

メトホルミン塩酸塩

製造販売承認申請

CTD 第2部

2.6 非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.1 緒言

大日本住友製薬株式会社

【本項における用語の説明】

用語	定義、読み替えなど
メトホルミン塩酸塩	化学名： 1,1-Dimethylbiguanide monohydrochloride 化学式（分子量）： $C_4H_{11}N_5 \cdot HCl$ (165.62)

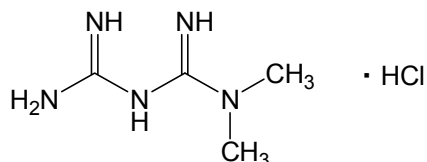
【一般的略号】

略号	省略しない表現	日本語
AMPK	Adenosine monophosphate-activated protein kinase	—
<i>db/db</i> マウス	BKC. <i>g</i> - <i>Lepr^{db}/+Lepr^{db}/Jcl</i> マウス	—

2.6.1 緒言

(1) 構造

メトホルミン塩酸塩は下記の化学構造を有するビグアニド系経口血糖降下剤である。



(2) 薬理学的特性

メトホルミン塩酸塩は、肥満糖尿病モデル動物である BKS.C g-*Lepr*^{db}/*Lepr*^{db}/Jcl マウス (*db/db* マウス) において、体重に影響を与えず、用量依存的な血糖降下作用を示した。*db/db* マウス以外の種々の糖尿病モデル動物においても、メトホルミン塩酸塩が体重に影響を与えず、血糖降下作用及び血漿インスリン濃度低下作用を示すことが報告されており、メトホルミン塩酸塩の血糖降下剤としての有用性が示されている。また、薬効用量のメトホルミン塩酸塩は糖尿病モデル動物の血糖値を正常範囲よりも低下させないことから、メトホルミン塩酸塩は低血糖を引き起こしにくい血糖降下剤であると考えられた。加えて、メトホルミン塩酸塩は、高フルクトース食負荷モデルラットにおける血中脂質改善作用、C57BL/6-*ob/ob* マウス (*ob/ob* マウス) 及びアルコール性脂肪肝モデルマウスにおける脂肪肝改善作用などを示すことが報告されており、脂質代謝に対する有用性も示唆されている。

メトホルミン塩酸塩の血糖降下作用には、肝臓における糖新生の抑制が主に関与しているとされている。メトホルミン塩酸塩の肝臓における糖新生抑制作用の分子メカニズムとしては、糖新生の律速酵素である Glucose-6-phosphatase, catalytic (G6pc) 遺伝子の発現抑制、生体エネルギー代謝の制御に関与する重要な因子である Adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK) の活性化、及びミトコンドリア呼吸鎖複合体 I の阻害などが考えられた。また、メトホルミン塩酸塩は、筋肉細胞及び脂肪細胞において、糖取り込み促進作用を有しており、その分子メカニズムとしては、AMPK の活性化、グルコーストランスポーターの細胞外膜への移行促進が関与すると報告されている。加えて、メトホルミン塩酸塩は小腸における糖吸収抑制作用を有することも報告されている。以上のような多彩な作用が複合して、メトホルミン塩酸塩は、血糖降下作用を発現すると考えられた。

メトホルミン塩酸塩の安全性薬理評価においては、中枢神経系や呼吸系に影響を及ぼすものの、それらの作用は死亡例が発現する用量付近でみられた。そのほか、重篤な副作用を予測させる所見は確認されなかったことから、安全性薬理の観点よりメトホルミン塩酸塩の安全性には問題がないと考えられた。

(3) 適応症及び用量に関する情報

【申請時】

適応症（効能・効果）	2 型糖尿病 ただし、下記のいずれかの治療で十分な効果が得られない場合に限る。 (1) 食事療法・運動療法のみ (2) 食事療法・運動療法に加えて、スルホニルウレア剤を使用
用法・用量	通常、成人にはメトホルミン塩酸塩として 1 日 500 mg より開始し、1 日 2～3 回食直前又は食後に分割経口投与する。維持量は 1 日 500～1500 mg とする。なお、症状を観察しながら適宜増減するが、上限は 1 日 2250 mg までとする。

なお、審査の過程で見直しを行った結果、効能・効果及び用法・用量を以下のように変更した。

【変更後】

適応症（効能・効果）	2 型糖尿病 ただし、下記のいずれかの治療で十分な効果が得られない場合に限る。 (1) 食事療法・運動療法のみ (2) 食事療法・運動療法に加えてスルホニルウレア剤を使用
用法・用量	通常、成人にはメトホルミン塩酸塩として 1 日 500 mg より開始し、1 日 2～3 回に分割して食直前又は食後に経口投与する。維持量は効果を観察しながら決めるが、通常 1 日 750～1500 mg とする。なお、患者の状態により適宜増減するが、1 日最高投与量は 2250 mg までとする。

メトホルミン塩酸塩

製造販売承認申請

CTD 第2部

2.6 非臨床試験の概要文及び概要表

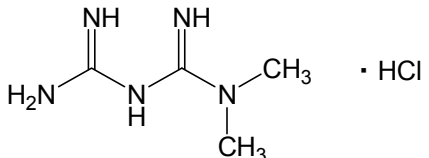
2.6.2 薬理試験の概要文

大日本住友製薬株式会社

目次

2.6.2 薬理試験の概要文	
2.6.2.1 まとめ.....	5
2.6.2.2 効力を裏付ける試験.....	9
2.6.2.3 副次的薬理試験.....	39
2.6.2.4 安全性薬理試験.....	40
2.6.2.5 薬力学的薬物相互作用試験.....	40
2.6.2.6 考察及び結論.....	41
2.6.2.7 図表.....	44
2.6.2.8 参考文献.....	44

【本項における用語の説明】

用語	定義、読み替えなど
メトホルミン塩酸塩	化学名： 1,1-Dimethylbiguanide monohydrochloride 化学式（分子量）： $C_4H_{11}N_5 \cdot HCl$ (165.62) 構造式： 

【一般的略号】

略号	省略しない表現	日本語
ACC	Acetyl-Coenzyme A carboxylase	—
ACh	Acetylcholine	アセチルコリン
AICAR	5-aminoimidazole-4-carboxamide riboside	—
ALT	Alanine aminotransferase	アラニン・アミノトランスフェラーゼ
AMP	Adenosine monophosphate	—
AMPK	AMP-activated protein kinase	—
AP	Alkaline phosphatase	アルカリホスファターゼ
AST	Aspartate aminotransferase	アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ
ATP	Adenosine triphosphate	—
AUC	Area under the plasma concentration-time curve	血漿中濃度-時間曲線下面積
C_{max}	Maximum plasma concentration	最高血漿中濃度
complex I	Mitochondrial respiratory chain complex I	ミトコンドリア呼吸鎖複合体 I
<i>db/db</i> マウス	BKS.C <i>g-+Lepr^{db}/+Lepr^{db}/Jcl</i> マウス	—
DCMU	3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea	—
Fas	Fatty acid synthase	—
FFA	Free fatty acid	遊離脂肪酸
G6pc	Glucose-6-phosphatase, catalytic	—
Gapdh	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	—
GK ラット	Goto-Kakizaki ラット	—
GLP-1	Glucagon like peptide-1	—
GLUT	Glucose transporter	—

【一般的略号】(続き)

略号	省略しない表現	日本語
HbA _{1c}	Hemoglobin A _{1c}	ヘモグロビン A _{1c}
HDL-C	High-density lipoprotein cholesterol	HDL-コレステロール
HMGR	Hydroxymethylglutaryl-Coenzyme A reductase	—
5-HT	5-hydroxytryptamine (Serotonin)	セロトニン
LDL-C	Low-density lipoprotein cholesterol	LDL-コレステロール
MC	Methyl cellulose	メチルセルロース
<i>ob/ob</i> マウス	C57BL/6- <i>ob/ob</i> マウス	—
PBS	Dulbecco's phosphate-buffered saline	ダルベッコ リン酸緩衝生理食塩液
QRT-PCR	Quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction	定量的逆転写ポリメラーゼチェーンリアクション
S14	Spot-14	—
SD	Standard deviation	標準偏差
SE	Standard error	標準誤差
SHR	Spontaneously hypertensive rat	高血圧自然発症ラット
SREBP-1	Sterol regulatory element-binding protein-1	—
TG	Triglyceride	トリグリセリド
VLDL-C	Very low-density lipoprotein cholesterol	VLDL-コレステロール
ZDF ラット	Zucker Diabetic Fatty ラット	—

2.6.2.1 まとめ

2.6.2.1.1 効力を裏付ける試験

本剤の20■■（平成■■）年■■月■■日■■■■■■相談（#■■■■、資料1.13.1）における非臨床試験の申請データパッケージに関する助言内容に鑑み、肥満糖尿病モデル動物である BKS.C g-+Lepr^{db}/+Lepr^{db}/Jcl マウス（db/db マウス）を用いた血糖降下作用の検討を追加実施した。更に、メトホルミン塩酸塩による血糖降下の作用メカニズム解明のため、db/db マウス及びラット肝癌由来細胞株を用いた分子レベルでの作用メカニズムの検討を行った。すなわち、db/db マウス肝臓における糖新生関連酵素である Glucose-6-phosphatase, catalytic（G6pc）の遺伝子発現抑制作用及びラット肝癌由来細胞株である H-4-II-E 細胞における Adenosine monophosphate-activated protein kinase（AMPK）の活性化作用について検討した。更に、Glucophage[®]の■■■■■■■■■■資料に含まれる公表文献の一部に最新の公表文献を追加し、参考資料とした。

(1) *In vivo* 薬効評価

肥満糖尿病モデル動物である db/db マウスにメトホルミン塩酸塩を 150、300、600 mg/kg の用量にて 1 日 1 回 28 日間強制経口投与したときの Hemoglobin A_{1c}（HbA_{1c}）値の変化量を評価したところ、メトホルミン塩酸塩は、HbA_{1c} 値の増加を用量依存的に抑制した。そのほか、種々の糖尿病モデル動物においてもメトホルミン塩酸塩による血糖降下作用が報告されている。肥満糖尿病モデル動物である Zucker Diabetic Fatty ラット（ZDF ラット）にメトホルミン塩酸塩を 90~270 mg/kg（6 日ごとに増量）の用量にて 1 日 1 回 24 日間強制経口投与すると、体重に影響を与えることなく、血糖値及び血漿インスリン濃度を低下させた。一方、対照ラットの血糖値には影響を与えなかった。高脂肪食負荷ストレプトゾトシン誘発糖尿病モデルラットにメトホルミン塩酸塩を 250 mg/kg の用量にて 1 日 2 回 3 日間強制経口投与すると、血糖値が低下した。非肥満糖尿病モデル動物である Goto-Kakizaki ラット（GK ラット）にメトホルミン塩酸塩（100 mg/kg/日）を 6 週間飲水投与すると、体重に影響を与えることなく、血糖値及び血漿インスリン濃度が低下した。また、薬効用量のメトホルミン塩酸塩は、これらのモデル動物における血糖値を正常範囲よりも低下させなかった。

更に、メトホルミン塩酸塩の血糖降下作用以外の有効性が、種々のモデル動物において報告されている。高フルクトース食負荷モデルラットにメトホルミン塩酸塩を 50 mg/kg の用量にて 1 日 1 回 2 週間強制経口投与すると、血糖降下に加え、血中脂質改善作用がみられた。デキサメタゾン投与してインスリン抵抗性を惹起したラットに、メトホルミン塩酸塩（183~333 mg/kg/日）を 26 日間飲水投与すると、インスリン抵抗性が改善された。脂肪肝を呈する肥満糖尿病モデル動物である C57BL/6-ob/ob マウス（ob/ob マウス）にメトホルミン塩酸塩（350 mg/kg/日）を 4 週間混餌投与すると、脂肪肝の改善がみられた。エタノール投与により惹起されるアルコール性脂肪肝モデルマウスにメトホルミン塩酸塩（350 mg/kg/日）を 4 週間混餌投与すると、脂肪肝の発症抑制作用がみられた。

(2) 作用メカニズム

メトホルミン塩酸塩の作用メカニズムに関しては、肝臓における糖新生の抑制が主であるとされており、末梢組織における糖取り込みの促進、小腸における糖吸収の抑制なども報告されている。実施した試験及び公表文献から現時点で明らかとなっているメトホルミン塩酸塩の作用を以下にまとめた。

1) 肝臓に対する作用

ラット初代培養肝細胞をメトホルミン塩酸塩で処理すると、濃度依存的に糖の産生が抑制された。また、高脂肪食負荷ラットにメトホルミン塩酸塩 (120 mg/kg/日) を 14 日間混餌投与すると、高脂肪食負荷により亢進したアラニンからの糖新生が抑制されたことから、メトホルミン塩酸塩の糖新生抑制作用が確認された。更に、メトホルミン塩酸塩を 600 mg/kg の用量にて強制経口投与した 2 時間後の *db/db* マウス肝臓及び 1、3 mmol/L メトホルミン塩酸塩で 2 時間処理した H-4-II-E 細胞において糖新生の律速酵素である G6pc の遺伝子発現が抑制されたことから、肝臓における G6pc 遺伝子の発現抑制がメトホルミン塩酸塩の糖新生抑制作用のメカニズムの 1 つである可能性が示された。

H-4-II-E 細胞を 1、3 mmol/L メトホルミン塩酸塩で 4 時間処理すると、AMPK が活性化 (リン酸化) された。また、H-4-II-E 細胞を 50、100 μ mol/L メトホルミン塩酸塩で 24 又は 60 時間処理すると、ミトコンドリア電子伝達系複合体 I (complex I) が阻害された。complex I と同様の機能を示す酵母 NDI1 遺伝子を導入した H-4-II-E 細胞では、メトホルミン塩酸塩による細胞内 Adenosine triphosphate (ATP) 濃度の低下及び AMPK の活性化がみられなかったが、G6pc 遺伝子の発現抑制は認められたことから、メトホルミン塩酸塩による G6pc 遺伝子の発現抑制は、complex I 阻害や AMPK 活性化を介していない可能性が示された。

AMPK など多くの kinase の活性化作用を有する LKB1 を肝臓特異的に欠失させたトランスジェニックマウスに、メトホルミン塩酸塩を 250 mg/kg の用量にて 3 日間腹腔内投与しても血糖値が低下しなかったことから、メトホルミン塩酸塩の血糖降下作用には、LKB1 の関与が重要であることが示された。

ヒト肝癌由来細胞株 HepG2 を 0.5、1、2 mmol/L メトホルミン塩酸塩で 24 時間処理すると、AMPK の活性化及び細胞内脂質量の低下がみられたが、AMPK の活性を消失した変異体を導入した細胞ではそれらがみられなくなったことから、メトホルミン塩酸塩は、AMPK の活性化を介して細胞内脂質量を低下させると考えられた。Acetyl-Coenzyme A carboxylase (ACC) は、AMPK によりリン酸化されることにより活性が抑制され、その結果として脂肪酸酸化が亢進することが知られており、ラット初代培養肝細胞を 50、500、2000 μ mol/L メトホルミン塩酸塩で 7 時間処理すると、ACC 活性が低下した。また、ラット初代培養肝細胞を 200、500 μ mol/L メトホルミン塩酸塩で 6 時間処理すると脂質合成関連遺伝子の発現が抑制された。よって、メトホルミン塩酸塩の脂質低下作用には、AMPK 活性化を介した脂肪酸合成酵素の発

現抑制や ACC 活性抑制による脂肪酸酸化の亢進が関与していると思われた。

2) 筋肉・脂肪に対する作用

ラット骨格筋由来細胞株である L6 細胞をインスリン非存在下及び存在下で 800、2000 $\mu\text{mol/L}$ メトホルミン塩酸塩で 16 時間処理すると、インスリンの有無に関わらず用量依存的に細胞への糖取り込みを促進した。このとき細胞外膜上のグルコーストランスポーターの存在量が増加したことから、メトホルミン塩酸塩は、グルコーストランスポーターの細胞内分布に作用し、細胞への糖取り込みを促進する可能性が示唆された。また、ヒト骨格筋細胞を高グルコース存在下で培養すると細胞への糖取り込みが低下するが、50 $\mu\text{mol/L}$ メトホルミン塩酸塩で 24 時間処理すると、それが改善した。ラット骨格筋細胞を 2 mmol/L メトホルミン塩酸塩で 3 時間処理すると、細胞への糖取り込みが促進し、AMPK の活性化がみられたことから、筋肉においてもメトホルミン塩酸塩の作用発現に AMPK 活性化の関与が示唆された。またヒトにおける知見としては、2 型糖尿病患者にメトホルミン塩酸塩を 10 週間投与すると、投与前に比べ投与後の筋肉中 AMPK が活性化されたという報告がある。

ラット脂肪細胞をインスリン非存在下及び存在下で 1~100 $\mu\text{g/mL}$ メトホルミン塩酸塩で 2 時間処理すると、インスリン非存在下では細胞への糖取り込みを促進しなかったが、インスリン存在下では糖取り込みを促進した。更に高インスリンで前処理を行うと、細胞への糖取り込み及びグルコーストランスポーターの細胞外膜への移行が低下するが、メトホルミン塩酸塩は、それらを改善した。

3) 小腸に対する作用

正常ラットにメトホルミン塩酸塩を 250 mg/kg の用量にて 1 日 1 回 5 日間強制経口投与し、小腸における糖吸収を灌流条件下にて評価すると、メトホルミン塩酸塩を投与したラットにおいて、小腸からの糖吸収の抑制がみられた。また、メトホルミン塩酸塩を投与した肥満患者において、糖負荷後の血漿中 Glucagon like peptide-1 (GLP-1) 濃度が増加することが報告されている。小腸上皮細胞からの GLP-1 分泌促進及び血中における GLP-1 の分解抑制の可能性が報告されているが、メトホルミン塩酸塩の GLP-1 増加に対する作用メカニズムは明確になっていない。

4) 膵臓に対する作用

メトホルミン塩酸塩は、ラット及びヒト単離膵ランゲルハンス氏島のインスリン分泌に対して、直接的に作用しなかった。一方、遊離脂肪酸添加や高グルコース前処理条件においてみられるグルコース応答性インスリン分泌の低下に対して、メトホルミン塩酸塩は改善作用を示した。また、2 型糖尿病患者から単離された膵ランゲルハンス氏島でみられるインスリン分泌低下及びアポトーシスの増加は、メトホルミン塩酸塩で処理すると改善された。

2.6.2.1.2 安全性薬理試験

本剤の20██（平成██）年██月██日██相談（#██、資料 1.13.1）において、安全性薬理試験及び毒性試験については██、██、及び██との助言を得た。そこで、メトホルミン塩酸塩に関して安全性薬理試験及び一般薬理試験は実施していないが、██毒性資料及び公表文献から、心血管系を含む安全性薬理試験に関連する知見を抽出し、それらを項目別（中枢神経系、呼吸系、心血管系、消化器系、平滑筋）にまとめて考察した。これら試験資料及び公表文献はすべて参考資料として添付した。

中枢神経系では、マウス、ラット、ウサギ、イヌ及びサルにおいて自発運動の減少及び痙攣が、マウス、ラット及びウサギにおいては歩行失調がそれぞれ認められた。また、呼吸系ではウサギ及びサルにおいて呼吸数の減少が認められたが、これらの症状発現はいずれも死亡例が発現する用量付近において確認された。心血管系に対し、メトホルミン塩酸塩は SHR で降圧作用を示すが、その降圧作用は重篤ではなかった。正常ラットでのメトホルミン塩酸塩による降圧作用は SHR に比べて弱かった。*In vitro* の検討ではラット摘出血管平滑筋弛緩及び血管平滑筋細胞内 $[Ca^{2+}]$ 増加抑制を引き起こすことが報告されている。心拍数に対する作用はラットで陽性または陰性の変時作用の両作用が報告されており、一致した知見は得られていない。消化器系では、ラット摘出十二指腸を用いた収縮運動に対して収縮薬の種類や反応処理時間に応じて亢進あるいは抑制作用の相反する作用を示すが、これらの作用は高濃度においてのみ認められた。

2.6.2.2 効力を裏付ける試験

2.6.2.2.1 *In vivo* 薬効評価

(1) *db/db* マウスにおけるメトホルミン塩酸塩の血糖降下作用 (資料 4.2.1.1.1、4.2.1.1.2)

7 週齢の雄性 *db/db* マウスに 0.5%メチルセルロース (MC) 液又はメトホルミン塩酸塩を 150、300、600 mg/kg の用量にて、群分け翌日 (day 1) から 1 日 1 回 28 日間強制経口投与した。群分け時 (day 0) から最終投与翌日 (day 29) の HbA_{1c} 値の変化量を図 2.6.2.2-1 に示す。HbA_{1c} 値の変化量は、メトホルミン塩酸塩投与により用量依存的に低下し、300 mg/kg 以上の投与量で 0.5%MC 液投与群と比較して有意であった。また 1 週間に 1 回、投与前と投与 6 時間後の血糖値を測定したところ、投与前の血糖値は、day 14 以降の測定日においてメトホルミン塩酸塩投与群で低下を示し、投与 6 時間後の血糖値は、すべての測定日においてメトホルミン塩酸塩投与群で低下を示した (図 2.6.2.2-2)。しかしながら、メトホルミン塩酸塩は、*db/db* マウスの血糖値を、対照マウスで報告されている血糖値 (74±55 mg/dL) ^{文献¹⁾}より低下させることはなかった。また、メトホルミン塩酸塩投与による体重の変化は認められなかった (図 2.6.2.2-3)。以上より、肥満糖尿病モデルマウスである *db/db* マウスに対してメトホルミン塩酸塩の用量依存的な抗糖尿病効果が確認された。

db/db マウスにメトホルミン塩酸塩を単回強制経口投与したときの血漿中メトホルミン濃度の測定結果から、HbA_{1c} 値の増加に対して有意な抑制作用を示す血漿中メトホルミンの C_{max} 及び AUC_{0-24hr} は、それぞれ約 16 µg/mL 以上及び約 67 µg·hr/mL 以上であると考えられた。健康成人に 1500 mg のメトホルミン塩酸塩を単回経口投与したときの血漿中メトホルミンの AUC_{0-∞} は 17.9 µg·hr/mL であり (資料 5.3.3.1.1)、*db/db* マウスの結果と比べ大きな差異はないと考えられた。

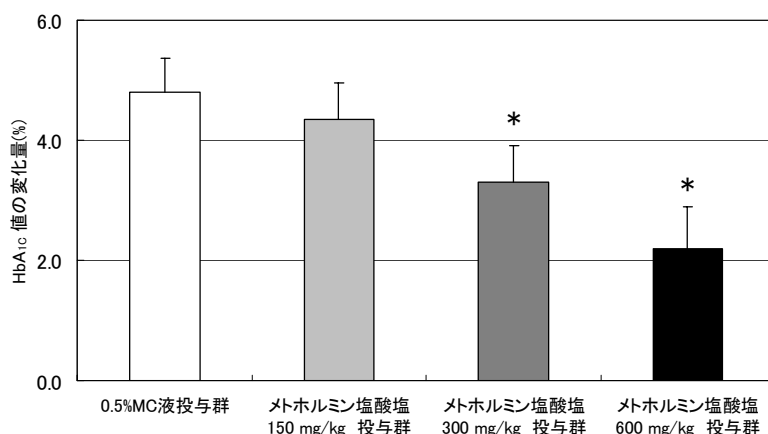
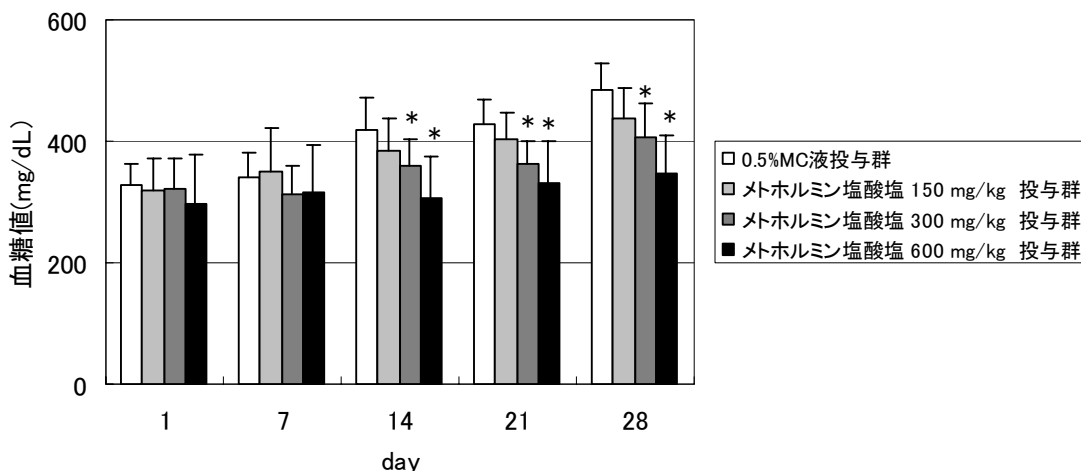


図 2.6.2.2-1 *db/db* マウスの HbA_{1c} 値の変化量に対するメトホルミン塩酸塩の効果

db/db マウス (雄性、7 週齢) に対して 0.5%MC 液、メトホルミン塩酸塩 150、300、600 mg/kg を 1 日 1 回 28 日間強制経口投与した。群分け時 (day 0) から最終投与翌日 (day 29) の HbA_{1c} 値の変化量を示した (Mean±SD, n=10)。本結果は Jonckheere-Terpstra 傾向検定にて用量反応性が認められた。また、HbA_{1c} 値の変化量は 0.5%MC 液投与群に対して、300 mg/kg 以上の投与量で有意差があった。*: p<0.05 (0.5%MC 液投与群を対照とした Williams の多重比較法 有意水準両側 5%)

A : 投与前



B : 投与 6 時間後

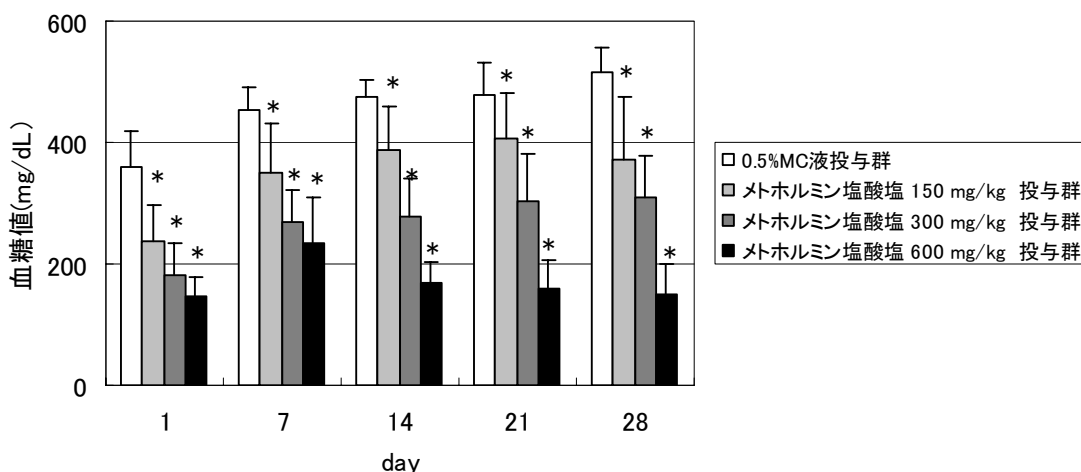


図 2.6.2.2-2 db/db マウスの血糖値に対するメトホルミン塩酸塩の効果

db/db マウス (雄性、7 週齢) に対して 0.5%MC 液、メトホルミン塩酸塩 150、300、600 mg/kg を 1 日 1 回 28 日間強制経口投与した。day 1、day 7、day 14、day 21、day 28 の投与前 (A) 及び投与 6 時間後 (B) の血糖値を示した (Mean±SD, n=10)。投与前の血糖値は、Jonckheere-Terpstra 傾向検定の結果、day 1、day 7 では用量反応性が認められず、day 14、day 21、day 28 では用量反応性が認められた。また、day 14、day 21、day 28 では 0.5%MC 液投与群に対して、300 mg/kg 以上の投与量で有意差があった。投与 6 時間後の血糖値は、Jonckheere-Terpstra 傾向検定の結果、全ての測定日で用量反応性が認められ、0.5%MC 液投与群に対して、150 mg/kg 以上の投与量で有意差があった。

*: p<0.05 (0.5%MC 液投与群を対照とした Williams の多重比較法 有意水準両側 5%)

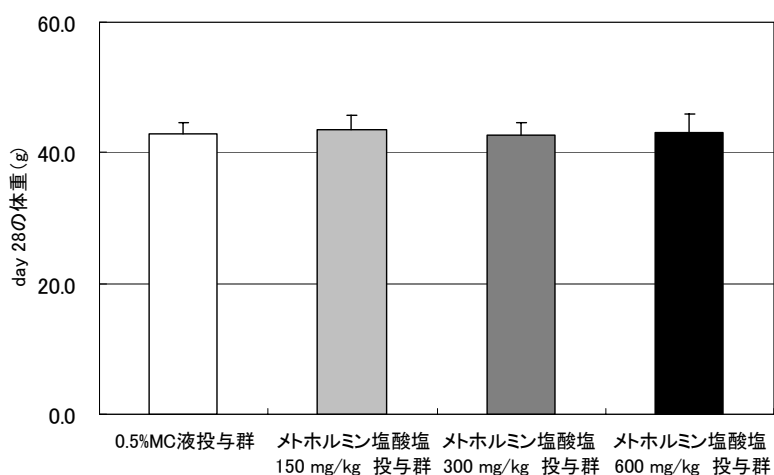


図 2.6.2.2-3 db/db マウスの体重に対するメトホルミン塩酸塩の効果

db/db マウス（雄性、7 週齢）に対して 0.5%MC 液、メトホルミン塩酸塩 150、300、600 mg/kg を 1 日 1 回 28 日間強制経口投与した。day 28 の体重を示した（Mean±SD、n=10）。Jonckheere-Terpstra 傾向検定の結果、用量反応性は認められなかった。また、0.5%MC 液投与群に対して、Dunnett の多重比較法により検定を行った結果、全ての群で有意差は認められなかった。

(2) ZDF ラットにおけるメトホルミン塩酸塩の血糖降下作用（参考資料 4.2.1.1.3（公表文献））

A. Handberg らは、肥満糖尿病モデル動物である ZDF ラット（雄性、8 週齢）を用いてメトホルミン塩酸塩の血糖降下作用を評価した。投与量は 90 mg/kg から開始し、6 日ごとに 180 mg/kg、225 mg/kg、270 mg/kg と増量し、合計 24 日間、メトホルミン塩酸塩を 1 日 1 回、ZDF ラット及び対照ラット（Zucker lean ラット）に強制経口投与した。表 2.6.2.2-1 に体重、空腹時血糖値、及び空腹時血漿インスリン濃度を示す。メトホルミン塩酸塩は ZDF ラットの体重に影響を与えることなく、血糖値及び血漿インスリン濃度を有意に低下させた。ただし、メトホルミン塩酸塩は、ZDF ラットの血糖値を対照ラットの血糖値以下には低下させなかった。一方、メトホルミン塩酸塩は、対照ラットの血糖値に影響を与えなかった。

表 2.6.2.2-1 ZDF ラットにおけるメトホルミン塩酸塩の血糖降下作用
(参考資料 4.2.1.1.3 (公表文献) より抜粋)

メトホルミン塩酸塩	対照ラット		ZDF ラット	
	-	+	-	+
匹数	7	6	7	5
体重 (g)				
投与開始時	278 ± 10 a	275 ± 10	348 ± 18	394 ± 28
投与終了時	342 ± 11 a	329 ± 12	482 ± 10	523 ± 22
空腹時血糖値 (mmol/L)	6.4 ± 0.3 b	6.6 ± 0.3	12.7 ± 1.0 c	8.9 ± 1.0
空腹時血漿インスリン濃度 (ng/mL)	2.8 ± 0.6 d	1.6 ± 0.5	10.9 ± 2.7 c	5.9 ± 0.7

表中の数値は Mean±SE を示す。表中の記号は one-sided Mann-Whitney test において、それぞれ以下に示す内容を意味する。

- a : メトホルミン塩酸塩非投与 ZDF ラットと比較して p<0.00005
- b : メトホルミン塩酸塩非投与 ZDF ラットと比較して p<0.002
- c : メトホルミン塩酸塩投与 ZDF ラットと比較して p<0.05
- d : メトホルミン塩酸塩非投与 ZDF ラットと比較して p<0.01

(3) 高脂肪食負荷ストレプトゾトシン誘発糖尿病モデルラットにおけるメトホルミン塩酸塩の血糖降下作用 (参考資料 4.2.1.1.4 (公表文献))

M. J. Reed らは、高脂肪食負荷ストレプトゾトシン誘発糖尿病モデルラットにおける血糖降下作用を評価した。Sprague-Dawley ラット (雄性、7 週齢) に高脂肪食を 2 週間与えた後、ストレプトゾトシン (50 mg/kg) を投与して作製した糖尿病モデルラットに、メトホルミン塩酸塩を 250 mg/kg の用量にて 1 日 2 回 3 日間経口投与した。メトホルミン塩酸塩投与により血糖値の有意な低下が認められた (表 2.6.2.2-2)。ただし、メトホルミン塩酸塩投与後の血糖値は、通常食飼育無処置ラットの血糖値 (7.8±0.2 mmol/L) を下回るものではなかった。

表 2.6.2.2-2 高脂肪食負荷ストレプトゾトシン誘発糖尿病モデルラットにおけるメトホルミン塩酸塩の血糖降下作用 (参考資料 4.2.1.1.4 (公表文献) より抜粋)

	溶媒投与群 n=8	メトホルミン塩酸塩投与群 n=8
投与前血糖値	27.3 ± 1.2	27.3 ± 1.2
投与後血糖値	23.4 ± 2.3	16.0 ± 1.4 *
変化量	-3.8 ± 1.4	-11.3 ± 1.3 †

表中の値は Mean±SE を示す。単位 : mmol/L

*, † : 溶媒投与群と比較してそれぞれ p<0.01, p<0.001 (Student の t 検定)

(4) GK ラットにおけるメトホルミン塩酸塩の血糖降下作用 (参考資料 4.2.1.1.5 (公表文献))

P. Rösen らは、非肥満糖尿病モデル動物である GK ラットを用いて血糖降下作用を評価した。メトホルミン塩酸塩を混合した水を GK ラット (雄性、6 週齢) に 6 週間摂取させた (投与量: 100 mg/kg/日)。メトホルミン塩酸塩は、体重に影響を与えることなく、血糖値及び血漿インスリン濃度を有意に低下させた (表 2.6.2.2-3)。ただし、メトホルミン塩酸塩は、GK ラットの血糖値を対照ラット (Wistar ラット) の血糖値以下には低下させなかった。

表 2.6.2.2-3 GK ラットにおけるメトホルミン塩酸塩の血糖降下作用
(参考資料 4.2.1.1.5 (公表文献) より抜粋)

	Wistar ラット	GK ラット	GK ラット メトホルミン塩酸塩投与
体重(g)	375 ± 6	383 ± 4	357 ± 6
血糖値(mmol/L)	5.6 ± 0.8	16.2 ± 0.9*	7.5 ± 11.0#
血漿インスリン濃度 (nmol/L)	1.2 ± 0.2	1.7 ± 0.2*	1.3 ± 0.2#

表中の値は Mean ± SE を示す。n=8~10。

*: Wistar ラットと比較して p<0.05、#: GK ラットと比較して p<0.05 (t 検定)

(5) 高フルクトース食負荷モデルラットにおけるメトホルミン塩酸塩の血中脂質改善作用 (参考資料 4.2.1.1.6 (公表文献))

P. Anurag らは、メトホルミン塩酸塩の血中脂質改善作用を評価した。高フルクトース食を 2 週間負荷した雄性 Wistar ラットに、メトホルミン塩酸塩を 50 mg/kg の用量にて 1 日 1 回 2 週間強制経口投与した。メトホルミン塩酸塩投与により、血糖値及び血漿インスリン濃度の有意な低下が認められた (図 2.6.2.2-4)。また、血漿トリグリセリド (TG) 濃度、血漿遊離脂肪酸 (FFA) 濃度、血漿 LDL-コレステロール (LDL-C) 濃度、及び血漿 VLDL-コレステロール (VLDL-C) 濃度の有意な低下、血漿 HDL-コレステロール (HDL-C) 濃度の有意な上昇が認められた。(図 2.6.2.2-4)

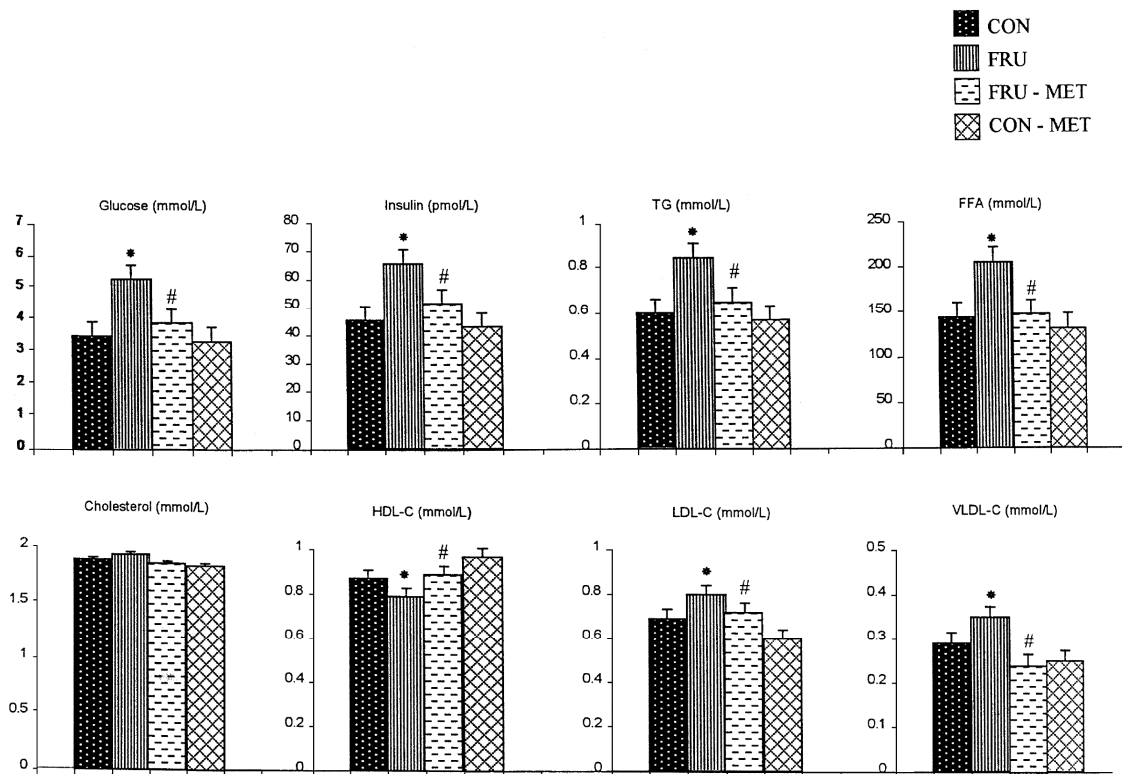


図 2.6.2.2-4 高フルクトース負荷モデルラットにおけるメトホルミン塩酸塩の血中脂質改善作用 (参考資料 4.2.1.1.6 (公表文献) より引用)

CON : 正常食 FRU : 高フルクトース食 MET : メトホルミン塩酸塩投与
 データは Mean±SE を示す (n=6)。

* : CON 群と比較して p<0.05 (Student の t 検定)
 # : FRU 群と比較して p<0.05 (Student の t 検定)

(6) デキサメタゾン誘発インスリン抵抗性モデルラットにおけるメトホルミン塩酸塩のインスリン抵抗性改善作用 (参考資料 4.2.1.1.7 (公表文献))

C. Severino らは、メトホルミン塩酸塩のインスリン抵抗性改善作用を評価した。デキサメタゾンを 1 日 2 回、1 μg/匹の用量にて皮下投与してインスリン抵抗性を惹起した雄性 Wistar ラットに対し、メトホルミン塩酸塩を 3.5 mg/mL になるように混合した水を 28 日間摂取させ (投与量 : 183~333 mg/kg/日)、8、14、26 日目にそれぞれインスリン負荷試験を行った。メトホルミン塩酸塩は、デキサメタゾン投与により低下したインスリン感受性を改善した (図 2.6.2.2-5)。

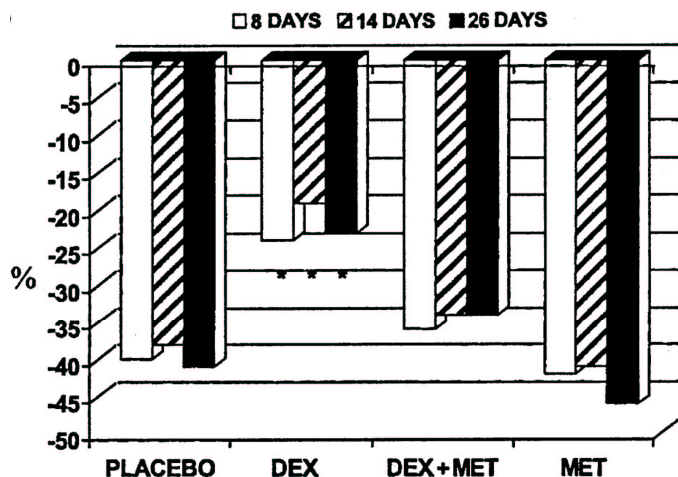


図 2.6.2.2-5 デキサメタゾン誘発インスリン抵抗性モデルラットにおけるメトホルミン塩酸塩のインスリン抵抗性改善作用 (参考資料 4.2.1.1.7 (公表文献) より引用)

PLACEBO : vehicle 投与群、DEX : デキサメタゾン投与群

DEX+MET : デキサメタゾン+メトホルミン塩酸塩投与群、MET : メトホルミン塩酸塩投与群

縦軸は、インスリン投与 30 分後の血糖値変化率。

データは Mean±SE を示す (n=6~7)。

* : コントロール群と比較して p<0.05 (Student の t 検定)

(7) *ob/ob* マウスにおけるメトホルミン塩酸塩の脂肪肝改善作用 (参考資料 4.2.1.1.8 (公表文献))

H. Z. Lin らは、肥満糖尿病モデル動物である *ob/ob* マウス (雄性、8~10 週齢) に、メトホルミン塩酸塩を混合した飼料を 4 週間摂取させ (投与量 : 350 mg/kg/日)、肝重量、肝臓組織像、及び血清中の肝臓関連酵素活性を評価した。C57BL/6 マウスを非肥満コントロール群とし、*ob/ob* マウスは、メトホルミン塩酸塩投与群、自由摂食群、及びメトホルミン塩酸塩投与群と摂食量が同じになるようコントロールされたペアフィード群をそれぞれ設定した。メトホルミン塩酸塩は体重当たりの肝重量、肝臓組織像における脂肪空胞変性像、及び肝臓関連酵素の血中への漏出量を減少させた (図 2.6.2.2-6)。

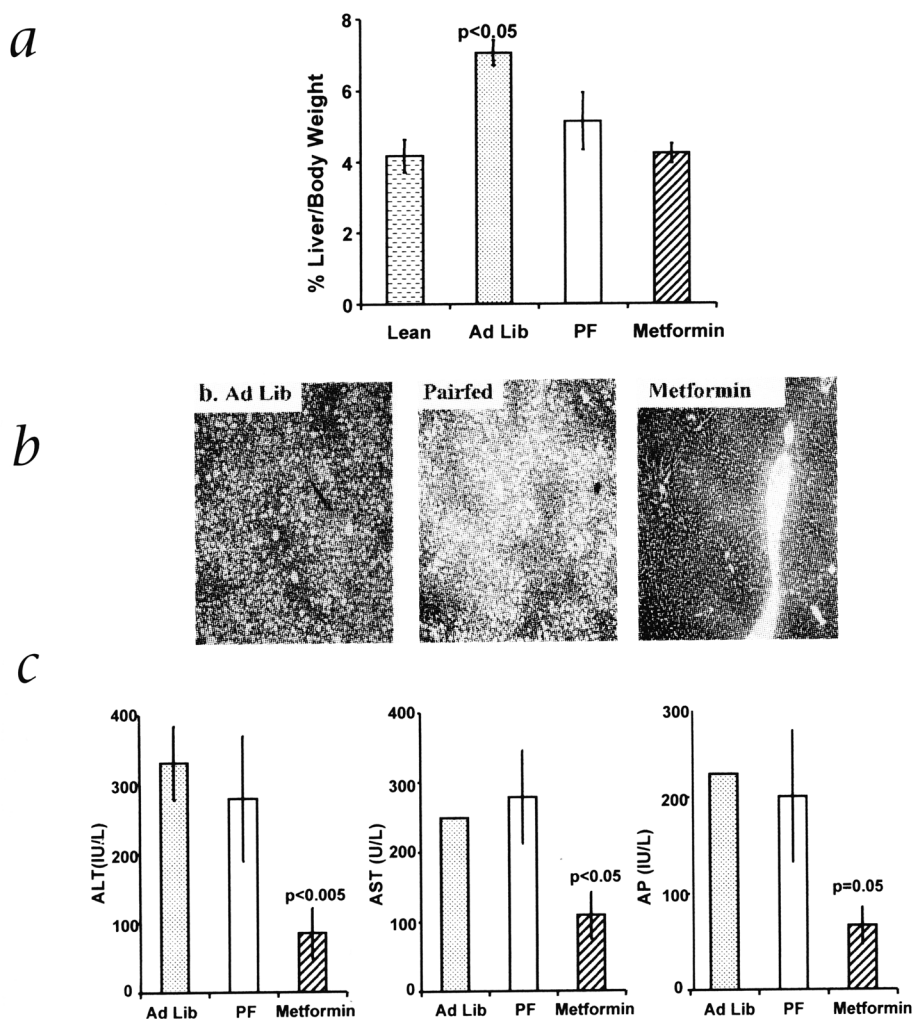


図 2.6.2.2-6 *ob/ob* マウスにおけるメトホルミン塩酸塩の脂肪肝改善作用

(参考資料 4.2.1.1.8 (公表文献) より引用)

Lean : 非肥満コントロール群(n=8) Ad Lib : 自由摂食群(n=4)
 PF : ペアフィード群(n=8) Metformin : メトホルミン塩酸塩投与群(n=8)
 データは Mean±SE を示す。

- a : 体重当りの肝臓重量
 p 値は自由摂食群と非肥満コントロール群の比較結果を示す。
- b : 肝臓切片のヘマトキシリン・エオジン染色像
- c : 血清中の肝臓関連酵素活性
 p 値はペアフィード群とメトホルミン塩酸塩投与群の比較結果を示す。

(8) アルコール性脂肪肝モデルマウスにおけるメトホルミン塩酸塩の肝保護作用(参考資料 4.2.1.1.9 (公表文献))

I. Bergheim らは、エタノール投与により惹起させたアルコール性脂肪肝モデルマウスを用いて、メトホルミン塩酸塩の脂肪肝に対する保護作用を評価した。C57BL/6J マウス (6 週齢) にエタノールを添加した高脂肪食を 4 週間摂取させて脂肪肝を惹起させ、その期間中メトホルミン塩酸塩を飼料に混合し同時に摂取させた (投与量 : 350 mg/kg/日)。メトホ

ルミン塩酸塩は、体重当たりの肝重量及び Alanine aminotransferase (ALT) の血中への漏出量を低下させ、肝組織像の悪化を抑制した (図 2.6.2.2-7)。

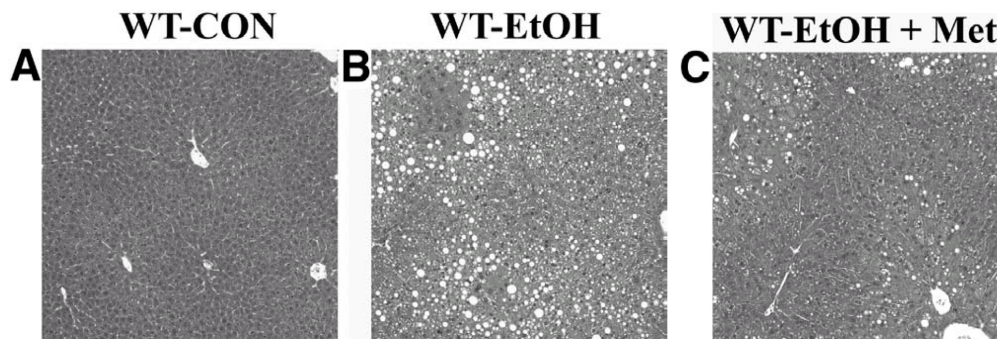


図 2.6.2.2-7 アルコール性脂肪肝モデルマウスにおけるメトホルミン塩酸塩の肝保護作用 (参考資料 4.2.1.1.9 (公表文献) より引用)

肝臓切片の Oil Red O 染色像

CON : 正常マウス EtOH : エタノール投与 Met : メトホルミン塩酸塩投与

2.6.2.2.2 作用メカニズム

メトホルミン塩酸塩の作用メカニズムに関しては、肝臓における糖新生の抑制、末梢組織における糖取り込みの促進、小腸における糖吸収の抑制などが知られている^{文献 2),3),4),5)}。それらの中で、肝臓における糖新生抑制作用の重要性が、最近の臨床における成績から示唆されている^{文献 6),7)}。

(1) 肝臓に対する作用

1) 糖新生抑制作用 (参考資料 4.2.1.1.10、4.2.1.1.11 (公表文献))

S. Song らは、高脂肪食負荷ラットを用いてメトホルミン塩酸塩の糖新生抑制作用を検討した (参考資料 4.2.1.1.10 (公表文献))。雄性 Wistar ラットに、メトホルミン塩酸塩を混合した通常食及び高脂肪食を 14 日間摂取させた (投与量: 120 mg/kg/日)。メトホルミン塩酸塩は、高脂肪食負荷により亢進した末梢糖産生及びアラニンからの糖新生を抑制した (図 2.6.2.2-8)。

N. Wollen らは、ラット初代培養肝細胞を用いてメトホルミン塩酸塩による糖新生抑制作用を評価した (参考資料 4.2.1.1.11 (公表文献))。ラット初代培養肝細胞をインスリン非存在下及び 10^{-10} mol/L インスリン存在下においてメトホルミン塩酸塩で 1 時間処理し、糖の産生量を測定した。メトホルミン塩酸塩は、インスリン非存在下及び存在下において濃度依存的に糖の産生を抑制した (図 2.6.2.2-9、図 2.6.2.2-10)。

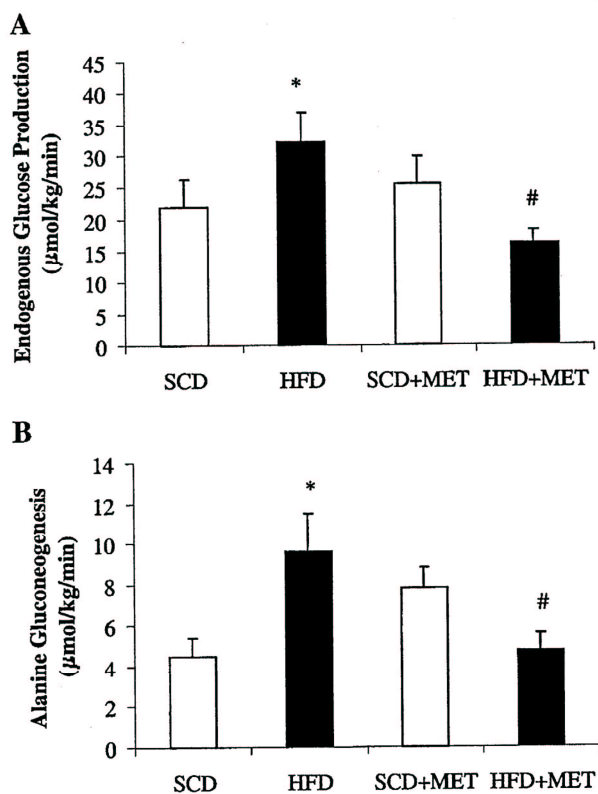


図 2.6.2.2-8 高脂肪食負荷ラットにおける糖産生及びアラニンからの糖新生に対するメトホルミン塩酸塩の抑制作用（参考資料 4.2.1.1.10（公表文献）より引用）

SCD：通常食群、HFD：高脂肪食群、MET：メトホルミン塩酸塩投与群
データは Mean \pm SE を示す（n=8）。

*：通常食群と比較して $p < 0.05$ （Student の t 検定）

#：高脂肪食群と比較して $p < 0.05$ （Student の t 検定）

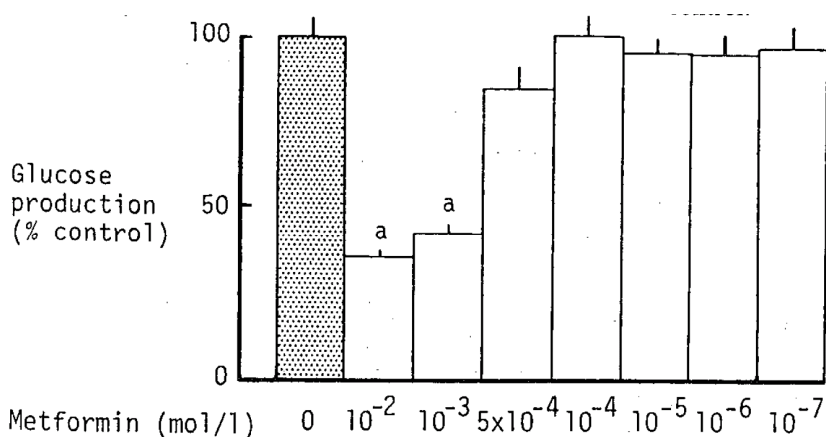


図 2.6.2.2-9 ラット初代培養肝細胞におけるインスリン非共存下でのメトホルミン塩酸塩の糖新生抑制作用（参考資料 4.2.1.1.11（公表文献）より引用）

データは Mean±SE を示す (n=6、ただしコントロールのみ n=18)。
 a: コントロールと比較して p<0.001 (Student の t 検定)

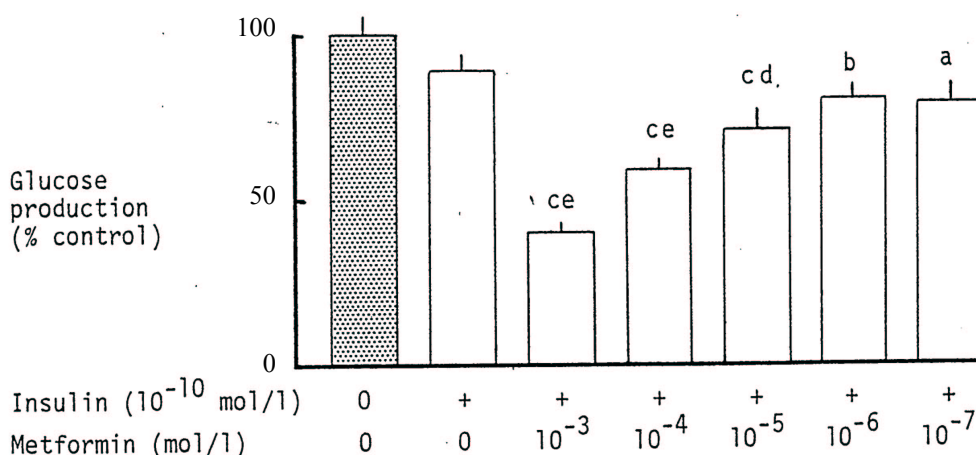


図 2.6.2.2-10 ラット初代培養肝細胞におけるインスリン共存下でのメトホルミン塩酸塩の糖新生抑制作用（参考資料 4.2.1.1.11（公表文献）より引用）

データは Mean±SE を示す (n=6、ただしコントロールのみ n=36)。
 a, b, c: コントロールと比較してそれぞれ p<0.05, p<0.01, p<0.001 (Student の t 検定)
 d, e: インスリン 10⁻¹⁰ mol/L と比較してそれぞれ p<0.05, p<0.01 (Student の t 検定)

2) G6pc 遺伝子の発現抑制作用（資料 4.2.1.1.12、参考資料 4.2.1.1.13（公表文献））

db/db マウスを用いて、糖新生の律速酵素である G6pc の遺伝子発現及び活性に対するメトホルミン塩酸塩の作用を検討した。8 週齢の雄性 *db/db* マウスに 0.5%MC 液又はメトホルミン塩酸塩を 600 mg/kg の用量にて単回強制経口投与し、2 時間後の肝臓中の G6pc 遺伝子の mRNA 量を定量的逆転写ポリメラーゼチェーンリアクション (QRT-PCR) 法により定量した (資料 4.2.1.1.12)。メトホルミン塩酸塩 600 mg/kg 投与群において、肝臓中の G6pc 遺伝子発現が有意に抑制された (図 2.6.2.2-11)。8 週齢の雄性 *db/db* マウスに 0.5%MC 液又はメトホルミン塩酸塩を 50、400 mg/kg

の用量にて単回強制経口投与し、2 時間後の肝臓中の G6pc 遺伝子発現量と血糖値との相関について検討した (参考資料 4.2.1.1.13 (公表文献))。G6pc 遺伝子発現量は、血糖値と高い相関を示した (図 2.6.2.2-12)。このとき、メトホルミン塩酸塩 400 mg/kg 投与群において、肝臓中の G6pc 活性が有意に低下していた (図 2.6.2.2-13)。更に、H-4-II-E 細胞を用いて、G6pc 遺伝子発現に対するメトホルミン塩酸塩の作用を検討した。H-4-II-E 細胞を vehicle、又は 1、3 mmol/L メトホルミン塩酸塩で処理し、2 時間後の G6pc 遺伝子の mRNA 量を QRT-PCR 法により定量した (参考資料 4.2.1.1.13 (公表文献))。その結果、メトホルミン塩酸塩処理により G6pc 遺伝子の発現が有意に抑制された (図 2.6.2.2-14)。以上より、肝臓における G6pc 遺伝子の発現抑制及び G6pc 活性の低下がメトホルミン塩酸塩の肝臓における糖新生抑制のメカニズムの 1 つである可能性が示された。

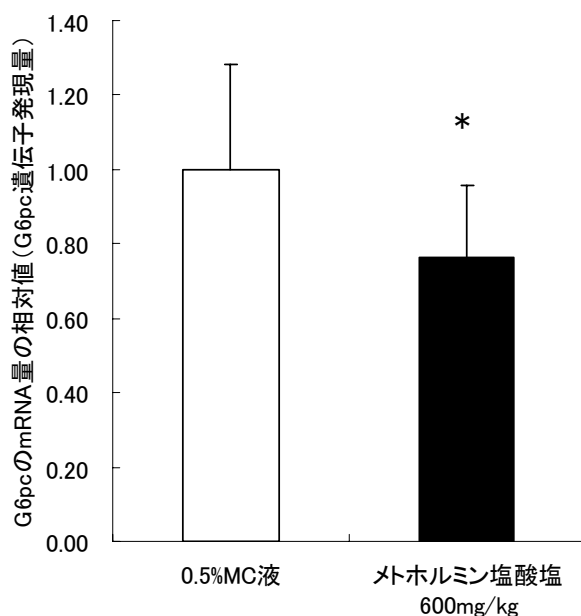


図 2.6.2.2-11 db/db マウス肝臓におけるメトホルミン塩酸塩の G6pc 遺伝子発現抑制作用

db/db マウス (雄性、8 週齢) に、0.5%MC 液、メトホルミン塩酸塩 600 mg/kg を単回強制経口投与した。投与 2 時間後の肝臓から調製した total RNA を用いて、QRT-PCR 法により G6pc 及び内部標準とした Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (Gapdh) の mRNA 量を測定した。G6pc の mRNA 量を Gapdh の mRNA 量で除した補正值を算出し、その 0.5%MC 液投与群の平均値を 1 とした相対値で G6pc 遺伝子発現量を表示した。データは Mean±SD を示す (0.5% MC 液投与群は n=10、メトホルミン塩酸塩 600 mg/kg 投与群は n=9)。

* : 0.5%MC 液投与群に対して p<0.05 (Student の t 検定)

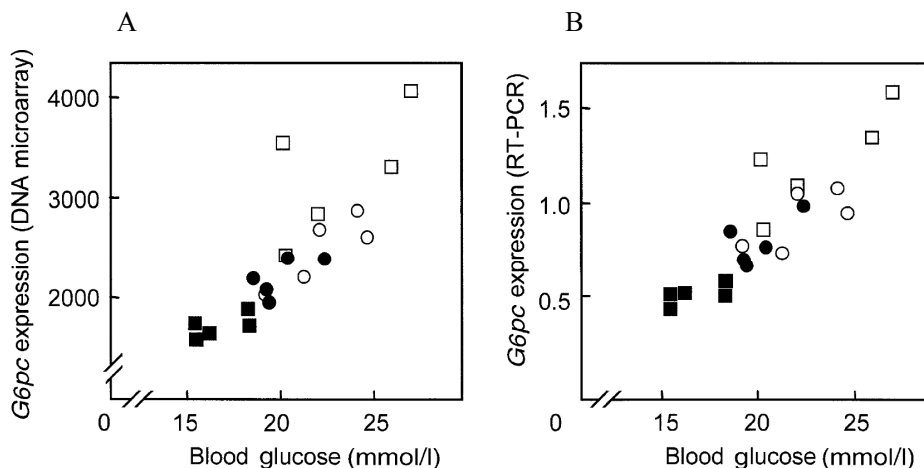


図 2.6.2.2-12 メトホルミン塩酸塩を投与した *db/db* マウス肝臓における G6pc 遺伝子発現量と血糖値の相関 (参考資料 4.2.1.1.13 (公表文献) より引用)

db/db マウス (雄性、8 週齢) に、0.5%MC 液、メトホルミン塩酸塩 50、400 mg/kg を単回強制経口投与し、投与 2 時間後の肝臓から調製した total RNA を用いて G6pc の mRNA 量を測定し、投与 2 時間後の血糖値との関係を図示した。G6pc の mRNA 発現量は DNA マイクロアレイ解析 (A)、QRT-PCR 法 (B) によって測定した。DNA マイクロアレイ解析による G6pc の mRNA 量と血糖値の相関係数は 0.833、QRT-PCR 法による G6pc の mRNA 量と血糖値の相関係数は 0.881 であった。
 ○ : 0.5%MC 液投与、● : 50 mg/kg メトホルミン塩酸塩投与、■ : 400 mg/kg メトホルミン塩酸塩投与、□ : 非投与 (n=5)

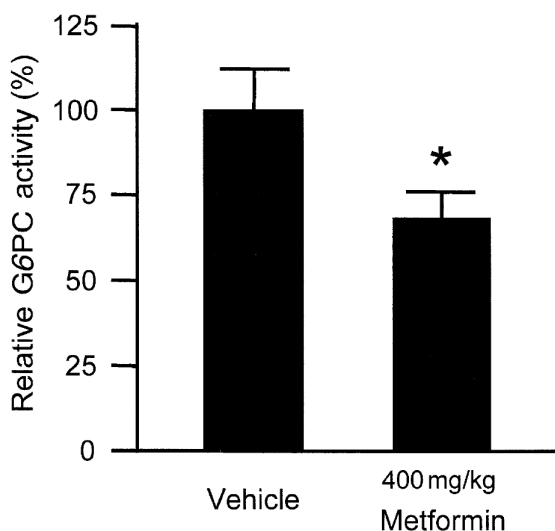


図 2.6.2.2-13 *db/db* マウス肝臓におけるメトホルミン塩酸塩の G6pc 活性低下作用 (参考資料 4.2.1.1.13 (公表文献) より引用)

db/db マウス (雄性、8 週齢) に、Vehicle (0.5%MC 液)、メトホルミン塩酸塩 400 mg/kg を単回強制経口投与し、投与 2 時間後の肝臓中 G6pc 活性を測定した。Vehicle 投与群の平均を 100%とした相対値でメトホルミン塩酸塩 400 mg/kg 投与群の G6pc 活性を示した。データは Mean±SD を示す (n=5)。

* : Vehicle 群に対して $p < 0.05$ (Student の t 検定)

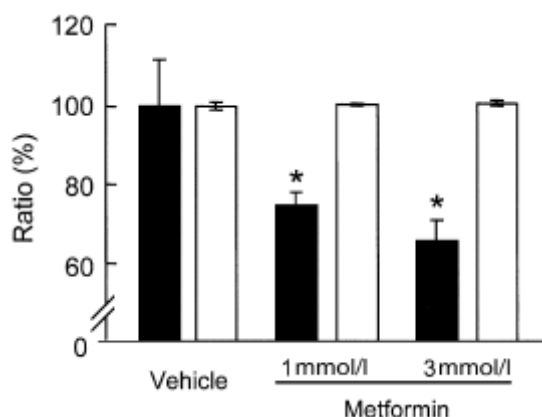


図 2.6.2.2-14 H-4-II-E 細胞におけるメトホルミン塩酸塩の G6pc 遺伝子発現抑制作用 (参考資料 4.2.1.1.13 (公表文献) より引用)

H-4-II-E 細胞を、Vehicle、1、3 mmol/L メトホルミン塩酸塩で 2 時間処理した。そのときの G6pc 遺伝子の mRNA 量を Vehicle 群の平均を 100% とした相対値で示した (■)。また培養上清中のグルコース濃度を Vehicle 群の平均を 100% とした相対値で示した (□)。データは Mean±SD を示す (n=3)。* : Vehicle 群に対して p<0.05 (Student の t 検定)

3) AMPK 活性化作用 (資料 4.2.1.1.14、参考資料 4.2.1.1.15 (公表文献))

H-4-II-E 細胞を用いて、生体エネルギー代謝の制御に關与する重要な因子である AMPK に対するメトホルミン塩酸塩の作用を検討した (資料 4.2.1.1.14)。AMPK はリン酸化によって活性化されることから、H-4-II-E 細胞を vehicle (Dulbecco's Phosphate-Buffered saline(PBS))、又は 0.3、1、3 mmol/L メトホルミン塩酸塩で 4 時間処理し、ウエスタンブロット法によりリン酸化 AMPK 量を定量した。その結果、リン酸化 AMPK 量は、メトホルミン塩酸塩の濃度が増加するに従い増加し、1 mmol/L 以上のメトホルミン塩酸塩処理群では PBS 処理群に比べ有意差が認められた (図 2.6.2.2-15)。更に、活性化された AMPK によりリン酸化される ACC についても同様に検討したところ、メトホルミン塩酸塩の濃度が増加するに従い、リン酸化 ACC 量も増加した (図 2.6.2.2-15) ことから、メトホルミン塩酸塩による AMPK の活性化作用が明らかとなった。

G. Zhou らはラット初代培養肝細胞を用いてメトホルミン塩酸塩による AMPK 活性化作用、ACC 活性抑制作用を評価した。ラット初代培養肝細胞をメトホルミン塩酸塩で 7 時間処理し、AMPK 活性及び ACC 活性を測定した (参考資料 4.2.1.1.15 (公表文献))。その結果、50 μmol/L 以上のメトホルミン塩酸塩処理により AMPK 活性が有意に増加すると共に、ACC 活性が有意に低下した (図 2.6.2.2-16)。

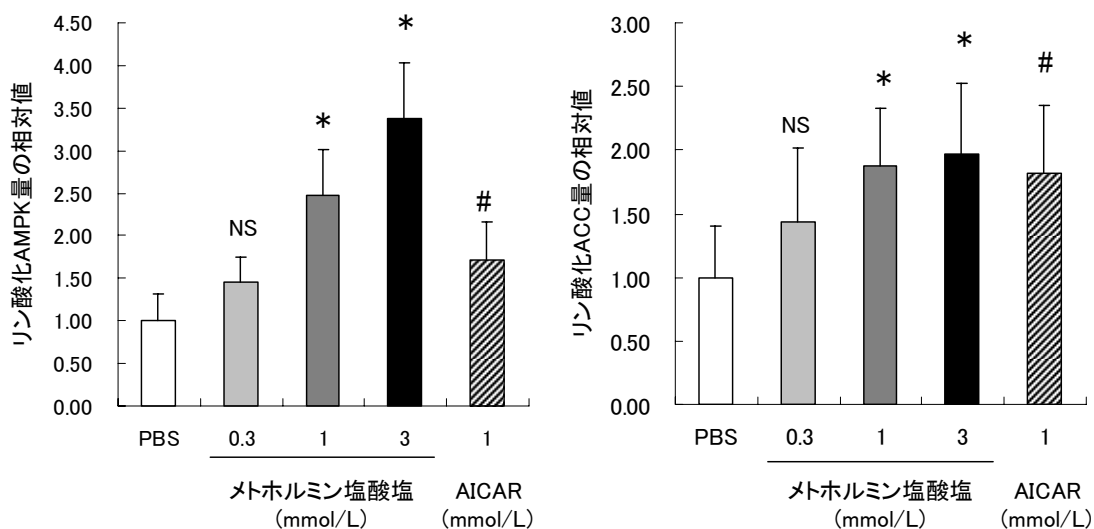


図 2.6.2.2-15 H-4-II-E 細胞におけるメトホルミン塩酸塩の AMPK リン酸化及び ACC リン酸化作用

H-4-II-E 細胞を、PBS、0.3、1、3 mmol/L メトホルミン塩酸塩、1 mmol/L 5-aminoimidazole-4-carboxamide riboside (AICAR) で 4 時間処理し、細胞抽出液を調製した。ウエスタンブロット法により各サンプルのリン酸化 AMPK 量及び AMPK 量を定量し、リン酸化 AMPK 量の相対値を算出した。ACC についても同様に行った。データは Mean±SD を示す (n=6)。

: PBS 処理群に対して Student の t 検定により p<0.05

*, NS : PBS 処理群に対してパラメトリック Dunnett 型多重比較によりそれぞれ p<0.05, p>0.05

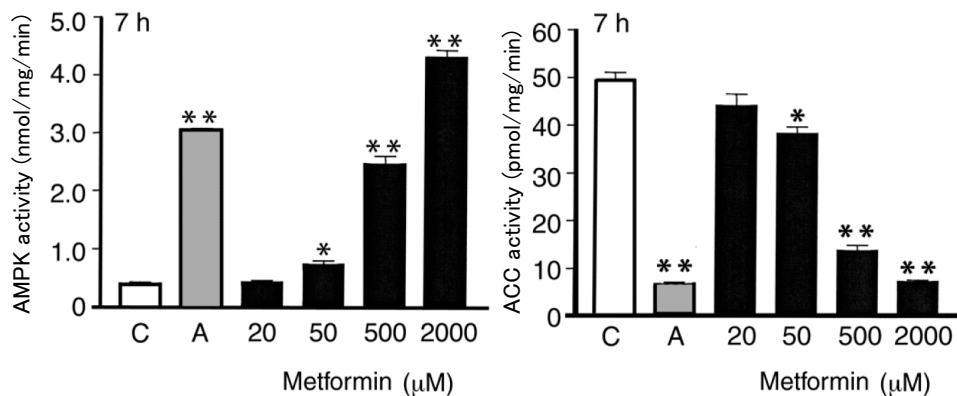


図 2.6.2.2-16 ラット初代培養肝細胞におけるメトホルミン塩酸塩の AMPK 活性上昇及び ACC 活性抑制作用 (参考資料 4.2.1.1.15 (公表文献) より引用)

ラット初代培養肝細胞にメトホルミン塩酸塩を添加し、7 時間後の AMPK 活性を合成基質のリン酸化を指標に検出した。また ACC 活性について ¹⁴CO₂ 固定化作用を指標に検出した。データは Mean±SE を示す (n=3)。μM=μmol/L

C : コントロール、A : AICAR 500 μmol/L 添加

*, **: コントロールと比較してそれぞれ p<0.05, p<0.01 (対応のある t 検定)

4) complex I 阻害作用 (参考資料 4.2.1.1.16 (公表文献))

M. R. Owen らは、H-4-II-E 細胞を用いて、メトホルミン塩酸塩のミトコンドリア呼吸鎖活性に対する作用を評価した。H-4-II-E 細胞を、メトホルミン塩酸塩 50、100 μmol/L で 24 又は 60 時間処理し、complex I 活性を測定した。いずれの条件においても、メトホルミン塩酸塩は、グルタミン酸とリンゴ酸を基質とした complex I の活性を阻害した (図 2.6.2.2-17)。

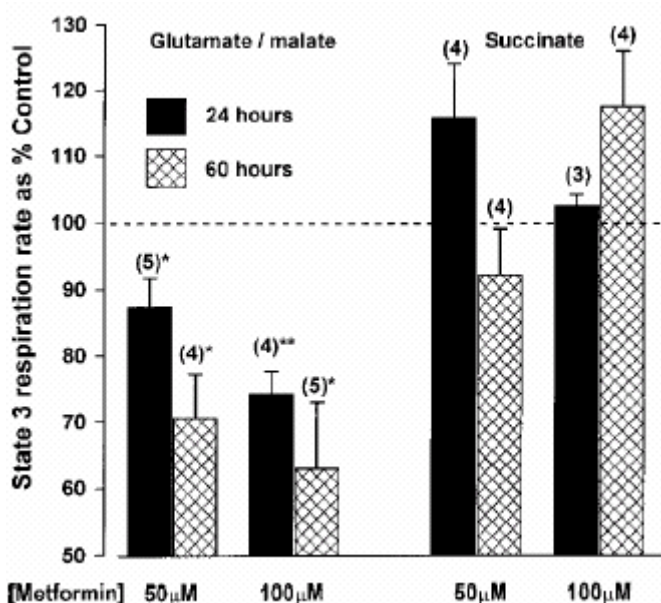


図 2.6.2.2-17 H-4-II-E 細胞におけるメトホルミン塩酸塩のミトコンドリア呼吸鎖活性阻害作用 (参考資料 4.2.1.1.16 (公表文献) より引用)

H-4-II-E 細胞を 50 μmol/L 又は 100 μmol/L のメトホルミン塩酸塩添加条件にて、24 又は 60 時間培養した後、ミトコンドリア呼吸鎖活性を complex I の基質 (Glutamate/malate) 又は complex II の基質 (Succinate) を用いて検出した。データは無処理条件を 100%とした相対値の Mean±SE を示す。括弧内の数字は、実験の回数を示す。μM=μmol/L

*, **: コントロール (無処理) と比較してそれぞれ p<0.05, p<0.01 (対応のある t 検定)

5) complex I 阻害作用と AMPK 活性化作用及び G6pc 遺伝子発現抑制作用との関連 (参考資料 4.2.1.1.17)

AMPK 活性化作用が知られている 5-aminoimidazole-4-carboxamide riboside (AICAR) で処理した H-4-II-E 細胞において、AMPK 活性化に伴う G6pc 遺伝子の発現抑制^{文献⁸}が、呼吸鎖阻害剤 3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea (DCMU)で処理したラット初代培養肝細胞では、呼吸鎖阻害に伴う糖新生の抑制^{文献⁹}が報告されている。そこで、メトホルミン塩酸塩の complex I 阻害作用と AMPK 活性化作用及び G6pc 遺伝子発現抑制作用との関連について解析を行った。哺乳動物細胞内で complex I と同様の機能を示す酵母 NDI1 遺伝子を導入した H-4-II-E 細胞を用いてメトホルミン塩酸塩及びロテノンの作用を検討した。ロテノンは、complex I 阻害剤で

あるが NDI1 を阻害しないことが報告されている^{文献¹⁰}。NDI1 発現細胞では、ロテノン、メトホルミン塩酸塩いずれによっても、細胞内 ATP 濃度の低下が起こらず(図 2.6.2.2-18)、AMPK や ACC のリン酸化も認められなかった(図 2.6.2.2-19)。この細胞では NDI1 の導入によって、ロテノン及びメトホルミン塩酸塩による complex I 阻害の影響が打ち消されたことによると考えられた。一方、NDI1 発現細胞ではロテノンによる G6pc 遺伝子の発現抑制がみられなくなったのに対し、メトホルミン塩酸塩による G6pc 遺伝子の発現抑制が観察された(図 2.6.2.2-20)。これらの結果から、NDI1 発現細胞におけるメトホルミン塩酸塩の G6pc 遺伝子の発現抑制は、complex I 阻害や AMPK 活性化には依存しないことが示唆された。以上より、メトホルミン塩酸塩による G6pc 遺伝子の発現抑制は complex I 阻害や AMPK 活性化を介していない可能性があると考えられた。

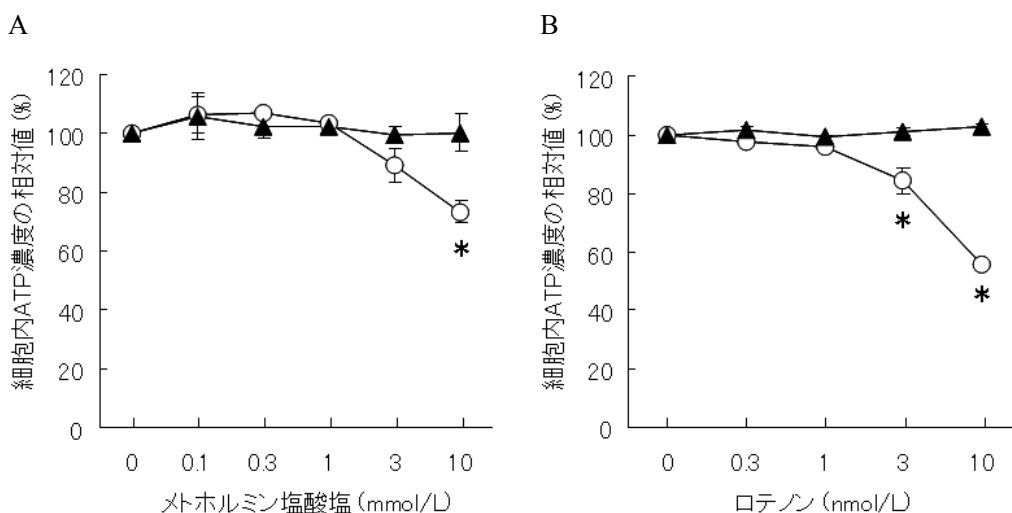


図 2.6.2.2-18 NDI1 発現細胞におけるメトホルミン塩酸塩及びロテノンの細胞内 ATP 濃度低下作用 (参考資料 4.2.1.1.17 より引用)

NDI1 発現細胞 (▲) 及びコントロール細胞 (○) をメトホルミン塩酸塩又はロテノンで処理し、2 時間後に細胞内 ATP 濃度を測定した。データは各 vehicle を 100%とした相対値の Mean±SD を示す(n=3)。

A : メトホルミン塩酸塩処理、B : ロテノン処理

* : vehicle 処理群に対して p<0.01 (パラメトリック Dunnett 型多重比較)

vehicle : PBS

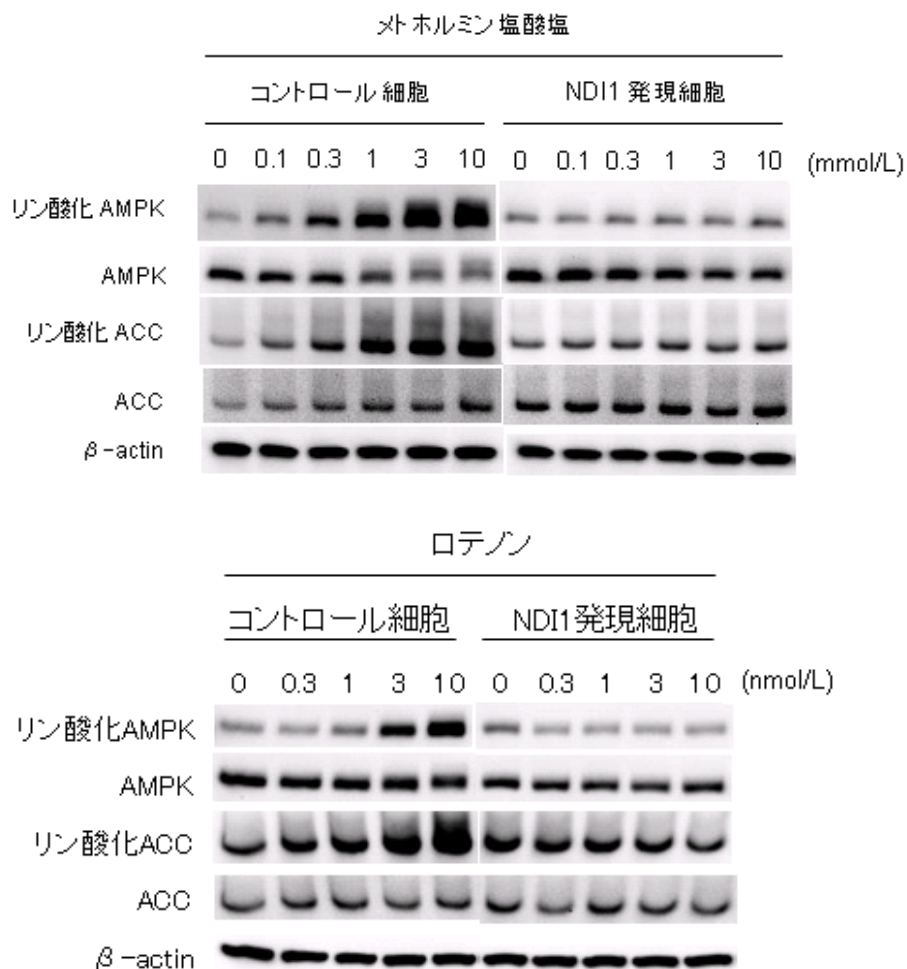


図 2.6.2.2-19 NDI1 発現細胞におけるメトホルミン塩酸塩及びロテノンの AMPK、ACC リン酸化作用 (参考資料 4.2.1.1.17 より引用)

NDI1 発現細胞及びコントロール細胞をメトホルミン塩酸塩又はロテノンで処理し、2 時間後に細胞抽出液を調製した。ウエスタンブロット法により各サンプルのリン酸化 AMPK、AMPK、リン酸化 ACC、ACC、 β -actin を検出した。上段：メトホルミン塩酸塩処理、下段：ロテノン処理

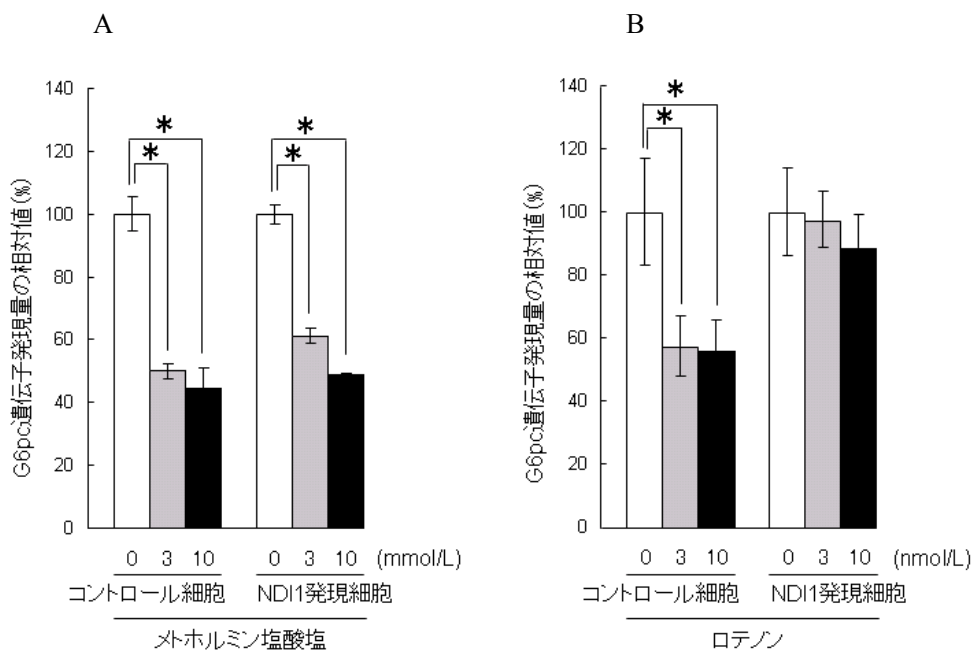


図 2.6.2.2-20 NDI1 発現細胞におけるメトホルミン塩酸塩及びロテノンの G6pc 遺伝子発現抑制作用 (参考資料 4.2.1.1.17 より引用)

NDI1 発現細胞及びコントロール細胞をメトホルミン塩酸塩又はロテノンで処理し、2 時間後の細胞から調製した RNA を用いて、QRT-PCR 法により G6pc および内部標準とした β -actin の mRNA 量を定量した。G6pc の mRNA 量を β -actin の mRNA 量で除した補正值を算出し、各 vehicle の平均値を 100% とした相対値の Mean \pm SD を示す (n=3)。

A : メトホルミン塩酸塩処理、B : ロテノン処理

* : vehicle 処理群に対して p<0.05 (パラメトリック Dunnett 型多重比較)

vehicle : PBS

6) 血糖降下作用に対する LKB1 の関与 (参考資料 4.2.1.1.18 (公表文献))

R. J. Shaw らは、AMPK など多くの kinase のリン酸化作用を有する LKB1 を肝臓でのみ欠失させたトランスジェニックマウスを作製し、メトホルミン塩酸塩の血糖降下作用に対する LKB1 の関与を評価した。高脂肪食負荷した肝臓特異的 LKB1 欠失トランスジェニックマウス及び野生型マウスにメトホルミン塩酸塩を 250 mg/kg の用量にて 3 日間腹腔内投与した。野生型マウスにおいては、メトホルミン塩酸塩投与により肝臓中の AMPK のリン酸化が増強されたのに対して、肝臓特異的 LKB1 欠失トランスジェニックマウスにおいては、リン酸化の増強は認められなかった。このとき、野生型マウスにおいては血糖値の低下がみられたが、肝臓特異的 LKB1 欠失トランスジェニックマウスにおいては血糖値の変化はみられなかった (図 2.6.2.2-21)。以上より、メトホルミン塩酸塩による血糖降下作用には、LKB1 の関与が重要であることが示された。

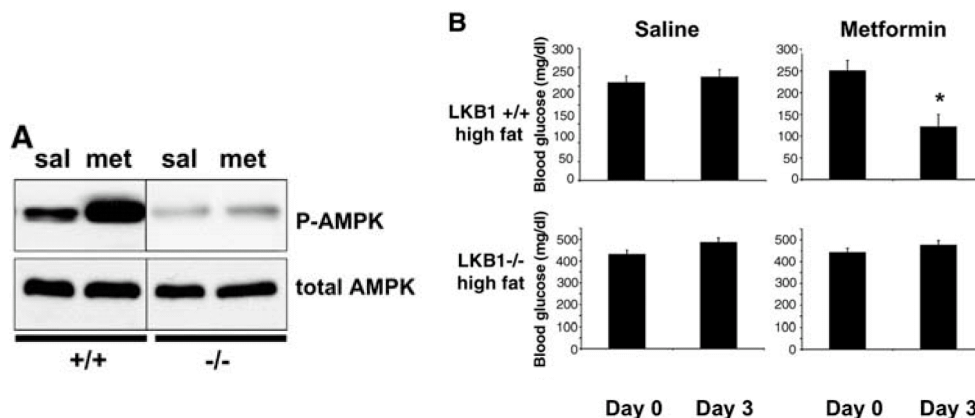


図 2.6.2.2-21 肝臓特異的 LKB1 欠失トランスジェニックマウスにおけるメトホルミン塩酸塩の作用 (参考資料 4.2.1.1.18 (公表文献) より引用)

A には、メトホルミン塩酸塩 (met) あるいは Saline (Sal) を 3 日間投与した後の、肝臓特異的 LKB1 欠失トランスジェニックマウス (-/-) 及び野生型マウス (+/+) 肝臓におけるリン酸化 AMPK と全 AMPK のウェスタンブロットの結果を示す。B には、各マウスのメトホルミン塩酸塩又は Saline 投与前と投与 3 日後の血糖値を示す。データは Mean±SE を示す (n=5)。

* : Student の t 検定により p<0.001

7) 脂質低下作用 (参考資料 4.2.1.1.19、4.2.1.1.15 (公表文献))

M. Zang らは、HepG2 細胞を用いて、メトホルミン塩酸塩による AMPK 活性化作用と細胞内脂質量の関係を評価した (参考資料 4.2.1.1.19 (公表文献))。HepG2 細胞をメトホルミン塩酸塩 (0.5、1、2 mmol/L) で 24 時間処理し、リン酸化 AMPK 量、リン酸化 ACC 量、及び細胞内脂質量の定量を行った。メトホルミン塩酸塩は、AMPK 及び ACC のリン酸化を促進し、同時に細胞内のトリグリセリド量、コレステロール量を減少させた (図 2.6.2.2-22)。アミノ酸に変異を導入し、活性を消失させた AMPK を発現するように作製した組換え HepG2 細胞では、メトホルミン塩酸塩による細胞内脂質量の低下はみられなかったことから、細胞内脂質量の低下作用は AMPK の活性化に依存した作用であることが示唆された。ACC は、AMPK によりリン酸化されることにより活性が抑制され、その結果として脂肪酸酸化が亢進する。図 2.6.2.2-15、図 2.6.2.2-16、図 2.6.2.2-22 に示したように、メトホルミン塩酸塩は、ACC のリン酸化を促進し、ACC 活性を低下させた。

G. Zhou らはラット初代培養肝細胞を用いて、脂質合成系の重要な転写因子である Sterol regulatory element-binding protein-1 (SREBP-1) 遺伝子及び脂質合成関連遺伝子の発現に対するメトホルミン塩酸塩の作用を評価した (参考資料 4.2.1.1.15 (公表文献))。ラット初代培養肝細胞をインスリン存在下、メトホルミン塩酸塩 (500 μmol/L) で 6 時間処理した後、細胞における SREBP-1 の mRNA 量を定量した。メトホルミン塩酸塩は、インスリンによる SREBP-1 発現亢進を抑制した (図 2.6.2.2-23)。また、ラット初代培養肝細胞をメトホルミン塩酸塩 (50~500 μmol/L) で 6 時間処理し、脂質合成関連遺伝子の mRNA 量を定量した。メトホルミン塩酸塩は Fatty acid synthase (Fas) などの脂質合成関連遺伝子の発現を抑制した (図 2.6.2.2-24)。

以上より、メトホルミン塩酸塩は、AMPK の活性化を介して、脂肪酸合成酵素の発現を抑制することで、あるいは、ACC 活性抑制による脂肪酸酸化を亢進することで、脂質低下作用を発現する可能性が示唆された。

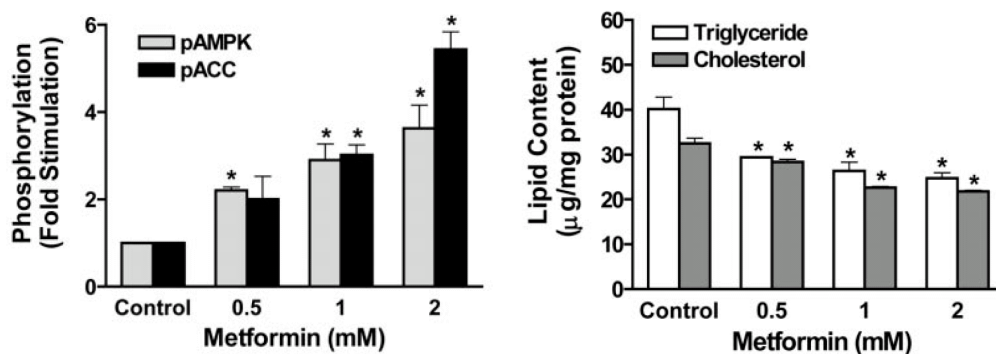


図 2.6.2.2-22 HepG2 細胞におけるメトホルミン塩酸塩の AMPK 及び ACC リン酸化作用と細胞内脂質量の低下作用（参考資料 4.2.1.1.19（公表文献）より引用）

左図は、HepG2 細胞を 0.5、1、2 mmol/L のメトホルミン塩酸塩で処理した 24 時間後のリン酸化 AMPK、リン酸化 ACC 量を示す。データは Mean±SE を示す (n=3)。* : コントロールと比較して p<0.05 (t 検定)。右図は、0.5、1、2 mmol/L のメトホルミン塩酸塩で処理した 24 時間後の細胞内トリグリセリド、コレステロール量を示す。データは Mean±SE を示す (n=4)。

* : コントロールと比較して p<0.05 (t 検定)

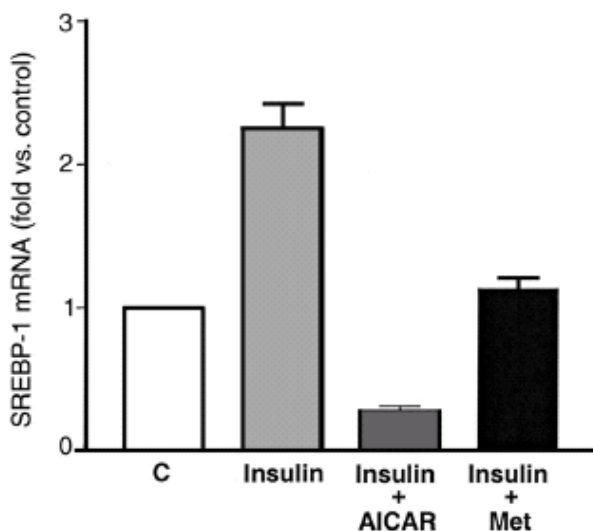


図 2.6.2.2-23 ラット初代培養肝細胞におけるメトホルミン塩酸塩の SREBP-1 遺伝子発現抑制作用（参考資料 4.2.1.1.15（公表文献）より引用）

ラット初代培養肝細胞を 100 nmol/L インスリン及び 500 µmol/L AICAR 又は 500 µmol/L のメトホルミン塩酸塩で処理し、6 時間後の SREBP-1 mRNA 量を定量した。データは Mean±SE を示す (n=3)。C: コントロール、Met: メトホルミン塩酸塩。コントロール群と比較して Insulin 処理群の p 値は 0.03、Insulin 処理群と比較して、Insulin+AICAR 処理群の p 値は 0.0046、Insulin+Met 処理群の p 値は 0.01 であった (t 検定)。

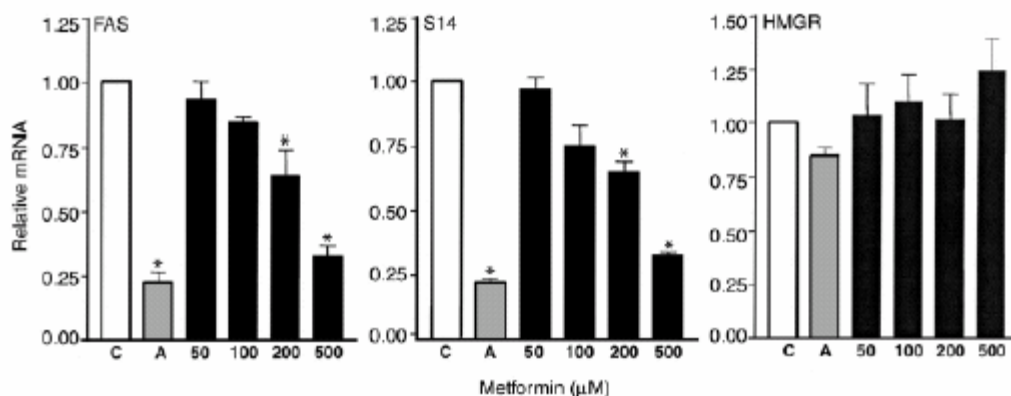


図 2.6.2.2-24 ラット初代培養肝細胞におけるメトホルミン塩酸塩の脂質合成関連遺伝子発現抑制作用（参考資料 4.2.1.1.15（公表文献）より引用）

ラット初代培養肝細胞を 500 μmol/L AICAR 又は 50~500 μmol/L のメトホルミン塩酸塩で処理し、6 時間後の脂質合成関連遺伝子の mRNA 量を定量した。データは Mean±SE を示す (n=3)。

FAS : Fatty acid synthase、S14 : Spot-14、HMGR : Hydroxymethylglutaryl-Coenzyme A reductase

C : コントロール、A : AICAR、* : コントロールと比較して p<0.05 (対応のある t 検定)

8) メトホルミン塩酸塩による遺伝子発現変動の網羅的な解析（参考資料 4.2.1.1.13、4.2.1.1.20（公表文献））

メトホルミン塩酸塩が *db/db* マウス肝臓における遺伝子発現に与える影響について網羅的な解析を行った。8 週齢の雄性 *db/db* マウスに 0.5%MC 液又はメトホルミン塩酸塩を 50、400 mg/kg の用量にて強制経口投与し、投与 2 時間後の肝臓における遺伝子発現を、非投与群も含め DNA マイクロアレイにより解析した（参考資料 4.2.1.1.13（公表文献））。血糖値の有意な低下が認められた 400 mg/kg メトホルミン塩酸塩投与群とそれ以外の群との遺伝子発現の違いを 59 の代謝パスウェイを対象に検討した結果、糖新生・糖代謝パスウェイ、脂肪酸代謝パスウェイなど 10 パスウェイについて、有意な遺伝子発現の変化が認められた。また、メトホルミン塩酸塩を 600 mg/kg の用量にて 1 日 1 回 4 週間強制経口投与した *db/db* マウスの肝臓におけるたん白質の発現を網羅的に解析したところ、100 種類のたん白質で発現量の変動が観察され、その多くが糖代謝及び脂質代謝に関するパスウェイに属する酵素であった^{文献 11)}。以上より、メトホルミン塩酸塩は、血糖値を低下させるのに伴い、G6pc 遺伝子以外にも糖代謝及び脂質代謝に関する多くの遺伝子やたん白質の発現に影響を与えることが示された。

更に、*db/db* マウス肝臓における遺伝子発現に与える影響を、メトホルミン塩酸塩とフェンホルミン塩酸塩で比較した。8 週齢の雄性 *db/db* マウスに 0.5%MC 液又はメトホルミン塩酸塩を 200、400、600 mg/kg の用量にて、フェンホルミン塩酸塩を 200、400 mg/kg の用量にて強制経口投与し、投与 2 時間後の肝臓における遺伝子発

現を DNA マイクロアレイにより解析した (参考資料 4.2.1.1.20 (公表文献))。その結果、フェンホルミン塩酸塩によって発現変動した遺伝子数は、メトホルミン塩酸塩に比べ多く、また、フェンホルミン塩酸塩のみで変動した遺伝子には、ストレス応答に関連した遺伝子が多く含まれていた。以上より、メトホルミン塩酸塩は、フェンホルミン塩酸塩に比べ、肝臓の遺伝子発現に対する影響が小さいことが示された。

(2) 筋肉・脂肪に対する作用

- 1) 筋肉細胞における糖取り込み促進作用 (参考資料 4.2.1.1.21、4.2.1.1.22、4.2.1.1.23、4.2.1.1.15 (公表文献))

H. S. Hundal らは、ラット骨格筋由来細胞株である L6 細胞を用いてメトホルミン塩酸塩の筋肉に対する作用を評価した (参考資料 4.2.1.1.21 (公表文献))。メトホルミン塩酸塩 (800、2000 $\mu\text{mol/L}$) で細胞を 16 時間処理し、最後の 30 分のみインスリンを共存又は非共存とし、細胞への糖取り込みを測定した。インスリン刺激に関わらず、メトホルミン塩酸塩は、細胞への糖取り込みを促進した (図 2.6.2.2-25)。またメトホルミン塩酸塩 (800 $\mu\text{mol/L}$) 処理により、細胞外膜中の GLUT1 が増加したことより、メトホルミン塩酸塩の糖取り込み促進作用には、グルコーストランスポーターの細胞内分布への作用の関与が示唆された (図 2.6.2.2-25)。V. Sarabia らは、ヒト骨格筋細胞を用いてメトホルミン塩酸塩の筋肉に対する作用を評価した (参考資料 4.2.1.1.22 (公表文献))。通常グルコース濃度 (5 mmol/L) に比べ、高グルコース添加条件にて培養されたヒト骨格筋細胞は、細胞への糖取り込みの低下を示した。メトホルミン塩酸塩 (50 $\mu\text{mol/L}$) で同時に処理することにより、その低下が改善された (図 2.6.2.2-26)。

筋肉においても肝臓と同様に、AMPK の関与が報告されている。G. Zhou らは、ラット骨格筋細胞をメトホルミン塩酸塩 (2 mmol/L) 存在下で 3 時間培養し、メトホルミン塩酸塩の筋肉に対する作用を評価した (参考資料 4.2.1.1.15 (公表文献))。メトホルミン塩酸塩は、AMPK を活性化するとともに、細胞への糖取り込みを促進した (図 2.6.2.2-27) ことから、筋肉におけるメトホルミン塩酸塩の作用発現に AMPK が重要であることが示唆された。また、N. Musi らは、メトホルミン塩酸塩 (500 mg/日 で開始し、1 週ごとに 500 mg ずつ 2000 mg/日 まで増量) を 10 週間投与した 2 型糖尿病患者の骨格筋の AMPK を評価した (参考資料 4.2.1.1.23 (公表文献))。メトホルミン塩酸塩投与により、投与前に比べ AMPK α サブユニットのリン酸化が亢進し (図 2.6.2.2-28)、AMPK α 2 サブユニットの活性が上昇した (図 2.6.2.2-29)。

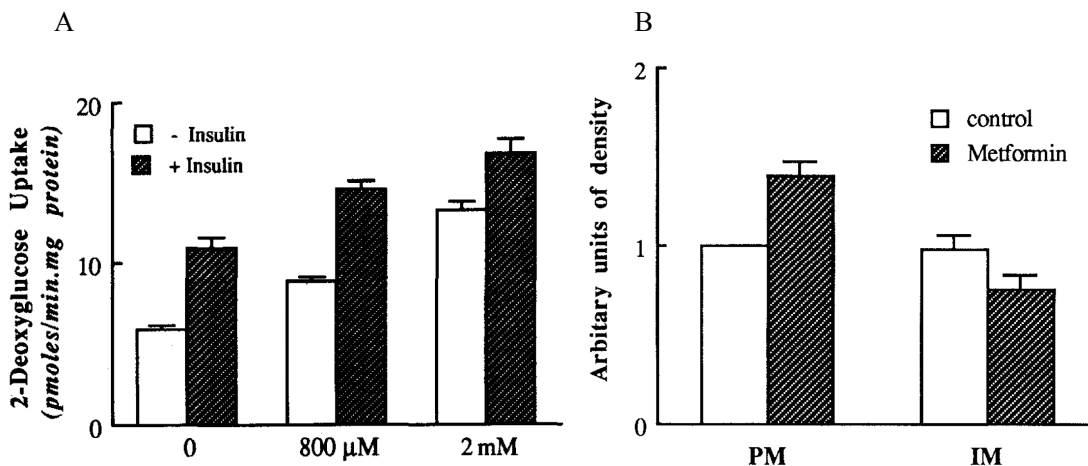


図 2.6.2.2-25 L6 細胞におけるメトホルミン塩酸塩の作用
(参考資料 4.2.1.1.21 (公表文献) より引用)

A: 糖取り込み

メトホルミン塩酸塩 (0, 800, 2000 μmol/L) で 16 時間処理し、最後の 30 分間にインスリン (10⁻⁷ mol/L) を共存 (斜線) あるいは非共存 (白抜き) させた (M=mol/L)。データは n=3 で実施された 4 回の独立した試験結果の Mean±SE を表す。

B: GLUT1 量

白抜きはコントロール、斜線はメトホルミン塩酸塩 (800 μmol/L、16 時間) 処理

PM : plasma membrane、IM : internal membrane

データは、コントロールの PM を 1 とした相対値で、5 回の独立した試験結果の Mean±SE を表す。

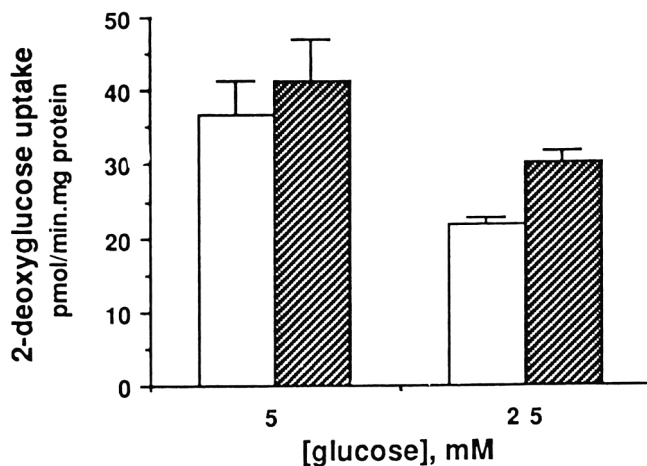


図 2.6.2.2-26 高グルコース添加によるヒト骨格筋細胞の糖取り込み低下に対するメトホルミン塩酸塩の作用 (参考資料 4.2.1.1.22 (公表文献) より引用)

白抜きはコントロール、斜線はメトホルミン処理(50 μmol/L、24 時間)を示す。

データは n=3 で実施された 3 回の独立した試験結果の Mean±SE を表す。

mM=mmol/L

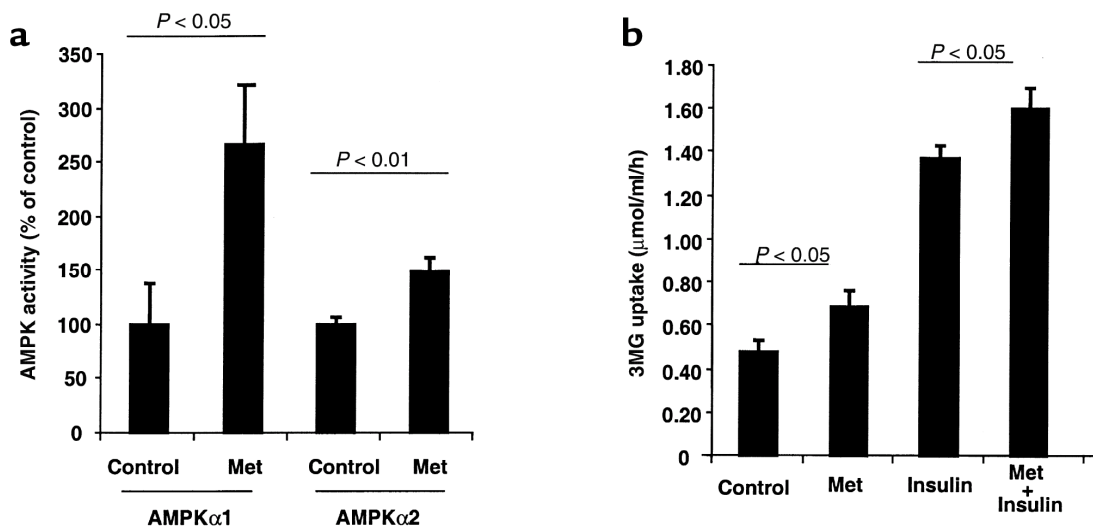


図 2.6.2.2-27 ラット骨格筋におけるメトホルミン塩酸塩の AMPK 活性化と糖取り込み促進作用 (参考資料 4.2.1.1.15 (公表文献) より引用)

a : AMPK 活性 b : 糖取り込み
 Met : メトホルミン塩酸塩処理 (2 mmol/L、3 時間)、Insulin : インスリン処理 (300 nmol/L、メトホルミン塩酸塩処理の最後 30 分間)
 3MG : 3-O-methylglucose
 データは Mean \pm SE (n=5~6) を示す。

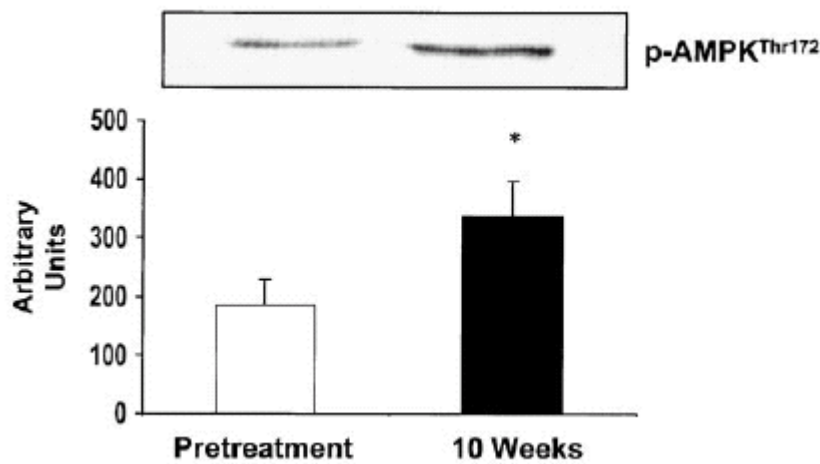


図 2.6.2.2-28 メトホルミン塩酸塩を投与した 2 型糖尿病患者筋肉における AMPK リン酸化の上昇 (参考資料 4.2.1.1.23 (公表文献) より引用)

メトホルミン塩酸塩を投与した 2 型糖尿病患者の投与前及び投与 10 週間後の筋肉バイオプシーサンプル中の AMPK リン酸化量を抗リン酸化 AMPK 抗体を用いてウェスタンブロット法にて検討した。データは Mean \pm SE (n=8) を示す。
 * : 投与開始前 (Pretreatment) と比較して p<0.05 (対応のある t 検定)

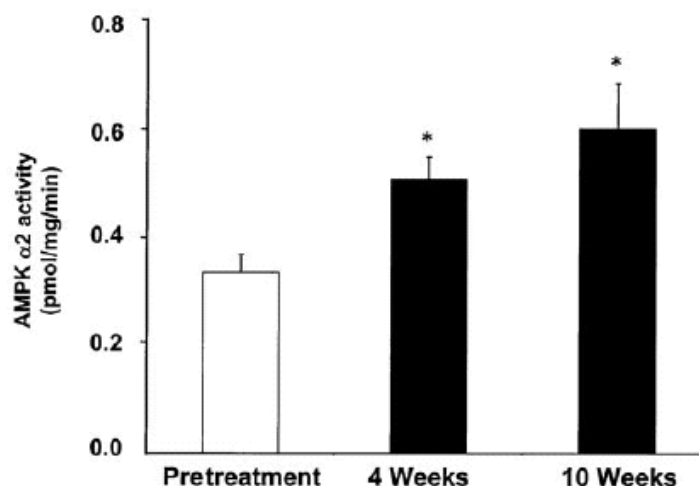


図 2.6.2.2-29 メトホルミン塩酸塩を投与した 2 型糖尿病患者筋肉における AMPK 活性の上昇 (参考資料 4.2.1.1.23 (公表文献) より引用)

メトホルミン塩酸塩を投与した 2 型糖尿病患者の投与前及び投与 4、10 週間後の筋肉バイオプシーサンプル中の AMPK 活性を合成基質のリン酸化を指標に検出した。データは Mean±SE (n=8) を示す。

* : 投与開始前 (Pretreatment) と比較して $p < 0.05$ (対応のある t 検定)

2) 脂肪細胞における糖取り込み促進作用 (参考資料 4.2.1.1.24、4.2.1.1.25 (公表文献))

S. Matthaei らは、単離ラット脂肪細胞におけるメトホルミン塩酸塩の作用を評価した (参考資料 4.2.1.1.24 (公表文献))。インスリン非存在下及び存在下においてメトホルミン塩酸塩 (1~100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) の添加による細胞への糖取り込みに対する影響を測定した。メトホルミン塩酸塩は、インスリン非存在下の糖取り込みには影響を与えなかったが、インスリン存在下の糖取り込みを促進した (図 2.6.2.2-30)。このとき、メトホルミン塩酸塩は、インスリン受容体への結合、インスリン受容体の活性化、及びグルコーストランスポーターの発現量に影響を与えず、グルコーストランスポーターの細胞外膜への移行を促進した。また、I. J. Kozka らは、同様に単離ラット脂肪細胞を用いて、高濃度のインスリン前処理に対するメトホルミン塩酸塩の効果を検討した (参考資料 4.2.1.1.25 (公表文献))。高濃度のインスリンの前処理により細胞への糖取り込み及びグルコーストランスポーターの細胞外膜への移行が低下したが、メトホルミン塩酸塩 (1 mmol/L) を同時に処理することにより、それらが改善された (図 2.6.2.2-31)。

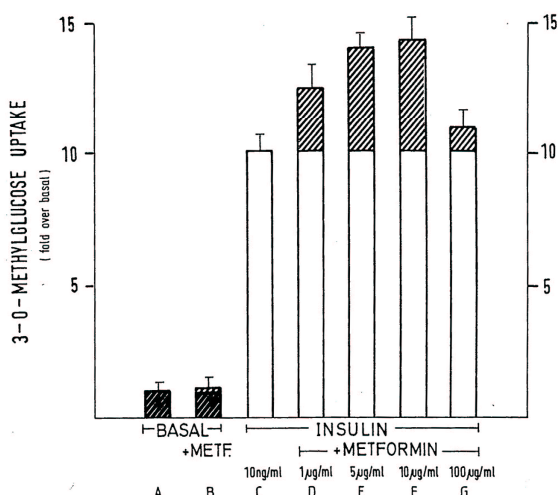


図 2.6.2.2-30 ラット脂肪細胞におけるメトホルミン塩酸塩の糖取り込み促進作用
(参考資料 4.2.1.1.24 (公表文献) より引用)

A : 薬剤添加なし、B : メトホルミン塩酸塩 (10 µg/mL、2 時間)、C : インスリン (1.72 nmol/L、30 分間)、
D~G : メトホルミン塩酸塩 (表記濃度、2 時間) 処理後、インスリン (1.72 nmol/L、30 分間) 処理
データは、n=4 で実施された 4 回の独立した試験結果の Mean±SE を示す。

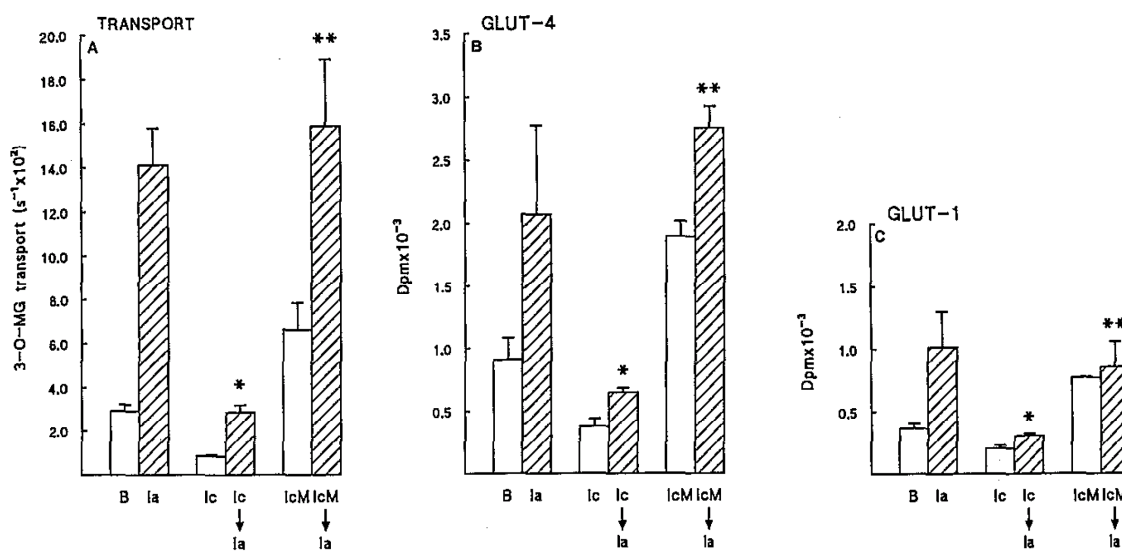


図 2.6.2.2-31 高インスリン前処理によるラット脂肪細胞の糖取り込み及びグルコース
トランスポーターの外膜移行の低下に対するメトホルミン塩酸塩の作用
(参考資料 4.2.1.1.25 (公表文献) より引用)

A : 糖取り込み、B : 細胞膜グルコーストランスポーター(GLUT4)量、C : 細胞膜グルコーストランスポーター(GLUT1)量
データは 3 回の独立した試験結果の Mean±SE を示す。
B : 無処理、Ia : インスリン 10 nmol/L、30 分処理、Ic : インスリン 500 nmol/L、24 時間処理、
IcM : インスリン 500 nmol/L+メトホルミン塩酸塩 1 mmol/L、24 時間処理、
→Ia : 24 時間処理後、インスリン 10 nmol/L、30 分処理
A : *は Ia と比較して p<0.005、**は Ic→Ia と比較して p<0.01
B : *は Ia と比較して p<0.05、**は Ic→Ia と比較して p<0.001
C : *は Ia と比較して p<0.05、**は Ic→Ia と比較して p<0.05

(3) 小腸に対する作用

1) 糖吸収抑制作用 (参考資料 4.2.1.1.26 (公表文献))

T. Ikeda らは、Wistar ラット (雄性、8 週齢) にメトホルミン塩酸塩を 250 mg/kg の用量にて 1 日 1 回 5 日間強制経口投与し、小腸における糖吸収を灌流条件下にて評価した。メトホルミン塩酸塩を投与したラットにおいて、小腸からの糖吸収の抑制がみられた (図 2.6.2.2-32)。

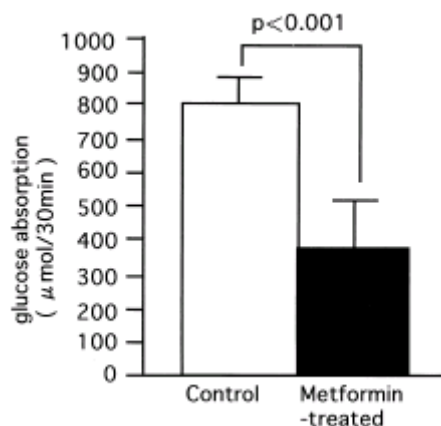


図 2.6.2.2-32 ラット小腸におけるメトホルミン塩酸塩の糖吸収抑制作用

(参考資料 4.2.1.1.26 (公表文献) より引用)

Control : コントロール群、Metformin-treated : メトホルミン塩酸塩投与群
データは Mean±SD を示す (n=6)。
コントロール群と比較して p<0.001 (Student の t 検定)

2) GLP-1 増加作用 (参考資料 4.2.1.1.27 (公表文献))

E. Mannucci らは、メトホルミン塩酸塩を投与した肥満患者において、血漿中 GLP-1 濃度を評価した。2550 mg/日のメトホルミン塩酸塩を 14 日間投与した肥満患者では、コントロール群と比較して糖負荷前の血漿中 GLP-1 濃度に変化はなかったが、糖負荷後の血漿中 GLP-1 濃度が増加した (図 2.6.2.2-33)。GLP-1 は小腸上皮細胞からグルコースの吸収に応答して血中に放出され、膵ランゲルハンス氏島に作用してグルコース濃度の上昇に応答したインスリン分泌を促進することが知られており、メトホルミン塩酸塩の血糖降下作用の一部に、この GLP-1 増加作用が寄与している可能性が考えられる。メトホルミン塩酸塩による血漿中 GLP-1 増加のメカニズムについては、小腸上皮細胞からの GLP-1 分泌促進^{文献 12),13)}及び血中における GLP-1 分解抑制^{文献 14),15)}の可能性が示されているが、いまだ明確になっていない。

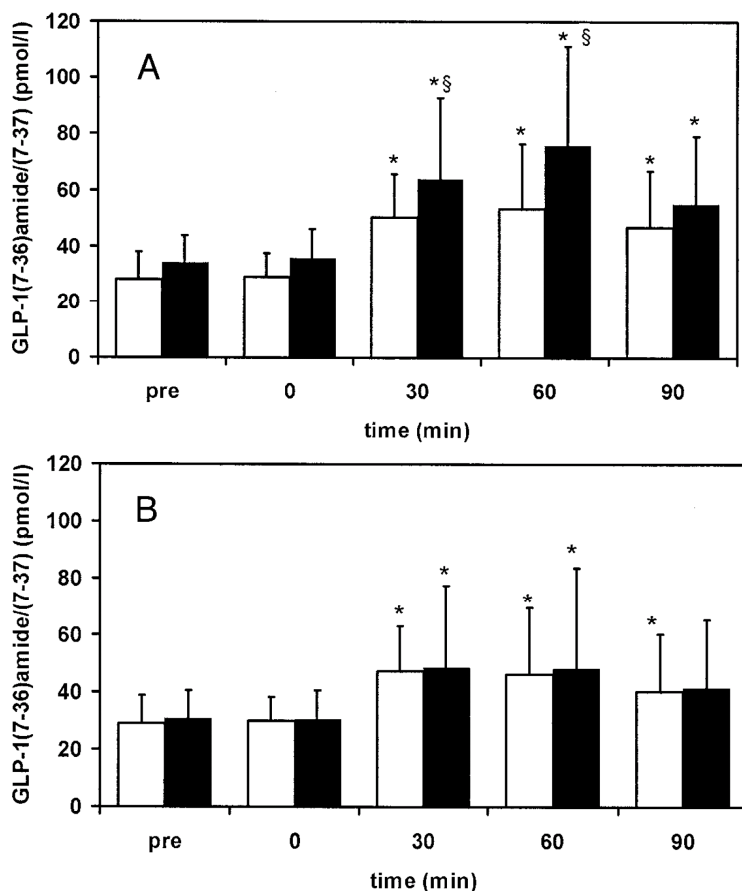


図 2.6.2.2-33 肥満患者におけるメトホルミン塩酸塩投与による血漿中 GLP-1 増加作用
(参考資料 4.2.1.1.27 (公表文献) より引用)

A : メトホルミン塩酸塩投与群 (2550 mg/日、14 日間)、B : コントロール群 (Mean±SD、n=10)
 □ : day 0 (投与開始前)、■ : day 15 (投与終了後)
 pre : 糖負荷前、0、30、60、90 : 糖負荷後時間 (分)
 * : time 0 と比較して p<0.05、§ : day 0 と比較して p<0.05 (t 検定)

(4) 膵臓に対する作用 (参考資料 4.2.1.1.28、4.2.1.1.29、4.2.1.1.30 (公表文献))

G. Patané らは、単離ラット膵ランゲルハンス氏島に対するメトホルミン塩酸塩の作用を評価した。通常グルコース濃度及び高グルコース濃度培養条件下において、メトホルミン塩酸塩を添加し、インスリン分泌量を測定した (参考資料 4.2.1.1.28 (公表文献))。メトホルミン塩酸塩は、グルコース濃度にかかわらずインスリン分泌に対して影響を与えなかった (図 2.6.2.2-34)。更に、高遊離脂肪酸添加条件にて培養したところ、通常グルコース濃度培養条件下のインスリン分泌の増加、及び高グルコース濃度培養条件下のインスリン分泌の低下が認められたが、メトホルミン塩酸塩の添加は、それらを改善させた (図 2.6.2.2-34)。

R. Lupi らは、単離ヒト膵ランゲルハンス氏島に対するメトホルミン塩酸塩の作用を評価した。通常グルコース濃度及び高グルコース濃度培養条件下において、メトホルミン塩酸塩を添加し、インスリン分泌量を測定した (参考資料 4.2.1.1.29 (公表文献))。メトホルミ

ン塩酸塩は、グルコース濃度にかかわらずインスリン分泌に対して影響を与えなかった(表 2.6.2.2-4)。更に、高グルコースで前処理を行ったところ、グルコース応答性インスリン分泌の低下が認められたが、メトホルミン塩酸塩の添加は、それを改善した(表 2.6.2.2-4)。P. Marchetti らは、2型糖尿病患者から単離したヒト膵ランゲルハンス氏島に対するメトホルミン塩酸塩の作用を評価した(参考資料 4.2.1.1.30 (公表文献))。健康成人に比べ、2型糖尿病患者から単離した膵ランゲルハンス氏島においては、インスリン分泌の低下及びアポトーシスの増加がみられたが、メトホルミン塩酸塩の添加により、それらが改善された(図 2.6.2.2-35)。

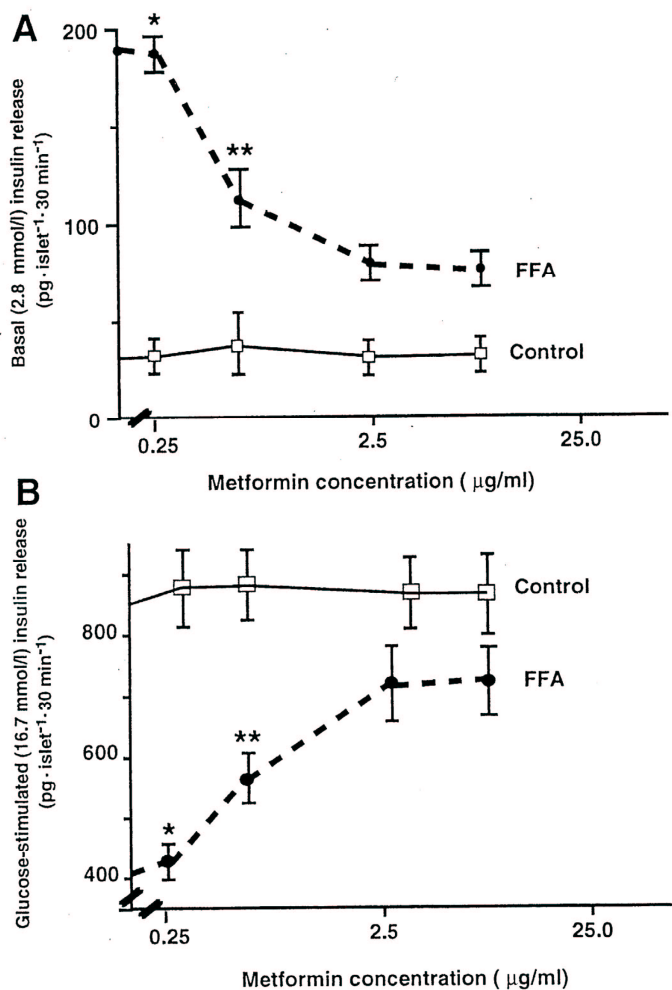


図 2.6.2.2-34 ラット膵臓ランゲルハンス氏島のインスリン分泌に対するメトホルミン塩酸塩の作用 (参考資料 4.2.1.1.28 (公表文献) より引用)

図中の実線はコントロール、破線は FFA 添加条件のデータ (Mean±SE、n=8) を示す。
 *, **: コントロールと比較してそれぞれ p<0.01, p<0.05 (Student の t 検定)

表 2.6.2.2-4 高グルコース処理によるヒト膵ランゲルハンス氏島におけるグルコース
 応答性インスリン分泌の減弱に対するメトホルミン塩酸塩の改善作用

(参考資料 4.2.1.1.29 (公表文献) より改変引用)

前処理 グルコース濃度 [mmol/L]	前処理 メトホルミン濃度 [μg/mL]	インスリン分泌量 [pmol/islet/45 min]	
		3.3 mmol/L グルコース刺激	16.7 mmol/L グルコース刺激
5.5	0	22.4 ± 2.8	67.9 ± 30.8 ^b
22.2	0	44.8 ± 8.4 ^d	46.2 ± 11.2
5.5	2.4	25.9 ± 1.4	60.2 ± 21 ^a
22.2	2.4	34.6 ± 8.4 ^e	81.9 ± 18.2 ^{c,f}

表中の値は Mean±SD を示す (n=5)。表中、数値右肩のアルファベットは Student の t 検定にて下記の意味であることを示す。

a, b, c : 前処理条件が同じである 3.3 mmol/L グルコース刺激と比較してそれぞれ p<0.05, p<0.02, p<0.01

d : 刺激条件が同じである 5.5 mmol/L グルコース前処理と比較して p<0.01

e : 刺激条件が同じである 5.5 mmol/L グルコース+メトホルミン塩酸塩 2.4 μg/mL 前処理と比較して p<0.05

f : 刺激条件が同じである 22.2 mmol/L グルコース前処理と比較して p<0.05

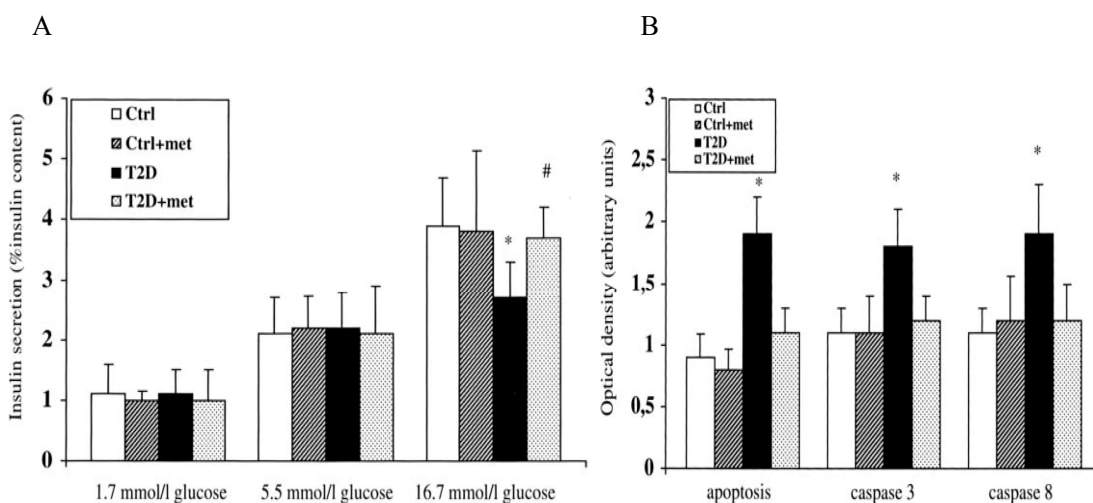


図 2.6.2.2-35 2型糖尿病患者から単離された膵ランゲルハンス氏島に対する
 メトホルミン塩酸塩の作用 (参考資料 4.2.1.1.30 (公表文献) より引用)

Ctrl : 健康成人、T2D : 2型糖尿病患者、met : メトホルミン塩酸塩 2.4 μg/mL、24 時間処理

A : インスリン分泌

Ctrl は n=10、T2D は n=6 の Mean±SD 示す。

* : Ctrl と比較して p<0.05、# : T2D と比較して p<0.05 (Student の t 検定)

B : アポトーシス、caspase-3 活性、caspase-8 活性

Ctrl は n=5、T2D は n=6 の Mean±SD を示す。

* : Ctrl と比較して p<0.05 (Student の t 検定)

2.6.2.3 副次的薬理試験

実施していない。

2.6.2.4 安全性薬理試験

本剤の20██ (平成██) 年██ 月██ 日██相談 (██、資料 1.13.1) において、安全性薬理試験及び毒性試験については██、及び██との助言を得た。そこで、メトホルミン塩酸塩の安全性薬理試験及び一般薬理試験は実施していないが、██毒性資料 (一般状態及び行動に及ぼす影響) と公表文献 (心血管系、平滑筋、消化器系に及ぼす作用) から、心血管系を含む安全性薬理試験に関連する知見を抽出し、それらを項目別 (中枢神経系、呼吸系、心血管系、平滑筋、消化器系) にまとめて考察した。これら試験資料及び公表文献はすべて参考資料として添付した。

メトホルミン塩酸塩の単回経口投与により生じる主な一般状態の変化は自発運動減少及び痙攣であり、これら中枢神経系症状はマウス、ラット、ウサギ、イヌ及びサルにおいて認められた (参考資料 4.2.3.1.1, 4.2.3.1.2, 4.2.3.1.3, 4.2.3.1.5, 4.2.3.1.6)。加えてマウス、ラット、ウサギでは歩行失調、下痢などが認められ、イヌ及びサルにおいては上記症状の発現用量よりも低用量で嘔吐が認められた。また、呼吸系に対してはウサギ及びサルにおいて呼吸数の減少が認められた (参考資料 4.2.3.1.3, 4.2.3.1.6)。

メトホルミン塩酸塩は 350~500 mg/kg の 8 週間の反復経口投与により高血圧自然発症ラット (SHR) で降圧作用を示したが、正常ラットの血圧に対しては影響を及ぼさなかった (参考資料 4.2.1.3.6)。また、高食塩食を負荷した SHR における血圧上昇に対して、メトホルミン塩酸塩は 350~500 mg/kg の 4 週間の反復投与により降圧作用を示したが、正常食の SHR の血圧に対しては影響を及ぼさなかった (参考資料 4.2.1.3.7)。メトホルミン塩酸塩は 10~100 mg/kg の単回静脈内投与により SHR において降圧作用を示した (参考資料 4.2.1.3.8, 4.2.1.3.9, 4.2.1.3.10, 4.2.1.3.11)。この降圧作用は SHR に比べて正常ラットで有意に弱かった (血圧降下 100 mg/kg : SHR ; 26 mmHg、正常ラット ; 9 mmHg ; 参考資料 4.2.1.3.9、50 mg/kg : SHR ; 14 mmHg、正常ラット ; 10 mmHg ; 参考資料 4.2.1.3.10)。ラットの心拍数に対しては、陽性変時作用、若しくは陰性変時作用の相反する作用が報告されている (参考資料 4.2.1.3.7, 4.2.1.3.8, 4.2.1.3.9, 4.2.1.3.11)。また、*in vitro* の検討において、メトホルミン塩酸塩は、収縮薬存在下でラット摘出血管平滑筋の弛緩作用や、刺激薬による血管平滑筋細胞内 $[Ca^{2+}]$ 増加の抑制作用を示した (参考資料 4.2.1.3.12, 4.2.1.3.13, 4.2.1.3.14)。

メトホルミン塩酸塩の消化器系に対する作用については、ラット摘出十二指腸を用いた 5-HT 及び KCl 誘発収縮運動に対して抑制作用を示したが、ACh 誘発収縮運動に対しては逆に亢進作用を示した。また、自発収縮運動に対して一過性の抑制作用を示したが、30~60 分の長時間処理においては収縮の亢進作用がみられた。これらの作用は 0.3 mM 以上の高濃度において確認され、多様な作用を示した (参考資料 4.2.1.3.15)。

2.6.2.5 薬力学的薬物相互作用試験

実施していない。

2.6.2.6 考察及び結論

2.6.2.6.1 効力を裏付ける試験

(1) *In vivo* 薬効評価

肥満糖尿病モデル動物である *db/db* マウスを用いた試験結果より、メトホルミン塩酸塩は血糖コントロールの指標である HbA_{1c} 値の増加を用量依存的に抑制した。そのほかにも ZDF ラット、高脂肪食負荷ストレプトゾトシン誘発糖尿病モデルラット、GK ラットなど種々の糖尿病モデル動物においてメトホルミン塩酸塩が血糖降下作用を有することが報告されており、メトホルミン塩酸塩の血糖降下剤としての有用性が示されている。また、薬効用量のメトホルミン塩酸塩は糖尿病動物の血糖値を正常範囲よりも低下させないことから、メトホルミン塩酸塩は低血糖を引き起こしにくい血糖降下剤と考えられた。更に、メトホルミン塩酸塩は、糖尿病モデル動物の体重増加を引き起こさず、血漿インスリン濃度を低下させた。加えて、種々のモデル動物を用いた検討において、メトホルミン塩酸塩の血中脂質改善作用、インスリン抵抗性改善作用、脂肪肝改善作用などが報告されており、血糖降下作用以外のメトホルミン塩酸塩の有用性も示されている。

(2) 作用メカニズム

メトホルミン塩酸塩の作用メカニズムに関しては、肝臓における糖新生の抑制が主であるとされており、末梢組織における糖取り込みの促進、小腸における糖吸収の抑制なども報告されている。

高脂肪食負荷ラット及びラット初代培養肝細胞を用いた検討により、メトホルミン塩酸塩は、肝臓における糖新生を抑制することが報告されている。その分子メカニズムの検討のため糖新生の律速酵素である G6pc に注目し、解析したところ、*db/db* マウス肝臓及び H-4-II-E 細胞において、メトホルミン塩酸塩が G6pc 遺伝子の発現を抑制することを見出した。また、メトホルミン塩酸塩は AMPK を活性化することや complex I を阻害することも報告されている。AMPK 活性化に伴う G6pc 遺伝子の発現抑制や呼吸鎖阻害に伴う糖新生抑制の報告もあることから、これらの作用とメトホルミン塩酸塩による G6pc 遺伝子発現抑制作用との関連を検討した結果、メトホルミン塩酸塩による G6pc 遺伝子発現抑制作用は、AMPK 活性化や complex I 阻害を介していない可能性が示された。一方、メトホルミン塩酸塩は、細胞内脂質量を低下させるが、その分子メカニズムとして、AMPK 活性化を介した脂肪酸合成酵素の発現抑制や ACC 活性抑制による脂肪酸酸化の亢進が示唆されている。

メトホルミン塩酸塩は、筋肉及び脂肪細胞における糖取り込みを促進することから、末梢臓器における糖利用の促進がメトホルミン塩酸塩の血糖降下作用に寄与していると思われる。その分子メカニズムとしては、AMPK の活性化、グルコーストランスポーターの細胞外膜への移行などが報告されている。

メトホルミン塩酸塩は、小腸における糖吸収を抑制することが報告されており、メトホルミン塩酸塩の血糖降下作用の一部への寄与が示唆された。また、メトホルミン塩酸塩に

よる小腸上皮細胞からのGLP-1分泌促進作用や血中GLP-1の分解抑制作用が報告されており、メトホルミン塩酸塩の血糖降下作用の一部に寄与している可能性が考えられた。

膵臓における作用として、メトホルミン塩酸塩は、インスリン分泌に対する直接的な作用を有していない。しかし、遊離脂肪酸添加、又は高グルコース条件下培養における単離膵ランゲルハンス氏島のグルコース応答性インスリン分泌低下を改善するなどの作用が報告されている。

以上のようなメカニズムを介して、メトホルミン塩酸塩は、血糖降下作用、血中脂質改善作用、インスリン抵抗性改善作用、脂肪肝改善作用などの薬理作用を発現すると考えられた。

2.6.2.6.2 安全性薬理試験

毒性試験成績から、メトホルミン塩酸塩の単回経口投与により生じる主な一般症状の変化は自発運動減少及び痙攣であり、これら中枢神経系症状はマウス、ラット、ウサギ、イヌ及びサルにおいて認められた。加えてマウス、ラット、ウサギでは歩行失調、下痢などが認められ、イヌ及びサルにおいては上記症状の発現用量よりも低用量で嘔吐がみられた。また、呼吸系に対してはウサギ及びサルにおいて呼吸数の減少が認められた。

それら中枢神経系及び呼吸系に対する影響と思われる一般症状変化の発現用量はマウスにおいて1500 mg/kg、ラットにおいて1000 mg/kg、ウサギにおいて100 mg/kg、イヌにおいて500 mg/kg、サルにおいて693.75 mg/kgであった。これらの発現用量を体表面積換算でヒト相当量に変換すると（ヒト体重60 kgとする）、マウスにおいて7200 mg/man、ラットにおいて9600 mg/man、ウサギにおいて1920 mg/man、イヌにおいて16200 mg/man、サルにおいて13320 mg/manであった。それら発現用量のヒト相当量は、申請した1日最高用量である2250 mg/manと比較して、マウスにおいて3.2倍、ラットにおいて4.3倍、ウサギにおいて0.9倍、イヌにおいて7.2倍、サルにおいて5.9倍であり、特に、ウサギでの一般症状変化が確認された発現用量は申請した1日最高用量を下回る。しかしながら、本剤の2型糖尿病患者対象臨床試験においてそれら中枢神経系及び呼吸系に対する影響と思われる一般状態変化の割合は高くなく（2.7.4.2.1.1、表2.7.4.7-5、表2.7.4.7-6）、それら重度の有害事象は発生しなかった。動物において確認された中枢神経系や呼吸系に対する一般症状変化はいずれも死亡例が発現する用量付近での瀕死状態と推察され、これら同様の一般症状変化はヒトにおける有害事象発現を示唆するものではないと考えられる。

また、特にイヌにおいては50 mg/kgの低用量から嘔吐が確認され、体表面積換算でヒト相当量に変換すると1620 mg/manとなり、申請した1日最高用量である2250 mg/manを下回る。本剤の2型糖尿病患者対象臨床試験における主な有害事象は消化器症状であるが、それら消化器症状の重症度はほとんどが軽度であり、「下痢」、「悪心」、「腹痛」、「嘔吐」、「食欲不振」において中等度が認められたが、メトホルミン塩酸塩投与によるそれらの発現割合は0.2～2.2%と低く、重度の有害事象は認められなかった（2.7.4.2.1.1.1(2)、表

2.7.4.2-5)。

メトホルミン塩酸塩の心血管系に及ぼす作用については、公表文献において、メトホルミン塩酸塩の反復経口投与により SHR で降圧作用を示したが、正常ラットの血圧に対しては影響を及ぼさなかった。メトホルミン塩酸塩は単回静脈内投与により SHR に対して降圧作用を示すが、正常ラットに対する降圧作用は SHR に比べ弱かった。SHR に対するメトホルミン塩酸塩の降圧作用も重篤ではなかった。ラットの心拍数に対しては、陽性変時作用あるいは陰性変時作用の相反する作用が報告されており、一致した知見は得られていない。そのほか、*in vitro* において、メトホルミン塩酸塩は収縮薬存在下でラット摘出血管平滑筋の弛緩作用や、刺激薬による血管平滑筋細胞内 $[Ca^{2+}]$ 増加の抑制作用を示した。反復経口投与の動物試験は飲水投与での結果であり、試験内でメトホルミン塩酸塩の血漿中濃度測定は実施されていないが、メトホルミン塩酸塩は高血圧状態において血圧上昇や心拍数上昇の軽減を示すにとどまり、その降圧作用も重篤ではなかった。*In vitro* の検討では、培養血管平滑筋細胞における平滑筋収縮薬による細胞内 $[Ca^{2+}]$ 増加作用の抑制作用は 1 $\mu\text{g/mL}$ 以上の濃度から報告され、この濃度は申請した 1 日最高用量である 2250 mg/man 投与時の C_{max} (平均 4282 ng/mL、2.7.2.2.2.1(1)、表 2.7.2.2-1) の 0.24 倍であったが (算出にはヒト血漿たん白結合率 1.1~2.8%を用いて、血漿中遊離薬物濃度として計算した (2.6.4.4.1(3)))、摘出血管を用いた平滑筋収縮薬による血管平滑筋弛緩作用は 3 mM 以上の濃度から報告され、この濃度は申請した 1 日最高用量である 2250 mg/man 投与時の C_{max} (平均 4282 ng/mL) の 117~119 倍以上であった。本剤の 2 型糖尿病患者対象臨床試験において血圧及び脈拍数のバイタルサインは変動しておらず (2.7.4.4.1、表 2.7.4.7-23)、動物や *in vitro* の検討において確認された心血管系に対する作用はヒトにおける重篤な有害事象発現を示唆するものではないと考えられる。

メトホルミン塩酸塩の消化器系に及ぼす作用については、ラット摘出十二指腸を用いた 5-HT 及び KCl 誘発収縮運動に対して抑制作用を示したが、ACh 誘発収縮運動に対しては亢進作用を示した。自発収縮運動に対しては一過性の抑制作用を示したが、長時間処理において収縮の亢進がみられた。これらの反応は高濃度のみで確認された。そのほか、重篤な消化器症状を引き起こすような消化器系への影響は報告されていない。

2.6.2.7 図表

すべての図表は概要文中に掲載した。

2.6.2.8 参考文献

- 1) Lee SM, Bressler R. Prevention of diabetic nephropathy by diet control in the *db/db* mouse. *Diabetes*. 1981; 30: 106-11. [【4.3.24】](#)
- 2) Wiernsperger NF, Bailey CJ. The antihyperglycaemic effect of metformin: therapeutic and cellular mechanisms. *Drugs*. 1999; 58 Suppl 1: 31-9. [【4.3.25】](#)
- 3) Wiernsperger NF. Chapter 12 Preclinical pharmacology of biguanides. In: Kuhlmann J, Puls W, editors. *Handbook of Experimental Pharmacology. Volume 119 Oral Antidiabetics*. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag; 1996. p.305-58. [【4.3.26】](#)
- 4) Bailey CJ, Path MRC, Turner RC. Metformin. *N Engl J Med*. 1996; 334: 574-9. [【4.3.3】](#)
- 5) Lee AJ. Metformin in noninsulin-dependent diabetes mellitus. *Pharmacotherapy*. 1996; 16: 327-51. [【4.3.8】](#)
- 6) Hundal RS, Krssak M, Dufour S, Laurent D, Lebon V, Chandramouli V, et al. Mechanism by which metformin reduces glucose production in type 2 diabetes. *Diabetes*. 2000; 49: 2063-9. [【4.3.27】](#)
- 7) Inzucchi SE, Maggs DG, Spollett GR, Page SL, Rife FS, Walton V, et al. Efficacy and metabolic effects of metformin and troglitazone in type II diabetes mellitus. *N Engl J Med*. 1998; 338: 867-72. [【4.3.28】](#)
- 8) Lochhead PA, Salt IP, Walker KS, Hardie DG, Sutherland C. 5-aminoimidazole-4-carboxamide riboside mimics the effects of insulin on the expression of the 2 key gluconeogenic genes PEPCK and glucose-6-phosphatase. *Diabetes*. 2000; 49: 896-903. [【4.3.29】](#)
- 9) Pryor HJ, Smyth JE, Quinlan PT, Halestrap AP. Evidence that the flux control coefficient of the respiratory chain is high during gluconeogenesis from lactate in hepatocytes from starved rats. Implications for the hormonal control of gluconeogenesis and action of hypoglycaemic agents. *Biochem J*. 1987; 247: 449-57. [【4.3.30】](#)
- 10) Seo BB, Kitajima-Ihara T, Chan EKL, Scheffler IE, Matsuno-Yagi A, Yagi T. Molecular remedy of complex I defects: rotenone-insensitive internal NADH-quinone oxidoreductase of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria restores the NADH oxidase activity of complex I-deficient mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998; 95: 9167-71. [【4.3.31】](#)
- 11) 石川 弘典、左海 順、市原 準二、泰地 睦夫、木村 徹. 蛍光標識二次元ディフアレックスゲル電気泳動法のメトホルミン作用機序研究への応用. *細胞*. 2006; 38: 458-62. [【4.3.32】](#)
- 12) Hinke SA, Kühn-Wache K, Hoffmann T, Pederson RA, McIntosh CHS, Demuth HU. Metformin effects on dipeptidylpeptidase IV degradation of glucagon-like peptide-1.

- Biochem Biophys Res Commun. 2002; 291: 1302-8. 【4.3.33】
- 13) Yasuda N, Inoue T, Nagakura T, Yamazaki K, Kira K, Saeki T, et al. Enhanced secretion of glucagon-like peptide 1 by biguanide compounds. Biochem Biophys Res Commun. 2002; 298: 779-84. 【4.3.34】
 - 14) Lindsay JR, Duffy NA, McKillop AM, Ardill J, O'Harte FPM, Flatt PR, et al. Inhibition of dipeptidyl peptidase IV activity by oral metformin in type 2 diabetes. Diabet Med. 2005; 22: 654-7. 【4.3.35】
 - 15) Green BD, Irwin N, Duffy NA, Gault VA, O'Harte FPM, Flatt PR. Inhibition of dipeptidyl peptidase-IV activity by metformin enhances the antidiabetic effects of glucagon-like peptide-1. Eur J Pharmacol. 2006; 547: 192-9. 【4.3.36】

メトホルミン塩酸塩

製造販売承認申請

CTD 第2部

2.6 非臨床試験の概要文及び概要表

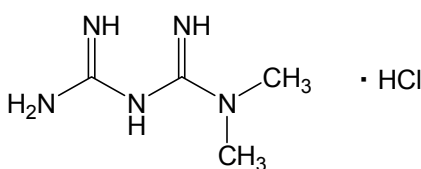
2.6.3 薬理試験概要表

大日本住友製薬株式会社

目次

2.6.3 薬理試験概要表	
2.6.3.1 薬理試験：一覧表.....	4
2.6.3.2 効力を裏付ける試験.....	10
2.6.3.3 副次的薬理試験.....	10
2.6.3.4 安全性薬理試験.....	11
2.6.3.5 薬力学的薬物相互作用試験.....	16

【本項における用語の説明】

用語	定義、読み替えなど
メトホルミン塩酸塩	化学名： 1,1-Dimethylbiguanide monohydrochloride 化学式（分子量）： $C_4H_{11}N_5 \cdot HCl$ (165.62) 構造式： 

【一般的略号】

略号	省略しない表現	日本語
ACh	Acetylcholine	アセチルコリン
AMPK	Adenosine monophosphate -activated protein kinase	—
<i>db/db</i> マウス	BKS.C g- <i>Lepr^{db}/Lepr^{db}</i> /Jcl マウス	—
EC ₅₀	50% effective concentration	50%有効濃度
GK ラット	Goto-Kakizaki ラット	—
GLP-1	Glucagon like peptide-1	—
G6pc	Glucose-6-phosphatase, catalytic	—
HbA _{1c}	Hemoglobin A _{1c}	ヘモグロビン A _{1c}
5-HT	5-hydroxytryptamine (Serotonin)	セロトニン
NE	Norepinephrine	ノルエピネフリン
<i>ob/ob</i> マウス	C57BL/6- <i>ob/ob</i> マウス	—
PDGF	Platelet derived growth factor	血小板由来成長因子
SD	Sprague Dawley	—
SHR	Spontaneously hypertensive rat	高血圧自然発症ラット
WKY	Wistar Kyoto	—
ZDF ラット	Zucker Diabetic Fatty ラット	—

2.6.3.1 薬理試験：一覧表

表 2.6.3.1-1 一覧表

被験物質：メトホルミン塩酸塩

試験の種類	試験系	投与方法	実施施設	試験番号	記載箇所 Vol. Section	
効力を裏付ける試験						
<i>In vivo</i> 薬効評価						
Glycohemoglobin A _{1c} (HbA _{1c})値 増加抑制作用	BKS.C g-+ <i>Lepr</i> ^{db} /+ <i>Lepr</i> ^{db} /Jcl マウス (<i>db/db</i> マウス)	経口 (強制)	住友製薬(株)	EXA00097	4-1	4.2.1.1.1
血漿中メトホルミン濃度	<i>db/db</i> マウス	経口 (強制)	大日本住友製薬(株)	DP1-SMP-862 -001	4-1	4.2.1.1.2
血糖降下作用	Zucker Diabetic Fatty ラット (ZDF ラット)	経口 (強制)	University of Copenhagen	公表文献	4-1	4.2.1.1.3 (参考資料)
血糖降下作用	高脂肪食負荷ストレプトゾ トシン誘発糖尿病モデルラ ット	経口 (強制)	Shaman Pharmaceuticals	公表文献	4-1	4.2.1.1.4 (参考資料)
血糖降下作用	Goto-Kakizaki ラット (GK ラット)	経口 (飲水)	German Diabetes Center	公表文献	4-1	4.2.1.1.5 (参考資料)
血糖降下作用、血中脂質改善作 用	高フルクトース食負荷モデ ルラット	経口 (強制)	Annamalai University	公表文献	4-1	4.2.1.1.6 (参考資料)
インスリン抵抗性改善作用	デキサメタゾン誘発インス リン抵抗性モデルラット	経口 (飲水)	University of Sassari	公表文献	4-1	4.2.1.1.7 (参考資料)
脂肪肝改善作用	C57BL/6- <i>ob/ob</i> マウス (<i>ob/ob</i> マウス)	経口 (混餌)	The Johns Hopkins University	公表文献	4-1	4.2.1.1.8 (参考資料)
肝保護作用	アルコール性脂肪肝モデル マウス	経口 (混餌)	University of Louisville Health Sciences Center	公表文献	4-1	4.2.1.1.9 (参考資料)

表 2.6.3.1-1 一覧表 (続き)

被験物質：メトホルミン塩酸塩

試験の種類	試験系	投与方法	実施施設	試験番号	記載箇所 Vol. Section	
効力を裏付ける試験						
作用メカニズム						
糖新生抑制作用	高脂肪食負荷ラット	経口 (混餌)	University of Melbourne	公表文献	4-1	4.2.1.1.10 (参考資料)
糖新生抑制作用	ラット初代培養肝細胞	<i>In vitro</i>	Aston University	公表文献	4-1	4.2.1.1.11 (参考資料)
肝臓の Glucose-6-phosphatase, catalytic (G6pc) 遺伝子発現抑制作用	<i>db/db</i> マウス	経口 (強制)	大日本住友製薬(株)	DP1-SMP-862-002	4-1	4.2.1.1.12
肝臓の G6pc 遺伝子発現及び G6pc 活性低下作用、肝臓の遺伝子発現プロファイル	<i>db/db</i> マウス	経口 (強制)	大日本住友製薬(株)	公表文献	4-1	4.2.1.1.13 (参考資料)
G6pc 遺伝子発現抑制作用	H-4-II-E 細胞	<i>In vitro</i>	大日本住友製薬(株)	公表文献	4-1	4.2.1.1.13 (参考資料)
Adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK) 活性化作用	H-4-II-E 細胞	<i>In vitro</i>	大日本住友製薬(株)	DP1-SMP-862-003	4-1	4.2.1.1.14
AMPK 活性化作用、脂質合成関連遺伝子発現抑制作用	ラット初代培養肝細胞	<i>In vitro</i>	Merck Research Laboratories	公表文献	4-1	4.2.1.1.15 (参考資料)
AMPK 活性化作用、糖取り込み促進作用	ラット骨格筋細胞	<i>In vitro</i>	Merck Research Laboratories	公表文献	4-1	4.2.1.1.15 (参考資料)
ミトコンドリア呼吸鎖活性阻害作用	H-4-II-E 細胞	<i>In vitro</i>	University of Bristol	公表文献	4-1	4.2.1.1.16 (参考資料)
G6pc 遺伝子発現抑制作用、AMPK 活性化作用、ATP 産生抑制作用	H-4-II-E 細胞	<i>In vitro</i>	大日本住友製薬(株)	Genomics-0707	4-1	4.2.1.1.17 (参考資料)

表 2.6.3.1-1 一覧表 (続き)

被験物質：メトホルミン塩酸塩

試験の種類	試験系	投与方法	実施施設	試験番号	記載箇所 Vol. Section
効力を裏付ける試験					
血糖降下作用、肝臓の AMPK 活性化作用	肝臓特異的 LKB1 欠損トランスジェニックマウス	腹腔内	Harvard Medical School	公表文献	4-1 4.2.1.1.18 (参考資料)
AMPK 活性化作用、細胞内脂質量低下作用	HepG2 細胞	<i>In vitro</i>	Boston University School of Medicine	公表文献	4-1 4.2.1.1.19 (参考資料)
肝臓の遺伝子発現プロファイル	<i>db/db</i> マウス	経口 (強制)	大日本住友製薬(株)	公表文献	4-1 4.2.1.1.20 (参考資料)
糖取り込み促進作用、グルコーストランスポーターの外膜移行作用	L6 細胞	<i>In vitro</i>	The Hospital for Sick Children	公表文献	4-1 4.2.1.1.21 (参考資料)
糖取り込み促進作用	ヒト骨格筋細胞	<i>In vitro</i>	The Hospital for Sick Children	公表文献	4-1 4.2.1.1.22 (参考資料)
AMPK 活性化作用	ヒト	経口	Joslin Diabetes Center	公表文献	4-1 4.2.1.1.23 (参考資料)
糖取り込み促進作用 グルコーストランスポーターの外膜移行作用	ラット脂肪細胞	<i>In vitro</i>	University-Hospital of Hamburg	公表文献	4-1 4.2.1.1.24 (参考資料)
糖取り込み促進作用 グルコーストランスポーターの外膜移行作用	ラット脂肪細胞	<i>In vitro</i>	University of Bath	公表文献	4-1 4.2.1.1.25 (参考資料)
糖吸収抑制作用	ラット	経口 (強制)	Tottori University	公表文献	4-1 4.2.1.1.26 (参考資料)
血漿中 Glucagon like peptide-1 (GLP-1) 濃度増加作用	ヒト	経口	University of Florence	公表文献	4-1 4.2.1.1.27 (参考資料)

表 2.6.3.1-1 一覧表 (続き)

被験物質：メトホルミン塩酸塩

試験の種類	試験系	投与方法	実施施設	試験番号	記載箇所 Vol. Section	
効力を裏付ける試験						
インスリン分泌低下改善作用	ラット腓ランゲルハンス氏島	<i>In vitro</i>	University of Catania	公表文献	4-1	4.2.1.1.28 (参考資料)
インスリン分泌低下改善作用	ヒト腓ランゲルハンス氏島	<i>In vitro</i>	University of Pisa	公表文献	4-1	4.2.1.1.29 (参考資料)
インスリン分泌低下改善作用 アポトーシス抑制作用	ヒト腓ランゲルハンス氏島	<i>In vitro</i>	University of Pisa	公表文献	4-1	4.2.1.1.30 (参考資料)

表 2.6.3.1-1 一覧表 (続き)

被験物質：メトホルミン塩酸塩

試験の種類	試験系	投与方法	実施施設	試験番号	記載箇所 Vol. Section
安全性薬理試験					
一般状態及び行動観察	マウス/CD-1	経口 (強制)	[REDACTED]	8038	4-2 4.2.3.1.1 (参考資料)
一般状態及び行動観察	ラット/SD	経口 (強制)	[REDACTED]	8038	4-2 4.2.3.1.2 (参考資料)
一般状態及び行動観察	ウサギ/ニュージーランドホワイト種	経口 (強制)	[REDACTED]	8038	4-2 4.2.3.1.3 (参考資料)
一般状態及び行動観察	イヌ/雑種	経口 (強制)	[REDACTED]	700-186	4-2 4.2.3.1.5 (参考資料)
一般状態及び行動観察	サル/アカゲ	経口 (強制)	[REDACTED]	700-196	4-2 4.2.3.1.6 (参考資料)
心血管系に対する作用 -血圧に及ぼす影響-	SHR、ラット/WKY	経口 (飲水)	University of British Columbia	公表文献	4-1 4.2.1.3.6 (参考資料)
心血管系に対する作用 -血圧・心拍数に及ぼす影響-	SHR	経口 (飲水)	Lehman College	公表文献	4-1 4.2.1.3.7 (参考資料)

表 2.6.3.1-1 一覧表 (続き)

被験物質：メトホルミン塩酸塩

試験の種類	試験系	投与方法	実施施設	試験番号	記載箇所 Vol. Section	
安全性薬理試験						
心血管系に対する作用 -血圧・心拍数に及ぼす影響-	SHR	静脈内	Midwestern University	公表文献	4-1	4.2.1.3.8 (参考資料)
心血管系に対する作用 -血圧・心拍数に及ぼす影響-	SHR、ラット/WKY	静脈内	Lehman College	公表文献	4-1	4.2.1.3.9 (参考資料)
心血管系に対する作用 -血圧に及ぼす影響-	SHR、ラット/WKY	静脈内	Lehman College	公表文献	4-1	4.2.1.3.10 (参考資料)
心血管系に対する作用 -血圧・心拍数に及ぼす影響-	SHR	静脈内	University of Copenhagen	公表文献	4-1	4.2.1.3.11 (参考資料)
平滑筋に対する作用 -摘出血管に及ぼす影響-	ラット/SD	<i>In vitro</i>	Midwestern University	公表文献	4-1	4.2.1.3.12 (参考資料)
平滑筋に対する作用 -摘出血管に及ぼす影響-	ラット/SD	<i>In vitro</i>	University of Virginia Health Sciences Center	公表文献	4-1	4.2.1.3.13 (参考資料)
血管平滑筋細胞に及ぼす影響	ラット/WKY	<i>In vitro</i>	University of Iowa College of Medicine	公表文献	4-1	4.2.1.3.14 (参考資料)
消化器系に対する作用 -摘出腸管に及ぼす影響-	ラット/SD	<i>In vitro</i>	Midwestern University	公表文献	4-1	4.2.1.3.15 (参考資料)

2.6.3.2 効力を裏付ける試験

すべての図表は概要文中に掲載した。

2.6.3.3 副次的薬理試験

該当する表の掲載はない。

2.6.3.4 安全性薬理試験

表 2.6.3.4-1 メトホルミン塩酸塩の安全性薬理

被験物質：メトホルミン塩酸塩

試験項目	動物	投与経路	実験方法	投与量 ^{a)} (mg/kg)	結果	試験番号	記載箇所	
							Vol.	Section
一般状態及び行動観察	マウス♂♀ CD-1 各5匹/群	強制経口	行動及び外観の観察	1500, 1920, 2450, 3130, 4000	自発運動減少、歩行失調、下痢 (≥1500 mg/kg) 死亡 (≥1920 mg/kg)	8038	4-2	4.2.3.1.1 (参考資料)
	ラット♂♀ SD 各5匹/群			1000, 1320, 1730, 2280, 3000	自発運動減少、歩行失調、死亡 (≥1000 mg/kg) 下痢、振戦 (≥2280 mg/kg) 流涎 (3000 mg/kg)	8038	4-2	4.2.3.1.2 (参考資料)
	ウサギ♂♀ ニュージール ランドホワイト種 各5匹/群			100, 150, 224, 334, 500, 748	呼吸困難、呼吸数減少 (100 mg/kg) 自発運動減少、歩行失調、下痢、軟便、食欲不振、死亡 (≥100 mg/kg) 鼻汁 (≥150 mg/kg) 血液を伴う下痢 (500 mg/kg) 痙攣 (748 mg/kg)	8038	4-2	4.2.3.1.3 (参考資料)

a) 特にことわりがない限り単回投与。

表 2.6.3.4-1 メトホルミン塩酸塩の安全性薬理 (続き)

試験項目	動物	投与経路	実験方法	投与量 ^{a)} (mg/kg)	結果	試験番号	記載箇所		
							Vol.	Section	
一般状態及び行動観察	イヌ♂♀ 雑種 各1匹/群 (100 mg/kgのみ各2匹/群)	強制経口	行動及び外観の観察	10, 25, 50, 100, 170, 290, 500	嘔吐 (≥50 mg/kg) 自発運動減少・消失、間代性痙攣、死亡 (500 mg/kg)	700-186	4-2	4.2.3.1.5 (参考資料)	
	サル♀ アカゲ 2匹/群			250, 375, 462.5, 693.75	嘔吐 (≥375 mg/kg) 自発運動減少、痛覚及び正向反射消失、前痙攣状態、単収縮運動、呼吸緩徐、眼瞼下垂、死亡 (693.75 mg/kg)			700-196	4-2
心血管系	血圧	ラット♂ SHR、WKY 7-9匹/群	経口 (飲水)	覚醒下 (tail cuff法)	350 mg/kg/日から開始し、2週間かけて500 mg/kg/日まで漸増 投与期間8週間	降圧作用 (SHR)、 作用なし (WKYラット)	公表文献	4-1	4.2.1.3.6 (参考資料)

a) 特にことわりがない限り単回投与。

表 2.6.3.4-1 メトホルミン塩酸塩の安全性薬理 (続き)

試験項目		動物	投与経路	実験方法	投与量 ^{a)} (mg/kg)	結果	試験番号	記載箇所	
								Vol.	Section
心血管系	血圧	ラット♂ SHR 各 6 匹/群	経口 (飲水)	覚醒下(テレメトリー法)	350 mg/kg/日から開始し、2 週間かけて 500 mg/kg/日まで漸増 投与期間 4 週間	降圧作用 (高食塩食負荷)、 作用なし (正常食)	公表文献	4-1	4.2.1.3.7 (参考資料)
		ラット♀ SHR 各 8 匹/群	静脈内	覚醒下 (観血法)	100	降圧作用	公表文献	4-1	4.2.1.3.8 (参考資料)
		ラット♂ SHR、WKY 6-14 匹/群	静脈内	覚醒下 (観血法)	10, 50, 100	降圧作用 (SHR : ≥ 10 mg/kg、 WKY ラット : ≥ 50 mg/kg)、 100 mg/kg における血圧降下 : SHR ; 26 mmHg、WKY ラット ; 9 mmHg	公表文献	4-1	4.2.1.3.9 (参考資料)
		ラット♂ SHR、WKY 5-8 匹/群	静脈内	麻酔下 (観血法)	10, 50, 100	降圧作用 (SHR、WKY ラットともに ≥ 50 mg/kg)、 50 mg/kg における血圧降下 : SHR ; 14 mmHg、WKY ラット ; 10 mmHg	公表文献	4-1	4.2.1.3.10 (参考資料)

a) 特にことわりがない限り単回投与。

表 2.6.3.4-1 メトホルミン塩酸塩の安全性薬理（続き）

試験項目	動物	投与経路	実験方法	投与量 ^{a)} (mg/kg)	結果	試験番号	記載箇所		
							Vol.	Section	
心血管系	血圧	ラット♂ SHR 6匹/群	静脈内	麻酔下（観血法）	1, 10, 100	降圧作用（ ≥ 10 mg/kg）	公表文献	4-1	4.2.1.3.11 (参考資料)
	心拍数	ラット♂ SHR 各6匹/群	経口（飲水）	覚醒下（テレメトリー法）	350 mg/kg/日から開始し、2週間かけて500 mg/kg/日まで漸増 投与期間4週間	心拍数減少（高食塩食負荷、正常食ともに）	公表文献	4-1	4.2.1.3.7 (参考資料)
		ラット♀ SHR 各8匹/群	静脈内	覚醒下（観血法）	100	心拍数増加	公表文献	4-1	4.2.1.3.8 (参考資料)
		ラット♂ SHR、WKY 6-14匹/群	静脈内	覚醒下（観血法）	10, 50, 100	心拍数増加（SHR、WKYラットともに ≥ 10 mg/kg）	公表文献	4-1	4.2.1.3.9 (参考資料)
		ラット♂ SHR 6匹/群	静脈内	麻酔下（観血法）	1, 10, 100	心拍数減少（100 mg/kg）	公表文献	4-1	4.2.1.3.11 (参考資料)

a) 特にことわりがない限り単回投与。

表 2.6.3.4-1 メトホルミン塩酸塩の安全性薬理 (続き)

試験項目		動物	投与経路	実験方法	適用濃度 (終濃度)	結果	試験番号	記載箇所	
								Vol.	Section
平滑筋	摘出血管・細胞	ラット♀ SD 6-7 標本/群	<i>In vitro</i>	血管標本 (NE, 5-HT, フェニレフリン収縮)	0.2-20 mM	血管平滑筋弛緩作用 (EC ₅₀ : 3-21 mM)	公表文献	4-1	4.2.1.3.12 (参考資料)
		ラット♂ SD 4-6 標本/群	<i>In vitro</i>	血管標本(フェニレフリン刺激・収縮)	1-30 mM	フェニレフリン刺激時の細胞内[Ca ²⁺]の減少、血管平滑筋弛緩 (≥10 mM)	公表文献	4-1	4.2.1.3.13 (参考資料)
		ラット♂ WKY 97-190 細胞/群	<i>In vitro</i>	培養血管平滑筋細胞 (PDGF, アンジオテンシン II 刺激)	1, 2 µg/mL	細胞内[Ca ²⁺]の増加抑制 (PDGF 刺激時: ≥1 µg/mL、アンジオテンシン II 刺激時: 2 µg/mL)	公表文献	4-1	4.2.1.3.14 (参考資料)
消化器系	摘出腸管	ラット (♂♀不明) SD 8-9 標本/群 (自発収縮の場合)	<i>In vitro</i>	十二指腸標本 (自発収縮、5-HT, KCl, ACh 収縮)	30 µM -10 mM	5-HT, KCl 収縮: 抑制作用 (それぞれ≥3 mM, ≥1 mM)、 ACh 収縮: 亢進作用 (≥0.3 mM)、 自発収縮: 一過性に抑制し (≥1 mM)、長時間処理で亢進(3.6 mM)	公表文献	4-1	4.2.1.3.15 (参考資料)

2.6.3.5 薬力学的薬物相互作用試験

該当する表の掲載はない。