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）

2.6.7　非臨床概要　毒性試験の概要表

株式会社三和化学研究所

参天製薬株式会社

目次

2.6.7. 毒性試験の概要表 ····· 3
2.6.7.1. 毒性試験一覧表 ····· 3
2.6.7.2. 単回投与毒性試験 ····· 5
2.6.7.3. 反復投与毒性試験 ····· 7
2.6.7.4. *In vitro* 遺伝毒性試験 ····· 11
2.6.7.5. *In vivo* 遺伝毒性試験 ····· 15

2.6.7.毒性試験の概要表

2.6.7.1.毒性試験一覧表

被験物質：メタコリン塩化物

試験の種類	動物種	投与方法	投与期間	投与用量又は濃度	GLP適用	実施施設	文献著者	記載箇所
単回投与毒性試験	マウス	経口 静脈内 皮下	単回	－	非適	Merck Institute of Therapeutic Research	Molitor H, 1936	4.3-36
	マウス	皮下	単回	－	非適	The University of Pennsylvania	Simonart A, 1932	4.3-37
	ラット	経口 静脈内 皮下	単回	－	非適	Merck Institute of Therapeutic Research	Molitor H, 1936	4.3-36
	ラット	皮下	単回	－	非適	Temple University School of Medicine	Fellows EJ, 1940	4.3-38
	ウサギ	皮下	単回	5, 10, 15, 20, 25, 50, 100 mg/kg	非適	The University of Pennsylvania	Simonart A, 1932	4.3-37
	ネコ	皮下	単回	10, 20, 30, 40, 50 mg/kg	非適	The University of Pennsylvania	Simonart A, 1932	4.3-37
	モルモット	吸入 15 分間	単回	24 mg/mL	非適	G.D. Searle and Co.	Hambourger WE, 1948	4.3-39
	カニクイザル	吸入 2 分間	単回	20 mg/mL	非適	Huntingdon Research Centre	Binns R, 1975	4.3-19
反復投与毒性試験	イヌ	皮下 筋肉内	皮下：2～194 日 筋肉内：2～74 日	皮下：10～50 mg/日 筋肉内：10～125 mg/日	非適	McGill University	Wener J, 1948, 1949	4.3-40 4.3-41
	カニクイザル	吸入	7 日間	0.02, 0.08, 0.4 mg/kg/日	非適	Huntingdon Research Centre	Binns R, 1975	4.3-19

－：不明

（続く）

2.6.7 毒性試験の概要表

2.6.7.1. 毒性試験一覧表（続き）

被験物質：メタコリン塩化物

試験の種類	動物種/系統	投与方法	投与期間	投与用量又は濃度	GLP適用	実施施設	試験番号	記載箇所
遺伝毒性試験	ネズミチフス菌 大腸菌	*in vitro*	直接法 代謝活性化法	51.2～5000 µg/plate	適	ハンガリー [redacted]	[redacted]	4.2.3.3.1-1
	チャイニーズハムスター肺由来線維芽細胞	*in vitro*	直接法 代謝活性化法	125, 250, 500 µg/mL	適	日本 [redacted]	[redacted]	4.2.3.3.1-2
	ラット/Crl:CD(SD)	静脈内	2 日間	2.5, 5, 10 mg/kg/日	適	日本 [redacted]	[redacted]	4.2.3.3.2-1

2.6.7 毒性試験の概要表

2.6.7.2. 単回投与毒性試験

被験物質：メタコリン塩化物

動物種	投与方法	投与量 (mg/kg)	1 群の動物数	概略の致死量 (mg/kg)	特記すべき所見	文献著者
マウス	経口，静脈内，皮下	－	20～30	LD_{50} 経口：1100 静脈内：15 皮下：90	－	Molitor H, 1936
マウス	皮下	－	－	最小致死量： 50～75	致死量の投与直後に排便，流涎，呼吸困難，チアノーゼ及び痙攣がみられ，これらの症状はアトロピンにより抑制された。	Simonart A, 1932
ラット	経口，静脈内，皮下	－	20～30	LD_{50} 経口：750 静脈内：20 皮下：75	－	Molitor H, 1936
ラット	皮下	－	25	LD_{50}：75	－	Fellows EJ, 1940
ウサギ	皮下	5, 10, 15, 20, 25, 50, 100	1	最小致死量：20	5，10 及び 15 mg/kg で死亡例はなかった。20 mg/kg では投与数分後，25 mg/kg では投与 8 分後，50 mg/kg では投与 5 分後，100 mg/kg では投与 5 分以内に死亡した。致死量の投与直後に排便，流涎，呼吸困難，チアノーゼ及び痙攣がみられ，これらの症状はアトロピンにより抑制された。	Simonart A, 1932

－：不明

（続く）

2.6.7.2. 単回投与毒性試験（続き）

被験物質：メタコリン塩化物

動物種	投与方法	投与量 (mg/kg)	1 群の動物数	概略の致死量	特記すべき所見	文献著者
ネコ	皮下	10, 20, 30, 40, 50	20 mg/kg は 4 例 他の用量は 1 例	最小致死量： 20 mg/kg	10 mg/kg 投与によって投与 2 分以内に流涙，流涎，鼻汁，吐気，嘔吐，排便及び下痢がみられ，数分後に浅速呼吸及び呼吸困難がみられた。用量依存的に症状は増強し，20 mg/kg では投与数日後，30 mg/kg 及び 40 mg/kg では投与翌日に死亡した。50 mg/kg では顕著な呼吸困難がみられ，投与 30 分後に死亡した。上記の症状はアトロピンにより抑制された。	Simonart A, 1932
モルモット	吸入，15 分間	24 mg/mL	－	－	ほぼ全例死亡した。	Hambourger WE, 1948
カニクイザル	吸入，2 分間	20 mg/mL	雄：2 雌：2	－	死亡なし。4 例中 3 例で投与 30 秒後から 1 回換気量及び動肺コンプライアンスが減少，呼吸数及び肺抵抗が増加した。これらの変化は投与 2～3 分後にピークに達し，投与終了 30 分後までに回復した。	Binns R, 1975

－：不明

2.6.7.3. 反復投与毒性試験

被験物質：メタコリン塩化物

動物種	投与方法	投与期間	投与量 (mg/日)	1 群の動物数	特記すべき所見	文献著者
イヌ	皮下 筋肉内 (蜜蝋に混合)	皮下：2～194 日 筋肉内：2～74 日	皮下：10～50 筋肉内：10～125	皮下：29 筋肉内：19	＜一般状態＞ 皮下及び筋肉内投与群ともに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。ほぼ全例が切迫屠殺又は死亡した。 ＜剖検＞ 皮下投与群の切迫屠殺又は死亡例 25 例中 13 例において，胃，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認められた。筋肉内投与群の切迫屠殺又は死亡例 19 例中 10 例では，胃，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，十二指腸に潰瘍はみられなかった。 ＜病理組織学的検査＞ 皮下投与群：　胃又は十二指腸の血管拡張，粘膜内出血，粘膜壊死，急性炎症細胞浸潤，びらん，潰瘍 結腸の充血，粘膜内出血，粘膜壊死，急性炎症細胞浸潤 筋肉内投与群：　胃又は十二指腸の血管拡張，粘膜内出血，粘膜壊死，急性炎症細胞浸潤，びらん 結腸の充血，粘膜内出血，粘膜壊死，急性炎症細胞浸潤，潰瘍	Wener J, 1948, 1949
カニクイザル	吸入	7 日間	0.02, 0.08, 0.4 mg/kg 日	雄：2 雌：2	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，呼吸困難が認められた。上記所見について，0.08 mg/kg/日では投与終了後 8 週間の休薬期間中に回復傾向が認められた。なお，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。	Binns R, 1975

（続く）

2.6.7.3. 反復投与毒性試験（続き）

イヌ反復皮下投与毒性試験　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

（続く）

2.6.7.3. 反復投与毒性試験（続き）

イヌ反復皮下投与毒性試験　所見一覧（続き）

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	
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

（続く）

2.6.7.3. 反復投与毒性試験（続き）

イヌ反復筋肉内投与毒性試験　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

2.6.7.4. *In vitro*遺伝毒性試験

2.6.7.4.1. 細菌を用いた復帰突然変異試験

報告書の題名： TESTING OF METHACHOLINE CHLORIDE USP WITH BACTERIAL REVERSE MUTATION ASSAY
試験の種類： 細菌を用いた復帰突然変異試験
菌株： ネズミチフス菌及び大腸菌
代謝活性化系： フェノバルビタール及び 5,6–ベンゾフラボン誘導ラット肝 S9
溶媒： 被験物質：蒸留水　陽性対照：蒸留水又は DMSO
処理： プレート法及びプレインキュベート法共に 48 時間
細胞毒性： なし　遺伝毒性： 陰性

独立して実施した試験数： 2
プレート数： 3
分析細胞数/培養： 全コロニーを計測

被験物質： メタコリン塩化物
試験番号： [redacted]
CTD における記載箇所： 4.2.3.3.1-1
GLP 適用： 適
処理年月： [redacted] 年 [redacted] 月

（続く）

2.6.7.4.1.細菌を用いた復帰突然変異試験（続き）

プレート法

代謝活性化	被験物質 1)	用量 (μg/plate)	復帰変異コロニー数（平均±SD） 2)				
			TA98	TA100	TA1535	TA1537	WP2 *uvrA*
なし	無処置	－	18.3±2.52	109.0±6.00	15.0±2.65	6.3±1.15	48.3±3.51
	蒸留水	50 μL	21.7±6.11	113.3±4.73	15.0±2.00	6.0±1.00	54.0±5.57
	DMSO	50 μL	20.3±3.51	100.7±8.14	14.7±3.21	6.0±1.00	50.0±2.65
	メタコリン	5000	22.0±2.00	128.0±4.36	14.0±2.65	7.0±1.00	45.3±4.73
		2000	18.7±4.51	119.0±3.61	14.3±2.08	6.7±0.58	52.7±6.81
		800	25.3±2.52	128.3±5.86	14.7±3.79	5.3±0.58	53.0±8.00
		320	25.3±8.08	113.3±2.52	20.3±0.58	6.3±1.53	51.7±8.39
		128	22.7±2.08	121.0±8.72	14.3±4.04	6.7±2.08	52.0±4.58
		51.2	22.0±1.00	130.0±4.36	17.3±2.31	6.3±2.52	46.7±12.58
	NPD	4	444.7±27.06	NE	NE	NE	NE
	SAZ	2	NE	660.7±32.13	583.7±25.03	NE	NE
	9AA	50	NE	NE	NE	281.7±19.55	NE
	MMS	2 μL	NE	NE	NE	NE	664.3±13.05
あり	無処置	－	26.7±1.15	111.7±8.08	15.0±4.00	8.0±2.65	56.0±8.72
	蒸留水	50 μL	27.0±4.58	111.7±9.87	13.7±3.79	9.3±2.08	59.7±5.86
	DMSO	50 μL	25.3±7.02	110.7±10.60	15.0±4.00	11.3±2.52	57.3±2.31
	メタコリン	5000	27.0±8.19	118.3±4.73	11.3±1.53	8.3±2.31	58.7±6.03
		2000	33.7±4.93	116.7±6.03	12.7±1.53	9.7±1.15	55.0±7.00
		800	23.0±4.58	113.3±8.96	16.0±3.61	9.7±1.53	54.7±3.79
		320	31.0±8.54	108.7±9.29	12.7±1.15	8.7±1.53	48.7±5.03
		128	31.3±7.09	110.0±6.08	15.7±1.53	7.7±0.58	52.7±3.21
		51.2	30.0±3.46	115.0±3.00	14.0±1.00	9.7±1.15	61.0±1.73
	2AA	2	794.3±59.87	1464.7±68.30	212.3±9.45	119.7±15.01	NE
		50	NE	NE	NE	NE	424.0±20.00

－：なし，NE：実施せず

1）：陰性対照；蒸留水，DMSO

陽性対照；4-nitro-o-phenylene-diamine（NPD），Sodium azide（SAZ），9-aminoacridine（9AA），Methyl-methanesulfonate（MMS），2-aminoanthracene（2AA）

2）：3 枚のプレートの平均値±S.D.

（続く）

2.6.7.4.1.細菌を用いた復帰突然変異試験（続き）

プレインキュベーション法

代謝活性化	被験物質 1)	用量 (μg/plate)	復帰変異コロニー数（平均±SD） 2)				
			TA98	TA100	TA1535	TA1537	WP2 *uvrA*
なし	無処置	－	20.3±2.08	98.0±4.58	13.3±5.13	6.7±2.52	31.7±4.73
	蒸留水	50 μL	22.3±3.06	98.3±9.24	14.7±2.08	6.7±1.15	31.7±3.51
	DMSO	50 μL	26.3±9.07	100.7±7.09	12.7±3.51	7.3±2.08	30.3±2.52
	メタコリン	5000	22.7±6.11	85.0±7.21	13.0±1.73	6.7±0.58	30.7±2.08
		2000	18.0±1.00	105.0±7.81	14.3±2.52	5.7±2.08	34.0±3.46
		800	23.0±0.00	104.3±5.51	13.7±3.51	7.0±2.00	33.7±1.15
		320	23.7±5.69	93.7±7.77	12.3±4.51	9.3±1.15	25.7±3.51
		128	18.7±1.53	114.3±3.79	14.0±3.46	7.7±2.31	33.3±4.04
		51.2	22.3±4.73	106.7±7.23	14.3±3.79	6.3±0.58	30.7±3.21
	NPD	4	1033.3±83.27	NE	NE	NE	NE
	SAZ	2	NE	600.7±48.00	534.3±39.26	NE	NE
	9AA	50	NE	NE	NE	155.7±12.58	NE
	MMS	2 μL	NE	NE	NE	NE	1116.3±55.19
あり	無処置	－	28.3±3.21	120.0±2.00	17.3±3.51	9.7±2.08	36.0±5.57
	蒸留水	50 μL	32.0±4.00	117.7±2.52	17.7±1.53	8.7±1.15	37.7±8.74
	DMSO	50 μL	30.3±6.81	117.7±3.21	15.3±3.21	9.7±4.51	33.3±6.81
	メタコリン	5000	37.7±1.15	117.3±5.69	14.7±1.53	8.0±1.00	41.3±5.51
		2000	32.0±5.00	127.0±6.24	15.7±2.08	9.7±1.53	40.7±4.04
		800	30.0±4.36	131.3±2.89	17.7±1.53	7.7±2.89	39.0±6.24
		320	31.7±5.13	122.7±5.51	16.7±2.52	8.3±2.08	39.0±7.00
		128	29.3±6.11	128.7±4.51	16.3±3.21	9.3±2.08	38.0±3.00
		51.2	28.7±2.52	115.7±4.51	16.0±3.46	7.7±2.08	38.7±4.73
	2AA	2	870.7±68.04	1610.7±147.02	242.0±7.00	182.0±8.89	NE
		50	NE	NE	NE	NE	434.3±15.37

－：なし，NE：実施せず

1）：陰性対照；蒸留水，DMSO

陽性対照；4-nitro-o-phenylene-diamine（NPD），Sodium azide（SAZ），9-aminoacridine（9AA），Methyl-methanesulfonate（MMS），2-aminoanthracene（2AA）

2）：3 枚のプレートの平均値±S.D.

2.6.7.4.2. ほ乳類培養細胞を用いた染色体異常試験

報告書の題名： Chromosomal Aberration Study of SK-1211 in Cultured Mammalian Cells
試験の種類： ほ乳類培養細胞を用いた染色体異常試験
菌株： チャイニーズハムスター肺由来線維芽細胞
代謝活性化系： フェノバルビタール及び 5,6-ベンゾフラボン誘導ラット肝 S9
溶媒： 被験物質：生理食塩液　　陽性対照：生理食塩液又は DMSO
処理： 短時間処理： S9 非添加及び添加で 6 時間処理の後，18 時間の回復時間。
　　連続処理：　S9 非添加で 24 時間処理。
細胞毒性： なし　　遺伝毒性： 陰性

独立して実施した試験数：2
プレート数： 2
分析細胞数/濃度： 200

被験物質： メタコリン塩化物
試験番号： [redacted]
CTD における記載箇所： 4.2.3.3.1-2
GLP 適用： 適
処理年月： [redacted] 年 [redacted] 月～[redacted] 月

条件		被験物質 1)	濃度（μg/mL）	細胞増殖率（%）	構造的異常細胞の出現頻度（%） 2)	倍数体の出現頻度（%） 2)
短時間処理	直接法	生理食塩液	0	100	1.0	0.0
		メタコリン	125	104.5	1.0	0.0
			250	101.5	1.0	0.0
			500	101.9	0.0	0.0
		マイトマイシン C	0.1		52.5	0.0
	代謝活性化法	生理食塩液	0	100	1.0	0.0
		メタコリン	125	101.4	1.5	0.5
			250	94.2	0.5	0.0
			500	91.3	1.5	0.0
		ベンゾ [a] ピレン	15		31.5	0.0
連続処理	直接法	生理食塩液	0	100	0.5	0.0
		メタコリン	125	93.7	0.5	0.0
			250	93.4	0.5	0.0
			500	93.0	0.5	0.5
		マイトマイシン C	0.05		46.5	0.0

1）：陰性対照；生理食塩液，陽性対照；マイトマイシン C，ベンゾ [a] ピレン
2）：各用量につき，2 枚の標本を作製して，1 枚当たり 100 個，合計 200 個の細胞を観察し，標本 1 枚あたりの異常細胞の平均値を算出した。

2.6.7.5. *In vivo*遺伝毒性試験

2.6.7.5.1. ラットを用いた小核試験

報告書の題名： Micronucleus Test of SK-1211 with Rat Bone Marrow Cells
試験の種類： ラットを用いた小核試験
動物種/系統/性別： ラット/Crl:CD(SD)/雄
週齢： 8 週齢
投与方法： 陰性及び被験物質：静脈内投与　　陽性対照：経口投与
分析細胞数/動物： 2000
毒性/細胞毒性： 5 mg/kg 及び 10 mg/kg の各 1/5 例が死亡した。予備試験時（用量：2.5, 5, 10, 20 mg/kg）では，20 mg/kg の 2/3 例が死亡し，10 mg/kg 以下の用量で死亡例はみられなかった。
遺伝毒性： なし
暴露証明： －

処理計画： 2 日間（1 回/日）
骨髄採取時間： 最終投与後 24 時間
評価した細胞：幼若赤血球

被験物質： メタコリン塩化物
試験番号： [redacted]
CTD における記載箇所： 4.2.3.3.2-1
GLP 適用： 適
投与年月日： [redacted] 年 [redacted] 月 [redacted] 日，[redacted] 日

処置 [1)]	投与経路，投与回数 [2)]	用量（mg/kg/日）	動物数（匹）	死亡数（匹）	解析数（匹）	小核を有する幼若赤血球の出現頻度（%） [3)]	全赤血球に対する幼若赤血球の比（%）
生理食塩液	静脈内，2 回	0	5	0	5	0.13±0.04	52.0±2.8
メタコリン	静脈内，2 回	2.5	5	0	5	0.08±0.04	52.2±2.8
		5	5	1 [4)]	4	0.13±0.06	53.7±1.8
		10	5	1 [5)]	5	0.13±0.04	52.2±1.9
シクロフォスファミド	経口，2 回	20	5	0	5	5.09±0.61##	25.2±1.4**

1）：陰性対照；生理食塩液，陽性対照；シクロフォスファミド
2）：24 時間間隔で 2 回投与した。
3）：1 用量について，1 標本あたり 2000 個，合計 8000 または 10000 個の幼若赤血球を観察したときの平均値±S.D.。
4）：2 回目の投与後に死亡したため，予備動物を追加しなかった。
5）：1 回目の投与後に死亡したため，予備動物を 1 例追加した。
##：陰性対照と比較して統計学的有意差あり（p<0.01）Kastenbaum & Bowman's method
**：陰性対照と比較して統計学的有意差あり（p<0.01）Student's t-test