2.6.7.7 反復投与毒性試験：重要な試験

2.6.7.7.A 反復投与毒性

報告書の標題：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　　**被験物質**：メコバラミン

動物種/系統：ラット/SD
投与開始週齢：8 週齢
初回投与年月日：20[redacted] 年[redacted] 月[redacted] 日
特記事項：なし
無毒性量：20 mg/kg

投与期間：1 日 1 回 2 週間
投与後の観察期間：適用なし
溶媒/投与形態：6.25%ラクトース，0.1725%リン酸ナトリウム，0.9%塩化ナトリウム水溶液（pH7.0 に調整）/溶液
投与方法：筋肉内（腓腹筋及び大腿筋）投与

試験番号：S03089
CTD における記載箇所：4.2.3.2.1
実施施設：エーザイ株式会社
GLP 適用：適

投与量（mg/kg/日）	0（対照）		5		10		20	
動物数[a]：	雄：10	雌：10	雄：10 (3)	雌：10 (3)	雄：10 (3)	雌：10 (3)	雄：10 (3)	雌：10 (3)
トキシコキネティクス：								
C_{max}（ng/mL）：								
投与 1 日	NA	NA	6873.0	4461.1	12703.6	12992.4	19637.6	18320.2
投与 13 日	NA	NA	7001.9	7422.5	13943.8	12158.8	23248.6	21534.7
$AUC_{(0\text{-}24h)}$（ng·h/mL）：								
投与 1 日	NA	NA	10699.2	5907.8	18250.0	19308.8	37661.2	32018.7
投与 13 日	NA	NA	10278.0	11114.3	22335.5	17929.7	37429.5	33995.9
特記すべき所見								
死亡及び切迫動物数	0	0	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (1[b])	0 (0)	0 (0)
体重	−	−	−	−	−	−	−	−
摂餌量	−	−	−	−	−	−	−	−
一般状態								
着色尿（赤色）	−	−	+	+	+	+	+	+
血液学的検査	−	−	−	−	−	−	−	−
血液生化学的検査	−	−	−	−	−	−	−	−
尿検査	−	−	−	−	−	−	−	−
眼科学的検査	−	−	−	−	−	−	−	−
器官重量	−	−	−	−	−	−	−	−
剖検所見	−	−	−	−	−	−	−	−

2.6.7.7.A　反復投与毒性（続き）

被験物質：メコバラミン

投与量（mg/kg/日）	0（対照）		5		10		20	
病理組織学的検査								
投与部位[c]：筋線維の壊死	6	3	6	6	5	4	7	5
筋線維の再生像	5	3	9	8	9	9	9	9
炎症細胞の浸潤	1	0	4	3	6	4	5	5
皮下／間質性出血	1	0	2	0	3	0	2	2

NA＝適用なし，－＝ 特記すべき所見なし，＋＝ 所見あり。
a：括弧内の数字 ＝TK 群の動物数。
b：採血時に動脈を傷つけたことによる出血死であり，メコバラミン投与に起因したものではないと判断した。
c：腓腹筋及び大腿筋。

2.6.7.7.B　反復投与毒性

報告書の標題：ラットにおける筋肉内投与による 6 ヵ月間反復投与毒性試験　　**被験物質**：メコバラミン

動物種/系統：ラット/SD
投与開始週齢：8 週齢
初回投与年月日：20[redacted] 年[redacted] 月[redacted] 日（雄）・[redacted] 日（雌）
特記事項：なし
無毒性量：20 mg/kg

投与期間：週 3 回 6 ヵ月間
投与後の観察期間：適用なし
溶媒/投与形態：6.25%ラクトース，0.1725%リン酸ナトリウム，0.9%塩化ナトリウム水溶液（pH7.0 に調整）/溶液
投与方法：筋肉内（腓腹筋及び大腿筋）投与

試験番号：SBL47-90
CTD における記載箇所：4.2.3.2.2
実施施設：[redacted]
GLP 適用：適

投与量（mg/kg/日）	0（対照）		5		10		20	
動物数[a]：	雄：15	雌：15	雄：15 (4)	雌：15 (4)	雄：15 (4)	雌：15 (4)	雄：15 (4)	雌：15 (4)
トキシコキネティクス：								
C_{max}（ng/mL）：								
投与 1 日	NA	NA	7512.9	8681.2	12709.1	17786.0	25475.5	26659.4
投与 26 日	NA	NA	6921.8	7329.0	12745.1	8435.7	22700.9	22762.5
投与 180 日	NA	NA	17173.3	7020.0	14595.3	41313.8	31967.1	33007.9
$AUC_{(0\text{-}24h)}$（ng·h/mL）：								
投与 1 日	NA	NA	12306.5	11894.7	23764.8	24858.0	53906.9	45888.0
投与 26 日	NA	NA	11367.3	7806.6	26019.6	13558.7	50683.4	46848.9
投与 180 日	NA	NA	164623.2	14829.9	85948.2	470315.0	245217.1	169723.0
特記すべき所見								
死亡及び切迫動物数	0	0	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
体重	−	−	−	−	−	−	−	−
摂餌量	−	−	−	−	−	−	−	−
一般状態								
着色尿（赤色）	−	−	+	+	+	+	+	+
血液学的検査	−	−	−	−	−	−	−	−
血液生化学的検査	−	−	−	−	−	−	−	−
尿検査	−	−	−	−	−	−	−	−
眼科学的検査	−	−	−	−	−	−	−	−
器官重量	−	−	−	−	−	−	−	−
剖検所見	−	−	−	−	−	−	−	−

2.6.7.7.B　　反復投与毒性（続き）

被験物質：メコバラミン

投与量（mg/kg/日）	0（対照）		5		10		20	
病理組織学的検査								
投与部位[b]：筋線維の壊死	7	6	8	3	8	7	10	7
筋線維の再生像	15	15	15	15	15	15	15	15
炎症細胞の浸潤	2	3	0	2	0	1	1	6
単核細胞の浸潤	4	9	10	6	12	10	12	10
皮下／間質性出血	0	1	0	1	0	1	1	0

NA＝ 適用なし，－＝ 特記すべき所見なし，＋＝ 所見あり。
a：括弧内の数字 ＝TK 群の動物数。
b：腓腹筋及び大腿筋。

2.6.7.7.C　反復投与毒性

報告書の標題：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　　**被験物質**：メコバラミン

動物種/系統：イヌ/ビーグル
投与開始週齢：9 ヵ月齢
初回投与年月日：20[redacted]年[redacted]月[redacted]日
特記事項：なし
無毒性量：6.25 mg/kg

投与期間：1 日 1 回 2 週間
投与後の観察期間：適用なし
溶媒/投与形態：6.25%ラクトース，0.1725%リン酸ナトリウム，0.9%塩化ナトリウム水溶液（pH7.0 に調整）/溶液
投与方法：筋肉内投与（臀筋及び大腿筋）

試験番号：S03037
CTD における記載箇所：4.2.3.2.3
実施施設：エーザイ株式会社
GLP 適用：適

投与量（mg/kg/日）	0（対照）		2.5		6.25	
動物数：	雄：3	雌：3	雄：3	雌：3	雄：3	雌：3
トキシコキネティクス：						
C_{max}（ng/mL）：						
投与 1 日	NA	NA	5742.0	5526.8	13020.8	12941.1
投与 14 日	NA	NA	5913.0	6070.9	11532.3	12900.5
$AUC_{(0\text{-}24h)}$（ng·h/mL）：						
投与 1 日	NA	NA	13756.2	13018.5	30662.1	27553.5
投与 14 日	NA	NA	14527.0	13426.7	32346.6	28947.8
特記すべき所見						
死亡及び切迫動物数	0	0	0	0	0	0
体重	−	−	−	−	−	−
摂餌量	−	−	−	−	−	−
一般状態						
着色尿（赤色）	−	−	+	+	+	+
血液学的検査	−	−	−	−	−	−
血液生化学的検査	−	−	−	−	−	−
尿検査	−	−	−	−	−	−
眼科学的検査	−	−	−	−	−	−
心電図検査	−	−	−	−	−	−
器官重量	−	−	−	−	−	−
剖検所見	−	−	−	−	−	−

2.6.7.7.C 反復投与毒性（続き）

被験物質：メコバラミン

投与量（mg/kg/日）	0（対照）		2.5		6.25	
病理組織学的検査						
投与部位[a]：筋線維の壊死	0	0	2	0	0	1
筋線維の再生像	0	1	1	2	1	1
皮下出血	1	0	1	0	0	0

NA＝ 適用なし，－＝ 特記すべき所見なし，＋＝ 所見あり。
a：臀筋及び大腿筋。

2.6.7.8 In vitro 遺伝毒性試験

本申請で新規に実施した in vitro 遺伝毒性試験はない。

以下，過去の承認申請時に提出済の in vitro 遺伝毒性試験（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
ネズミチフス菌（TA1535，TA1537，TA1538，TA98 及び TA100）及び大腸菌（WP2/*uvrA*）	代謝活性化系（S9 mix）の存在下及び非存在下で，5%マンニトール水溶液に溶解したメコバラミンを処理した。	－	100～5000 μg/plate	1 用量当たり 3 plate	陰性	857103
チャイニーズハムスターV79 細胞	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を処理した。	直接法：48 時間暴露 代謝活性化法：1 時間 30 分プレインキュベーション及び 24 時間暴露	直接法：0～2.7 mg/mL 代謝活性化法：0～3.6 mg/mL	1 用量当たり細胞 100 個	陰性	857401

2.6.7.9 In vivo 遺伝毒性試験

報告書の標題：ラットにおける静脈内投与小核試験　　**被験物質**：メコバラミン

試験の種類：骨髄小核
動物種/系統：ラット/SD
投与時週齢：8 週齢

処理計画：単回投与
試料採取時間：24 及び 48 時間

試験番号：S05147
CTD における記載箇所：4.2.3.3.2.1

投与年月日：20[redacted] 年[redacted] 月[redacted] 日

溶媒/投与形態：6.25%ラクトース，0.1725%リン酸ナトリウム，0.9%塩化ナトリウム水溶液（pH7.0 に調整）/溶液

実施施設：エーザイ株式会社

評価した細胞：多染性赤血球
分析細胞数/動物：2000 個

投与方法：静脈内投与

GLP 適用：適

特記事項：なし
毒性/細胞毒性：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。
遺伝毒性：なし
暴露証明：臨床製剤（12.5 mg/mL）を用いて，投与可能最大量（20 mL/kg）を動物に単回静脈内投与した。

被験物質	投与量 (mg/kg)	動物数	時間 (時間)	% PCE (平均値)	% MN-PCE (平均値)
対照	0	雄 5	24	71.8	0.20
		雄 5	48	67.4	0.11
メコバラミン	50	雄 5	24	64.4	0.10
		雄 5	48	60.9	0.13
	125	雄 5	24	53.4	0.08
		雄 5	48	71.3	0.08
	250	雄 5	24	57.7	0.07
		雄 5	48	62.2	0.11
シクロホスファミド	10	雄 5	24	51.7	0.89

MN-PCE＝ 小核を有する多染性赤血球，PCE＝ 多染性赤血球。

2.6.7.10 がん原性試験

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）。

2.6.7.11 生殖発生毒性試験：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生殖発生毒性試験はない。

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

本申請で新規に実施した受胎態及び着床までの初期胚発生に関する試験はない。

以下，過去の承認申請時に提出済の受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験（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
ラット/SD	静脈内投与 （5%マンニトール水溶液）	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	雌雄各 25	≥0.5 mg/kg：着色尿（赤色） 50 mg/kg：明らかな体重増加抑制，摂餌量の減少（雌） 胎児：異常なし	335

2.6.7.13 生殖発生毒性試験：胚・胎児発生に関する試験

本申請で新規に実施した胚・胎児発生に関する試験はない。

以下，過去の承認申請時に提出済の胚・胎児発生に関する試験（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
ラット/SD	静脈内投与 （5%マンニトール水溶液）	妊娠 7～17 日	0, 0.5, 5, 50	雌 40	母動物： ≥0.5 mg/kg：着色尿（赤色） 胎児： 異常なし	336
ウサギ/JW-NIBS	静脈内投与 （5%マンニトール水溶液）	妊娠 6～18 日	0, 0.5, 5, 50	雌 17	母動物： ≥5 mg/kg：着色尿（赤色） 胎児： 異常なし	338

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

本申請で新規に実施した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はない。

以下，過去の承認申請時に提出済の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（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
ラット/SD	静脈内投与 （5%マンニトール水溶液）	妊娠 17 日～分娩 20 日	0, 0.5, 5, 50	雌 25	母動物： ≥0.5 mg/kg：着色尿（赤色） 胎児： 異常なし	337

2.6.7.15 幼若動物を用いた試験

幼若動物を用いた試験は実施していない。

2.6.7.16 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。

2.6.7.17 その他の毒性試験

本申請では，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（C_{max} 及び AUC）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。

また，過去の承認申請時に提出済のマウス，モルモット及びウサギを用いた抗原性試験（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	感作				惹起			性別及び一群の動物数	特記すべき所見	試験番号
	抗原	投与方法	投与期間	投与量	抗原	投与方法	投与量			
抗原性										
マウス/BALB/c ラット/SD （PCA 反応試験）	メコバラミン＋Alum メコバラミン-OVA＋Alum 媒体+ Alum	腹腔内投与（乳化物）	1 週間間隔で 2 回	1, 10, 100 μg/匹 1, 10, 100 μg/匹 0 μg/匹	メコバラミン メコバラミン-BSA 媒体 OVA	静脈内投与	0.5 mg/匹	感作：マウス雄 10/抗原 惹起：ラット雄 2/抗原	陰性	NRILS 85-1526
モルモット/ハートレー （ASA 反応試験，PCA 反応試験，遅延型皮膚反応試験）	メコバラミン+FCA メコバラミン-OVA＋FCA 媒体 ＋FCA	皮下投与（乳化物）	2 週間間隔で 3 回	0.25 mg/匹 0.25 mg/匹 0 mg/匹	メコバラミン， メコバラミン-BSA 媒体， OVA	ASA, PCA: 静脈内投与 遅延型皮膚反応: 皮内	0.5 mg/匹（静脈内投与） 0.1, 1, 10 μg/匹（皮内投与）	雌 4～5/抗原	遅延型皮膚反応で陽性（ASA 及び PCA は陰性）	NRILS 85-1526
	メコバラミン-OVA＋FCA 媒体 ＋FCA							雌 10/抗原 雌 5/抗原		

2.6.7.17 その他の毒性試験（続き）

被験物質：メコバラミン

動物種/系統	感作				惹起			性別及び一群の動物数	特記すべき所見	試験番号
	抗原	投与方法	投与期間	投与量	抗原	投与方法	投与量			
抗原性（続き）										
モルモット/ハートレー（遅延型皮膚反応試験）	メコバラミン	静脈内投与（溶液）	2 週間毎に隔日 3 回，総計 9 回	0.125 mg/匹	メコバラミン，メコバラミン-BSA，媒体，OVA	PCA: 皮内	0.1, 1, 10 µg/匹	雌 10/抗原	メコバラミン 0.25 mg+FCA を感作したモルモットの遅延型皮膚反応で陽性（メコバラミン単独では陰性）	NRILS 86-1811
	メコバラミン	皮下投与（溶液）	2 週間毎に 1 回，総計 3 回	0.25 mg/匹						
	メコバラミン-FCA	皮下投与（乳化物）		0.025, 0.25 mg/匹						
	メコバラミン-OVA＋FCA	皮下投与（乳化物）		0.25 mg/匹						
ウサギ/NZW（間接赤血球凝集反応試験，PCA 反応試験，遅延型皮膚反応試験）	メコバラミン＋FCA	筋肉内投与（乳化物）	2 週間間隔で 3 回	0.5 mg/匹	メコバラミン，メコバラミン-BSA，媒体，OVA	PCA: 静脈内投与 遅延型皮膚反応: 皮内	0.5 mg/匹（静脈内投与） 0.1, 1, 10 µg/匹（皮内投与）	雌 10/抗原	いずれも陰性	NRILS 85-1526

2.6.7.17　その他の毒性試験（続き）

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
TK/毒性発現の機序に関する試験						
ラット[a]/SD	筋肉内投与及び静脈内投与（6.25%ラクトース，0.1725%リン酸ナトリウム，0.9%塩化ナトリウム水溶液（pH7.0 に調整）/溶液）	単回投与	20	雄 4	加齢による C_{max} 及び $AUC_{(0\text{-}24h)}$の増加並びに個体間のばらつきはみられなかった。	S06049
ラット/SD	筋肉内投与及び静脈内投与[b]（6.25%ラクトース，0.1725%リン酸ナトリウム，0.9%塩化ナトリウム水溶液（pH7.0 に調整）/溶液）	週 3 回 6 ヵ月	0, 20	雄 5	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。	K13096

Alum = 水酸化アルミニウムゲル，ASA = 能動性全身アナフィラキシー，BSA = ウシ血清アルブミン，FCA = フロインド完全アジュバント，OVA = オバルブミン，PCA = 受身皮膚アナフィラキシー，－= 該当せず。
a：雄の加齢ラット（37 週齢）を用いた。
b：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。