メタコリン塩化物

プロボコリン吸入粉末溶解用 100 mg

ケンブラン吸入粉末溶解用 100 mg

第 2 部（モジュール 2）

2.4　非臨床に関する概括評価

株式会社三和化学研究所

参天製薬株式会社

略語一覧

略語	省略していない表現
$AUC_{0-\infty}$	Area under the blood concentration-time curve up to infinity（無限大時間までの血液中濃度-時間曲線下面積）
BG	Basenji-Greyhound
C_{max}	Maximum concentration（最高濃度）
CL_{tot}	Total body clearance（全身クリアランス）
FEV_1	1 秒量, 最大努力呼気の際に呼出開始から最初の 1 秒間に呼出される肺気量
LD_{50}	50% lethal dose（50%致死量）
NSAID	Non-steroidal anti-inflammatory drug（非ステロイド性抗炎症薬）
OVA	Ovalbumin（卵白アルブミン）
[^{3}H] QNB	^{3}H-labeled quinuclidinyl benzilate
SD ラット	Sprague Dawley ラット
$t_{1/2}$	Elimination half life（消失半減期）
Vd_{ss}	Distribution volume at steady state（定常状態における分布容積）

目次

2.4.　非臨床に関する概括評価 …… 4
2.4.1.　非臨床試験計画概略 …… 4
2.4.1.1.　緒言 …… 4
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 …… 5
2.4.2.　薬理試験 …… 6
2.4.2.1.　効力を裏付ける試験 …… 6
2.4.2.2.　副次的薬理試験 …… 8
2.4.2.3.　安全性薬理試験 …… 9
2.4.2.4.　薬力学的薬物相互作用試験 …… 9
2.4.3.　薬物動態試験 …… 10
2.4.3.1.　吸収 …… 10
2.4.3.2.　分布 …… 10
2.4.3.3.　代謝 …… 10
2.4.3.4.　排泄 …… 10
2.4.4.　毒性試験 …… 11
2.4.4.1.　単回投与毒性試験 …… 11
2.4.4.2.　反復投与毒性試験 …… 11
2.4.4.3.　遺伝毒性試験 …… 11
2.4.4.4.　がん原性試験 …… 12
2.4.4.5.　生殖発生毒性試験 …… 12
2.4.4.6.　局所刺激性試験 …… 12
2.4.4.7.　幼若動物を用いた試験 …… 12
2.4.4.8.　その他の毒性試験 …… 13
2.4.5.　総括及び結論 …… 14
2.4.5.1.　薬理試験 …… 14
2.4.5.2.　薬物動態試験 …… 15
2.4.5.3.　毒性試験 …… 15
2.4.6.　参考文献 …… 17

2.4. 非臨床に関する概括評価

2.4.1. 非臨床試験計画概略

2.4.1.1. 緒言

気管支喘息（以下，喘息）は，繰り返し起こる咳，喘鳴及び呼吸困難，可逆性の気道狭窄と気道過敏性の亢進を伴う慢性疾患であり，息切れや呼吸困難によって日常生活を著しく制限する疾患である。一般に喘息の臨床診断は，①発作性の呼吸困難，喘鳴，胸苦しさ，咳などの症状の反復，②可逆性の気流制限，③他の心肺疾患などの除外により行われている[1]。しかしながら，発症初期や，上記の臨床症状が認められない軽度な症例の場合，その診断は困難である。また，診断の遅れは早期治療及び管理を行うことができず気流制限が不可逆となり，喘息の慢性化，重症化を引き起こす。喘息の治療において，高い確度で診断を行い，早期に適切な治療を開始することが極めて重要であることから，喘息の客観的な評価が必要であり，その一つとして気道過敏性検査が用いられている。

メタコリン塩化物（以下，メタコリン）は 1911 年に Taveau 及び Hunt により創製された，アセチルコリンの β-メチル同族体であり[2]，直接アセチルコリン受容体に作用することで気管支平滑筋を収縮させる。メタコリンは，当初は精神科領域やその他領域において自律神経機能を評価する検査（Funkenstein test，メコリール試験）に用いられたが[3] [4]，その後は主に気道過敏性検査に用いられている。

[redacted] 年代に，Hoffmann- La Roche 社はメタコリン（現商品名 Provocholine®）を用いた気道過敏性検査における安全性及び有効性を裏付ける主要な臨床試験（MC-101 試験）をアメリカにおいて実施し，1986 年に承認を得て発売した。その後 Hoffmann- La Roche 社は Provocholine®（以下，本薬）に関する権利を Methapharm Inc.に譲渡し，1998 年以降 Methapharm Inc.がアメリカで販売している。また，同社はカナダでも承認取得し，1999 年から市販している。さらに，欧州（スペイン）等でも承認を取得し販売している。

国内では，1970 年代よりメタコリンを用いた気道過敏性検査が行われているが，本剤は国内で医療用医薬品として製造販売承認を受けていないため，現在は研究用試薬を用いて検査が行われている。医療用医薬品として医療保険適用下で適正に使用されることが医療現場で望まれていることから，本剤は「医療上の必要性の高い未承認薬・適応外薬検討会議」で医療上の必要性が高い未承認薬と判断され，2012 年 4 月より開発企業が募集された。

このような状況を踏まえ，[redacted] 年 [redacted] 月に株式会社三和化学研究所（以下，三和）と参天製薬株式会社（以下，参天）との間で国内での共同開発契約を締結し，本剤の開発に着手した。

2.4.1.2. 薬理試験

効力を裏付ける試験として，ヒトを含む種々動物の気管組織，気管支組織又は気管平滑筋を用いた *in vitro* 試験において，メタコリンの気管平滑筋収縮作用及び粘液糖タンパク質分泌作用を評価した。さらに，正常動物及び病態モデル動物を用いた *in vivo* 試験において，メタコリンのエアロゾルでの吸入投与における気道抵抗増大作用，動肺コンプライアンス及び気道粘液分泌促進作用を評価した。また，ウシ気管組織を用いたムスカリン受容体結合試験において、メタコリンのムスカリン受容体に対する結合性を評価した。

副次的薬理作用として，種々動物へのメタコリンの静脈内投与及び皮下投与は，気道抵抗

の増大及び動肺コンプライアンスの減少及び気管支分泌物を増加させることが報告されている。さらに，全身曝露により心拍数減少など心血管系への作用も認められた。これらの文献情報に加え，副交感神経刺激作用及びメタコリン吸入投与後の血中濃度推移から，メタコリンの副次的薬理作用を評価した。

安全性薬理作用として，非臨床で実施された安全性薬理に関する文献情報に加え，臨床での安全性情報も踏まえて評価した。

薬力学的相互作用として，効力を裏付ける試験の *in vitro* 及び *in vivo* 試験においてメタコリンの作用を減弱させることが報告されているアトロピン以外の薬剤について評価した。

2.4.1.3.　薬物動態試験

メタコリンの薬物動態に関しては，公表文献情報に加えて，本剤の開発に当たり実施したラット静脈内投与時の血液中メタコリン濃度測定及びヒト血液を用いた *in vitro* 代謝試験により評価した。

2.4.1.4.　毒性試験

メタコリンの承認申請に必要な毒性試験のうち，遺伝毒性試験として，細菌を用いた復帰突然変異試験，ほ乳類培養細胞を用いた染色体異常試験及びラットを用いた小核試験を GLP 試験として実施した。急性毒性及び反復投与毒性については，文献情報により評価した。なお，生殖発生毒性試験は，メタコリンが遺伝毒性を示さず，臨床での吸入後の全身曝露が非常に低かったこと（2.7.2.2.1 参照）に加え，海外での臨床試験及び副作用に関する文献調査において生殖発生毒性を示唆する副作用は報告されていないことから，実施しなかった。

2.4.2.　薬理試験

2.4.2.1.　効力を裏付ける試験

2.4.2.1.1.　主要な薬理試験

ヒト気管組織を用いた *in vitro* 試験において，メタコリンの気管平滑筋収縮作用及び気道粘液分泌促進作用が認められた。さらに，正常イヌ，サルおよびモルモットを用いた *in vivo* 試験において，メタコリンのエアロゾルでの吸入投与は投与量に依存して気道抵抗を増大させ，動肺コンプライアンスを減少させた。モルモット喘息モデルではメタコリンの気道抵抗増加作用が増強した。また，ウシ気管組織を用いた受容体結合試験において、メタコリンはムスカリン受容体特異的リガンドと組織との結合を阻害し、ムスカリン受容体に特異的に結合することを確認した。

（1）ヒト気管組織における気管平滑筋収縮作用

ヒト気管組織を用い，気管平滑筋の収縮に対するメタコリンの作用を評価した。ヒト気管平滑筋に対して，メタコリンは 1～100 μmol/L の適用で濃度に依存した収縮作用を示した（添付資料：4.2.1-1）。

（2）ヒト気道粘液分泌に対する作用

ヒト気管組織を用いた器官培養において，メタコリンは 100 μmol/L の濃度で，気管組織の粘液糖タンパク質の分泌を増加させた。アトロピンはメタコリンの作用を阻害した（添付資料：4.2.1-2）。

（3）イヌの気道抵抗及び動肺コンプライアンスに対するメタコリン吸入投与の作用

イヌを用いた *in vivo* 試験において，気道抵抗及び動肺コンプライアンスに対するメタコリン吸入の作用を評価した。メタコリンを 0.025，0.075 及び 0.15 mg/mL の濃度のエアロゾルで漸増吸入させた結果，吸入濃度に依存して BG 犬の気道抵抗を増加させ，動肺コンプライアンスを減少させた（添付資料：4.2.1-3）。

（4）サルの気道抵抵抗に対するメタコリン吸入投与の作用

ニホンザルにメタコリンを 0.15～2.5 mg/mL のエアロゾルで 1 分間吸入投与し（漸増投与）した結果，メタコリンは投与量に依存して気道抵抗を増加させた（添付資料：4.2.1-4）。ヒスタミン H_1 受容体拮抗薬であるジフェンヒドラミンの前投与は，メタコリンによる気道抵抗の増加をわずかに阻害した。

（5）モルモット病態モデルにおける気道抵抗に対するメタコリン吸入投与の作用

モルモットに OVA を感作し，感作後 2 週間に OVA をエアロゾル吸入して喘息モデル動物を作製した。OVA 惹起後 24 時間のモルモットにメタコリンを 0.1，0.3 及び 1 mg/mL の濃度のエアロゾルで 10 秒間吸入し，気道抵抗を測定した。OVA 感作モルモットの気道抵抗はメタコリン投与で用量依存的に増加し，0.3 mg/mL 以上で非感作正常動物に比べ有意な変化を示した（添付資料：4.2.1-5）。

（6）気管組織におけるムスカリン受容体とリガンドとの結合に対する作用

[^{3}H] QNB（放射性同位元素で標識したムスカリン受容体リガンド）を用いて，ウシ気管組織におけるムスカリン受容体と特異リガンドとの結合に対するメタコリンの作用を検討した。メタコリンは 0.01～1000 μmol/L の適用で，濃度に依存して[^{3}H] QNB との結合を阻害し，阻害定数（Ki）は 1.88 μmol/L であった。同様の結果は他のコリン作動薬及びコリン遮断薬においても認められたことから，メタコリンは気管平滑筋のムスカリン受容体に特異的に結合していることが示唆された（添付資料：4.2.1-6）。

2.4.2.1.2.　その他の薬理試験

2.4.2.1.2.1.　*in vitro*試験

様々な動物種の気管及び気管支組織を用いた *in vitro* 試験において，メタコリンの気管平滑筋収縮作用及び気道粘液分泌促進作用が認められた。

（1）ラット，モルモット，イヌ，ウサギ，ネコ及びウシ気管及び気管支組織における気管平滑筋収縮作用

ラット気管組織片を用いた評価において，メタコリン 0.1～30 μg の適用は気管組織の管腔内圧を用量依存的に増加させた[5]。また，メタコリンの管腔内圧増加作用は抗コリン薬であるアトロピン処理によって阻害された。

モルモット気管組織を用いた評価において，メタコリンは 0.002～30 μg/mL の適用で濃度に依存した気管収縮作用を示した[6] [7]。抗コリン薬であるアトロピン，ジフェマニル及びイプラトロピウム，β_2受容体作動薬であるイソプロテレノール，NSAID であるインドメタシン及びホスホジエステラーゼ阻害薬であるパパベリンは，いずれもメタコリンの作用を阻害した。

イヌの気管組織を用いた評価において，メタコリンは 0.03 又は 1 μg/mL の適用で細気管支腔閉塞及び組織収縮など，気管平滑筋収縮作用を示した[8] [9]。これらの作用はアトロピン，イソプロテレノール，トロンボキサン A_2 合成阻害薬であるトラピジル並びにホスホジエステラーゼ阻害薬であるテオフィリン及びパパベリンによって阻害された。

その他，メタコリンは，ウサギ，ネコ及びウシの気管又は気管支組織に対して，適用濃度に依存した気管平滑筋収縮作用を示した[10] [11] [12]。また，ネコ気管支組織においてエピネフリンはメタコリンの作用を阻害した。

（2）気道粘液分泌に対する作用

ヒト気管組織を用いた器官培養において，メタコリンは 30 μg/mL の濃度で気管組織の粘液糖タンパク質及びリゾチームの分泌を増加させ，アトロピンはメタコリンの作用を阻害した[13] [14]。

2.4.2.1.2.2.　*in vivo*試験

正常動物及び気道過敏性亢進モデル動物において，メタコリンをエアロゾルで吸入投与することで気道抵抗の増加，動肺コンプライアンス減少及び気道粘液物の増加作用が認められた。

（1）正常動物の気道抵抗及び動肺コンプライアンスに対するメタコリン吸入投与の作用

イヌを用いた *in vivo* 試験において，気道抵抗及び動肺コンプライアンスに対するメタコリン吸入の作用を評価した。Mongrel 犬にメタコリンを 0.75 又は 2.5 mg/mL の濃度のエアロゾルで吸入させた結果，気道抵抗の増加及び動肺コンプライアンスの減少が認められた[15]。カルシウム拮抗薬であるニフェジピン，麻酔薬であるハロタン及びイソフルラン並びに β_2 受容体作動薬であるイソプロテレノールはメタコリンの作用を阻害した[16] [17] [18]。

サルを用いた *in vivo* 試験において，カニクイザルにメタコリンを 20 mg/mL の濃度のエアロゾルで 2 分間吸入投与し，呼吸機能に対する作用を検討した[19]。メタコリンの吸入投与によって，呼吸数の増大，1 回換気量の減少，気道抵抗の増加及び動肺コンプライアンスの減少がそれぞれ認められた。

その他，モルモット及びブタへのメタコリンの吸入投与は，それぞれ 0.1～1 mg/mL 及び 100 mg/mL の投与量でいずれも気道抵抗を増加あるいは動肺コンプライアンスを減少させた（添付資料：4.2.1-5）[20]。

（2）病態モデルにおける気道抵抗及び動肺コンプライアンスに対するメタコリン吸入投与の作用

ヒツジを Ascaris suum で感作させたアレルギー性気道炎症モデルを用い，呼吸機能に対するメタコリンの作用を検討した[21]。非感作ヒツジでは，10 mg/mL のメタコリン吸入による変化は認められなかったが，Ascaris suum 感作ヒツジでは，同濃度のメタコリンの投与で，呼吸抵抗の増加，機能的残気量の増加及び肺コンダクタンスの減少が認められた。

（3）気道粘液分泌に対する *in vivo* 試験

メタコリンの気道粘液分泌に対する作用を検討する目的で，慢性的気管切開モデルイヌ（Mongrel 犬）を用い，メタコリン投与後の気道粘液の分泌量及び粘弾性を測定した[22]。メタコリン 2～32 mg/mL のエアロゾルでの 1 分間吸入投与は，4 mg/mL 以上の濃度で粘液量を増加させた。粘弾性は 2，4 及び 8 mg/mL の濃度で低下したが，16 及び 32 mg/mL の投与では増加が認められた。

2.4.2.2.　副次的薬理試験

（1）吸入投与以外の投与におけるメタコリンの作用

ラットにメタコリンを 2，3 及び 4.5 μg/body の投与量で 2 分間隔で漸増静脈内投与し，気管内圧及び心拍数を測定した[23]。メタコリンは，2 μg/body の投与よりラットの気管内圧を一過性に上昇させ，投与量に依存して作用が増大した。さらに 24%の心拍数減少が認められた。同様に 4，6 及び 9 μg/body を投与した結果，投与量に依存した気管内圧上昇に加え，40%の心拍数減少が認められた。

OVA 感作モルモットにメタコリンを 2～16 μg/kg の投与量で静脈内投与し，肺機能に対する作用を検討した[24]。メタコリンは用量依存的に OVA 感作モルモットの肺抵抗を増加させ，動肺コンプライアンスを減少させた。

麻酔下でウサギにメタコリンを 0.05～1 mg/body の用量で静脈内投与した結果，気管支けいれんを伴って機能的残気量が増加し，動肺コンプライアンスは減少した[25]。呼吸頻度に変化は認められなかった。

イヌにメタコリンを 0.14 mg/kg の用量で皮下投与した結果，気管支分泌物が最大で 3 倍増加した[26]。総タンパク量も増加し，ムチン量はコントロールの 170%まで増加した。また，いずれの作用もアトロピン投与で阻害された。

2.4.2.3.　安全性薬理試験

メタコリンを吸入した喘息患者及び健康人の心血管系又は呼吸器系への影響を確認したところ，喘息患者では，心血管系への影響として心係数の減少，心拍数及び末梢抵抗の増加，呼吸器系への影響として分時換気量の増加，1 秒量（FEV_1）及び肺活量の減少がみられた。健康人では，心血管系への影響として心拍数の増加がみられたが，著明な変化ではなく，血圧に異常はみられなかった。また，呼吸器系への影響として，FEV_1，肺活量及び動脈血 O_2 分圧の減少がみられた。上記の心血管系及び呼吸器系への変化はアトロピンによって抑制されたため，メタコリンのムスカリン受容体を介した作用であると推測された[27]。

メタコリンの非臨床安全性薬理に関する文献調査では，心血管系の影響として，メタコリンを静脈内投与した場合，ウサギ及びイヌで心房細動及び房室ブロックがみられた[28]。ラットの静脈内投与により心拍数が減少した[23]。吸入した場合では，イヌで心拍数の減少及び血圧低下がみられたが[29]，カニクイザルでは心電図に異常は認められなかった[19]。また，呼吸器系への影響として，メタコリンを吸入した場合にモルモット，イヌ及びカニクイザルで肺抵抗の増加，動肺コンプライアンスの減少，1 回換気量の減少，呼吸数の増加，動脈血 O_2 分圧の減少，動脈血 CO_2 分圧の増加，分時換気量の増加，呼吸インピーダンスの増加，呼吸困難の変化が観察された（添付資料 4.2.1-3）[15] [19] [29] [30] [31] [32] [33]。

2.4.2.4.　薬力学的薬物相互作用試験

効力を裏付ける試験で評価した公表文献において，アトロピンなどの抗コリン薬に加え，交感神経作動薬，ホスホジエステラーゼ阻害薬，カルシウム拮抗薬，ヒスタミン H_1 受容体拮抗薬，トロンボキサン A_2 合成阻害薬及び NSAID はメタコリンの作用を減弱させることが報告されている（添付資料：4.2.1-4）[6] [7] [8] [9] [10] [17] [18]。

2.4.3.　薬物動態試験

2.4.3.1.　吸収

雄性 SD ラットに 0.01，0.03 及び 0.1 mg/kg のメタコリンを単回静脈内投与したときの血液中メタコリン濃度を測定した（添付資料：4.2.2.2-1）。

静脈内投与後の血液中メタコリン濃度は，0.01，0.03 及び 0.1 mg/kg の投与量において，最初の測定時点である投与後 2 分にそれぞれ 4.96，18.4 及び 55.6 ng/mL を示し，投与後 1 時間では 0.707，1.82 及び 9.88 ng/mL まで低下した。$t_{1/2}$ はそれぞれ 28.9，24.5 及び 33.0 min であった。0.01，0.03 及び 0.1 mg/kg での $AUC_{0-\infty}$ はそれぞれ 129，393 及び 1710 ng·min/mL であり，投与量に伴って増加した。

また，CL_{tot} 及び Vd_{ss} については，投与量間で大きな差は認められなかった。

2.4.3.2.　分布

該当資料なし。

2.4.3.3.　代謝

公表文献より，メタコリンはコリンエステラーゼに親和性を示すことから[2] ，生体内で加水分解を受け，β-メチルコリンに変換されると考えられた。

ヒト血液とメタコリン（添加濃度：50 ng/mL）を 37℃ で 0.25～180 分間インキュベートしたのち，血液中メタコリン及び代謝物である β-メチルコリン濃度を測定した（添付資料：4.2.2.4-1）。その結果，ヒト血液中においてメタコリンは速やかに代謝され，インキュベート開始後 0.25 分における血液中残存率は 52.7%となったが，それ以降の代謝は緩やかとなり，終末相におけるメタコリンの $t_{1/2}$ は 175 min であった。また，血液中 β-メチルコリン濃度は経時的な増加を示したことから，メタコリンの代謝により β-メチルコリンが生成することが確認された。

2.4.3.4.　排泄

公表文献より，メタコリンの代謝により生成するメチルコリンは，速やかに腎排泄されることが知られている[34]。

また，類薬である ^{14}C-ベタネコールをラットに経口投与した場合，投与後 24 時間以内までに排泄された尿中放射能の 95%が β-メチルコリンで，3%が未変化体であることが報告されている[35]。

2.4.4.　毒性試験

メタコリンの承認申請に必要な毒性試験のうち，遺伝毒性試験として，細菌を用いた復帰突然変異試験，ほ乳類培養細胞を用いた染色体異常試験及びラットを用いた小核試験を GLP 試験として実施した。また，メタコリンの毒性に関する文献調査を実施し，急性毒性に関する文献（動物種：マウス，ラット，ウサギ，ネコ，モルモット，カニクイザル，投与経路：吸入，経口，静脈内，皮下），に加え，反復投与毒性に関する皮下投与（イヌ，2～194 日間），筋肉内投与（イヌ，2～74 日間）及び吸入投与（カニクイザル，7 日間）の文献情報により，メタコリンの毒性を評価した。なお，がん原性及び生殖発生毒性に関する文献は確認できなかった。

2.4.4.1.　単回投与毒性試験

マウスにおけるメタコリンの LD_{50} 値は 1100 mg/kg（経口），15 mg/kg（静脈内），90 mg/kg（皮下）であり[36]，別の文献では皮下投与による最小致死量は 50～75 mg/kg であった[37]。また，ラットにおける LD_{50} 値は 750 mg/kg（経口），20 mg/kg（静脈内），75 mg/kg（皮下）であり[36]，別の文献でも皮下投与による LD_{50} 値は 75 mg/kg であった[38]。ウサギ及びネコにおける皮下投与による最小致死量は 20 mg/kg であった[37]。また，メタコリンの吸入による急性毒性について，モルモットに 24 mg/mL 溶液を 15 分間吸入した場合の致死率はほぼ 100%であった[39]。一方，カニクイザルに 20 mg/mL 溶液を 2 分間吸入した場合には死亡はみられなかった[19]。

2.4.4.2.　反復投与毒性試験

イヌに 10～50 mg/日のメタコリンを 2～194 日間皮下投与又は 10～125 mg/日の蜜蝋に混合したメタコリンを 2～74 日間筋肉内投与した。皮下投与及び筋肉内投与ともほぼ全例で浅速呼吸，流涎，流涙，吐気，嘔吐，排尿，排便が認められた。また，投与期間中に皮下投与群で 29 例中 25 例，筋肉内投与群では 19 例全例が切迫屠殺又は死亡した。剖検において切迫屠殺及び死亡例の胃，十二指腸又は結腸に潰瘍，びらん，出血又は炎症がみられたため，主な死因は消化管障害と考えられた[40] [41]。

カニクイザルに 20 mg/mL 溶液（用量：0.02，0.08 及び 0.4 mg/kg/日）を 7 日間吸入させた結果，0.02 mg/kg/日以上で肺抵抗の増加，0.08 mg/kg/日以上で浅速呼吸及び呼吸困難がみられた。なお，0.08 mg/kg/日では，8 週間の休薬期間中を設定した結果，肺抵抗の増加に回復傾向がみられた。心電図，血液学的検査，血液生化学的検査，尿検査，臓器重量，剖検及び病理組織学的検査にメタコリンの影響はみられなかった[19]。

2.4.4.3.　遺伝毒性試験

細菌を用いた復帰突然変異試験では，ネズミチフス菌の TA98, TA100, TA1535 及び TA1537 株，大腸菌の WP2 *uvrA* 株を使用し，5000 μg/プレートを最高用量として，プレート法及びプレインキュベーション法により評価した。その結果，代謝活性化の有無に関わらず，いずれの条件下でも復帰変異コロニー数の増加は認められず，陰性と判定した。（添付資料：4.2.3.3.1-1）

ほ乳類培養細胞を用いた染色体異常試験では，チャイニーズハムスター肺由来線維芽細胞

を用いて，500 μg/mL を最高濃度として，短時間処理（6 時間処理，直接法及び代謝活性化法）及び連続処理（24 時間処理，直接法）により評価した。その結果，代謝活性化の有無に関わらず，いずれの条件下でも染色体異常を有する細胞の増加は認められず，陰性と判定した。（添付資料：4.2.3.3.1-2）

ラットを用いた小核試験では，雄性 SD ラットに 2.5，5 及び 10 mg/kg/日の用量で 1 日 1 回 2 日間静脈内投与し，最終投与後 24 時間に骨髄を採取，骨髄塗沫標本を作製し，小核誘発作用の有無を検討した。その結果，いずれの用量においても小核誘発作用は認められず陰性と判定した。（添付資料：4.2.3.3.2-1）

2.4.4.4.　がん原性試験

メタコリンは気道過敏性の検査薬として，検査日のみに投与され，長期間投与されないため，がん原性試験は実施しなかった。

2.4.4.5.　生殖発生毒性試験

メタコリンの生殖発生毒性試験については，以下の理由により，メタコリンが生殖発生に悪影響を及ぼす懸念はないものと考えられたため，実施しなかった。

- メタコリンに遺伝毒性は認められなかった。
- ヒトに 0.039～25 mg/mL の本剤を漸増吸入させ，最高濃度（25 mg/mL）を吸入したときの血液中メタコリン濃度は，吸入直後に C_{max} 1.18～5.16 ng/mL を示し，$t_{1/2}$ 28.1～175 min で減少した（2.7.2.2.1 参照）。このときの C_{max} は，*in vitro* でヒト気管平滑筋収縮作用を示した濃度 10^{-6}～10^{-4} mol/L（200～20000 ng/mL に相当）の 40 分の 1 未満であることから，メタコリン吸入後に全身曝露を介した作用を示す可能性は非常に低いと考えられた。
- メタコリンの副作用に関する文献調査では，妊娠期間中にメタコリンを吸入した女性の妊娠期間中の性ホルモンは順調に増加し，産まれた新生児にも異常はみられなかった[42]。また，海外での臨床試験において生殖発生毒性を示唆する副作用は報告されていない（2.7.4.2.1.1.(3) 参照）。

2.4.4.6.　局所刺激性試験

本剤吸入時の局所刺激性は，吸入経路でのカニクイザル反復投与毒性試験にて検討され，呼吸器系にメタコリンの刺激性を示唆する所見は認められなかった（2.6.6.3.2 参照）。

2.4.4.7.　幼若動物を用いた試験

メタコリンの臨床試験及び副作用に関する文献調査では，小児において多くの使用実績があり，メタコリンを吸入した小児に重篤な副作用は認められておらず，成人及び小児に対するメタコリンの安全性に明らかな違いは認められなかった（2.7.4.2.1.1.(3)，2.7.4.2.1.1.(4) 参照）。さらに申請者が実施したメタコリンの小児臨床試験において，小児患者に対する安全性への懸念は認められなかった（2.7.4.2.1.1.(2) 参照）。したがって，幼若動物を用いた非臨床試験を実施しなかった。

2.4.4.8.　その他の毒性試験

該当資料なし。

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＞

効力を裏付ける試験結果より，メタコリンは，ヒトを含む種々の動物の気管及び気管支組織に対して，気管平滑筋収縮作用及び粘液タンパク分泌作用を有することが示された（添付資料：4.2.1-1, 4.2.1-2）[5] [6] [7] [8] [9] [10] [11] [12] [13] [14]。また，種々の正常動物及び病態モデル動物に対し，エアロゾルで吸入することで投与量に依存した気道抵抗増加作用，動肺コンプライアンス減少作用及び気道粘液物増加作用を示すことが確認され（添付資料：4.2.1-3, 4.2.1-4, 4.2.1-5）[15] [16] [17] [18] [19] [20] [21] [22], その作用は抗コリン薬により阻害された。さらに，ウシ気管組織を用いた受容体結合試験において、メタコリンはムスカリン受容体特異的リガンドと組織との結合を阻害し、ムスカリン受容体に特異的に結合することを確認した（添付資料4.2.1-6）。以上，メタコリンは気管支平滑筋及び気管支腺のムスカリン受容体に作用して，平滑筋の収縮及び気管支分泌物の増加により，気道閉塞を惹起すると考えられた。

＜副次的薬理試験＞

メタコリンの副次的薬理作用について，メタコリンは吸入投与のみでなく，静脈内投与及び皮下投与においても薬理作用を発揮する。その作用は，気道抵抗の増加又は動肺コンプライアンスの減少などの呼吸機能に加え，心拍数減少など心血管系への作用も全身曝露によって認められた[23] [24] [25] [26]。さらに，メタコリンは末梢において，副交感神経終末の後節のムスカリン受容体に作用し，様々な効果を示す。すなわち，気管支平滑筋収縮及び気管支分泌物の分泌促進のほか，瞳孔括約筋の収縮，涙液，唾液及び消化液等の分泌促進，血圧及び心拍数の低下並びに消化管蠕動運動の促進等の薬理作用がムスカリン受容体を介した作用として挙げられる[2] [37]。また，臨床における最高濃度（25 mg/mL）のメタコリンをヒトに吸入させたときの血中メタコリン濃度は，*in vitro* でヒト気管平滑筋収縮作用を示す濃度の 40 分の 1 未満であることから（2.4.4.5 参照），臨床においてメタコリンが吸入投与によって全身曝露を介した他の作用を示す可能性は低いと考えられた。

＜安全性薬理試験＞

喘息患者に 0.025～2.5 mg/mL，健康人に 2.5 mg/mL のメタコリンを吸入した結果，心血管系への影響として，喘息患者では，心係数の減少，心拍数及び末梢血管抵抗の増加が認められた。健康人では，心拍数の増加がみられたが著明な変化ではなく，血圧には異常が認められなかった。また，呼吸器系への影響として，喘息患者では，分時換気量の増加，1 秒量（FEV_1）及び肺活量の減少，FEV_1，肺活量及び動脈血 O_2 分圧の減少がみられた。上記の心血管系及び呼吸器系の変化はアトロピンによって抑制されたため，メタコリンのムスカリン受容体を介した作用による変化と推測された[27]。

メタコリンの非臨床安全性薬理に関する文献調査では，心血管系の影響として，メタコリンを静脈内投与した場合，ウサギ及びイヌで心房細動及び房室ブロックがみられた[28]。ラットの静脈内投与により心拍数が減少した[23]。吸入した場合では，イヌで心拍数の減少及び血圧低下がみられたが[29], カニクイザルでは心電図に異常は認められなかった[19]。また，

呼吸器系への影響として，メタコリンを吸入した場合にモルモット，イヌ及びカニクイザルで肺抵抗の増加，動肺コンプライアンスの減少，1 回換気量の減少，呼吸数の増加，動脈血 O_2 分圧の減少，動脈血 CO_2 分圧の増加，分時換気量の増加，呼吸インピーダンスの増加，呼吸困難の変化が観察された（添付資料 4.2.1-3）[15] [19] [29] [30] [31] [32] [33]。

＜薬力学的薬物相互作用試験＞

薬力学的相互作用について，交感神経作動薬，ホスホジエステラーゼ阻害薬，カルシウム拮抗薬，ヒスタミン H_1 受容体拮抗薬，トロンボキサン A_2 合成阻害薬，NSAID はメタコリンの作用を減弱させることが報告されている。

2.4.5.2.　薬物動態試験

雄性ラットに 0.01，0.03 及び 0.1 mg/kg のメタコリンを単回静脈内投与したときの血液中メタコリン濃度は用量依存的に増加し，いずれの投与量においても約 30 min の $t_{1/2}$ で消失した。

ヒト血液とメタコリンを 37°C で 0.25～180 分間インキュベートした場合，インキュベート開始後 0.25 分までに添加したメタコリンの約半量が β-メチルコリンに代謝されたが，それ以降の代謝は緩やかとなり，終末相におけるメタコリンの $t_{1/2}$ は 175 min であった。

また，メタコリンはコリンエステラーゼにより加水分解を受け，β-メチルコリンに変換されること，代謝により生成したメチルコリンは速やかに腎排泄されることが知られている。

本剤を吸入投与後，メタコリンは標的部位である気管組織に直接到達するとともに，一部は呼気から排泄され，一部は肺組織から全身循環血液に移行する。体内に吸収されたメタコリンはコリンエステラーゼにより，速やかに加水分解を受け，β-メチルコリンに変換されたのち，速やかに腎より排泄されると推察された。

2.4.5.3.　毒性試験

メタコリンの遺伝毒性試験として，細菌を用いた復帰突然変異試験，ほ乳類培養細胞を用いた染色体異常試験及びラットを用いた小核試験を GLP 試験として実施したが，メタコリンは遺伝毒性を示さなかった。

メタコリンの急性毒性はマウス，ラット，ウサギ，ネコ，モルモット及びカニクイザルで報告されている。投与経路は吸入，経口，静脈内及び皮下であり，経口，静脈内及び皮下投与による致死量は動物種間又は文献間で大きな違いはなく，最小致死量又は LD_{50} 値は経口投与で 750～1100 mg/kg，静脈内投与で 15～20 mg/kg，皮下投与で 20～90 mg/kg と考えられた[36] [37] [38]。また，モルモットに 24 mg/mL 溶液を 15 分間吸入した場合の致死率はほぼ 100%であった[39]。一方，カニクイザルに 20 mg/mL 溶液を 2 分間吸入した場合には死亡はみられなかった[19]。

イヌを用いた皮下（10～50 mg/日，2～194 日間）及び筋肉内投与（10～125 mg/日，2～74 日間）による反復投与毒性試験では，ほぼ全例で浅速呼吸，流涎，流涙，吐気，嘔吐，排尿及び排便が認められ，その多数が死亡した。死亡例の胃，十二指腸又は結腸に潰瘍，びらん，出血又は炎症がみられたため，主な死因は消化管障害と考えられた[40] [41]。一方，カニクイザルを用いた吸入による反復投与毒性試験では，20 mg/mL 溶液を 1 回/日，7 日間投与した

結果，肺抵抗の増加，浅速呼吸及び呼吸困難が認められた以外には異常はみられなかった[19]。

がん原性及び生殖発生毒性に関する文献は確認できなかった。メタコリンは気道過敏性の検査薬として，検査日のみに投与され，長期間投与されないため，がん原性試験は実施しなかった。生殖発生毒性については，メタコリンが遺伝毒性を示さず，臨床での吸入後の全身曝露が，*in vitro* でヒト気管平滑筋収縮作用を示した濃度の 40 分の 1 未満であったことに加え，海外でのメタコリンの臨床試験及び副作用に関する文献調査において，生殖発生毒性を示唆する副作用は報告されていないことから，実施しなかった（2.7.4.2.1.1.(3) 参照）[42]。

なお，幼若動物に関する文献についても確認できなかったが，メタコリンは小児において多くの使用実績があり，メタコリンを吸入した小児に重篤な副作用は認められておらず，成人及び小児に対するメタコリンの安全性に明らかな違いは認められなかったため，幼若動物を用いた非臨床試験を実施しなかった。（2.7.4.2.1.1.(1)，2.7.4.2.1.1.(2)，2.7.4.2.1.1.(3)，2.7.4.2.1.1.(4) 参照）。

以上より，メタコリンの有効性及び安全性が示されたことから，本剤は気道過敏性検査薬として有用であると考えられる。

2.4.6. 参考文献

[1] 「喘息予防・管理ガイドライン 2012」作成委員．1 喘息の管理目標，定義，病型，診断，重症度．喘息予防・管理ガイドライン 2012：1-16.

[2] Brown JH, Taylor P. Muscarinic receptor agonists and antagonists. In: Hardman JG, ed. Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 9th ed. 1996:141-160.

[3] Rouleau Y, Coulombe M. Clinical applications of the Funkenstein test to psychiatric patients. Can Med Assoc. J. 1957; 77: 116-121.

[4] 笠井和，阿部栄子，伊村和子．小児におけるメコリール試験．東京女子医科大学雑誌． 1961; 31: 348-353.

[5] Burns JW, Doe JE. A comparison of drug-induced responses on rat tracheal, bronchial and lung strip in vitro preparations. Br J Pharmacol. 1978;64:71-74.

[6] Diamond L, O'Donnell M. A comparative study of two parasympatholytic bronchodilator agents: ipratropium bromide and diphemanil methylsulfate. J Pharmacol Exp Therap. 1981;216:1-5.

[7] Farmer JB, Farrar DG, Wilson J. Antagonism of tone and prostaglandin-mediated responses in a tracheal preparation by indomethacin and SC-19220. Br J Pharmacol. 1974;52:559-565.

[8] Rinard GA, Rubinfeld AR, Brunton LL, Mayer SE. Depressed cyclic AMP levels in airway smooth muscle from asthmatic dogs. Proc Natl Acad Sci. 1979;76:1472-1476.

[9] Sakanashi M, Takeo S, Miyamoto Y, Higuchi M. Relaxant effect of trapidil on isolated dog bronchus. Arch Int Pharmacodyn. 1982;259:134-143.

[10] Sollmann T, Gilbert AJ. Microscopic observations of bronchiolar reactions. J Pharmacol Exp Therap. 1937;61:272-285.

[11] Duckles SP, Rayner MD, Nadel JA. Effects of CO_2 and pH on drug-induced contractions of airway smooth muscle. J Pharmacol Exp Therap. 1974;190:472-481.

[12] Cheng JB, Townley RG. Comparison of muscarinic and beta-adrenergic receptors between bovine peripheral lung and tracheal smooth muscles: a striking difference in the receptor concentration. Life Sciences. 1982;30:2079-2086.

[13] Boat TF, Kleinerman JI. Human respiratory tract secretions. 2. Effect of cholinergic and adrenergic agents on in vitro release of protein and mucous glycoprotein. Chest. 1975(Suppl.);67:32S-34S.

[14] Boat TF, Kleinerman JI, Fanaroff AA, Stern RC. Human tracheobronchial secretions: development of mucous glycoprotein and lysozyme- secreting systems. Pediatr Res. 1977;11:977-980.

[15] Hirshman CA, Malley A, Downes H. Basenji-Greyhound dog model of asthma: reactivity to Ascaris suum, citric acid, and methacholine. J Appl Physiol. 1980;49:953-957.

[16] Hirshman CA, Edelstein G, Peetz S, Wayne R, Downes H. Mechanism of action of inhalational anesthesia on airways. Anesthesiol. 1982;56:107-111.

[17] Brugman TM, Darnell ML, Hirshman CA. Nifedipine aerosol attenuates airway constriction in dogs with hyperreactive airways. Am Rev Respir Dis. 1983;127:14-17.

[18] Stephan WC, Chick TW, Avner BP, Jenne JW. Tachyphylaxis to inhaled isoproterenol and the effect of methylprednisolone in dogs. J Allergy Clin Immunol. 1980;65:105-109.

[19] Binns R, Clark GC, Hardy CJ. Methacholine: A 7-day inhalation toxicity study with primates. Toxicology. 1975;4:117-132.

[20] Kelly S, Pavia M, Engel LA. Bronchoconstriction and gas mixing in canine and pig lungs. Bull Europ Physiopath Resp. 1982;18:229-237.

[21] Wanner A, Reinhart ME. Respiratory mechanics in conscious sheep: response to methacholine. J Appl Physiol. 1978;44:479-482.

[22] King M, Viires N. Effect of methacholine chloride on rheology and transport of canine tracheal mucus. J Appl Physiol. 1979;47:26-31.

[23] Salonen RO, Mattila MJ. Dose-related bronchoconstriction with methacholine in rats, as modified by terbutaline alone and in combination with theophylline. Acta Pharmacol Toxicol. 1981;48:193-198.

[24] Andersson P, Bergstrand H. Antigen-induced bronchial anaphlylaxis in actively sensitized guinea-pigs:effect of long-term treatment with sodium cromoglycate and aminophylline. Br J Pharmacol. 1981;74:601-609.

[25] Anthonisen NR. Changes in compliance in rabbits subject to acute bronchoconstriction. J Appl Physiol. 1963;18:539-543.

[26] Reasor MJ, Cohen D, Proctor DF, Rubin RJ. Tracheobronchial secretions collected from intact dogs. II. Effects of cholinomimetic stimulation. J Appl Physiol. 1978;45:190-194.

[27] Grieco MH, Pierson RN. Cardiopulmonary effects of methacholine in asthmatic and normal subjects. J Allergy. 1970;45:195-207.

[28] Iglauer A, Davis D, Altschule MD. Auricular fibrillation in normal, intact animals after the intravenous injection of mecholyl (Acetyl-ß-methylcholine). Am Heart J. 1941;22:47-55.

[29] Rubinfeld AR, Wagner PD, West JB,Matthews RC. Gas exchange during acute experimental canine asthma. Am Rev Respir Dis. 1978;118:525-536.

[30] Mue S, Shibahara S, Suzuki S, Takahashi M, Hida W, Yamauchi K, et al. Bronchial response to methacholine and histamine in monkeys with beta adrenergic blockade. J Allergy Clin Immunol. 1980;65:338-345.

[31] Deal EC, Jr, Kelsen SG, Eberlin LB, Salamone JA, Cherniack NS. Respiratory effects of bronchoconstriction in anesthetized dogs. Am Rev Respir Dis. 1983;127:310-315.

[32] Nakazawa H, Townley R. The effects of propranolol on the bronchoconstriction by histamine, acetyl-beta-methylcholine and anaphylaxis in inbred guinea pigs in vivo. Ann Allergy. 1976;36:77-85.

[33] Savoy J, Arnup ME, Anthonisen NR. Response to external inspiratory resistive loading and bronchospasm in anesthetized dogs. J Appl Physiol. 1982;53:355-360.

[34] Roef M, Vogel WV. The effects of muscle exercise and bed rest on [^{18}F]methylcholine PET/CT. Eur J Nucl Med Mol Imaging. 2011;38:526-530.

[35] 医薬品インタビューフォーム，ベサコリン® 散 5%， 改訂第 6 版，エーザイ株式会社 (2010)

[36] Molitor H. A comparative study of the effects of five choline compounds used in therapeutics: acetylcholine chloride, acetyl beta-methylcholine chloride, carbaminoyl choline, ethyl ether beta-methylcholine chloride, carbaminoyl beta-methylcholine chloride. J Pharmacol Exp Therap. 1936;58:337-360.

[37] Simonart A. On the action of certain derivatives of choline. J Pharmacol Exp Therap. 1932;46:157-193.

[38] Fellows EJ, Livingston AE. The pharmacology of certain furfuryl and tetrahydro-furfuryl ammonium iodides. J Pharmacol Exp Therap. 1940;68:231-246.

[39] Hambourger WE, Freese HB, Winbury MM, Michiels PM. Protective action of combinations of diphenhydramine and aminophylline in fatal bronchospasm in guinea pigs due to mecholyl aerosol. J Pharmacol Exp Therap. 1948;94:367-371.

[40] Wener J, Hoff HE, Simon MA. Production of gastric and duodenal ulcers by the prolonged administration of mecholyl. Gastroenterol. 1948;11:904-922.

[41] Wener J, Hoff HE, Simon MA. Production of ulcerative colitis in dogs by the prolonged administration of mecholyl. Gastroenterol. 1949;12:637-647.

[42] Juniper EF, Daniel EE, Roberts RS, Kline PA, Hargreave FE, Newhouse MT. Improvement in airway responsiveness and asthma severity during pregnancy. Am Rev Respir Dis. 1989;140:924-931.