目次

2.4 非臨床試験の概括評価 3
2.4.1 非臨床試験計画概略 3
2.4.2 薬理試験 4
2.4.2.1 効力を裏付ける試験 4
2.4.2.2 安全性薬理試験 5
2.4.3 薬物動態試験 5
2.4.3.1 試験方法 5
2.4.3.2 吸収及び血漿中濃度 6
2.4.3.3 分布 6
2.4.3.4 代謝 7
2.4.3.5 排泄 7
2.4.3.6 薬物動態学的薬物相互作用 7
2.4.3.7 その他の薬物動態試験 8
2.4.4 毒性試験 8
2.4.4.1 反復投与毒性試験（筋肉内投与） 8
2.4.4.2 遺伝毒性試験 8
2.4.4.3 局所刺激性試験 8
2.4.4.4 既提出毒性試験概要 9
2.4.5 総括及び結論 10
2.4.6 参考文献一覧 11

非臨床試験の概括評価の略号一覧表

略号	省略していない表現（英語）	省略していない表現（日本語）
ALS	amyotrophic lateral sclerosis	筋萎縮性側索硬化症
AUC	area under the concentration-time curve	濃度-時間曲線下面積
$AUC_{(0\text{-}24h)}$	area under the concentration-time curve from zero time to 24 hours	投与時から 24 時間までの濃度-時間曲線下面積
BCRP	breast cancer resistance protein	乳癌耐性タンパク
CL	(plasma) total clearance	（血漿）全身クリアランス
C_{max}	maximum observed concentration	最高濃度
CYP	cytochrome P450	チトクローム P450
FCA	Freund's complete adjuvant	フロインド完全アジュバント
F_{im}	bioavailability after intramuscular dose	筋肉内投与後のバイオアベイラビリティ
GAD	gracile axonal dystrophy	簿束軸索ジストロフィー
hERG	human ether-à-go-go related gene	ヒト ether-à-go-go 関連遺伝子
iPS 細胞	induced pluripotent stem cell	人工多能性幹細胞
LC-MS/MS	liquid chromatography with tandem mass spectrometry	液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析
MATE	multidrug and toxin extrusion	多剤・毒性化合物排出
mRNA	messenger ribonucleic acid	メッセンジャーRNA
NMDA	*N*-methyl-D-aspartate	*N*-メチル-D-アスパラギン酸
NOAEL	no observed adverse effect level	無毒性量
NSC-34D	differentiated form of a Mouse Motor Neuron-Like Hybrid Cell Line	分化したマウス運動神経と神経芽細胞腫のハイブリッド細胞株
OAT	organic anion transporter	有機アニオントランスポーター
OATP	organic anion transporting polypeptide	有機アニオン輸送ポリペプチド
OCT	organic cation transporter	有機カチオントランスポーター
$OH\text{-}B_{12}$	hydroxocobalamin	ヒドロキソコバラミン
P-gp	P-glycoprotein	P 糖タンパク
SAM	*S*-adenosylmethionine	*S*-アデノシルメチオニン
SOD1	Cu/Zn superoxide dismutase	—
$t_{1/2}$	terminal elimination phase half-life	最終消失半減期
Tg	transgenic	トランスジェニック
TK	toxicokinetics	トキシコキネティクス
V_{ss}	volume of distribution at steady state	定常状態における分布容積

2.4 非臨床試験の概括評価

2.4.1 非臨床試験計画概略

メコバラミンは，活性型ビタミン B_{12} であり，日本では末梢性神経障害及びビタミン B_{12} 欠乏による巨赤芽球性貧血の治療剤として使用されている。1990 年代後半より，厚生科学研究費補助金特定疾患対策研究事業の神経変性疾患に関する研究班において，高用量のメコバラミンが筋萎縮性側索硬化症（ALS）患者に対して臨床効果を示すことが示唆されてきた。高用量メコバラミンの ALS の病態における作用機序は不明であるが，in vitro 及び in vivo において神経保護作用を有することから，ALS を含む神経変性疾患治療において有効であることが示唆された。

効力を裏付ける試験の社内研究として，ヒト人工多能性幹細胞（iPS 細胞）から分化させた運動神経を用いた酸化ストレスによる運動神経細胞傷害に対する本薬の保護効果，G93A 変異 Cu/Zn superoxide dismutase（SOD1）発現アストロサイトによるマウス運動神経細胞死に対する本薬の保護効果及び ALS モデル動物 G93A 変異 SOD1 トランスジェニック（Tg）マウスにおける本薬の延命効果を検討した。

効力を裏付ける試験の論文報告として，ラット培養網膜神経細胞及び大脳皮質神経細胞におけるグルタミン酸及びニトロプルシドナトリウム誘発神経細胞死に対する保護効果，ラット培養小脳顆粒細胞における軸索伸展促進作用，運動神経様に分化したマウス NSC-34D 細胞におけるホモシステイン誘発細胞死に対する保護効果，簿束軸索ジストロフィー（GAD）マウスの運動神経終末の変性に対する神経再生作用，ラットアクリルアミド神経障害モデルにおける神経再生作用及び ALS モデル動物である wobbler マウスにおける神経保護効果が報告されている。

安全性薬理試験として，心血管系，呼吸系及び中枢神経系に対する影響をラットとイヌを用いて検討した。また，ヒト ether-à-go-go 関連遺伝子産物（hERG）のカリウム電流及び活動電位パラメータへの影響を 2 種類の in vitro 電気生理学的試験で評価した。

メコバラミンの単回又は反復投与後の in vivo 薬物動態試験は，安全性試験で用いられた動物種であるラット及びイヌを用いて実施した。ラット及びイヌにおける組織分布及び排泄の評価には，^{57}Co 標識したメコバラミンを用いた。メコバラミンの血漿タンパク結合率は in vitro 系で評価した。メコバラミンによるヒトチトクローム P450（CYP）阻害及び誘導，並びにヒト薬物トランスポーターの阻害を介した薬物相互作用の可能性を in vitro 系で評価した。血漿中メコバラミン濃度の定量は，バリデートされた液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析（LC-MS/MS）による測定法を用いた。

メコバラミンの毒性試験は，反復投与毒性試験として，ラット及びイヌを用いた筋肉内投与による 2 週間反復投与毒性試験と，ラットを用いた週 3 回の間歇筋肉内投与による 6 ヵ月間反復投与毒性試験を実施した。また，遺伝毒性として，ラットを用いた in vivo 小核試験を実施した。さらに，ラットの 6 ヵ月反復投与試験のトキシコキネティクス（TK）検査においてみられた血漿中濃度のばらつきの機序解明に関する試験（加齢ラットを用いた単回投与 TK 試験，6 ヵ月反復投与による追加 TK 試験）を実施した。

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 ヒト iPS 細胞由来運動神経細胞における酸化ストレスに対する保護作用

（2.6.2.2.1 項参照）

ヒト iPS 細胞由来運動神経細胞を用い，抗酸化剤を含まない培地で培養して誘導した酸化ストレスに対するメコバラミンの効果を検討した。メコバラミン（0.1，0.3，1 μmol/L）は，抗酸化剤非添加による酸化ストレス誘発神経突起傷害を有意に抑制した。

2.4.2.1.2 G93A 変異 SOD1 発現アストロサイト誘発細胞死に対する保護作用

（2.6.2.2.2 項参照）

家族性 ALS 原因遺伝子の一つであるヒト変異 SOD1（G93A）導入マウスから調製したアストロサイトとマウス胚性幹細胞から分化させた運動神経細胞を共培養すると，運動神経細胞死が確認された。この運動神経細胞死に対して，メコバラミンは 0.01 μmol/L から濃度依存的に保護効果を示した。

2.4.2.1.3 グルタミン酸他誘発細胞死に対する保護作用

（2.6.2.2.3 項，2.6.2.2.4 項参照）

メチオニンとアデノシンの縮合により *S*-アデノシルメチオニン（SAM）が生成するが，SAM は種々のメチル化反応におけるメチル基供与体として働き，酸化ストレスによるタンパク質のダメージの修復時にもメチル基供与体として働く（Ingrosso D, et al., 2000）。メコバラミン及び SAM は，ラット培養網膜神経細胞におけるグルタミン酸及びニトロプルシドナトリウム誘発神経細胞死，ラット培養大脳皮質神経細胞におけるグルタミン酸，*N*-メチル-D-アスパラギン酸（NMDA），及びニトロプルシドナトリウム誘発神経細胞死を 0.01～10 μmol/L の範囲で抑制することが示された。よって，メコバラミンは SAM を介して神経細胞死を抑制することが示唆された。

2.4.2.1.4 神経軸索伸展促進効果

（2.6.2.2.5 項参照）

ラット培養小脳顆粒細胞において，メコバラミンは 0.1 μmol/L 以上で神経軸索伸展を促進したが，Erk1/2 のリン酸化阻害剤 U0126 及び Akt のリン酸化阻害剤 LY294002 存在下で抑制された。メコバラミンによる Erk1/2 及び Akt のリン酸化増加はメチオニン合成阻害剤 Nbtd により阻害されること，SAM 添加により Erk1/2 及び Akt のリン酸化が増加することから，メコバラミンは SAM を介して Erk1/2 及び Akt のリン酸化を増加させて神経軸索伸展を促進すると考えられた。

2.4.2.1.5 ホモシステイン誘発細胞死に対する保護作用

（2.6.2.2.6 項参照）

ホモシステインは，神経変性にかかわると考えられている。メコバラミンはホモシステインからメチオニンを合成するメチオニン合成酵素の補酵素として働くため，ALS におけるホモシステイン誘発細胞死を抑制することが示唆される。メコバラミンは，NSC-34D 細胞におけるホモシステイン誘発アポトーシス及びカスパーゼ 3/7 の活性化を 1 μmol/L 以上で抑制することが

示された。

2.4.2.1.6 ALS モデル動物における作用
（2.6.2.2.7 項，2.6.2.2.8 項参照）

メコバラミンは，ALS モデル動物である wobbler マウスにおける筋力低下と運動神経の変性に対して 30 mg/kg（腹腔内）で改善効果を示すことが確認された。一方，10 mg/kg（皮下）のメコバラミンは，ALS モデル動物 G93A 変異 SOD1 Tg マウスにおいて，反応個体数，生存日数及び発症後生存日数に対して媒体群に比べ増加を示したものの統計学的有意差はなかった。

2.4.2.1.7 その他の神経変性モデル動物における作用
（2.6.2.2.9 項，2.6.2.2.10 項参照）

メコバラミンは，簿束軸索ジストロフィー（GAD）マウスにおける運動神経終末の変性に対して 1 mg/kg（経口）で変性神経終末の再生を促進すること，ラットアクリルアミド末梢神経障害モデルにおいて 500 μg/kg（腹腔内）で軸索再生を促進することが確認された。

2.4.2.2 安全性薬理試験
（2.6.2.4 項参照）

中枢神経系に対する影響については，ラットにおける筋肉内投与試験で検討した。心血管系に対する影響については，hERG チャネルを発現した HEK293 細胞や摘出モルモット乳頭筋標本を用いた電気生理学的 in vitro 試験で検討した。また，心血管系及び呼吸系に対する影響について，テレメトリーを装着した覚醒犬を用いた筋肉内投与による試験で検討した。

その結果，中枢神経系の一般症状及び行動では，16 mg/kg まで影響は認められなかった。心血管系への影響について，hERG 末尾電流に対して 10 μmol/L で影響は認められなかった。摘出モルモット乳頭筋においては，各活動電位パラメータに対して 10 μmol/L で影響は認められなかった。覚醒イヌでは，血圧，心拍数及び心電図に対して 10 mg/kg で影響は認められなかった。呼吸系では，10 mg/kg で呼吸数及び血液ガスパラメータに影響は認められなかった。

以上，安全性薬理試験において，中枢神経系，心血管系及び呼吸系に対して，有害作用は認められなかった。

2.4.3 薬物動態試験
2.4.3.1 試験方法
（2.6.4.2 項参照）

ラット及びイヌの血漿試料中メコバラミン濃度の定量のために LC-MS/MS による測定法を開発してバリデート後に試験に用いた。なお，メコバラミンの代謝物であるヒドロキソコバラミン（OH-B_{12}）及びコバマミドの血漿中定量法に関しても LC-MS/MS による測定法を開発しバリデートした。ラット及びイヌにおける組織分布及び排泄の評価には，^{57}Co 標識したメコバラミン（[^{57}Co]メコバラミン）を用いた。メコバラミンの血漿タンパク結合率は in vitro 系で評価した。

2.4.3.2 吸収及び血漿中濃度
（2.6.4.3 項参照）

ラット及びイヌにメコバラミンを 1 mg/kg の用量で単回静脈内投与した際の未変化体の血漿中濃度はそれぞれ最終消失半減期（$t_{1/2}$）が 0.78 及び 1.30 時間で減少した。ラットにおける全身クリアランス（CL）及び定常状態における分布容積（V_{ss}）はそれぞれ 277.0 mL/h/kg 及び 245.0 mL/kg であり，イヌではそれぞれ 180.2 mL/h/kg 及び 257.0 mL/kg であった。いずれの動物種においても CL 及び V_{ss} は比較的小さい値であった。

単回筋肉内投与した際の濃度-時間曲線下面積（AUC）及び最高濃度（C_{max}）はいずれの動物種においても 0.3～3 mg/kg の用量範囲で投与量の増加に従って増加し，CL 及び $t_{1/2}$ は投与量によらずほぼ一定であった。この投与量範囲での筋肉内投与後のバイオアベイラビリティ（F_{im}）はラットで 72%以上，イヌでほぼ 100%であった。

OH-B_{12} 及びコバマミドの血漿中濃度を測定したところ，いずれの動物種においても静脈内及び筋肉内投与した際の血漿中 OH-B_{12} 濃度は未変化体の 10%以下であり，コバマミドは全ての測定時点で定量下限（10 ng/mL）未満であった。

雌雄のラットにメコバラミン（5, 10, 20 mg/kg）を 1 週間に 3 回 26 週間筋肉内投与し，投与開始日，投与開始後 26 日目並びに 180 日目の血漿中濃度を測定した。初回投与後の $AUC_{(0\text{-}24h)}$は 5 から 20 mg/kg の範囲内でほぼ投与量公比に従って上昇した。投与開始後 26 日目では $AUC_{(0\text{-}24h)}$ に顕著な変化は認められなかったが，180 日目では半減期の延長を伴う $AUC_{(0\text{-}24h)}$の顕著な上昇が 5 mg/kg の雌の群を除く全ての投与群で認められた。

2.4.3.3 分布
（2.6.4.4 項参照）

ラットに[^{57}Co]メコバラミンを単回筋肉内投与（1 mg/kg）後 0.5 時間において腎臓，膀胱及び動脈中放射能濃度は血漿より高値を示した。組織中放射能濃度は投与後 4 時間まで速やかに減少し，以後の消失は緩徐であった。投与後 0.5 時間で投与部位の筋肉中放射能濃度は血漿中濃度に近い値となったことから，メコバラミンは速やかに吸収されることが示唆された。

イヌに[^{57}Co]メコバラミンを単回筋肉内投与（1 mg/kg）後 0.5 時間において膀胱尿，腎髄質，投与部位の骨格筋，腎皮質及び静脈中の放射能濃度は血漿中放射能濃度より高値を示した。投与後 24 時間までに血漿を始めとする組織の放射能濃度は速やかに減少したが，投与後 168 時間における組織中放射能濃度は投与後 24 時間での値とほぼ同程度であった。

ラット，イヌ及びヒトにおける[^{57}Co]メコバラミンの血漿タンパク結合率は，30～3000 ng/mL の濃度で 21%～37%と低く，種差も小さかった。

ラット（妊娠 12 及び 18 日）に[^{57}Co]メコバラミン（1 mg/kg）を筋肉内投与したとき，投与後 0.5 時間の胎児中放射能濃度は母動物の血漿中濃度よりも低く，放射能の胎児への移行は低いことが示された。妊娠 18 日の場合も同様であり，放射能の胎児への移行は低かった。放射能の組織分布に性差は認められなかった。

分娩後 12 日の雌ラットに[^{57}Co]メコバラミン（1 mg/kg）を単回筋肉内投与したとき，投与後 0.5 時間の母乳中放射能濃度は，母動物の血液中濃度より低い値であった。その後乳汁中濃度は

上昇し，投与後 2 時間に最高値となり，以後徐々に減少した。

2.4.3.4 代謝
（2.6.4.5 項参照）

ラット及びイヌに[^{57}Co]メコバラミンを単回筋肉内投与した際の血漿，組織，尿を採取し代謝物の組成について検討した。

ラットに投与後 0.5 時間の血漿及びイヌに投与後 5 分から 2 時間の血漿には未変化体のみが検出された。ラット及びイヌに投与後 0.5 時間の骨格筋，肝臓及び腎臓では放射能の 94.6%以上が未変化体であった。ラットの腎臓では経時的に未変化体の比率が減少し，168 時間ではコバマミド及び OH-B_{12} が未変化体より濃度が高かった。ラット及びイヌの投与後 24 時間までの尿には投与量の 89.1%以上が未変化体として排泄された。

ヒト肝ミクロソームを用いた in vitro 実験系で，9 種の CYP 分子種の酵素活性に対するメコバラミンの阻害作用を検討したところ，検討した全ての CYP 分子種（11 種の基質）に対してメコバラミンの阻害率は検討した最高濃度（100 μmol/L）においても 50%に満たなかった。

ヒト凍結肝細胞を用いた in vitro 試験により,メコバラミン（10，30，100 μmol/L）の CYP1A2, CYP2B6 及び CYP3A4 のメッセンジャーRNA（mRNA）の発現量に対する影響を調べたところ，メコバラミンは，検討した 3 分子種に対してほとんど誘導能を示さなかった。

2.4.3.5 排泄
（2.6.4.6 項参照）

ラット及びイヌに[^{57}Co]メコバラミン（1 mg/kg）を単回筋肉内投与し排泄を調べた。

ラットにおいては，投与後 24 時間までに投与放射能の 90.8%が尿中に，3.3%が糞中に排泄され，放射能は速やかに尿中へ排泄されることが示された。投与後 168 時間までの尿中に 91.6%，糞中に 4.2%が排泄され，体内には 1.6%の放射能が残存しており，放射能の回収率は 97.4%であった。放射能の胆汁中排泄はほとんど認められなかった。

イヌでは，投与後 24 時間までに，投与放射能の 98.9%が尿中に，0.5%が糞中に排泄されており，放射能は速やかに尿中へ排泄されることが示された。投与後 168 時間までに尿中に 99.3%，糞中に 0.8%，計 100.0%の放射能が排泄された。

2.4.3.6 薬物動態学的薬物相互作用
（2.6.4.7 項参照）

In vitro 評価系によるヒト代謝酵素に対する誘導及び阻害については 2.4.3.4 項に示した。また，メコバラミンのヒト薬物トランスポーターの輸送活性に対する阻害作用を in vitro で評価した。検討した薬物トランスポーターは，P 糖タンパク（P-gp），乳癌耐性タンパク（BCRP），有機アニオン輸送ポリペプチド（OATP，検討分子種は OATP1B1 及び OATP1B3），有機アニオントランスポーター（OAT，検討分子種は OAT1 及び OAT3），有機カチオントランスポーター（OCT，検討分子種は OCT1 及び OCT2）及び多剤・毒性化合物排出（MATE，検討分子種は MATE1 及び MATE2-K）とした。メコバラミンの阻害作用は，検討した全てのトランスポーターの輸送活性に対して最高濃度（100 μmol/L）においても 50%に満たなかった。

2.4.3.7 その他の薬物動態試験
（2.6.4.8 項参照）

ラットにメコバラミンを反復投与した際の AUC の上昇の原因を追及するためにラットにメコバラミン 20 mg/kg を反復投与後のメコバラミンの CL 変動及び[redacted]を媒体投与群と比較した。その結果，AUC の上昇は加齢及び投与経路に依存した変化ではなく，メコバラミンの反復投与により[redacted]することが原因であることが明らかとなった。

2.4.4 毒性試験
2.4.4.1 反復投与毒性試験（筋肉内投与）
（2.6.6.3 項参照）

メコバラミンのラット（2 週間反復及び 6 ヵ月間歇投与）及びイヌ（2 週間反復投与）における筋肉内投与では，メコバラミンの尿中排泄による尿の着色（赤色）がみられた。投与部位の変化（筋線維における局所的な壊死や再生像）は 2 週間反復投与ではラット・イヌともに対照群と同程度であったが，より長期投与したラットの 6 ヵ月間歇投与では，対照群に比べて 20 mg/kg で再生像が顕著であった。しかしながら，投与部位の変化は対照群を含めて軽度であり，刺激性及び傷害性を示唆するものではなかった。また，ラットの 6 ヵ月間歇投与における TK 測定では，投与 180 日に $AUC_{(0\text{-}24h)}$の高値と個体間のばらつきがみられた。本試験における無毒性量（NOAEL）は 20 mg/kg と考えられた。

TK パラメータのばらつきの原因を解明するため，雄の加齢ラットを用いた単回静脈内及び筋肉内投与 TK 試験を実施したところ，加齢による TK パラメータへの影響はみられなかった。次に，6 ヵ月反復投与による追加 TK 試験を実施して，反復投与による影響を検討したところ，反復投与による C_{max} の明らかな上昇はみられなかったが，$AUC_{(0\text{-}24h)}$は顕著に上昇し，再現性が認められた。また，2.4.3.7 項に記載したように，メコバラミンの反復投与により[redacted]することがクリアランス低下の要因であることが明らかとなった。

2.4.4.2 遺伝毒性試験
（2.6.6.4 項参照）

ラットを用いた骨髄小核試験では，250 mg/kg まで静脈内投与しても，小核を有する幼若赤血球の出現頻度及び全赤血球に対する多染性赤血球の比は，いずれの群においても陰性対照群と有意な差はみられず，染色体異常誘発作用を示さなかった。

2.4.4.3 局所刺激性試験
（2.6.6.7 項参照）

本承認申請で実施したラット及びイヌの反復投与毒性試験において，投与部位に対する影響を評価した結果，投与部位の変化（筋線維における局所的な壊死や再生像）は 2 週間反復投与ではラット・イヌともに対照群と同程度であったが，より長期投与したラットの 6 ヵ月間歇投与では，対照群に比べて 20 mg/kg で再生像が顕著であった。しかしながら，対照群を含めて軽度であり，刺激性及び傷害性を示唆するものではなく，局所刺激性はないものと判断した。

2.4.4.4 既提出毒性試験概要
（2.6.6.2 項，2.6.6.3 項，2.6.6.4 項，2.6.6.6 項，2.6.6.7 項及び2.6.6.8項参照）

単回投与毒性試験（静脈内投与）

イヌにおける静脈内投与による単回投与毒性試験（50，200 mg/kg）では，いずれの投与量においても死亡はみられなかった。50 mg/kg 以上で流涎及びメコバラミンの尿排泄による着色尿（赤色），200 mg/kg で顔面及び腹部の紅潮及び不穏がみられた。

反復投与毒性試験（静脈内投与）

イヌにおける静脈内投与による 3 ヵ月反復投与毒性試験（0.5，5 及び 50 mg/kg）では，5 mg/kg 以上でメコバラミンの尿排泄による着色尿（赤色）がみられ，50 mg/kg では皮膚の紅潮及び腎の近位尿細管上皮細胞質内にライソソームの増加が観察された。腎の所見はメコバラミンの大量投与に起因する生理的な適応性変化と考えられ，可逆的なものであった。イヌにおける静脈内投与による 12 ヵ月反復投与毒性試験（0.5，5 及び 50 mg/kg）では，同様に 5 mg/kg 以上でメコバラミンの尿排泄による着色尿（赤色）がみられ，50 mg/kg では皮膚の紅潮がみられた。5 mg/kg 以上で腎及び肝にメコバラミンの大量投与による生理的な適応性変化がみられた。12 ヵ月反復投与時の NOAEL は 5 mg/kg と考えられた。

遺伝毒性試験

細菌を用いたプレインキュベーション法による復帰突然変異原性試験では，ネズミチフス菌 TA1535，TA1537，TA1538，TA98，TA100，大腸菌 WP2/*uvrA* のいずれの菌株についても S9 mix 存在下及び非存在下で 5000 μg/plate まで遺伝子突然変異誘発作用を示さなかった。

哺乳動物細胞（チャイニーズハムスターV79 細胞）を用いた in vitro 染色体異常試験では，直接法では 2.7 mg/mL，代謝活性化法では 3.6 mg/mL まで，メコバラミンは染色体異常誘発能を示さなかった。

生殖発生毒性試験（静脈内投与）

ラットの妊娠前及び妊娠初期投与試験（0.5，5 及び 50 mg/kg）では，50 mg/kg で雌雄ともに明らかな体重増加抑制が，雌では摂餌量低下がみられたが，いずれの投与量においても性周期及び雌雄の生殖機能，胎児の発生及び発育に対する影響はみられなかった。一般毒性に対する NOAEL は雌雄ともに 5 mg/kg，生殖機能及び次世代発生に対する NOAEL は雌雄ともに 50 mg/kg 以上であると考えられた。

ラットの胎児器官形成期投与試験（0.5，5 及び 50 mg/kg）では，いずれの投与量においても母動物の死亡はみられず，臨床症状観察，哺育状態，体重，着床率，妊娠期間及び分娩指標への影響はなかった。胎児に対しては，いずれの投与量においても一腹平均の生存胎児数，外表，骨格及び内部観察に影響はみられなかった。また，胎児発育，出生児（F1）での生後発育及び生殖機能，並びに F2 胎児の発生及び発育に対しても影響はみられなかった。したがってメコバラミンは催奇形性を有しておらず，母動物，胎児及び出生児（F1）に対するメコバラミンの NOAEL は 50 mg/kg と考えられた。

ウサギの胎児器官形成期投与試験（0.5，5 及び 50 mg/kg）では，いずれの投与群においても母動物の死亡はみられず，臨床症状観察，体重及び摂餌量測定，妊娠状態への影響はみられなかった。また，

胎児の発育及び形態観察（外表，骨格，内部器官）においても影響はみられなかった。したがってメコバラミンは催奇形性を有しておらず，母動物及び胎児に対する NOAEL は 50 mg/kg と考えられた。

ラットの静脈内投与による周産期・授乳期投与試験（0.5，5 及び 50 mg/kg）では，いずれの投与群においても母動物の死亡はみられず，妊娠後期及び授乳期間における母動物，F1 出生児の生後発育及び生殖機能並びに第三世代（F2）の発生及び発育に対する影響はみられなかった。したがって，母動物，出生児（F1）及び胎児（F2）に対するメコバラミンの NOAEL は 50 mg/kg と考えられた。

その他の毒性試験

マウス，モルモット及びウサギを用いた抗原性試験の結果，マウス及びウサギでは陰性であった。モルモットではメコバラミン+フロインド完全アジュバント（FCA）で感作した遅延型アレルギー皮膚反応のみで陽性を示したが，メコバラミン単独で静脈内又は皮下投与で免疫したモルモットでは陰性であった。

2.4.5 総括及び結論

ALS の病因は未だ解明されていないが，ALS の病態には興奮性アミノ酸及び酸化ストレス等が運動神経細胞死にかかわると考えられている。メコバラミンは，ヒト iPS 細胞由来運動神経細胞における，抗酸化剤非添加による酸化ストレス誘発神経突起傷害を 0.1～1 μmol/L で有意に抑制した。メコバラミンは，ヒト変異 SOD1（G93A）導入マウスアストロサイト誘発運動神経細胞死に対し 0.01 μmol/L 以上で保護効果を示すことが確認された。さらに，メチオニンより SAM が生成するが，メコバラミン及び SAM は，培養神経細胞におけるグルタミン酸，NMDA，及びニトロプルシドナトリウム誘発神経細胞死を 0.01～10 μmol/L の範囲で抑制したことから，メコバラミンは興奮性神経細胞死を抑制すること，メコバラミンによる神経細胞死の抑制は，SAM を介することが示唆された。また，メコバラミンは，NSC-34D 細胞におけるホモシステイン誘発アポトーシスを 1 μmol/L 以上で抑制したことから，ALS におけるホモシステイン誘発細胞死を抑制することも示唆される。ALS モデル動物を用いた研究では，メコバラミンは wobbler マウスにおける筋力低下と運動神経の変性に対して 30 mg/kg（腹腔内）で改善効果を示すことが確認されたが，SOD1 Tg マウスにおける反応個体数，生存日数及び発症後生存日数に対して 10 mg/kg（皮下）で媒体群に比べ増加を示すことが確認されたものの統計学的有意差はなかった。

安全性薬理試験において，中枢神経系，心血管系及び呼吸系に対して，有害作用は認められなかった。

ラット PK 試験及び TK 試験の結果から，筋肉内投与時のメコバラミンの生体内利用率は 70%以上であり，ヒトにおいても筋肉内投与時のメコバラミンの生体内利用率は高いものと思われた。

ラット及びイヌに[^{57}Co]メコバラミン（1 mg/kg）を単回筋肉内投与した際，大部分が未変化体として尿に排泄され，ヒトにおいても同様に投与したメコバラミンは主に未変化体として尿に排泄されるものと思われる。また，ラットに[^{57}Co]メコバラミン（1 mg/kg）を単回筋肉内投与した際の放射能の分布に性差は認められず，放射能の乳汁移行は緩徐であり，胎児移行は低かった。

メコバラミンを高投与量反復投与すると[redacted]することが明らかとなった。[redacted]クリアランスが低下すると推定された。ヒトにおいても[redacted]は上昇すると思われる。初回投与後 183 日目の投与後 0.5 時間における[redacted]となっており，メコバラミンと[redacted]があることが示唆された。間歇的に反復投与した場合には，[redacted]していると思われたため，[redacted]の上昇に寄与するが，[redacted]は初回投与時と比べて大きく変動することはないと考えられた。

ラット及びイヌを用いた反復投与毒性試験において，本薬由来の顕著な毒性は認められず，暴露量の観点からも本薬の臨床使用における高い安全性が示唆された。

2.4.6 参考文献一覧

Ingrosso D, D'Angelo S, di Carlo E, Perna AF, Zappia V, Galletti P. Increased methyl esterification of altered aspartyl residues in erythrocyte membrane proteins in response to oxidative stress. Eur J Biochem. 2000;267(14):4397–405.