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）

2.6.6　非臨床概要　毒性試験の概要文

株式会社三和化学研究所

参天製薬株式会社

2.6.6 毒性試験の概要文

略語一覧

略語	省略していない表現
LD_{50}	50% lethal dose（50%致死量）
SD ラット	Sprague Dawley ラット
$t_{1/2}$	Elimination half life（消失半減期）

目次

2.6.6. 毒性試験の概要文 4
2.6.6.1. まとめ 4
2.6.6.2. 単回投与毒性試験 4
2.6.6.3. 反復投与毒性試験 5
2.6.6.4. 遺伝毒性試験 8
2.6.6.5. がん原性試験 9
2.6.6.6. 生殖発生毒性試験 9
2.6.6.7. 局所刺激性試験 9
2.6.6.8. 幼若動物を用いた試験 9
2.6.6.9. 考察及び結論 10
2.6.6.10. 図表 10
2.6.6.11. 参考文献 11

2.6.6. 毒性試験の概要文

2.6.6.1. まとめ

メタコリンは長年にわたり臨床で使用されており，多くの安全性に関する情報が集積されている。そのため，非臨床で実施された毒性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メタコリンの毒性を評価した。

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が，メタコリンは遺伝毒性を示さなかった。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，吸入，7 日間）の文献を確認できた。急性毒性について，投与経路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。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。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。反復投与毒性については，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。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。一方，カニクイザルを用いた吸入による試験では，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，呼吸困難が認められた以外には異常はみられなかった。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。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暴露が，*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。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。

2.6.6.2. 単回投与毒性試験

文献情報の概要を下の表 2.6.6.2-1 に示した。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った。マウスにおける LD_{50} 値は 1100 mg/kg（経口），15 mg/kg（静脈内），90 mg/kg（皮下）であり[1]，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[2]。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[1]，別の文献でも皮下投与による LD_{50} 値は 75 mg/kg であった[3]。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[2]。したがって，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。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[4]。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[5]。

表 2.6.6.2-1 単回投与毒性試験成績

動物種	投与方法	試験結果	引用文献
マウス	経口	LD_{50}：1100 mg/kg	[1]
	静脈内	LD_{50}：15 mg/kg	
	皮下	LD_{50}：90 mg/kg	
マウス	皮下	最小致死量：50～75 mg/kg	[2]
ラット	経口	LD_{50}：750 mg/kg	[1]
	静脈内	LD_{50}：20 mg/kg	
	皮下	LD_{50}：75 mg/kg	
ラット	皮下	LD_{50}：75 mg/kg	[3]
ウサギ	皮下	最小致死量：20 mg/kg	[2]
ネコ	皮下	最小致死量：20 mg/kg	[2]
モルモット	吸入（用量：24 mg/mL, 15 分間）	ほぼ全例死亡	[4]
カニクイザル	吸入（用量：20 mg/mL, 2 分間）	死亡なし	[5]

2.6.6.3. 反復投与毒性試験

メタコリンの反復投与毒性試験として，イヌを用いた皮下及び筋肉内投与試験，カニクイザルを用いた吸入による反復投与試験が報告されている。

2.6.6.3.1. イヌ反復投与毒性試験

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。当該試験では，個体ごと，投与日ごとに脱力及びショック等の臨床症状の発現を指標として忍容量（torelable dose）を設定し，死亡するまで忍容量の反復投与が継続されたため，投与期間も 2 日から 194 日と幅があり，投与量も個体ごとに異なり，同一個体でも臨床症状によって投与量が増減された。表 2.6.6.3.1-1 に皮下投与，表 2.6.6.3.1-2 に筋肉内投与の投与期間，投与回数，最大投与量，消化管における病理所見と推定死因を示した。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，嘔吐物及び便には血液がみられた。これらの症状はアトロピン投与によって軽減した。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，皮下投与群の切迫屠殺又は死亡例 25 例中 13 例の胃又は十二指腸に潰瘍，びらん又は出血，8 例の結腸にびらん，出血又は急性結腸炎がみられた。生存例でも 4 例中 2 例の胃又は十二指腸に潰瘍又はびらん，1 例の結腸に急性結腸炎がみられた。一方，筋肉内投与群では切迫屠殺又は死亡例 19 例中 10 例の胃又は十二指腸にびらん又は出血，4 例の結腸に潰瘍，びらん又は急性結腸炎がみられたが，

胃又は十二指腸に潰瘍はみられなかった。皮下投与及び筋肉内投与とも主な死因は消化管障害と考えられた[6] [7]。

表 2.6.6.3.1-1 イヌに本薬を皮下投与したときの所見一覧

動物 No.	投与期間（日）	投与回数	最大投与量（mg/kg）	病理所見（消化管）			推定死因
				胃	十二指腸	結腸	
1	2	2	0.6	粘膜出血	びらん	充血	急性反応
2	2	2	1.1	びらん	粘膜出血	充血	急性反応
3	2	2	1.5	びらん	充血	粘膜出血	急性反応
4	2	2	1.6	びらん	びらん	粘膜出血	急性反応
5	4	4	2.1	所見なし	所見なし	所見なし	呼吸器障害
6	4	4	4.0	充血	充血	充血	急性反応
7	5	3	0.7	粘膜出血	粘膜出血	粘膜出血	急性反応
8	5	3	0.8	充血	充血	粘膜出血	呼吸器障害
9	5	5	1.9	所見なし	所見なし	炎症	不明
10	7	5	2.7	充血	充血	充血	急性反応
11	8	6	4.9	びらん	びらん	充血	消化管出血
12	10	8	0.6	充血	充血	充血	不明
13	10	15	1.3	所見なし	所見なし	所見なし	呼吸器障害（生存）
14	12	11	1.5	所見なし	所見なし	所見なし	呼吸器障害
15	13	12	2.5	所見なし	所見なし	所見なし	呼吸器障害
16	23	17	2.3	粘膜出血	充血	炎症	消化管出血
17	34	26	1.3	充血	充血	充血	急性反応
18	38	28	1.1	充血	充血	充血	不明（生存）
19	40	30	2.4	びらん	びらん	充血	不明（生存）
20	41	31	1.2	所見なし	所見なし	所見なし	感染症
21	44	32	3.5	びらん	びらん	炎症	消化管出血（生存）
22	49	41	2.5	充血	充血	充血	消化管出血
23	68	52	1.5	びらん	充血	充血	消化管出血
24	86	72	1.8	所見なし	所見なし	所見なし	不明
25	96	82	2.0	びらん	潰瘍	びらん	急性反応
26	104	96	2.2	びらん	粘膜出血	充血	不明
27	120	111	1.8	びらん	粘膜出血	充血	消化管出血
28	154	114	1.5	潰瘍	びらん	所見なし	安楽殺
29	194	134	2.1	びらん	びらん	炎症	消化管出血

表 2.6.6.3.1-2 イヌに本薬を筋肉内投与したときの所見一覧

動物 No.	投与期間（日）	投与回数	最大投与量（mg/kg）	病理所見（消化管）			推定死因
				胃	十二指腸	結腸	
1	2	2	10.4	充血	充血	充血	消化管出血
2	3	3	6.2	びらん	びらん	充血	急性反応
3	4	4	2.0	充血	充血	充血	呼吸器障害
4	5	5	9.5	粘膜出血	充血	充血	安楽殺
5	5	5	10.6	粘膜出血	充血	充血	安楽殺
6	6	6	7.9	びらん	粘膜出血	充血	消化管出血
7	6	6	8.3	びらん	充血	充血	消化管出血
8	7	7	7.5	充血	充血	充血	消化管出血
9	10	8	3.5	びらん	粘膜出血	びらん	不明
10	10	10	3.8	所見なし	所見なし	所見なし	呼吸器障害
11	13	5	7.1	びらん	粘膜出血	充血	消化管出血
12	13	12	4.4	充血	充血	充血	消化管出血
13	17	10	9.4	びらん	充血	充血	消化管出血
14	20	20	10.8	所見なし	所見なし	所見なし	安楽殺
15	37	37	3.6	充血	充血	潰瘍	急性反応
16	50	50	6.4	びらん	充血	炎症	衰弱
17	51	51	5.5	びらん	充血	潰瘍	不明
18	73	71	5.9	充血	充血	充血	急性反応
19	74	68	12.9	所見なし	所見なし	所見なし	安楽殺

2.6.6.3.2. カニクイザル反復投与毒性試験

文献情報の概要をに示した。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 日間吸入した結果，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。0.08 mg/kg/日群については投与終了後 8 週間の回復期間を設定した結果，肺抵抗の増加に回復傾向がみられた。1 回換気量，呼吸数，動肺コンプライアンス及び血液ガス分析には異常はみられなかった。また，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[5]。

表 2.6.6.3.2-1 カニクイザル反復投与毒性試験成績

動物	カニクイザル，体重：約 1.7 kg			
投与経路，投与期間	20 mg/mL 溶液，吸入，7 日間，1 回/日			
投与量（mg/kg/日）	対照群	0.02	0.08	0.4
動物数	♂2/♀2	♂2/♀2	♂2/♀2	♂2/♀2
死亡例	0	0	0	0
一般状態	－	－	浅速呼吸，呼吸困難（投与終了後 5 分以内に回復）	浅速呼吸，呼吸困難（投与終了後 5 分以内に回復）
肺機能 1)	－	肺抵抗の増加	肺抵抗の増加	肺抵抗の増加
血液ガス分析 2)	－	－	－	－
心電図 2)	－	－	－	－
血液学的検査 3)	－	－	－	－
血液生化学的検査 3)	－	NE	NE	－
尿検査 3)	－	－	－	－
剖検 4)	－	－	－	－
臓器重量	－	－	－	－
病理組織学的検査	－	NE	－	－

－：特記すべき所見なし，NE：実施せず
1）：対照群，0.02 mg/kg/日群及び 0.4 mg/kg/日群は投与終了後当日に実施。0.08 mg/kg/日群については，投与終了後当日，その後は投与終了後 8 週間まで週 1 回の頻度で実施。
2）：投与終了後当日に実施。
3）：投与終了 2 日後に実施。
4）：対照群，0.02 mg/kg/日群及び 0.4 mg/kg/日群は投与終了 9 日又は 10 日後，0.08 mg/kg/日群は投与終了 8 週後に剖検を実施した。

2.6.6.4. 遺伝毒性試験

2.6.6.4.1. 細菌を用いた復帰突然変異試験［添付資料 4.2.3.3.1-1］

ネズミチフス菌（TA98 及び TA100 株）を用いて，19.53～5000 μg/プレートの用量で用量設定試験を実施した後，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，51.2～5000 μg/プレートの用量で，本試験を実施した。用量設定試験はプレート法，本試験はプレート法及びプレインキュベーション法により実施した。

試験の結果，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。

2.6.6.4.2. ほ乳類培養細胞を用いた染色体異常試験［添付資料 4.2.3.3.1-2］

チャイニーズハムスター肺由来線維芽細胞を用いて，7.81～500 μg/mL の濃度で実施した細胞増殖抑制試験では，細胞の増殖抑制及び被験物質の沈殿がみられなかったことから，本試験の短時間処理（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）を 125, 250 及び 500 μg/mL の濃度で実施した。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。

2.6.6.4.3. ラットを用いた小核試験［添付資料 4.2.3.3.2-1］

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，骨髄塗抹標本を作製し，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。

なお，メタコリンの海外での臨床試験及び副作用に関する文献調査では発がん，胎児毒性，催奇形性もしくは遺伝性疾患など，遺伝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)，2.7.4.2.1.1.(4) 参照）[8]。

2.6.6.5. がん原性試験

がん原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。

2.6.6.6. 生殖発生毒性試験

メタコリンの生殖発生毒性に関する文献は確認できなかったが，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，生殖発生毒性試験を実施しなかった。

- 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，吸入直後に最高濃度 1.18～5.16 ng/mL を示し，$t_{1/2}$ 28.1～175 min で消失することが明らかにされている（2.7.2.2.1 参照）。このときの最高血液中濃度は，*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暴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[8]。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）。

2.6.6.7. 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）。

2.6.6.8. 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）。以上のことから，幼若動物を用いた非

臨床試験を実施しなかった。

2.6.6.9. 考察及び結論

メタコリンは長年にわたり臨床で使用されており，多くの安全性に関する情報が集積されている。そのため，非臨床で実施された毒性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メタコリンの毒性を評価した。

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[1] [2] [3]。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[4]。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[5]。

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。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[6] [7]。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[5]。

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なかったこと，ヒトで最高濃度のメタコリン（25 mg/mL）を吸入したときの最高血中濃度は，*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 未満であり，メタコリン吸入後に全身暴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こと，さらにメタコリンの海外での臨床試験及び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ず，生殖発生毒性を示唆する副作用も報告されていないことから，メタコリンが生殖発生へ悪影響を及ぼす懸念はないと考えられたため，生殖発生毒性試験を実施しなかった（2.7.4.2.1.1.(3) 参照）[8]。

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）。

2.6.6.10. 図表

図表は本文中に記載。

2.6.6.11. 参考文献

[1] 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.

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

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

[4] 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.

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

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

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

[8] 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.