目次

2.6.6 毒性試験の概要文 3
2.6.6.1 まとめ 3
2.6.6.2 単回投与毒性試験 6
2.6.6.3 反復投与毒性試験 6
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 11
2.6.6.8 その他の毒性試験 11
2.6.6.9 考察及び結論 14
2.6.6.10 図表 15
2.6.6.11 参考文献 15

毒性試験の概要文の略号一覧表

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
ASA	active systemic anaphylaxis	能動性全身アナフィラキシー反応試験
Alum	aluminum hydroxide gel	水酸化アルミニウムゲル
AUC	area under the concentration-time curve	濃度–時間曲線下面積
BSA	bovine serum albumin	ウシ血清アルブミン
C_{15min}	observed concentration at 15 min	投与後 15 分における濃度
C_{max}	maximum observed concentration	最高濃度
FCA	Freund's complete adjuvant	フロインド完全アジュバント
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
NOAEL	no observed adverse effect level	無毒性量
NZW	New Zealand white	－（ウサギの系統）
OVA	ovalbumin	オバルブミン
PCA	passive cutaneous anaphylaxis	受身皮膚アナフィラキシー
S9 mix	9000×g supernatant of homogenate	ホモジネート 9000×g 上清
SD	Sprague Dawley	－（ラットの系統）
TK	toxicokinetics	トキシコキネティクス
t_{max}	time at which the highest drug concentration occurs	最高血漿中濃度到達時間

2.6.6 毒性試験の概要文

2.6.6.1 まとめ

本申請では，メコバラミンの ALS における臨床投与レジメに準じた反復投与毒性試験を 3 試験，in vivo 遺伝毒性試験を 1 試験，その他の毒性試験を 2 試験，計 6 試験を実施して，過去のメコバラミン注の承認申請で提出済の毒性試験も踏まえて評価した。

すなわち，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 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。非 GLP で実施したラット単回投与 TK 試験を除く 5 つの GLP 試験を本承認申請における添付資料（評価資料）とした。

本申請のために実施した毒性試験のリストを表 2.6.6-1 に示した。

表 2.6.6-1 本申請のために実施した毒性試験プログラム（評価資料）

試験種及び投与期間	投与経路	試験系	GLP の適否
反復投与毒性試験			
2週間	筋肉内	ラット，イヌ	適
6ヵ月（週3回間歇投与）	筋肉内	ラット	適
遺伝毒性試験			
小核試験	静脈内	ラット	適
その他の毒性試験			
単回投与TK試験	筋肉内／静脈内	ラット[a]	否[b]
6ヵ月反復投与TK試験	筋肉内／静脈内	ラット	適

a：加齢の雄ラット（投与時37週齢）を用いた。
b：非GLPで実施したことから，参考資料の扱いとした。

上記の毒性試験は，本申請の用法･用量（25 mg 又は 50 mg を週 2 回筋肉内注射）が既承認（500 μg を週 3 回筋肉内又は静脈内注射）の範囲を大きく超えており，また，用法も異なることから，臨床使用を模した非臨床安全性試験に関する資料は必要であると判断して追加実施した。遺伝毒性では，標準的な遺伝毒性試験の組み合わせである in vivo 試験が実施されていなかったことから，ラットを用いた in vivo 小核試験を実施した。

反復投与毒性試験（筋肉内投与）

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。

遺伝毒性試験（静脈内投与）

ラットを用いた骨髄小核試験では，臨床製剤を用いて投与可能最大である 250 mg/kg まで投与しても，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。

局所刺激性試験

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。

その他の毒性試験

先に実施したラットの筋肉内投与による 6 ヵ月反復投与毒性試験の TK 測定では，反復投与により $AUC_{(0\text{-}24h)}$が増加し，動物間で値のばらつきがみられた。こ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。

表 2.6.6-2 に示す毒性試験（メコバラミンの静脈内投与による毒性試験等）については，過去の承認申請時に既に提出済であるが，本申請でメコバラミンの毒性評価の際に参照とするため，本承認申請時に参考資料として再度提出することとした。

表 2.6.6-2 既に提出済みの毒性試験プログラム（参考資料）

試験種及び投与期間	投与経路	試験系	GLP の適否
単回投与毒性試験	静脈内	イヌ	適
反復投与毒性試験			
3ヵ月	静脈内	イヌ	適
12ヵ月	静脈内	イヌ	適
遺伝毒性試験			
細菌を用いた復帰突然変異試験	in vitro	細菌[a]	適
培養細胞を用いた染色体異常試験	in vitro	CHL細胞	適
生殖発生毒性試験			
妊娠前・妊娠初期投与試験（Segment I）	静脈内	ラット	適
胎児の器官形成期投与試験（Segment II）	静脈内	ラット，ウサギ	適
周産期・授乳期投与試験（Segment III）	静脈内	ラット	適
その他の毒性試験			
抗原性試験	腹腔内／皮下／筋肉内／静脈内／皮内	マウス，モルモット，ウサギ	適

a：ネズミチフス菌 TA1535，TA1537，TA1538，TA98，TA100 及び大腸菌 WP2/*uvrA*。

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。

2.6.6.2 単回投与毒性試験

本承認申請で新規に実施した単回投与毒性試験はない。

2.6.6.2.1 イヌにおける静脈内投与による単回投与毒性試験（試験番号：841244，4.2.3.1.1 項参照）（参考資料）

メコバラミンを 5%マンニトール水溶液に溶解し，雌雄のビーグル犬（1 匹/性/群）に 50 及び 200 mg/kg の投与量で単回静脈内投与した。対照群には媒体を投与した。動物は，投与後 15 日に剖検した。

その結果，いずれの投与量でも死亡はみられなかった。50 mg/kg 以上で流涎及び着色尿（赤色）がみられた。着色尿については，メコバラミンの尿排泄によるものであり，毒性学的に意義のある変化ではないと判断した。200 mg/kg では，投与中～投与終了直後に顔面及び腹部の紅潮及び不穏がみられた。その他，体重，摂餌量，摂水量，血液学的検査，血液生化学的検査，尿検査及び剖検所見に変化はみられなかった。

以上の結果から，イヌにおける単回投与による概略の致死量は 200 mg/kg 超と判断された。

2.6.6.3 反復投与毒性試験

本承認申請では，新たに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 ヵ月反復投与毒性試験を実施した。

2.6.6.3.1 ラットにおける筋肉内投与による 2 週間反復投与毒性試験（試験番号：S03089，添付資料 4.2.3.2.1 ）

メコバラミンを 6.25%ラクトースを含む媒体に溶解し，雌雄の SD ラット（10 匹/性/群）に 5，10 及び 20 mg/kg の投与量で 1 日 1 回 2 週間，筋肉内（腓腹筋及び大腿筋）に投与した。対照群には媒体を投与した。投与容量は，対照群及び 20 mg/kg では 1.6 mL/kg，10 mg/kg では 0.8 mL/kg，5 mg/kg では 0.4 mL/kg とした。TK を評価するため，対照群を除く各群に雌雄各 3 匹を別途設定した。2 週間の投与期間終了後に全生存例を剖検した。検査項目として，死亡の有無，臨床症状観察，体重及び摂餌量測定，眼科学的検査，血液学的検査，血液生化学的検査，尿検査，TK 測定，臓器重量測定，肉眼及び病理組織学的検査を実施した。

その結果，いずれの投与量でも薬物投与に起因する死亡はみられなかった。投与期間中，全ての薬物投与群でメコバラミンの尿排泄による着色尿（赤色）がみられた。また，投与部位に局所的な筋線維の壊死や再生像等が観察されたが，筋肉内反復投与に伴う機械的障害によるものであった。その他の検査項目では，毒性学的に意義のある変化はみられなかった。

TK では，t_{max} は投与後 0.25～0.5 時間の間にあった。C_{max} 及び $AUC_{(0\text{-}24h)}$は用量に依存して増加し，明らかな性差及び連投による蓄積性はみられなかった。

以上，メコバラミンの 5，10 及び 20 mg/kg を雌雄の SD ラットに 2 週間筋肉内投与した結果，20 mg/kg まで毒性学的に意義のある変化はみられなかった。

2.6.6.3.2 ラットにおける筋肉内投与による 6 ヵ月反復投与毒性試験（試験番号：SBL47-90，添付資料 4.2.3.2.2 ）

メコバラミンを 6.25%ラクトースを含む媒体に溶解し，雌雄の SD ラット（15 匹/性/群）に 5，10 及び 20 mg/kg の投与量で週 3 回 6 ヵ月間，筋肉内（腓腹筋及び大腿筋）に投与した。対照群には媒体を投与した。投与容量は，対照群及び 20 mg/kg では 1.6 mL/kg，10 mg/kg では 0.8 mL/kg，5 mg/kg では 0.4 mL/kg とした。TK を評価するため，対照群を除く各群に雌雄各 4 匹を別途設定した。6 ヵ月間の投与期間終了後に全生存例を剖検した。検査項目として，死亡の有無，臨床症状観察，体重及び摂餌量測定，眼科学的検査，血液学的検査，血液生化学的検査，尿検査，TK 測定，臓器重量測定，肉眼及び病理組織学的検査を実施した。

その結果，いずれの投与量でも死亡はみられなかった。投与期間中，全ての薬物投与群でメコバラミンの尿排泄による着色尿（赤色）がみられた。また，投与部位に 2 週間反復投与と同様に局所的な筋線維の壊死や再生像が観察された。20 mg/kg で筋線維の再生像が顕著であったが，対照群を含め全ての投与群でみられた軽度の変化であった。その他の検査項目では，毒性学的に意義のある変化はみられなかった。

TK では，t_{max} は投与後 0.38～1 時間であった。C_{max} 及び $AUC_{(0\text{-}24h)}$は投与初日及び 26 日に雌雄ともに用量に依存して増加し，明らかな性差はみられなかった。投与 180 日には投与初日と比較して 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（C_{max} は約 0.8～1.3 倍，$AUC_{0\text{-}24h}$ は約 1.2～18.9 倍），値は動物間でばらつきがみられた。

以上，メコバラミンの 5，10 及び 20 mg/kg を雌雄の SD ラットに週 3 回 6 ヵ月筋肉内投与した結果，対照群も含め投与部位における局所的な筋線維の再生像が観察され，20 mg/kg でやや顕著であった。また，TK において投与 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 NOAEL は 20 mg/kg と考えられた。

2.6.6.3.3 イヌにおける筋肉内投与による 2 週間反復投与毒性試験（試験番号：S03037，添付資料 4.2.3.2.3 ）

メコバラミンを 6.25%ラクトースを含む媒体に溶解し，雌雄のビーグル犬（3 匹/性/群）に 2.5 及び 6.25 mg/kg の投与量で 1 日 1 回 2 週間，筋肉内（臀筋及び大腿筋）に投与した。対照群には媒体を投与した。投与容量は，対照群及び 6.25 mg/kg では 0.5 mL/kg，2.5 mg/kg では 0.2 mL/kg とした。2 週間の投与期間終了後に生存動物を剖検した。検査項目として，死亡の有無，臨床症状観察，体重及び摂餌量測定，眼科学的検査，心電図測定，血液学的検査，血液生化学的検査，尿検査，TK 測定，臓器重量測定，肉眼及び病理組織学的検査を行った。

その結果，いずれの投与量でも死亡はみられなかった。ラット同様，投与期間中，全ての薬物投与群でメコバラミンの尿排泄による着色尿（赤色）がみられた。また，投与部位に局所的な筋線維の壊死や再生像等が観察されたが，筋肉内への反復投与に伴う機械的障害によるものであった。その他の検査項目では，毒性学的に意義のある変化はみられなかった。

TK では，t_{max} は投与後 0.25～0.5 時間の間にあった。C_{max} 及び $AUC_{(0\text{-}24h)}$は用量に依存して増加し，明らかな性差及び蓄積性はみられなかった。

以上，メコバラミンの 2.5 及び 6.25 mg/kg を雌雄のビーグル犬に 2 週間筋肉内投与した結果，6.25 mg/kg まで毒性学的に意義のある変化はみられなかった。

2.6.6.3.4 イヌにおける静脈内投与による 3 ヵ月間反復毒性試験及び 1 ヵ月間回復性試験（試験番号：FLS 84-4029，添付資料 4.2.3.2.4 ［参考］）

メコバラミンを 5%マンニトール水溶液に溶解し，雌雄のビーグル犬（5 匹/性/群）に 0.5，5 及び 50 mg/kg の投与量で 1 日 1 回 3 ヵ月間静脈内投与した。対照群には媒体を投与した。各群の雌雄各 3 匹を 3 ヵ月間投与後に，雌雄各 2 匹を 1 ヵ月間の休薬後にそれぞれ剖検した。検査項目として，死亡の有無，臨床症状観察，体重及び摂餌量測定，眼科学的検査，心電図測定，血液学的検査，血液生化学的検査，尿検査，臓器重量測定，骨髄像検査，肉眼及び電顕を含む病理組織学的検査を行った。

その結果，いずれの投与量でも死亡はみられなかった。投与期間中，5 mg/kg 以上でメコバラミンの尿排泄による着色尿（赤色）がみられた。50 mg/kg では全例で皮膚の紅潮がみられ，雌 1 例で全身性の浮腫と紅色蕁麻疹様の膨疹もみられた。いずれの変化も 1 時間以内に消失した。投与期間終了後の剖検では，50 mg/kg の全例で腎皮質の変色がみられ，5 及び 50 mg/kg の雄では精巣上体がメコバラミンと同色の赤色調を帯びていた。これらの色調は，回復期間終了後わずかに退色した。病理組織学的検査では，腎の近位尿細管上皮細胞質内にライソソームの著しい増加がみられた。腎の変化はメコバラミンの大量投与による生理的な反応と考えられ，また

可逆的なものであった。精巣上体には病理組織学的変化はみられなかった。その他の検査項目では，毒性学的に意義のある変化はみられなかった。

以上，メコバラミンの 0.5，5 及び 50 mg/kg を雌雄のビーグル犬に 3 ヵ月間静脈内投与した結果，5 mg/kg まで毒性所見はみられなかった。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。

2.6.6.3.5 イヌにおける静脈内投与による 12 ヵ月慢性毒性試験（試験番号：FLS 84-4030，添付資料 4.2.3.2.5 ［参考］）

メコバラミンを 5%マンニトール水溶液に溶解し，雌雄のビーグル犬（4 匹/性/群）に 0.5，5 及び 50 mg/kg の投与量で 1 日 1 回 12 ヵ月間静脈内投与した。対照群には媒体を投与した。12 ヵ月間の投与期間終了後に生存動物を剖検した。検査項目として，死亡の有無，臨床症状観察，体重及び摂餌量測定，眼科学的検査，心電図測定，血液学的検査，血液生化学的検査，尿検査，臓器重量測定，骨髄像検査，肉眼及び電顕を含む病理組織学的検査を行った。

その結果，いずれの投与量でも死亡はみられなかった。3 ヵ月間反復投与と同様，投与期間中 5 mg/kg 以上でメコバラミンの尿排泄による着色尿（赤色）がみられた。50 mg/kg では全例で皮膚の紅潮がみられ，少数例において投与直後に一過性の丘疹がみられた。投与期間終了後の剖検では，5 及び 50 mg/kg で雌雄全例の腎皮質及び雄全例の精巣上体が，50 mg/kg で雄 2 例の前立腺が，いずれもメコバラミンと同色の赤色調を示した。病理組織学的検査では，腎の近位尿細管上皮細胞質内に光顕的に好酸性顆粒の沈着がみられ，電顕的にはライソソームの増加がみられた。50 mg/kg では，腎の糸球体メサンギウム及び肝のクッパー細胞にライソソームの増加がみられた。5 又は 50 mg/kg での腎又は肝の病理組織学的検査でみられた変化はメコバラミンの大量投与による生理的な反応と考えられた。また，精巣上体及び前立腺にメコバラミンに関連した変化はみられなかった。その他の検査項目では，毒性学的に意義のある変化はみられなかった。

以上，メコバラミンの 0.5，5 及び 50 mg/kg を雌雄のビーグル犬に 12 ヵ月間静脈内投与した結果，5 mg/kg まで毒性所見はみられなかった。50 mg/kg では皮膚の紅潮がみられた。5 mg/kg 以上で腎又は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。本試験における NOAEL は 5 mg/kg と考えられた。

2.6.6.4 遺伝毒性試験

本承認申請では，新たに実施した in vitro 試験はないが，ラットを用いた in vivo 小核試験を実施した。

2.6.6.4.1 細菌を用いた復帰変異原性試験（試験番号：857103，添付資料 4.2.3.3.1.1 項［参考］）

メコバラミンの遺伝子突然変異誘発作用を評価するため，ネズミチフス菌（TA1535，TA1537，TA1538，TA98 及び TA100）及び大腸菌（WP2/*uvrA*）を用いてプレインキュベーション法で復帰突然変異試験を実施した。代謝活性化系（S9 mix）の存在下及び非存在下で，5%マンニトール溶液に溶解したメコバラミンの 100～5000 µg/plate の濃度で試験を実施した。

その結果，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 まで生育阻害はみられず，復帰変異コロニー数の増加もなかった。

以上，メコバラミンは遺伝子突然変異誘発作用を示さなかった。

2.6.6.4.2 哺乳動物培養細胞を用いた染色体異常試験（試験番号：857401，添付資料 4.2.3.3.1.2 ［参考］）

メコバラミンの染色体異常誘発作用を評価するため，メコバラミンを 5%マンニトール水溶液

に溶解し，チャイニーズハムスターV79 細胞を用いた染色体異常試験を S9 mix の存在下及び非存在下で実施した。処理濃度は，直接法では 0～2.7 mg/mL，代謝活性化法では 0～3.6 mg/mL とした。直接法の陽性対照物質として Mitomycin C，代謝活性化法の陽性対照物質として *N*-nitrosodimethylamine を使用した。分裂中期像の細胞について染色体の構造及び数的異常を光学顕微鏡下で観察した。

その結果，メコバラミンのいずれの処理濃度においても形態的異常を有する分裂中期像の細胞の出現頻度に有意差はみられなかった。

以上，メコバラミンは染色体異常誘発能を示さなかった。

2.6.6.4.3 ラットを用いた小核試験（試験番号：S05147，添付資料 4.2.3.3.2.1 ）

メコバラミンの in vivo 染色体異常誘発能を評価するために，メコバラミンを 6.25%ラクトースを含む媒体に溶解し，雄の SD ラット（5 匹／群）に 50，125 及び 250 mg/kg の投与量で単回静脈内投与した。陰性対照群には媒体を投与した。投与後 24 及び 48 時間後に大腿骨の骨髄細胞塗抹標本を作製し，アクリジンオレンジ染色した。小核を有する幼若赤血球の出現頻度は，各個体あたり 2000 個の多染性赤血球数（RNA 陽性赤血球）から求めた。また，各個体における全赤血球 200 個中における多染性赤血球数の比を算出した。その他，死亡の有無，臨床症状，体重及び摂餌量測定も実施した。

その結果，いずれの投与量でも死亡はみられず，臨床症状，体重あるいは摂餌量に対する異常もみられなかった。

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なかった。

以上，メコバラミンは，ラットを用いた骨髄小核試験において，臨床製剤を用いて投与可能最大量である 250 mg/kg まで投与しても，染色体異常誘発作用を示さなかった。

2.6.6.5 がん原性試験

なお，本薬のがん原性試験成績は，適応症である ALS の重篤性を鑑み，ICH M3（R2）に準じ製造販売承認後の提出を計画している（製造販売承認申請の時点で予試験を実施中）。

2.6.6.6 生殖発生毒性試験

本承認申請で新規に実施した生殖発生毒性試験はない。

メコバラミンの生殖発生毒性を評価するため，ラットを用いた妊娠前及び妊娠初期投与試験，ラット及びウサギを用いた静脈内投与による胎児の器官形成期投与試験，及びラットを用いた周産期及び授乳期投与試験を行った。投与経路はいずれも静脈内投与で，旧医薬品毒性試験法ガイドライン（薬審 1 第 4 号）に従って実施された。

2.6.6.6.1 ラットを用いた妊娠前及び妊娠初期投与試験（試験番号：335，添付資料 4.2.3.5.1.1 ［参考］）

メコバラミンを 5%マンニトール水溶液に溶解し，雄の SD ラット（25 匹/群）に 0.5，5 及び 50 mg/kg の投与量で交配前（63 日間）及び交配期間（14 日間）を通して 1 日 1 回静脈内投与するとともに，雌の SD ラット（25 匹/群）に交配前（14 日間）及び交配期間（最長 14 日間）並びに妊娠 7 日まで 1 日 1 回静脈内投与した。なお，対照群として無処置対照及び陰性対照（媒体）を設定した。雄は交配期間終了後，雌は妊娠 21 日に剖検した。検査項目として，死亡の有無，臨床症状観察，体重及び摂餌量測定，性周期，親動物の剖検，生殖機能，妊娠状態（子宮内観察・胎児観察），胎児発生及び発育測定を行った。

その結果，雌雄ともにいずれの投与量でも死亡はみられなかった。投与期間中，全ての薬物投与群でメコバラミンの尿排泄による着色尿（赤色）がみられたが，5 mg/kg 以上で顕著であった。

50 mg/kg の雌雄で明らかな体重増加量の抑制がみられ，雌で摂餌量の減少がみられた。雌の性周期，雌雄の生殖機能及び胎児発生及び発育に対する有害な影響はみられなかった。

以上，メコバラミンの雌雄における一般毒性に対する NOAEL は 5 mg/kg であった。また，雌雄の生殖機能及び次世代発生に対する NOAEL は 50 mg/kg 以上であると考えられた。

2.6.6.6.2 ラットを用いた器官形成期投与試験（試験番号：336，添付資料 4.2.3.5.2.1 ［参考］）

メコバラミンを 5%マンニトール水溶液に溶解し，雌の SD ラット（40 例/群）に 0.5，5 及び 50 mg/kg の投与量で器官形成期に相当する妊娠 7～17 日まで，1 日 1 回静脈内投与した。対照群として無処置対照及び陰性対照（媒体）を設定した。半数の母動物は自然分娩させ，残りの半数を妊娠 21 日に剖検した。検査項目として，死亡の有無，臨床症状観察，体重及び摂餌量測定，妊娠期間，分娩指標，哺育状態，母動物の剖検，妊娠状態（子宮内観察・胎児観察），胎児重量，胎児性別，胎児形態（外表，内部及び骨格観察），出生児の生存率，形態分化と反射機能，離乳指標，行動機能及び生殖機能，F_1 母動物の臨床症状観察，体重及び妊娠状態（子宮内観察・胎児観察），F2 胎児重量，性別及び外表異常観察を行った。

その結果，投与期間を含む妊娠期間及び授乳期間のいずれにおいても母動物の死亡はみられなかった。投与期間中，全ての薬物投与群でメコバラミンの尿排泄による着色尿（赤色）がみられたが，その他，母動物体重，摂餌量，妊娠期間，妊娠状態，分娩指標，哺育状態では影響はみられなかった。胎児に対する致死作用もみられず，一腹平均の生存胎児数，外表，骨格及び内部観察の異常発生率における影響もみられなかった。さらに，出生児での形態分化，反射機能獲得ともに遅延はみられず，全出生児において離乳指標，行動機能に影響はみられなかった。出生児の性成熟の遅延はみられず，生殖機能に対しても影響はみられなかった。出生児（F1）を母動物とする胎児（F2）の発生及び発育への影響もみられなかった。

以上，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 NOAEL は 50 mg/kg と考えられた。

2.6.6.6.3 ウサギを用いた器官形成期投与試験（試験番号：338，添付資料 4.2.3.5.2.2 ［参考］）

メコバラミンを 5%マンニトール水溶液に溶解し，雌の JW-NIBS ウサギ（17 匹/群）に 0.5，5 及び 50 mg/kg の投与量で器官形成期に相当する妊娠 6～18 日まで，1 日 1 回静脈内投与した。対照群として無処置対照及び陰性対照（媒体）を設定した。母動物は妊娠 29 日に剖検した。検査項目として，死亡の有無，臨床症状観察，体重及び摂餌量測定，母動物の剖検，妊娠状態（子宮内観察・胎児観察），胎児重量，胎児性別，胎児形態（外表，内部及び骨格観察）を行った。

その結果，投与期間を含む妊娠期間中に母動物の死亡はみられなかった。投与期間中，5 mg/kg 以上でメコバラミンの尿排泄による着色尿（赤色）がみられたが，その他，妊娠期間中の母動物の体重及び摂餌量，着床後死亡率，一腹平均の生存胎児数には影響はみられなかった。胎児に対する致死作用，生存胎児での形態観察における骨格異常もみられず，外表異常及び内部異常胎児の発生率にも影響はみられなかった。さらに，胎児の発育に対しても影響はみられなかった。

以上，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。

2.6.6.6.4 ラットを用いた周産期及び授乳期投与試験（試験番号：337，添付資料 4.2.3.5.3.1 ［参考］）

メコバラミンを 5%マンニトール水溶液に溶解し，雌の SD ラット（25 匹/群）に 0.5，5 又は 50 mg/kg の投与量で妊娠 17 日～分娩 20 日まで，1 日 1 回静脈内投与した。対照群として無処置対照及び陰性対照（媒体）を設定した。母動物は分娩 21 日に剖検した。検査項目として，死亡の有無，臨床症状観察，体重及び摂餌量測定，妊娠期間，分娩指標，哺育状態，母動物の剖検，

母動物の着床痕と離乳指標，出生児の体重，形態分化，反射・行動機能及び生殖機能，F1 母動物の臨床症状観察，体重及び妊娠状態（子宮内観察・胎児観察）及び F2 胎児重量，性別及び外表異常観察を行った。

その結果，妊娠期間及び授乳期間中に母動物の死亡はみられなかった。投与期間中，全ての薬物投与群でメコバラミンの尿排泄による着色尿（赤色）がみられたが，その他，母動物体重，摂餌量，妊娠期間に変化はみられず，一腹平均の着床痕数，分娩児数及び分娩指標，分娩時の出生児死亡率，周産期死亡率，離乳指標に影響はみられなかった。出生児の体重，形態分化，反射機能獲得，聴覚反射，協調運動及び情動行動にも影響はみられなかった。出生児の学習能検査では，刺激条件回避学習に抑制効果を及ぼさないと考えられた。また，出生児の精巣下降又は腟開口，同一群での雌雄交配による出生児の生殖機能検査では，交尾率，受胎率ともに影響はみられなかった。さらに，妊娠期間中の母動物（F1）に死亡はみられず，一般状態の変化及び体重増加量抑制もみられなかった。母動物（F1）の帝王切開観察では，一腹平均の黄体数，着床数，着床後死亡率，一腹平均の生存胎児数，生存胎児の性比及び体重，外表異常胎児の出現頻度においても影響はみられなかった。

以上，母動物，出生児（F1）及び胎児（F2）に対する NOAEL は 50 mg/kg と考えられた。

2.6.6.7 局所刺激性試験

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（2.6.6.3.1 ，2.6.6.3.2 ，2.6.6.3.3 ）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。

2.6.6.8 その他の毒性試験

2.6.6.8.1 抗原性試験

本承認申請で新規に実施した抗原性試験はない。

2.6.6.8.1.1 マウス，モルモット及びウサギを用いた抗原性試験（試験番号：NRIS 85-1526，添付資料 4.2.3.7.1.1 ［参考］）

<u>マウスを用いた抗原性試験</u>

メコバラミン（5%マンニトール水溶液に溶解），メコバラミン-オバルブミン（OVA）又は媒体と水酸化アルミニウムゲル（Alum）の混合液（メコバラミン+Alum：1，10，100 µg/0.3 mL/匹，メコバラミン-OVA+Alum：1，10，100 µg/0.3 mL/匹，媒体+Alum：0.3 mL/匹）を 1 週間間隔で 2 回，BALB/c マウスの腹腔内に免疫した。

最終免疫から 2 週間後に採血して得られた血漿を用いて，ラットにおける 72 時間受身皮膚アナフィラキシー（PCA）反応試験を行い，IgE 抗体を測定した。

その結果，メコバラミンに対する抗体は検出されなかった。

<u>モルモットを用いた抗原性試験</u>

メコバラミン（5%マンニトール水溶液に溶解），メコバラミン-OVA 又は媒体と FCA とのエマルジョン（メコバラミン+FCA：0.25 mg/mL/匹，メコバラミン-OVA+FCA：0.25 mg/mL/匹，媒体+FCA：1 mL/匹）を 2 週間間隔で 3 回，ハートレー系モルモットの皮下に免疫した。最終免疫から 2 週間後に採血して得られた血清を用いて PCA 反応試験，能動性全身アナフィラキシー反応試験（ASA）及び遅延型皮膚反応試験を行った。なお，惹起抗原としてメコバラミン，メコバ

ラミン-ウシ血清アルブミン（BSA）又は媒体を静脈内あるいは皮内投与した。
その結果，モルモット血清中にメコバラミンに対する抗体は測定されなかった。いずれの動物においても全身性のアナフィラキシー反応は観察されなかった。遅延型皮膚反応はメコバラミン＋FCA で感作したモルモットにメコバラミン又はメコバラミン-BSA を皮内投与したときにのみ，皮内投与後 24 時間から陽性を示した。

ウサギを用いた抗原性試験
メコバラミン（5%マンニトール水溶液に溶解），メコバラミン-OVA 又は媒体と FCA とのエマルジョン（メコバラミン+FCA：0.5 mg/2 mL/匹，メコバラミン-OVA+FCA：0.5 mg/2 mL/匹，媒体+FCA：2 mL/匹）を 2 週間間隔で 3 回にわたり NZW ウサギの筋肉内に免疫した。最終免疫から 2 週間後に採血して得られた血清を用いた間接赤血球凝集反応並びに PCA 反応試験及び遅延型皮膚反応試験を行った。
その結果，メコバラミン，媒体又はメコバラミンと BSA の混合溶液を惹起抗原とした際，血清中にメコバラミンに対する特異的な抗体は検出されなかった。また，即時型又は遅延型のアレルギー性皮膚反応はみられなかった。

以上，メコバラミンのマウス，モルモット又はウサギを用いた抗原性試験では，モルモットへの皮内投与により遅延型皮膚反応が誘引されたものの，いずれの動物種でも抗原性はなかった。

2.6.6.8.1.2 モルモットを用いた抗原性試験（遅延型皮膚反応）（試験番号：NRIS 86-1811，添付資料 4.2.3.7.1.2 ［参考］）

先に実施した抗原性試験（2.6.6.8.1.1 ）では，メコバラミンのモルモットへの皮下投与により遅延型皮膚反応が誘引された。そこで，皮下投与による再現性と静脈内投与による遅延型皮膚反応を検討した。
メコバラミン（5%マンニトール水溶液に溶解）を静脈内（0.125 mg/0.25 mL/匹）又は皮下投与（0.25 mg/0.5 mL/匹），あるいはメコバラミン又はメコバラミン-OVA に FCA を加えたエマルジョン（メコバラミン+FCA：0.025 又は 0.25 mg/mL/匹，メコバラミン-OVA+FCA：0.25 mg/mL/匹）を皮下投与により，ハートレー系モルモットに免疫した（静脈内投与は 2 週間毎に隔日 3 回，計 9 回，皮下投与は 2 週間間隔で 3 回）。その後，メコバラミンを静脈内投与した群は最終免疫から 10 日後，その他の群は 2 週間後にメコバラミン，メコバラミン-BSA，媒体，OVA 又は生理食塩液を皮内投与し，皮膚反応を観察した。
その結果，遅延型の皮膚反応はアジュバントで処理したメコバラミンを免疫したモルモットで惹起されたが，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惹起されなかった。
以上，メコバラミン単独では遅延型皮膚反応は誘引されず，メコバラミン＋FCA で感作したモルモットの遅延型皮膚反応のみ陽性であった。

2.6.6.8.2 TK/毒性発現機序に関する試験

2.6.6.8.2.1 加齢ラットを用いた単回投与 TK 試験（試験番号：S06049，添付資料 4.2.3.7.3.1 ［参考］）

ラットにおける筋肉内投与による 6 ヵ月反復投与毒性試験（2.6.6.3.2 ）の TK で，$AUC_{(0\text{-}24h)}$ は投与初日及び 26 日に比べて投与 180 日に増加し，これらの値には動物間でばらつきがみられた。その原因解明にあたり，まず，筋肉内投与後の本薬の吸収プロファイル及びクリアランスに対する加齢の影響を検討するため，雄の加齢ラットを用いた単回投与 TK 試験を実施した。
メコバラミンを 6.25%ラクトースを含む媒体に溶解し，加齢（37 週齢）の雄 SD ラット（4 匹/

群）に 20 mg/kg の投与量で筋肉内（腓腹筋及び大腿筋）及び静脈内に単回投与した。検査項目として，TK 測定を実施したほか，死亡の有無，臨床症状観察，体重及び摂餌量測定を行った。

その結果，筋肉内及び静脈内投与で $AUC_{(0\text{-}24h)}$はほぼ同等であり，筋肉内投与後の t_{max} は 0.5 時間であった（表 2.6.6-3）。加齢ラットに単回筋肉内投与したときの $AUC_{(0\text{-}24h)}$は反復投与初日及び 26 日目の $AUC_{(0\text{-}24h)}$に近似しており，加齢による個体間のばらつきもみられなかった。

表 2.6.6-3 ラット単回筋肉内投与における TK パラメータ

投与経路	投与量 (mg/kg)	t_{max} (h)	C_{max} (ng/mL)	$AUC_{(0\text{-}24h)}$ (ng·h/mL)
筋肉内	20	0.50	34927.2±8624.9	82189.5±8174.5
静脈内		0.25	58854.8±4891.5	63914.4±3700.9

C_{max}及び$AUC_{(0\text{-}24h)}$は，4例の動物の平均値±SDを示す。
t_{max}は，4例の動物の中央値を示す。

なお，いずれの投与群でも死亡はみられず，毒性学的に意義のある変化もみられなかった。

以上，雄の加齢ラットを用いた単回静脈内及び筋肉内投与による TK 試験では，加齢による TK パラメータへの影響はみられなかった。

2.6.6.8.2.2 ラットにおける 6 ヵ月反復投与 TK 試験（試験番号：K13096，4.2.3.7.3.2 項参照）

加齢ラットを用いた単回投与試験（2.6.6.8.2.1 ）で TK パラメータへの影響がみられなかったことから，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。

メコバラミンを 6.25%ラクトースを含む媒体に溶解し，雄の SD ラット（5 匹/群）に 20 mg/kg の投与量で週 3 回 27 週間，筋肉内（腓腹筋及び大腿筋）に投与した。対照群には媒体を投与した。投与 143 日（投与 20 週）に，メコバラミンを投与した群と媒体を投与した群それぞれに，安定同位体で標識したメコバラミン（[Methyl-^{13}C, d_3] メコバラミン）の 20 mg/kg を単回静脈内投与して，そのクリアランスを評価した。さらに，メコバラミンの 27 週間反復投与が終了した 48 日後，再度メコバラミンを筋肉内投与して休薬による影響を評価した。検査項目として，TK 測定，[Methyl-^{13}C, d_3] メコバラミンの単回投与によるクリアランス測定を実施したほか，死亡の有無，臨床症状観察，体重及び摂餌量測定を行った。

その結果，TK では，反復投与期間中の t_{max} は投与後 0.5～1 時間であった。また，C_{max} は投与期間を通じて 1.5 倍以内であったが，$AUC_{(0\text{-}24h)}$は反復投与により明らかに上昇して，投与 122 日の値は投与初日に比べて約 9 倍であった。さらに，48 日間休薬後にメコバラミンを単回筋肉内投与したところ，C_{max} は投与 122 日の数値と比べて約 3 分の 2，$AUC_{(0\text{-}24h)}$は約半分まで低下した（表 2.6.6-4）。

表 2.6.6-4 ラット 6 ヵ月反復筋肉内投与における TK パラメータ

投与量 (mg/kg)	投与日	t_{max} (h)	C_{max} (ng/mL)	$AUC_{(0\text{-}24h)}$ (ng·h/mL)
20	1	0.50	25496.4±2604.0	39172.8±2464.1
	31	0.50	27013.6±4015.3	50608.6±6086.0
	59	1.00	25980.7±4178.4	89595.2±13558.8
	87	1.00	27826.9±1951.1	176133.3±27119.6
	122	1.00	36283.0±2901.0	352898.0±52924.4
	233[a]	0.50	24577.5±3562.8	174958.5±41728.5

C_{max}及び$AUC_{(0\text{-}24h)}$は，5例の動物の平均値±SDを示す。
t_{max}は，5例の動物の中央値を示す。
a：27週間の反復投与が終了した48日後に単回筋肉内投与した。

[Methyl-^{13}C, d_3] メコバラミンの単回投与によるクリアランス測定では，メコバラミンの投与143 日における[Methyl-^{13}C, d_3] メコバラミンの C_{max} は対照群とメコバラミン投与群で同程度であったが，$AUC_{(0\text{-}24h)}$はメコバラミン投与群で約 6 倍であった（表 2.6.6-5 ）。

表 2.6.6-5 [Methyl-^{13}C, d_3] メコバラミン単回静脈内投与における TK パラメータ

群名	投与量（mg/kg）([Methyl-^{13}C, d_3] メコバラミン)	投与日	C_{max} (ng/mL)	$AUC_{(0\text{-}24h)}$ (ng·h/mL)
対照群	20	143[a]	42293.4±5804.6	51731.2±11749.1
メコバラミン 20 mg/kg			37992.0±16013.6	332849.6±53680.8

C_{15min}及び$AUC_{(0\text{-}24h)}$は，5例の動物の平均値±SDを示す。
a：メコバラミンの投与143日に[Methyl-^{13}C, d_3] メコバラミン20 mg/kgを単回静脈内投与した。

なお，いずれの投与群でも死亡はみられず，毒性学的に意義のある変化もみられなかった。

以上，雄ラットを用いた 6 ヵ月反復筋肉内投与による TK 試験では，C_{max} は反復投与による変化は顕著でなかったが，$AUC_{(0\text{-}24h)}$は明らかに上昇することが示された。また，安定同位体で標識したメコバラミンを用いたクリアランス測定では，C_{max} は対照群とメコバラミン投与群で同程度であったが，$AUC_{(0\text{-}24h)}$はメコバラミン投与群で高値であった。

2.6.6.9 考察及び結論

メコバラミンの ALS における臨床投与レジメに準じた筋肉内投与試験では，ラット（2 週間反復及び 6 ヵ月間歇）及びイヌ（2 週間反復）いずれにおいても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。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。

ラットの 6 ヵ月間歇投与による長期反復投与試験における 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。

この原因を解明するため，まず，加齢ラットを用いた単回静脈内及び筋肉内投与による 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，$AUC_{(0\text{-}24h)}$は顕著に上昇した。反復投与したラットの[redacted]していた（2.6.4.8 項参照）。以上のことから，ラットに本薬を反復投与した際，本薬と[redacted]し $AUC_{(0\text{-}24h)}$が高値となったものと思われた。また個体及び投与量により[redacted]が異なるために本薬血漿中濃度のばらつきが観察されたものと思われた。

メコバラミンの全身暴露による毒性に関して，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。さらに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。

したがって，メコバラミンのラット及びイヌにおける反復投与試験においていずれの動物種

及び投与経路においても，メコバラミンの尿中排泄による尿の着色（赤色）がみられたのみで，明らかな毒性所見は認められなかった。

遺伝毒性は，今回実施したラットを用いた小核試験を含めていずれも陰性であった。また，生殖発生毒性においても催奇形性，生殖機能及び胎児発育に対する影響はみられなかった。抗原性試験では，モルモットでのメコバラミンと FCA のエマルジョンで感作した遅延型皮膚反応を除いて，いずれの動物種においても陰性であった。

また，局所刺激性は，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。

2.6.6.10 図表

図表は本文中に記載した。

2.6.6.11 参考文献

該当せず。

目次

2.6.7 毒性試験概要表 2
2.6.7.1 毒性試験：一覧表 2
2.6.7.2 トキシコキネティクス：トキシコキネティクス試験の一覧表 5
2.6.7.3 トキシコキネティクス：トキシコキネティクス成績の一覧 6
2.6.7.4 毒性試験：被験物質（バッチ毎）一覧 8
2.6.7.5 単回投与毒性試験 11
2.6.7.6 反復投与毒性試験：重要な試験以外の試験 12
2.6.7.7 反復投与毒性試験：重要な試験 13
2.6.7.7.A 反復投与毒性 13
2.6.7.7.B 反復投与毒性 15
2.6.7.7.C 反復投与毒性 17
2.6.7.8 In vitro 遺伝毒性試験 19
2.6.7.9 In vivo 遺伝毒性試験 20
2.6.7.10 がん原性試験 21
2.6.7.11 生殖発生毒性試験：重要な試験以外の試験 22
2.6.7.12 生殖発生毒性試験：受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験 23
2.6.7.13 生殖発生毒性試験：胚・胎児発生に関する試験 24
2.6.7.14 生殖発生毒性試験：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 25
2.6.7.15 新生児を用いた試験 26
2.6.7.16 局所刺激性試験 27
2.6.7.17 その他の毒性試験 28

2.6.7 毒性試験概要表

2.6.7.1 毒性試験：一覧表

被験物質：メコバラミン

試験の種類	動物種/系統	投与方法	投与期間	投与量（mg/kg [a]）	GLP適用	実施施設	試験番号	CTDにおける記載箇所
単回投与毒性	イヌ/ビーグル	静脈内投与	単回	0, 50, 200	適	エーザイ株式会社	841244	4.2.3.1.1
反復投与毒性	ラット/SD	筋肉内投与	2週間	0, 5, 10, 20	適	エーザイ株式会社	S03089	4.2.3.2.1
	ラット/SD	筋肉内投与	週3回6ヵ月	0, 5, 10, 20	適	[redacted]	SBL47-90	4.2.3.2.2
	イヌ/ビーグル	筋肉内投与	2週間	0, 2.5, 6.25	適	エーザイ株式会社	S03037	4.2.3.2.3
	イヌ/ビーグル	静脈内投与	3ヵ月	0, 0.5, 5, 50	適	[redacted]	FLS 84-4029	4.2.3.2.4
	イヌ/ビーグル	静脈内投与	12ヵ月	0, 0.5, 5, 50	適	[redacted]	FLS 84-4030	4.2.3.2.5
遺伝毒性	ネズミチフス菌及び大腸菌	In vitro	－	100～5000 μg/plate	適	エーザイ株式会社	857103	4.2.3.3.1.1
	チャイニーズハムスターV79細胞	In vitro	－	直接法：0～2.7 mg/mL 代謝活性化法：0～3.6 mg/mL	適	エーザイ株式会社	857401	4.2.3.3.1.2
	ラット/SD	静脈内投与	単回	0, 50, 125, 250	適	エーザイ株式会社	S05147	4.2.3.3.2.1
生殖発生毒性	ラット/SD	静脈内投与	雄：交配前（63日間）及び交配期間（14日間） 雌：交配前（14日間）及び交配期間並びに妊娠7日まで	0, 0.5, 5, 50	適	[redacted]	335	4.2.3.5.1.1
	ラット/SD	静脈内投与	妊娠7～17日	0, 0.5, 5, 50	適	[redacted]	336	4.2.3.5.2.1
	ウサギ/JW-NIBS	静脈内投与	妊娠6～18日	0, 0.5, 5, 50	適	[redacted]	338	4.2.3.5.2.2
	ラット/SD	静脈内投与	妊娠17日～分娩20日	0, 0.5, 5, 50	適	[redacted]	337	4.2.3.5.3.1

2.6.7.1 毒性試験：一覧表（続き）

被験物質：メコバラミン

試験の種類	動物種/系統	投与方法	投与期間	投与量（mg/kg [a]）	GLP 適用	実施施設	試験番号	CTD における記載箇所
その他の毒性試験 （抗原性試験）	マウス/BALB/c （免疫） ラット/SD （PCA 反応）	腹腔内投与 （免疫） 静脈内投与 （PCA 反応の惹起）	1 週間間隔で 2 回 （免疫） 単回皮内投与した 72 時間後に単回静脈内投与（PCA 反応の惹起）	感作: 1, 10, 100 µg/匹 惹起: 0.5 mg/匹	適	[redacted]	NRILS 85-1526	4.2.3.7.1.1
	モルモット/ハートレー	皮下投与 （免疫） 静脈内投与 （PCA, ASA 反応の惹起） 皮内投与 （遅延型皮膚反応の惹起）	2 週間間隔で 3 回 （免疫） 単回（PCA, ASA 反応の惹起及び遅延型皮膚反応の惹起）	感作: 0.25 mg/匹 惹起: 0.5 mg/匹				
	ウサギ/NZW	筋肉内投与 （免疫） 静脈内投与 （PCA 反応の惹起） 皮内投与 （遅延型皮膚反応の惹起）	2 週間間隔で 3 回 （免疫） 単回（遅延型皮膚反応の惹起）	感作: 0.5 mg/匹 惹起: 0.1, 1, 10 µg/匹				
	モルモット/ハートレー	静脈内投与又は皮下投与 （免疫） 皮内投与（遅延型皮膚反応の惹起）	2 週間毎に隔日 3 回，総計 9 回（静脈内投与による免疫）又は 2 週間毎に 1 回，総計 3 回（皮下投与による免疫） 単回（遅延型皮膚反応の惹起）	感作: 0.025～0.25 mg/匹 惹起: 0.1, 1, 10 µg/匹	適	[redacted]	NRILS 86-1811	4.2.3.7.1.2

2.6.7.1 毒性試験：一覧表（続き）

被験物質：メコバラミン

試験の種類	動物種/系統	投与方法	投与期間	投与量（mg/kg [a]）	GLP 適用	実施施設	試験番号	CTD における記載箇所
その他の毒性試験（TK/毒性発現の機序に関する試験）	ラット [b]/SD	筋肉内投与及び静脈内投与	単回投与	20	非適	エーザイ株式会社	S06049	4.2.3.7.3.1
	ラット/SD	筋肉内投与及び静脈内投与 [c]	週 3 回 6 ヵ月	0, 20	適	[redacted]	K13096	4.2.3.7.3.2

Alum＝ 水酸化アルミニウムゲル，FCA＝ フロインド完全アジュバント，OVA＝ オバルブミン，－ ＝ 該当せず。
a：特に記載のない限り，投与量は mg/kg として示した。
b：雄の加齢ラット（37 週齢）を用いた。
c：安定同位体で標識したメコバラミン（[Methyl-^{13}C, d_3] メコバラミン）のクリアランス評価の際，単回静脈内投与した。

2.6.7.2 トキシコキネティクス：トキシコキネティクス試験の一覧表

被験物質：メコバラミン

試験の種類	試験系	投与方法	投与量（mg/kg[a]）	GLP 適用	試験番号	CTD における記載箇所
2 週間投与毒性	ラット	筋肉内投与	0, 5, 10, 20	適	S03089	4.2.3.2.1
6 ヵ月投与毒性（週 3 回投与）	ラット	筋肉内投与	0, 5, 10, 20	適	SBL47-90	4.2.3.2.2
2 週間投与毒性	イヌ	筋肉内投与	0, 2.5, 6.25	適	S03037	4.2.3.2.3
単回投与 TK 試験	ラット[b]	筋肉内投与及び静脈内投与	20	非適	S06049	4.2.3.7.3.1
6 ヵ月投与 TK 試験（週 3 回投与）	ラット	筋肉内投与及び静脈内投与[c]	0, 20	適	K13096	4.2.3.7.3.2

a：特に記載のない限り，投与量は mg/kg として示した。
b：雄の加齢ラット（37 週齢）を用いた。
c：安定同位体で標識したメコバラミン（[Methyl-^{13}C, d_3] メコバラミン）のクリアランス評価の際，単回静脈内投与した。

2.6.7.3 トキシコキネティクス：トキシコキネティクス成績の一覧

被験物質：メコバラミン

定常状態における C_{max}（ng/mL）						
1 日投与量（mg/kg）	動物種	ラット[a]		イヌ[a]		ヒト[a]
	性別	雄	雌	雄	雌	男性＋女性
0.83		–	–	–	–	1580[b]
2.5		–	–	5913.0[c]	6070.9[c]	–
5		17173.3[d]	7020.0[d]	–	–	–
6.25		–	–	11532.3[c]	12900.5[c]	–
10		14595.3[d]	41313.8[d]	–	–	–
20		31967.1[d]	33007.9[d]	–	–	–

– = データなし。
a：筋肉内投与。
b：50 mg/man（体重 60 kg/man として換算），外国 002 試験における日本人データ。
c：2 週間投与毒性試験。
d：6 ヵ月投与毒性試験（週 3 回投与）。

2.6.7.3 トキシコキネティクス：トキシコキネティクス成績の一覧（続き）

被験物質：メコバラミン

定常状態における AUC（ng·h/mL）						
1 日投与量（mg/kg）	動物種	ラット[a]		イヌ[a]		ヒト[a]
	性別	雄	雌	雄	雌	男性＋女性
0.83		–	–	–	–	8840[b]
2.5		–	–	14527.0[c]	13426.7[c]	–
5		164623.2[d]	14829.9[d]	–	–	–
6.25		–	–	32346.6[c]	28947.8[c]	–
10		85948.2[d]	470315.0[d]	–	–	–
20		245217.1[d]	169723.0[d]	–	–	–

– = データなし。
a：筋肉内投与。
b：50 mg/man（体重 60 kg/man として換算），外国 002 試験における日本人データ。
c：2 週間投与毒性試験。
d：6 ヵ月投与毒性試験（週 3 回投与）。

2.6.7.4 毒性試験：被験物質（バッチ毎）一覧

被験物質：メコバラミン

バッチ（ロット）番号	純度（%）	規格設定された不純物		試験番号	試験の種類，動物種
		個々の類縁物質（%）	総類縁物質（%）		
申請規格	[redacted]	[redacted]	[redacted]	CTD における記載箇所：3.2.S.4.4.3	ロット分析
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	S03089 S03037	反復投与毒性試験，ラット，2 週間（GLP 適用） 反復投与毒性試験，イヌ，2 週間（GLP 適用）
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	SBL47-90 S05147 S06049	反復投与毒性試験，ラット，6 ヵ月（GLP 適用） 遺伝毒性試験，ラット小核試験（GLP 適用） その他の毒性試験（TK/毒性発現の機序に関する試験），ラット単回投与（GLP 非適用）
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	K13096	その他の毒性試験（TK/毒性発現の機序に関する試験），ラット 6 ヵ月反復投与（GLP 適用）

2.6.7.4 毒性試験：原薬（続き）

被験物質：メコバラミン

バッチ（ロット）番号	純度（%）	規格設定された不純物		試験番号	試験の種類，動物種
		個々の類縁物質（%）	総類縁物質（%）		
申請規格	[redacted]	[redacted]	[redacted]	CTD における記載箇所：3.2.S.4.4.3	ロット分析
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	841244 FLS 84-4029 FLS 84-4030	単回投与毒性試験，イヌ（GLP 適用） 反復投与毒性試験，イヌ，3 ヵ月（GLP 適用） 反復投与毒性試験，イヌ，12 ヵ月（GLP 適用）
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	FLS 84-4029 FLS 84-4030	反復投与毒性試験，イヌ，3 ヵ月（GLP 適用） 反復投与毒性試験，イヌ，12 ヵ月（GLP 適用）
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	FLS 84-4029 FLS 84-4030	反復投与毒性試験，イヌ，3 ヵ月（GLP 適用） 反復投与毒性試験，イヌ，12 ヵ月（GLP 適用）
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	FLS 84-4029 FLS 84-4030	反復投与毒性試験，イヌ，3 ヵ月（GLP 適用） 反復投与毒性試験，イヌ，12 ヵ月（GLP 適用）
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	335 336 337 338	生殖発生毒性試験，ラット，妊娠前及び妊娠初期投与試験（GLP 適用） 生殖発生毒性試験，ラット，器官形成期投与試験（GLP 適用） 生殖発生毒性試験，ラット，周産期及び授乳期投与試験（GLP 適用） 生殖発生毒性試験，ウサギ，器官形成期投与試験（GLP 適用）

2.6.7.4 毒性試験：原薬（続き）

被験物質：メコバラミン

バッチ（ロット）番号	純度（%）	規格設定された不純物		試験番号	試験の種類，動物種
		個々の類縁物質（%）	総類縁物質（%）		
申請規格	[redacted]	[redacted]	[redacted]	CTD における記載箇所：3.2.S.4.4.3	ロット分析
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	857103	遺伝毒性試験，Ames 試験（GLP 適用）
				857401	遺伝毒性試験，染色体異常試験（GLP 適用）
				335	生殖発生毒性試験，ラット，妊娠前及び妊娠初期投与試験（GLP 適用）
				336	生殖発生毒性試験，ラット，器官形成期投与試験（GLP 適用）
				337	生殖発生毒性試験，ラット，周産期及び授乳期投与試験（GLP 適用）
				338	生殖発生毒性試験，ウサギ，器官形成期投与試験（GLP 適用）
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	335	生殖発生毒性試験，ラット，妊娠前及び妊娠初期投与試験（GLP 適用）
				336	生殖発生毒性試験，ラット，器官形成期投与試験（GLP 適用）
				337	生殖発生毒性試験，ラット，周産期及び授乳期投与試験（GLP 適用）
				338	生殖発生毒性試験，ウサギ，器官形成期投与試験（GLP 適用）
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	NRILS 85-1526	その他の毒性試験（抗原性試験），マウス・モルモット・ウサギ（GLP 適用）
				NRILS 86-1811	その他の毒性試験（抗原性試験），モルモット（GLP 適用）

[redacted]。

2.6.7.5 単回投与毒性試験

本申請で新規に実施した単回投与毒性試験はない。

以下，過去の承認申請時に提出済の単回投与毒性試験につき，要約を記載した。

被験物質：メコバラミン

動物種 /系統	投与方法 （溶媒 /投与形態）	投与量 （mg/kg）	性別及び一群の動物数	最大非致死量 （mg/kg）	概略の致死量 （mg/kg）	特記すべき所見	試験番号
イヌ/ビーグル	静脈内投与 （5%マンニトール水溶液）	0 50 200	雌雄各 1	>200	>200	≥50 mg/kg：流涎及び着色尿（赤色） 200 mg/kg：投与中～投与終了直後に顔面及び腹部の紅潮及び不穏	841244

2.6.7.6 反復投与毒性試験：重要な試験以外の試験

本申請で新規に実施した重要な試験以外の反復投与毒性試験はない。

以下，過去の承認申請時に提出済の反復投与毒性試験（GLP 試験）につき，要約を記載した。

被験物質：メコバラミン

動物種 /系統	投与方法 （溶媒/投与形態）	投与期間	投与量 （mg/kg）	性別及び一群 の動物数	特記すべき所見	試験番号
イヌ/ビーグル	静脈内投与 （5%マンニトール 水溶液）	3 ヵ月	0 0.5 5 50	雌雄各 5	≥5 mg/kg：着色尿（赤色），精巣上体の赤色調 50 mg/kg：皮膚の紅潮，全身性の浮腫と紅色蕁麻疹様の膨疹（雌），腎皮質の変色（近位尿細管上皮細胞質内にライソソームの著しい増加）	FLS 84-4029
イヌ/ビーグル	静脈内投与 （5%マンニトール 水溶液）	12 ヵ月	0 0.5 5 50	雌雄各 4	≥5 mg/kg：着色尿（赤色），腎皮質・精巣上体の赤色調，腎の近位尿細管上皮細胞質内に好酸性顆粒の沈着（電顕：ライソソーム増加） 50 mg/kg：皮膚の紅潮，前立腺の赤色調，一過性の丘疹，腎の糸球体メサンギウム，肝のクッパー細胞にライソソームの増加	FLS 84-4030