) Williams GM. Modulation of chemical carcinogenesis by xenobiotics. *Fundam Appl Toxicol*. 1984;4(3 Pt 1):325-344.
- 111) Williams GM, Iatropoulos MJ. Principles of testing for carcinogenic activity. In: Hayes AW, ed. *Principles and Methods of Toxicology*, 4th edition. Taylor & Francis, Philadelphia. 2001;959-1000.

