

トレドミン（塩酸ミルナシプラン）
に関する資料

旭化成工業株式会社

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は旭化成工業株式会社にあります。

イ. 起原又は発見の経緯及び外国における使用状況等

1. うつ病の現状	1
2. 発見の経緯	2
3. 開発の経緯	3
(1) 安全性試験	3
(2) 薬理試験	3
1) 効力を裏付ける薬理試験	3
2) 一般薬理試験	6
(3) 吸収・分布・代謝・排泄	6
1) 動物における成績	6
2) ヒトにおける成績	6
(4) 臨床試験	7
1) 第Ⅰ相臨床試験	7
2) 前期第Ⅱ相臨床試験	7
3) 後期第Ⅱ相臨床試験	8
4) 第Ⅲ相比較臨床試験	9
5) 高齢者うつ病に対する臨床試験	11
6) 長期投与試験	12
7) その他の一般臨床試験	12
8) 吸収排泄試験	12
4. 本剤の特長及び有用性	13
5. 特許	16
6. 外国における使用状況	16
7. 一般的名称	17
8. 同種同効品一覧表	17

ロ. 物理的・化学的性質並びに規格及び試験方法

..... 47

八. 安定性

..... 81

二. 毒性

総括	103
1. 急性毒性 (国内実施試験 ^A)	107
(1) ラット急性毒性試験	107
(2) サルの経口投与急性毒性試験	108
(3) まとめ	109
2. 急性毒性	110
(1) ラット急性毒性試験	110
(2) まとめ	111
3. 亜急性及び慢性毒性 (国内実施試験 ^A)	112
(1) ラット13週間投与試験及び4週間回復試験	112
(2) サル13週間投与試験及び4週間回復試験	115
(3) ラット52週間投与試験	116
(4) サル52週間投与試験	116
(5) まとめ	116
4. 亜急性及び慢性毒性	119
(1) ラット4週間投与試験	119
(2) サル1ヶ月投与試験	119
(3) ラット26週間投与試験	122
(4) サル26週間投与試験	122
(5) まとめ	122
5. 生殖に及ぼす影響 (国内実施試験 ^A)	125
(1) 妊娠前及び妊娠初期投与試験 (Segment I)	125
(2) 胎児の器官形成期投与試験 (Segment II)	128
1) ラットにおける試験	128
2) ウサギにおける試験	131
(3) 周産期及び授乳期投与試験 (Segment III)	133
(4) まとめ	133
6. 生殖に及ぼす影響	139
(1) ラットにおける繁殖試験 (FDA方式)	139
7. 依存性	143
(1) 急性行動効果	143
(2) 身体依存性試験	143
(3) 精神依存性試験	144
(4) まとめ	144
8. 抗原性	144
(1) マウス-ラット系受身皮膚アナフィラキシー反応 (PCA 反応)	144
(2) モルモットを用いた全身アナフィラキシー反応 (ASA 反応) 及び PCA 反応	144
(3) マウス、モルモットの感作血清を用いた受身赤血球凝集反応 (PHA 反応)	144
9. 変異原性	146

(1) 復帰突然変異試験	146
(2) 染色体異常試験	146
(3) マウス小核試験	148
(4) まとめ	148
10. がん原性	148
(1) マウス 104 週間がん原性試験	148
(2) ラット 104 週間がん原性試験	151
(3) まとめ	153
11. 主代謝物、分解物及び光学異性体の毒性	154

ホ. 薬理作用

1. 効力を裏付ける試験	155
総括	155
(1) 効力を裏付ける薬理試験	166
1) 薬物誘発による諸症状に対する作用	166
①レセルピン誘発低体温に対する作用	166
②テトラベナジン誘発眼瞼下垂に対する作用	167
③ヨヒンビン誘発致死に対する作用	168
④5-ヒドロキシ-L-トリプトファン(5-HTP)誘発首振り行動に対する作用	169
2) 強制水泳モデルにおける不動時間に対する作用	170
3) 条件恐怖行動に対する作用	171
(2) 作用機序	173
1) 脳内モノアミン再取り込み部位への親和性	173
2) 脳内モノアミン取り込みに対する作用	174
3) 脳内の細胞外モノアミン濃度に対する作用	175
4) 脳内各種受容体に対する親和性	179
5) モノアミンオキシダーゼ(MAO)活性に対する作用	180
6) 前シナプス性 5-HT 神経の 5-HT _{1A} 受容体機能に対する反復投与の影響	181
7) 後シナプス性 5-HT 神経の 5-HT _{1A} 受容体機能に対する反復投与の影響	183
8) 反復投与による脳内β及び 5-HT ₂ 受容体数に対する作用	184
(3) 選択的セロトニン再取り込み阻害薬(SSRI)との比較試験	186
1) 前シナプス性 5-HT 神経の 5-HT _{1A} 受容体機能に対する反復投与の影響	186
2) 強制水泳モデルにおける不動時間に対する作用	187
3) 条件恐怖行動に対する作用	188
(4) その他の薬理試験	190
1) 抗コリン作用	190
①フィゾスチグミン誘発致死に対する作用	190
②オキソトレモリン誘発振戦に対する作用	190

2) 心機能に対する作用	191
① 摘出心房収縮及び律動数に対する作用	191
② 摘出心房の自発収縮及び電気駆動収縮に対する作用	192
(5) 脱エチル体及び環化体の効力についての薬理試験	194
(6) 光学異性体の効力についての薬理試験	194
2. 一般薬理試験	195
総括	195

へ. 吸収、分布、代謝、排泄

総括	199
1. 体液、組織内濃度測定法	202
(1) 標識化合物の場合	202
(2) 非標識化合物の場合	202
2. 動物における成績	204
(1) 吸収	204
(2) 血液及び血漿中濃度	204
(3) 分布	208
(4) 血漿蛋白への結合	211
(5) 排泄	212
(6) 胎盤通過性及び乳汁への移行	214
(7) 代謝	216
(8) 性差	218
(9) 反復投与	219
(10) 肝薬物代謝酵素系に対する作用	224
(11) 光学異性体の相互変換に関する検討	224
3. ヒトにおける成績	226
(1) 健常人における検討	226
(2) 光学異性体の体内動態	234
(3) 高齢者における検討	236
(4) フランス人腎及び肝機能障害者における検討	237
(5) 薬物相互作用	238
4. 製剤の生物学的同等性	240

ト. 臨床試験

総括	244
1. 臨床試験成績	247
(1) 第 I 相臨床試験	247

(2) 前期第Ⅱ相臨床試験	250
(3) 後期第Ⅱ相臨床試験	260
1) 二重盲検比較試験	261
2) オープン試験	275
(4) 第Ⅲ相比較臨床試験	288
1) イミプラミンを対照とした臨床試験	288
2) ミアンセリンを対照とした臨床試験	304
(5) 高齢者うつ病に対する臨床試験	318
(6) 長期投与試験	325
(7) 心療内科領域におけるうつ病に対する臨床試験	334
(8) 薬物動態試験における臨床所見	340
1) 生物学的同等性試験	340
2) 吸収排泄試験 (健常成人)	341
3) 吸収排泄試験 (健常高齢者)	342
(9) 海外臨床試験	343
2. 臨床試験成績のまとめ	345
(1) 有効性のまとめ	345
(2) 安全性のまとめ	345
1) 副作用 (自他覚症状)	345
2) 臨床検査値異常変動	345
3) 合併症を有する症例における安全性	350
4) 併用薬を使用した症例における安全性	350
5) 有害事象	351
(3) 高齢者における成績	352
(4) 参考. 外国での臨床試験成績の要約 (副作用)	354
3. 効能・効果、用法・用量、使用上の注意 (案) 及びその設定根拠	358
(1) 効能・効果及びその設定根拠	358
(2) 用法・用量及びその設定根拠	359
(3) 使用上の注意 (案) 及びその設定根拠	361
4. 毒薬・劇薬等の指定審査資料のまとめ	364

イ. 起原又は発見の経緯及び外国における使用状況等

1. うつ病の現状

現代社会においては、高齢化が急激に進んでいるばかりではなく、社会的心理的ストレスも強くなってきていることが指摘されている。このため、働きざかりの中年層の自殺にみられるように、うつ病は大きな影響を社会に与えており、さらに、高齢者のうつ病が増加するという状況にある。このような状況の中で、軽症うつ病までを含めるとその発生率は全人口の1%に近い数字になり、うつ病は、精神分裂病、神経症と並んで最も重要な精神疾患に位置付けられている。

うつ病・うつ状態に対する薬物療法としては、1950年代後半に、イミプラミンの抗うつ作用が発見されて以来、イミプラミンに代表される三環系化合物の抗うつ作用が明確になり、いわゆる三環系抗うつ薬(TCA)が開発され、上市された。これら三環系抗うつ薬は抗うつ効果は強いが、副作用(口渇、便秘、排尿障害等の抗コリン作用)の発生頻度が高く、心・循環器に対する影響が強い特徴を有する。その後、臨床上の副作用の軽減を目的としてミアンセリンなどの四環系化合物が開発され、前者は第一世代の抗うつ薬、後者は第二世代の抗うつ薬と称されている。これらの抗うつ薬の開発に並行して、神経生化学的研究が進み、うつ病患者は神経伝達物質である脳内モノアミン(ノルアドレナリン及びセロトニン)が欠乏しており、三環系、四環系抗うつ薬は神経終末における脳内モノアミンの再取り込み阻害作用により、神経接合部における脳内モノアミン量を増加させて抗うつ効果を発現するといういわゆるモノアミン仮説が確立された。そして、本仮説に基づき、近年、三環系、四環系以外の化合物にも抗うつ作用を有する物質があることがわかり、化学構造的にも、また、薬理作用の面でも、特徴のある抗うつ薬が開発されるようになった。現在でも、イミプラミン、ミアンセリンなどの第一世代、第二世代の抗うつ薬がうつ病の治療の中心であるが、アメリカ及び西欧諸国では1980年代に開発されたフルオキセチン(ベルギー1986年、米国1988年、イギリス1989年)、フルボキサミン(スイス1983年、イギリス1987年、スウェーデン1990年)などのセロトニン選択的取り込み阻害薬(Serotonin Selective Reuptake Inhibitor:SSRI)がうつ病の治療の主流となりつつあり、国内でも塩酸トラゾドン(1991年)、フルボキサミン(1999年)が発売された。しかし、これらセロトニン選択的取り込み阻害薬においても、三環系、四環系抗うつ薬で観察される副作用(抗コリン作用、心・循環器に対する影響)は軽減されたものの、効力面では三環系抗うつ薬より優れているとはいえ効果発現も早期ではないことが判明しつつあり^{1)・2)}、三環系抗うつ薬と同等の効果を有し、かつ、副作用が軽減された薬剤の開発が望まれていた。この観点から、1990年代にセロトニンに加えてノルアドレナリンの再取り込み阻害作用を有する選択的セロトニン・ノルアドレナリン再取り込み阻害薬(Serotonin Noradrenarine Selective Reuptake Inhibitor:SNRI)が開発された。SNRIの薬理学的特徴はノルアドレナリン及びセロトニン両者の再取り込み阻害作用を同程度に有し、各種神経伝達物質の受容体(ムスカリン性アセチルコリン受容体、 α 受容体、 β 受容体、他)との親和性がほとんどない点にあり、このことから、SSRIと比較し、臨床的に効力面で優れ、副作用が同程度であることが報告されている。SNRIとしてはベンラファキシン(ニュージーランド1993年、米国、フランス1994年、イギリス1995年承認)、デュロキセチン(ポルトガル1994年承認)等があり、ミルナシプランは、ポルトガル(1994年)、フランス(1996年)で承認されている。

上述した抗うつ薬の臨床的・薬理学的特徴を表イー1に示した。

文献1. 村崎光邦: 脳神経, 47:1027-1037, 1995

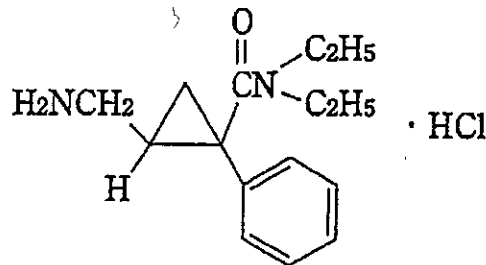
文献2. 上島国利: ファルマシア, 29(4):383-385, 1993

表イ-1 抗うつ薬の分類

分類	代表的薬剤	臨床的特徴				薬理的特徴			開発年代
		抗うつ効果	効果発現日	副作用	心毒性	取込阻害 NA	5-HT	受容体親和性	
第一世代	イミプラミン アミトリプチリン	++	2~3w	+++	++	++ ~+	++ ~+	++	1950~
第二世代	ミアンセリン マプロチリン	+	2w	++	+	- ++	- -	+	1970~
SSRI	フルオキセチン フルボキサミン セルトラリン	+	2~3w	+	-	-	++	±	1980~
SNRI	ミルナシبران ベンラファキシン デュロキセチン	++	1~2w	+	-	++	++	-	1990~

2. 発見の経緯

こうした状況下において、フランス、ピエール・ファール社は、抗うつ薬として新規の化学構造を有する、一連のシクロプロパンカルボン酸の誘導体を合成した。そして、効力面では、セロトニンに加え、ノルアドレナリンの再取り込み阻害作用も共有する方が強力であるとの考えに立ち、副作用面では、抗コリン作用、心・循環器に対する影響について各種神経伝達物質の受容体(ムスカリン性アセチルコリン受容体、 α 受容体、 β 受容体、他)との結合能に注目し、抗うつ薬の開発を進めてきた。その結果、ヨヒンビン誘発致死試験、テトラベナジン眼瞼下垂試験でイミプラミンの約1/10の用量で抗うつ活性を有し、抗コリン作用(散瞳)が極めて弱いミルナシبران(milnacipran hydrochloride、治験記号:TN-912)が創製された(B. Bonnaud, et. al, :J. Med. Chem., 30, 318-325, 1987)。以下にその化学構造を示す。



図イ-1 ミルナシبرانの化学構造

3. 開発の経緯

開発の経緯を図イー2に示す。旭化成工業株式会社(旧東洋醸造株式会社：合併前)は、1987年7月にピエール・ファール社より開発の権利を取得し、製剤化検討を実施すると共に動物実験を開始した。さらに、臨床試験に使用する製剤の物性、品質規格並びに安定性、ラットの急性毒性、変異原性試験、再取り込み阻害作用、循環器に及ぼす影響などの薬理作用の確認を行い、また、国外で実施された急性、亜急性、慢性毒性、繁殖毒性(FDA方式)、薬理、吸収・分布・代謝・排泄並びに臨床試験成績を評価し、第I相臨床試験に移行する上で科学的かつ倫理的に問題はないと判断した。

1989年2月より第I相臨床試験が開始され、以後、図イー2に示した経緯で基礎・臨床両面の試験が実施された。

(1) 安全性試験

1988年2月より1995年3月までの間にラット及びサルによる急性、亜急性、慢性毒性試験、ラットによる生殖試験、サルによる依存性試験、抗原性試験及び変異原性試験が実施された。その結果、亜急性、慢性毒性試験における毒性学的無影響量はラットでそれぞれ5mg/kg、3mg/kg、サルではそれぞれ5mg/kg、7.9mg/kgであった。ラットによる生殖試験においては、親動物に対する毒性学的無影響量は、妊娠前及び妊娠初期投与試験で雄5mg/kg、雌20mg/kg、器官形成期投与試験で10mg/kg未満、周産期及び授乳期投与試験で2.5mg/kg、生殖能力に対しては、それぞれ80mg/kg、40mg/kg、2.5mg/kg、胎児に対しては、それぞれ80mg/kg、10mg/kg、2.5mg/kgであり、親動物に体重増加抑制が発現し、生殖能力及び胎児、出生児に親動物の全身状態の悪化によると考えられる影響が認められた。催奇形性は認められなかった。また、1985年6月より1990年6月までの間に、国外で実施された試験においては、ラットによる急性、ラット及びサルによる亜急性、慢性毒性試験、ラットによる繁殖試験では上記国内における試験とほぼ同様の結果が得られ、また、マウス及びラットによるがん原性試験、ウサギによる生殖試験及び小核試験では特に問題となる所見は観察されなかった。なお、安全性試験は、医薬品毒性試験ガイドラインに基づいて実施された。

(2) 薬理試験

1) 効力を裏付ける薬理試験

1987年6月より1995年3月までの間に動物モデル試験及び神経生化学的試験が国内で実施された。薬物誘発モデルでは、レセルピン誘発低体温試験、テトラベナジン誘発眼瞼下垂試験、ヨヒンビン誘発致死試験において、それぞれ、1mg/kg以上、1mg/kg以上、10mg/kg以上の経口投与で低体温拮抗作用、眼瞼下垂拮抗作用、誘発致死増強作用が認められた。行動を指標とした試験では、強制水泳試験において絶望状態の指標である不動時間を30mg/kg以上の経口投与で短縮した。以上の試験においてはミルナシブランはイミプラミン、ミアンセリンより低用量又は同用量で作用が認められた。神経生化学的試験では、神経終末における脳内モノアミン(ノルアドレナリン及びセロトニン)の再取り込み部位に結合し、その取り込みを阻害することが示唆された。一方、脳内神経伝達物質の受容体のいずれに対しても親和性を示さず、ミルナシブランはノルアドレナリン及びセロトニンの再取り込み部位に選択的に作用する薬物であると考えられた。ミルナシブランのノルアドレナリン及びセロトニンの取り込み阻害能はイミプラミンのIC₅₀値を1とした濃度比でそれぞれ1.3と1.5(Na⁺依存性取り込み)、0.4と2.9(Na⁺依存性+Na⁺非依存性取り込み)であり、ミアンセリンのIC₅₀値を1とした濃度比でそれぞれ0.19と0.008であった。さらに、前シナプス神経細胞の5HT_{1A}受容体機能の低下がミルナシブランの方がイミプラミン、フルボキサミンより速く生じ、臨床における速効性を裏付ける結果が得られた。

受容体との親和性は抗うつ薬の副作用発現との関連性が高いといわれており、ムスカリン性アセチルコリン受容体は抗コリン作用(口渇、便秘、排尿障害、視調節障害等)、 α_1 受容体は血圧低下、めまい等、ヒスタミン受容体は血圧低下、鎮静作用(眠気、倦怠感等)と密接な関連があると考えられている。ミルナシプランはいずれの受容体に対しても親和性を示さなかったのに対し、イミプラミンはムスカリン性アセチルコリン受容体、 α_1 受容体、ヒスタミン受容体等に、ミアンセリンは、 α_1 受容体、ヒスタミン受容体等に親和性を示した。臨床試験におけるこれらの副作用の発現について一覧表に示した(表イ-2)。参考として、セロトニン取り込み阻害作用に関連するといわれている嘔気・嘔吐についても示した。抗コリン作用、 α_1 受容体関連の副作用はイミプラミンに多く、ヒスタミン受容体関連の副作用はミアンセリンに多かった。一方、嘔気・嘔吐はミルナシプランに多く、このことは本剤がヒスタミン受容体と関連する鎮静作用を有しないことによると推察した。薬理試験における受容体との親和性の違いが臨床試験における副作用の発現率の違いにほぼ反映されていると考えられる結果が得られた。

表イ-2 受容体との親和性と関連する副作用の発現一覧表

薬 剤	ミルナシプラン (全試験)	イミプラミン (第Ⅲ相)	ミアンセリン (第Ⅲ相)	
評価対象例数	467	65	95	
副作用発現例数 (%)	150 (32.1)	33 (50.8)	41 (43.2)	
副作用発現件数	236	62	80	
関連する受容体	副作用の種類	発現件数(%)	発現件数(%)	発現件数(%)
ムスカリン性 アセチルコリン	口渇	35(7.5)	21(32.3)	12(12.6)
	便秘	27(5.8)	9(13.8)	8(8.4)
	排尿障害	5(1.1)	2(3.1)	1(1.1)
	視調節障害	4(0.9)	0(0.0)	1(1.1)
α_1	起立性低血圧	7(1.5)	4(6.2)	0(0.0)
	めまい	13(2.8)	9(13.8)	6(6.3)
ヒスタミン	眠気	19(4.1)	3(4.6)	22(23.2)
	倦怠感	6(1.3)	1(1.5)	7(7.4)
(セロトニン取り込み阻害)	嘔気・嘔吐	28(6.0)	1(1.5)	2(2.1)

[抗コリン作用、心・循環器系に及ぼす影響]

抗コリン作用については、フィソスチグミン、オキシトレモリンによって誘発されるコリン作動性の致死及び振戦に対し、ミルナシプランは最大申請用量の36倍(ヒト体重を60kgとして換算)である60mg/kgまでの腹腔内投与で抑制作用を示さなかったが、イミプラミンはそれぞれ最大臨床用量の9倍である30mg/kgの腹腔内投与で抑制が認められた。心・循環器系については、モルモット、ウサギの摘出心房の自発収縮力、律動数、電気駆動収縮に対し、ミルナシプランはほとんど抑制作用を示さなかったが、イミプラミンはウサギの収縮力、モルモットの律動数を減少させ、モルモットで心停止を起こす等強い抑制作用を示した。心・循環器系に及ぼす影響が少ないことは、国内外の臨床試験において、イミプラミン、三環系抗うつ薬より起立性低血圧が少なく、不整脈の副作用は発現していないこと並びに海外臨床の心電図変化においても確認されている。

表イ-3 海外臨床試験でのミルナシプラシ(100mg/日)及び対照薬による心電図変化

		ミルナシプラシ	TCA	SSRI	プラセボ
PR時間	開始時(ms)	150.2	151.3	152.2	165.9
	(n)	(328)	(190)	(58)	(27)
	終了時の変化(ms)	0.5	6.3	-4.8	-7.0
QRS時間	開始時(ms)	81.4	81.3	82.6	80.0
	(n)	(332)	(190)	(59)	(28)
	終了時の変化(ms)	0.3	2.1	1.5	0.7
QTc時間	開始時(ms)	399.8	398.1	389.9	386.2
	(n)	(331)	(190)	(59)	(28)
	終了時の変化(ms)	-1.7	3.9	2.4	-1.7

以上、ミルナシプラシは①抗うつ薬評価モデルでイミプラミン、ミアンセリンより低用量又は同用量で有効であること、②作用機序でミアンセリンとは異なり、イミプラミンとは類似するが、受容体に対する親和性を示さない等イミプラミン、ミアンセリンより、ノルアドレナリン及びセロトニンの再取り込み部位に対する作用の選択性が高い薬物であること、③イミプラミンよりも抗コリン作用が少なく、心機能抑制作用に基づく副作用の危険性も少ない薬物であることが示唆されたことから、従来の三環系、四環系抗うつ薬との比較において抗うつ薬としての有用性が期待された。

2) 一般薬理試験

ミルナシプラシ100mg/kgの経口投与により、一般症状の軽度の変化、睡眠延長等の中枢神経系作用、ナトリウム排泄量及びナトリウム/カリウム比の増加、催吐作用が認められた。呼吸・循環器系に対しては10mg/kgの静脈内投与により、麻酔イヌの呼吸数増加、血圧下降及びPR間隔の一過性の延長を示した。

上記以外の一般症状、中枢神経系、自律神経系、呼吸・循環器系、消化器系、泌尿器系、その他に及ぼす影響について検討した結果、特に問題となる所見は観察されなかった。

なお、一般薬理試験のガイドライン(薬新薬第4号課長通知、1991年1月29日)通知以降に開始された試験は、本ガイドラインに基づいて実施された。

(3) 吸収・分布・代謝・排泄

1) 動物における成績

マウス、ラット、イヌ、サル及びヒトにおいて1983年6月より1995年3月までの間に検討された。ラットにおける吸収は速やかで、各組織に分布した後、尿中及び糞中に排泄された。尿中及び糞中への排泄率はそれぞれ59.2%及び41.4%であった。また、胆汁中への排泄率は42.7%であり、腸肝循環が観察された。尿中代謝物としては8種の代謝物が観察された。サルにおいてもラットと同様吸収は速やかで、各組織に分布した後、尿中及び糞中に排泄された。尿中及び糞中への排泄率はそれぞれ87.5%及び7.9%であった。マウス及びイヌにおいて吸収を検討した結果、いずれの動物も速やかであった。ラット経口投与において、胎児及び乳汁への移行が認められた。胎児中放射能濃度は母獣血液中放射能濃度と同程度であった。乳汁中放射能濃度は血漿中放射能濃度の3倍の値を示した。なお、薬物動態試験のガイドライン(薬新薬第6号課長通知、1991年1月29日)通知以降に開始された試験は、本ガイドラインに基づいて実施された。

2) ヒトにおける成績

ヒトにおける吸収は速やかで、最高血漿中濃度は投与後約2時間に得られ、血漿中半減期は約8時間であった。また、尿中へは投与量の80.6~87.3%が排泄され、そのうち約60%が未変化体で、残りは不活性体の代謝物3種が観察された(糞中排泄については、尿中排泄が80%以上であったことから、

検討しなかった)。反復投与による体内動態に対する影響については、初回投与時と最終投与時のCmax及びAUCは約1.4及び1.7倍になったが、Tmax及びT1/2には変化はなかった。さらに、食事の影響を検討したところ、最高血漿中濃度は食後投与の方が高かったが、AUCには差はなかった。

高齢者では、非高齢者を上回る血漿中濃度推移が得られ、血漿中濃度と年齢との間に正の相関性が、腎機能(Ccr)との間に負の相関性が示唆された(年齢 vs Cmax:R=0.67、年齢 vs AUC:R=0.58、Ccr vs Cmax:R=0.54、Ccr vs AUC:R=0.76)。また、薬物の消失に遅延がみられた。

フランスにおける検討で、腎機能障害者では、Cmax、AUC共に高くなり、また、T1/2は延長し、健常人と比べ差が認められた。肝機能障害者では、Cmax、AUC、T1/2に有意差はないものの健常人と比べ高かった。

アメリカ、フランスにおいてミルナシبرانと併用される可能性のある抗不安薬ロラゼパム、抗精神病薬レボメプロマジン、抗てんかん薬カルバマゼピンと併用試験を実施し、臨床問題となる副作用、薬物動態の変動は認められなかった。

(4) 臨床試験

健常人を対象とした第Ⅰ相臨床試験を実施した後、本試験成績及び外国での臨床報告を参考にし、患者を対象とする臨床試験が、うつ病・うつ状態に対して開始された。第Ⅲ相臨床試験からは「医薬品の臨床試験の実施に関する基準について」(薬発第874号局長通知、1989年10月2日付、1990年10月実施)に従って進められた。

1) 第Ⅰ相臨床試験

1989年2月より健常男子志願者を対象に第Ⅰ相臨床試験が北里大学東病院村崎光邦先生により実施された。単回投与は急性、亜急性毒性試験の毒性学的無影響量、外国での用量設定試験における至適用量(1回50mg、1日2回)を参考に12.5mgから開始し、25、50及び100mgまで実施した。その結果、25mg以下の投与量では全く異常症状の発現は認められなかったが、50mg投与で、嘔気、頭痛、頭重等が2名/5名に、100mg投与で同様の症状が4名/5名に、熱感、口渇が2名/5名に発現した。一方、投与量と血中濃度の間には線形性がみられた。なお、外国では健常人において、25mg、50mg、100mg、200mg、300mg及び400mg投与し、200mg以上ではほぼ全例に悪心・嘔吐がみられていること並びに単回投与の嘔気の発現状況から、本試験は100mgまでで終了することとなった。本結果から、反復投与試験では1回投与量を嘔気等の現れなかった25mgに設定し、1日朝夕2回、8日間投与した結果、頭痛、頭重が3名/4名、嘔気、口渇、ふらつき等が2名/4名に発現したが、いずれも軽度であり、短時間で消失した。発現時期は1～3日に多かった。一方、対照としたイミプラミン25mg1日朝夕2回投与では2名/2名に口渇、眠気が出た。ミルナシبرانの血中濃度は5日目には定常状態に達し、蓄積性は認められなかった。以上の結果から、ミルナシبرانは嘔気等の消化器症状が特徴的であるが、本試験の投与量範囲内では、軽度のものが多く、いずれも短時間で消失するものであり、対象患者の身体的変化等に十分注意を払えば、第Ⅱ相臨床試験に移行できると判断した。

2) 前期第Ⅱ相臨床試験

1989年10月より1990年5月まで北里大学東病院精神科及び北海道大学精神科の2施設において、47例に投与され、うつ病・うつ状態に対するミルナシبرانの有効性及び安全性について検討された。投与量は第Ⅰ相臨床試験結果より、1回25mg、1日朝夕2回(50mg/日)を初期用量とし、2週目以降は臨床症状により1日2～3回投与で適宜増量する漸増法が採用された(最高投与量は1回100mg、投与期間は4週間)。従って、1日投与量は第Ⅰ相臨床試験の反復投与試験の投与量を越えて設定されたが、精神科領域でよくみられる健常人と患者の感受性の差を考慮し、本剤は第Ⅰ相臨床試験では健常人におけるほぼ上限の投与量に達していると考えられたことから、前期第Ⅱ相臨床試験において慎重に

漸次増量することで実施できると結論した。なお、外国では、健常人に対して400mgまで投与し、200mg以上でほぼ全例に悪心・嘔吐がみられたこと、患者に対しては300mg/日までの使用経験があったことも参考に上述のごとく決定した。その結果、50～225mg/日の範囲で投与され、最終全般改善度における改善率は50.0%であり、1日最高投与量別では、150mg/日までで「中等度改善」以上の症例の82.6%を占めた。また、安全性については、副作用が37.0%発現し、主な内容は便秘、口渇及び嘔気などで、50mg/日の投与初期での発現が多かったが、いずれも重篤なものではなかった。以上の結果から、ミルナシプランのうつ病・うつ状態に対する有用性が確認され、投与量は50～150mg/日が適当と判断した。

3) 後期第Ⅱ相臨床試験

漸増法は本来有効投与量と副作用発現用量が近似している薬剤の臨床使用として採用されており、その主な目的は低用量から投与を開始し、薬に対して慣れることにより副作用の発現を減弱ないしは止めようとするにある。また、向精神薬においては、前述の副作用のみでなく、効果の面においても患者個々の感受性が異なることが多い。このことから、近年までに開発された抗うつ薬は本法にて臨床用量が設定されている。ミルナシプランの場合にも前期第Ⅱ相臨床試験成績から50mg/日を初期投与量とし、漸増法により150mg/日まで増量することで十分な効果が認められ、副作用は50mg/日の投与初期に多かった点から、固定法より漸増法が適していると判断した。ただし、従来実施されていた1用量からの増量では初期投与量の設定根拠が不十分と考え、初期投与量を前期第Ⅱ相臨床試験と同様の50mg/日並びにその半量25mg/日の2群とした至適用量の設定を目的とする試験が以下の2グループで実施された。

①二重盲検比較試験

1990年8月より1991年8月まで北海道地区の19施設(代表世話人：小野寺勇夫先生；岡本病院、コントローラー：菅野盛夫教授；北海道大学第二薬理学)において、2用量群(初期投与量25mg/日群及び50mg/日群)における二重盲検比較試験が実施された。総症例数は104例であり、25mg/日群55例、50mg/日群49例であった。試験方法としては、群分けされた初期投与量で1週間投与観察された後、2週目以降は臨床症状により適宜増量する漸増法が採用された(最高用量は各々75mg/日、150mg/日、投与期間は4週間)。その結果、最終全般改善度で初期投与量50mg/日群が25mg/日群に比べ有意に優れていた(Wilcoxon検定 $p=0.018$)。また、50mg/日群の方が増量により効果がみられた症例が多かった。概括安全度では両群間に有意差は認められず、全般有用度において初期投与量50mg/日群が25mg/日群に比べ有意に優れていた(Wilcoxon検定 $p=0.003$)。副作用としては、25mg/日群で眠気、起立性低血圧、発疹など、50mg/日群で口渇、嘔気・嘔吐、胃部不快感、便秘などがみられた。本成績より、ミルナシプランの初期投与量は50mg/日が適切であると判断され、推奨用量として100～150mg/日までの増量が必要と推察した。

表イ-4 用量設定試験成績

初期投与量群	改善率(%)	副作用あり率(%)	有用率(%)
25mg/日群	23/50(46.0)	26/50(52.0)	20/50(40.0)
50mg/日群	31/47(66.0)	18/47(38.3)	29/47(61.7)
Wilcoxon検定	$p=0.018$	$p=0.211$	$p=0.003$

②オープン試験

1990年10月より1991年7月まで関東の25施設(代表世話人：三浦貞則教授；北里大学精神科)において、初期投与量を25mg/日群及び50mg/日群に設定した2用量群における群間比較試験がオープン試験で実施された。総症例数は82例であり、25mg/日群39例、50mg/日群43例であった。試験方法として

は、群分けされた初期投与量で1週間投与観察された後、2週目以降は臨床症状により適宜増量する漸増法が採用された(最高用量は150mg/日、投与期間は4週間)。その結果、最終全般改善度の改善率は25mg/日群で37.1%、50mg/日群で46.2%であった。また、概括安全度の「副作用あり」率は25mg/日群で25.7%、50mg/日群で25.0%であった。そして、全般有用度の有用率は25mg/日群で34.4%、50mg/日群で43.6%であった。副作用としては、25mg/日群で口渇、嘔気・嘔吐、眠気など、50mg/日群で口渇、便秘、嘔気などがみられた。この成績から、本剤の初期投与量は50mg/日が妥当であると判断され、100~150mg/日までの増量が必要と考えた。

以上2グループによる試験結果より、ミルナシبرانはうつ病・うつ状態に有効で、その至適用量は50mg/日を初期用量とした100~150mg/日の漸増であると推察した。

4) 第Ⅲ相比較臨床試験

従来の抗うつ薬は、ムスカリン性アセチルコリン受容体、 α_1 受容体、ヒスタミン受容体などの神経伝達物質の受容体との親和性に関連して、口渇、便秘などの抗コリン作用、さらに、起立性低血圧、めまい、眠気、倦怠感などの副作用を有する。この点でミルナシبرانは神経伝達物質の各種受容体との親和性が極めて弱く、これらの副作用は少ないと予想された。第Ⅲ相臨床試験の対照薬としては、効果が強く、副作用が強いといわれている第一世代の抗うつ薬と副作用の点で第一世代よりすぐれるといわれている第二世代の抗うつ薬からひとつずつ選択することとした。

第一世代の抗うつ薬は中枢神経系におけるノルアドレナリン、セロトニン両方の再取り込み阻害作用を示すものが多く、作用機序の点でミルナシبرانと類似している。その中ではイミプラミンとアミトリプチリンが対照薬に用いられ、その臨床評価も確立されているが、再取り込み阻害作用のより強いイミプラミンを対照薬に選定した。

第二世代の抗うつ薬は再取り込み阻害作用がノルアドレナリン、セロトニンの一方に選択的であったり、阻害作用がないものもある。その中ではミアンセリンは神経接合部の前シナプスの α_2 受容体に作用してノルアドレナリン量を増加させ、後シナプスの5-HT₂受容体に直接作用しセロトニンにも影響を及ぼす。対照薬にも用いられ、その臨床評価も確立されているので、対照薬に選定した。

また、機序は明確にされていないが、イミプラミンは効果発現が2~3週と遅く、ミアンセリンは効果発現が早いとの報告が多く、薬効では、同程度の効果が得られるか否かという点のみならず、効果発現の早さを比較することをひとつの目的とした。

上記の理由から、イミプラミン、ミアンセリンを対照とした2本の二重盲検比較試験が実施された。

①イミプラミンとの二重盲検比較試験

1992年4月より1993年8月まで北海道地区の21施設(治験総括医師：小野寺勇夫先生、コントローラー：菅野盛夫教授)において、イミプラミンとの比較試験が実施された。投与量は両剤とも50mg/日より開始し、2週目以降はその臨床症状により適宜増量する漸増法が採用された。なお、最高投与量は両剤とも150mg/日に設定された(投与期間は4週間)。総症例数は132例であり、ミルナシبران群66例、イミプラミン群66例であった。その結果、最終全般改善度、概括安全度、全般有用度では両群間に有意差はみられなかった。本試験は薬理学的プロファイルの比較を目的とし、同等性の検証を目的として計画された試験ではないが、最終全般改善度の改善率についての薬剤群間差の両側90%信頼区間の下限は-14.3%であり、同等と見なしうる臨床的に許容できる差を10%とすると、同等と判断できなかった。しかし、週別改善度では、1週改善度においてミルナシبرانはイミプラミンに比較し有意に優れており(Wilcoxon検定 $p=0.029$)、ミルナシبرانの方が早期に効果が発現することが示された。うつ病は精神的苦痛を主として身体症状も発現する疾患であり、1日も速く苦痛を軽減することが患者にとって第一である。さらに、自殺志向の点からも速く患者の精神状態を

安定させることが重要であり、速効性は新しい抗うつ薬に求められている最も重要な条件のひとつである。最高投与量別(50~150mg/日)にみると、ミルナシプランは、100mg/日までで「中等度改善」以上の症例の97.2%(35例/36例)が含まれ、100mg/日の投与量でも十分な改善が得られることが示された。

一方、口渇等の抗コリン作用による副作用発現率並びに循環器系副作用のひとつである起立性低血圧の発現率は、ミルナシプランの方が低値であり、特に後者には有意差が認められた(発現の有無と重症度によるWilcoxon検定 $p=0.048$)。項目別では、ミルナシプラン46件中、口渇13件、便秘4件、嘔気・嘔吐5件、めまい4件など、イミプラミン62件中、口渇20件、便秘9件、めまい9件などが主にみられた。

表イ-5-1 イミプラミンとの二重盲検比較試験成績

薬剤群	改善率(%)	副作用あり率(%)	有用率(%)
ミルナシプラン	36/62(58.1)	27/62(43.5)	33/62(53.2)
イミプラミン	36/64(56.3)	33/65(50.8)	35/64(54.7)
Wilcoxon検定	$p=0.789$	$p=0.571$	$p=0.948$
差の90%信頼区間	-14.3%~17.9%	-8.9%~23.3%	-17.7%~14.7%

表イ-5-2 1週改善度

薬剤群	著明改善	改善	軽度改善	不変	やや悪化	悪化	重篤悪化	合計	Wilcoxon検定
ミルナシプラン	9 (14.5)	15 (38.7)	15 (62.9)	20	3	0	0	62	$p=0.029$
イミプラミン	0 (0.0)	12 (18.8)	20 (50.0)	31	0	1	0	64	

():累積%

②ミアンセリンとの二重盲検比較試験

1992年7月より1994年3月まで全国の45施設(治験総括医師:三浦貞則教授、コントローラー:栗原雅直先生、山本皓一先生)において、ミアンセリンとの二重盲検比較試験が実施された。初期投与量としてはミルナシプランは50mg/日、ミアンセリンは30mg/日に設定され、2週目以降はその臨床症状により適宜増減する漸増法が採用された。なお、最高投与量については、ミルナシプランとミアンセリンの用量比は5:3であり、ミアンセリンは承認用量(30~60mg/日)。最高投与量が初期投与量の2倍)の範囲内の60mg/日に設定され、ミルナシプランは100mg/日に設定された(投与期間は4週間)。総症例数は179例であり、ミルナシプラン群84例、ミアンセリン群95例であった。その結果、最終全般改善度、概括安全度、全般有用度では両群間に有意差はみられなかった。本試験は同等性の検証を目的として計画された試験ではないが、最終全般改善度の改善率についての薬剤群間差の両側90%信頼区間の下限は-3.0%であり、同等と見なしうる臨床的に許容できる差を10%とすると、同等と判断できた。週別改善度では、ミルナシプランは1週に20.5%、2週に45.5%、3週に66.7%、ミアンセリンは1週に14.8%、2週に25.8%、3週に43.6%の改善率が得られた。

一方、口渇等の抗コリン作用による副作用発現率並びに眠気の発現率はミルナシプランの方が低値で、特に後者には有意差が認められた(発現の有無と重症度によるWilcoxon検定 $p=0.001$)。項目別では、ミルナシプラン36件中、口渇5件、嘔気5件、眠気5件など、ミアンセリン80件中、眠気22件、

口渇12件、便秘8件などがみられた。さらに、臨床検査値異常変動発現率はミルナシبرانの方が有意に低値であった(Fisher検定 $p=0.047$)。項目別にみると、ミルナシبرانではGPT上昇2件、GOT上昇、 γ -GTP上昇、Al-P上昇、トリグリセライド上昇各1件など、ミアンセリンでは γ -GTP上昇9件、GPT上昇8件、GOT上昇、Al-P上昇各3件、白血球数上昇2件、下降2件などがみられた。肝機能検査値異常(GOT、GPT、Al-P、 γ -GTP及びLDHの上昇)は、ミルナシبران群で2例5件、ミアンセリン群で14例25件であった。

表イ-6 ミアンセリンとの二重盲検比較試験成績

薬剤群	改善率(%)	副作用あり率(%)	有用率(%)
ミルナシبران	40/83(48.2)	27/83(32.5)	38/83(45.8)
ミアンセリン	37/95(38.9)	46/95(48.4)	33/95(34.7)
Wilcoxon検定	$p=0.093$	$p=0.056$	$p=0.061$
差の90%信頼区間	-3.0%~21.5%	1.7%~30.1% *	-1.0%~23.1%

*副作用あり率の差の95%信頼区間

第Ⅲ相比較臨床試験の結果、初期用量を50mg/日、最高投与量を100mg/日としたミアンセリン対照の比較試験で同等性が得られ、初期用量を50mg/日、最高投与量を150mg/日としたイミプラミン対照の比較試験で100mg/日までの投与量で150mg/日までの増量と同程度の効果が得られた。以上より、ミルナシبرانはうつ病・うつ状態に有用で、50mg/日を初期用量とし、推奨用量100mg/日までの増量による効果が確認された。

③SSRIとの二重盲検比較試験(海外臨床)

海外においてミルナシبران100mg/日とSSRIとのうつ病を対象とした比較試験は、フルボキサミン200mg/日並びにフルオキセチン20mg/日との2試験が実施された。評価尺度は国内同様のハミルトンうつ病評価尺度(HAMD)、海外で常用されるモンゴメリー・アスベルグ評価尺度(MADRS)が使用された。その結果、ミルナシبران100mg/日はSSRIより効果並びに効果発現の速さの点において優っていた。

5) 高齢者うつ病に対する臨床試験

一般に、高齢者においては非高齢者に比較して生理機能が低下している。事実、ミルナシبرانは、高齢者におけるフランスの吸排試験において、非高齢者の25mg投与時の血中濃度推移が高齢者の15mg投与時のそれに匹敵すると判断される結果が得られた。また、この後に国内で実施された高齢者における吸排試験において同様の結果が得られた。更に、第Ⅱ相臨床試験における65歳以上の少数例(18例)の成績から、25mg/日投与開始例と50mg/日投与開始例では、効果が変わらず、副作用が50mg/日投与開始例が多かったことから、50mg/日より低用量から投与を開始する臨床試験を実施して、高齢者の用法・用量を検討する必要があると考えられた。なお、非高齢者における15mg投与の吸排試験を実施して高齢者うつ病に対する臨床試験を開始したが、その後、高齢者投与量は、指標としてではなく、用法・用量として設定しなければならないと判断し、国内の高齢者における吸排試験で高齢者投与量について確認した次第である。

1992年10月より1994年8月まで北里大学東病院及びその関連施設の3施設(治験総括医師：村崎光邦

先生)において、高齢者のうつ病・うつ状態に対する一般臨床試験が実施された。上記の吸排試験成績より、初期投与量は30mg(15mg×2)/日に設定され、2週目以降は臨床症状により適宜増量する漸増法によって、29例に投与された(最高投与量は90mg/日、投与期間は4週間)。その結果、30mg/日を維持した症例で60.0%、60mg/日まで増量された症例で55.6%の改善率が得られた。一方、90mg/日まで増量された症例では改善はみられなかった。副作用は26.9%発現したが、本剤の他の試験に比較して発現頻度は高いものではなく、内容は便秘、口渴等で重篤なものではなかった。

6) 長期投与試験

1992年9月より1994年7月まで山形大学及びその関連施設の7施設(治験総括医師：十束支朗教授；山形大学精神神経科)において、50mg/日から漸増法(最高投与量は200mg/日)により、ミルナシプランを12週間以上連続投与し、その有効性及び安全性に対する影響について観察された。総症例数は38例であり、4週を越えて長期投与に移行した症例は27例であった。4週時と長期投与終了時評価の比較を行った23例では、22例(95.7%)で効果が維持された。効果維持例22例のうち、4週以降増量された症例は9例、その中で2例が最高投与量200mg/日まで増量された。一方、副作用の発現は22.9%で、嘔気、頭痛・頭重、ふらつきなどであったが、4週を過ぎて発現したものは便秘及びアカシジアの2件で、いずれも軽度であり、4週以降副作用による中止例はなかった。

7) その他の一般臨床試験

健常成人の15mg錠の吸排試験を実施(1992年2月)した後、1992年8月より1993年11月まで東邦大学を中心に10施設(治験総括医師：筒井末春教授；東邦大学心療内科)において、心療内科領域におけるうつ病・うつ状態に対する一般臨床試験が実施された。症例数は46例であった。投与量としては、本試験の対象となる患者は一般に身体症状を主訴としているため、身体症状の副作用発現に敏感であることから、副作用の発現に注意が必要であると考えられたため、類薬の精神科領域と心療内科領域における頻用用量比(5:3)を参考とし、本剤においても同様の用量比になるものと考え、高齢者と同様の30~90mg/日の用量が設定された。その結果、30~60mg/日の投与で62.2%の改善率が得られた。一方、副作用は16.3%発現したが、本剤の他の試験に比較して発現頻度は高くなかった。

8) 吸収排泄試験

1989年2月に第Ⅰ相臨床試験を開始し、2月から4月まで、健常非高齢者に12.5mg、25mg、50mg及び100mg単回投与、5月から6月まで、健常非高齢者に50mg/日、8日間反復投与し薬物動態を検討した。

1989年10月から第Ⅱ相臨床試験を実施し、至適用量を初期用量50mg/日、最高用量100~150mg/日と推察した。しかしながら、65歳以上の症例では、第Ⅱ相臨床試験で投与された25mg/日開始8例と50mg/日開始10例で、効果が変わらず、副作用が25mg/日開始例で少なかった。従って、50mg/日より低用量から投与開始する試験を実施して、高齢者の用法・用量を検討する必要があると考えられた。

更に、高齢者におけるフランスの吸収排泄試験において、高齢者の血中濃度推移が非高齢者より高く、最高血中濃度は1.8倍となる結果が得られた。従って、高齢者を対象とする場合、ミルナシプランは1回15mg、1日2回を初期用量とする方がよいと判断され、高齢者を対象とする臨床試験が必要と考えられた。また、特に副作用に注意を要する患者などを対象とする場合も同様と考えられた。従って、これらの患者への投与に先立ち、健常非高齢者の15mg投与の吸収排泄試験を実施することとした。

1992年2月から3月まで、健常非高齢者に15mg単回投与並びに45mg/日、8日間反復投与し薬物動態を検討した。

1992年10月から高齢者を対象とする臨床試験を開始した。その後、1993年12月「高齢者に使用される医薬品の臨床評価法に関するガイドライン」が通知されるなど、高齢者の投与量について注目

度が高まったため、ミルナシプランの高齢者投与量を適宜増減並びに使用上の注意への記載にとどめるのではなく、用法・用量欄に記載する方がよいと判断した。これに伴い、高齢者に対する臨床試験用量を裏付ける申請資料として国内の高齢者吸排試験が必要と考えられたため、高齢者を対象とする臨床試験の開始後ではあったが、高齢者吸排試験を実施した。

1994年5月、健常高齢者に15mg単回投与し薬物動態を検討した。

①健常成人の15mg錠の吸収排泄試験

健常非高齢者の15mg錠の吸収排泄試験(単回投与、反復投与並びに食事の影響の検討)が北里大学東病院(治験総括医師：村崎光邦先生)において実施された。その結果、単回投与で、第I相臨床試験における結果と総合して投与量と血中濃度の間には線形性がみられた。また、15mg錠を1日毎食後3回、8日間投与した結果、第I相試験の反復投与成績同様、蓄積性は認められなかった。

②高齢者吸排試験

65歳以上の健常高齢者における15mg単回投与での吸排試験が関野病院(治験総括医師：関野久之先生)において実施された。その結果、上記非高齢者を上回る血中濃度推移が得られた。

4. 本剤の特長及び有用性

ミルナシプランは抗うつ薬として新規の化学構造を有し、セロトニンに加えてノルアドレナリンの再取り込みを阻害することから三環系抗うつ薬に匹敵する強い抗うつ作用を示すとともに、各種脳内神経伝達物質の受容体に対する親和性が極めて低いことから三環系抗うつ薬の有する副作用(抗コリン作用、心・循環器に対する影響)を軽減した、第四世代^{註1)}あるいはSNRIと称される極めて新しい抗うつ薬である。その特長及び有用性は以下のとおりである。

注1) 第一世代(イミプラミンを代表とする三環系抗うつ薬)、第二世代(ミアンセリンを代表とする四環系抗うつ薬など)、第三世代(セロトニン選択的取り込み阻害薬)に対し、更に新しい構造、機序を有する薬物が第四世代の抗うつ薬と称される。

注2) フルボキサミンなどのセロトニン選択的取り込み阻害薬SSRIに対し、セロトニン、ノルアドレナリンの両方に作用する薬物が選択的セロトニン・ノルアドレナリン再取り込み阻害薬SNRIと称される。

非臨床試験より

- ①うつ病動物モデルに対してイミプラミン、ミアンセリンより低用量又は同用量で有効であった
- ②脳内モノアミンであるノルアドレナリン及びセロトニンに対して、イミプラミンとの濃度比にして1前後の強力な再取り込み阻害作用を示した
- ③前シナプス神経細胞の5HT_{1A}受容体機能の低下がミルナシプランの方がイミプラミン、フルボキサミンより速かった
- ④各種脳内神経伝達物質の受容体に対する親和性が極めて低かった
- ⑤抗コリン作用について、ミルナシプランは最大申請用量の36倍(ヒト体重を60kgとして換算)である60mg/kgまでの腹腔内投与で抑制作用を示さなかったが、イミプラミンは最大臨床用量の9倍である30mg/kgの腹腔内投与で抑制が認められた
- ⑥心・循環器系について、ミルナシプランはほとんど抑制作用を示さなかったが、イミプラミンはモルモットで心停止を起こす等強い抑制作用を示した

臨床試験より

- ①ミルナシブランはうつ病・うつ状態を対象としたイミプラミンとの比較試験において、最終全般改善度については、同等性の検証はできなかったが、1週改善度においてミルナシブランはイミプラミンに比較し有意に優れており(Wilcoxon検定 $p=0.029$)、ミルナシブランの方が早期に効果が発現することが示された。一方、口渇等の抗コリン作用による副作用発現率並びに循環器系副作用のひとつである起立性低血圧の発現率は、ミルナシブランの方が低値であり、特に後者には有意差が認められた(発現の有無と重症度によるWilcoxon検定 $p=0.048$)。項目別では、ミルナシブラン46件中、口渇13件、便秘4件、嘔気・嘔吐5件、めまい4件など、イミプラミン62件中、口渇20件、便秘9件、めまい9件などが主にみられた
- ②ミルナシブランはうつ病・うつ状態を対象としたミアンセリンとの比較試験において、最終全般改善度について、同等性が検証された。一方、口渇等の抗コリン作用による副作用発現率並びに眠気の発現率はミルナシブランの方が低値で、特に後者には有意差が認められた(発現の有無と重症度によるWilcoxon検定 $p=0.001$)。項目別では、ミルナシブラン36件中、口渇5件、嘔気5件、眠気5件など、ミアンセリン80件中、眠気22件、口渇12件、便秘3件などがみられた。さらに、臨床検査値異常変動発現率はミルナシブランの方が有意に低値であった(Fisher検定 $p=0.047$)。項目別にみると、ミルナシブランではGPT2件、GOT、 γ -GTP、Al-P、トリグリセライド各1件など、ミアンセリンでは γ -GTP9件、GPT8件、GOT、Al-P各3件、白血球数上昇2件、下降2件などがみられた。肝機能検査値異常は、ミルナシブラン群で2例5件、ミアンセリン群で14例25件あった。
- ③ミルナシブランは大うつ病を対象としたSSRI(フルボキサミン、フルオキセチン)との比較試験において、効果並びに効果発現の速さに優った
- ④高齢者のうつ病・うつ状態に対して、非高齢者より低用量で有効性が認められ、副作用の発現頻度は本剤の他の試験に比較して高いものではなく、内容も重篤なものではなかった
- ⑤長期投与例における効果の持続率は高かった。また、副作用の発現は本剤の他の試験に比較して高くなく、長期投与により発現したものはいずれも軽度であった

以上より、①国内におけるうつ病の第一選択薬ミアンセリンに比較して、有効性が同等以上で安全性に優れる、②第一世代の抗うつ薬イミプラミンに比較して、効果発現の速さで優れ、抗コリン作用が少なく、心・循環器への影響が少なく過量投与でも安全である点で優れることから、ミルナシブランはうつ病の第一選択薬としての位置付けが期待できる有用な薬剤である。さらに、うつ病の治療で再発予防に重要といわれている維持療法において、イミプラミンなど従来の抗うつ薬は副作用の点でコンプライアンスが悪く問題とされていることから、副作用の少ないミルナシブランは維持療法にも適していると考えられる。海外臨床においては、海外の最近の治療指針における第一選択薬SSRIに有効性、効果発現の速さで優り、その有用性が確認されている。

以上の結果より、ミルナシブランは有用な薬剤であると考え、承認申請を行うものである(表イー7)。

表イー7 申請品目表

申請者 ^(注)	販売名	含量	申請の種類
旭化成工業 株式会社	トレドミン(原薬)		医薬品輸入承認申請
	トレドミン錠15	1錠中15mg	医薬品製造承認申請
	トレドミン錠25	1錠中25mg	

注) 薬審1第65号通知(1986年12月18日付)に従い、共同開発を実施した。

6. 外国における使用状況(1999年6月)

ピエール・ファール社はフランスにおいて本剤の開発を手掛けていたが、その後、1990～1994年にスウェーデンのアストラ社と提携し、ヨーロッパ各国並びにアメリカ合衆国における臨床開発を展開してきた。現在までに、ピエール・ファール社がフランス、ポルトガル等10カ国において承認を取得した(表イー8)。また、イギリス、スウェーデン、ドイツ等EC諸国を中心に、同社より申請中である。さらに、アメリカ合衆国では第Ⅲ相臨床試験準備中である。

表イー8 外国における許可取得の状況

国名	販売名	許可年月日
ポルトガル	Dalcipran(ダルシプラン) 25・50・100	1994年 2月25日
フランス	Ixel(イクセル) 25mg・50mg	1996年12月6日
オーストリア	Ixel(イクセル) 25mg・50mg	1998年 9月11日
フィンランド	Ixel(イクセル) 25mg・50mg	1998年 9月21日
ルーマニア	Ixel(イクセル) 25mg・50mg	1998年12月 4日
イスラエル	Ixel(イクセル) 25mg・50mg	1998年12月 6日
アルゼンチン	Ixel(イクセル) 25mg・50mg	1998年12月15日
ブラジル	Ixel(イクセル) 25mg・50mg	1999年 1月21日
コロンビア	Ixel(イクセル) 25mg・50mg	1999年 2月24日
ルクセンブルグ	Ixel(イクセル) 25mg・50mg	1999年 3月24日

7. 一般的名称

(1) 国内の一般的名称

平成6年10月3日付薬研第5号通知にて次のとおり決定された。

一般的名称(日本名): 塩酸ミルナシبران

(英名): milnacipran hydrochloride

化学名(日本名): (±)-シス-2-アミノメチル-N, N-ジエチル-1-フェニルシクロプロパンカルボキサミド 一塩酸塩

(英名): (±)-*cis*-2-aminomethyl-N, N-diethyl-1-phenylcyclopropane-carboxamide monohydrochloride

(2) 国際一般的名称

WHO Drug Information Vol. 3, No. 3, 1989, r-INN: List 29 に次のとおり収載された。

一般的名称: milnacipran

化学名: (±)-*cis*-2-(aminomethyl)-N, N-diethyl-1-phenylcyclopropanecarboxamide

8. 同種同効品一覧表

本品は抗うつ薬に分類される薬物であり、同種同効品としてミアンセリン、イミプラミン、マレイン酸フルボキサミン、塩酸トラゾドン、マレイン酸セチプチリン、塩酸ドスレピン、塩酸ロフェプラミン、塩酸マプロチリン、アモキサピン、塩酸アミトリプチリン、塩酸クロミプラミン、スルピリドがある。

ロ. 物理的・化学的性質並びに規格及び試験方法

1. 物理的・化学的性質

(1) 外観・性状

白色の結晶性の粉末で、味は苦く、わずかに芳香がある。

(2) 溶解性

各種溶媒に対する溶解性(W/V %、測定温度：20±5℃)

水:250 エタノール:50 クロロホルム:50 アセトニトリル:14.3 エーテル:<0.01

各種 pH 溶液(Britton-Robinson 緩衝液)に対する溶解性(W/V %、測定温度：20±5℃)

pH2.0:171 pH3.3:165 pH4.1:160 pH5.0:157 pH6.1:152 pH7.0:158 pH8.0:162

pH9.0:165 pH9.9:164 水:162

(3) 吸湿性

25℃において、32～53%RH ではほとんど吸湿性を示さなかったが、75%RH でわずかに吸湿し、84%RH では吸湿により水溶液となった。

(4) 融点(分解点)、沸点、凝固点

融点：約 171℃ (分解)

(5) 酸塩基解離定数

pKa：9.7 (滴定法)

(6) 分配係数(クロロホルム層/水層、測定温度：25℃)

pH2.2:<0.01 pH3.5:<0.01 pH4.3:<0.01 pH5.0:0.01 pH6.2:0.2 pH7.1:1.2 pH8.1:10

pH9.0:56 pH9.9:186

(7) その他の主な示性値

pH：5.7 (1%水溶液)

吸光度： $E_{1\%}^{1\text{cm}}$ (260nm)：7.5～8.5 (0.04g、エタノール(99.5)、100mL)

旋光度：ラセミ体であるので水溶液(1→100)は旋光性を示さなかった。

なお、d 体の比旋光度 $[\alpha]_D^{20}$ は-23.4°、l 体の比旋光度 $[\alpha]_D^{20}$ は+24.3°であった。

2. 原薬の試験法

確認試験法 1) 呈色反応：ニンヒドリン試験(青紫色)

2) 沈殿反応：ドラーゲンドルフ試液(だいだい色沈殿)

硝酸銀試液(白色沈殿)

3) 紫外吸収

4) 赤外吸収

定量法 日局「液体クロマトグラフ法(内標準法)」による。

3. 剤形、性状

フィルムコート錠 トレドミン錠 15:淡黄色 トレドミン錠 25:白色

4. 製剤の組成

(1) 含量

トレドミン錠 15：1錠中に塩酸ミルナシプランを 15 mg 含有

トレドミン錠 25：1錠中に塩酸ミルナシプランを 25 mg 含有

(2) 添加物

トレドミン錠 15 は「医療用医薬品添加物の記載について」(昭和 63 年 10 月 1 日薬発 853 号)により定められた添付文書に記載すべき医療用医薬品添加物を含まないが、添加物として 12 成分を含有する。トレドミン錠 25 は「医療用医薬品添加物の記載について」(昭和 63 年 10 月 1 日薬発 853 号)により定められた添付文書に記載すべき医療用医薬品添加物を含まないが、添加物として 10 成分を含有する。

5. 混入する可能性のある夾雑物

類縁物質	化学名
I	(±)- <i>cis</i> -1-phenyl-3-azabicyclo[3.1.0]hexane-2-one
II	diethylamine
III	(±)- <i>cis</i> -2-aminomethyl-1-phenylcyclopropane carboxylic acid
IV	(±)- <i>cis</i> -2-diethylamino-1-phenyl-3-azabicyclo[3.1.0]hex-2-ene
V	(±)- <i>trans</i> -2-aminomethyl- <i>N,N</i> -diethyl-1-phenylcyclopropane carboxamide monohydrochloride

6. 製剤の試験法

溶出試験 (方法) 日局溶出試験法第2法 (パドル法) 条件: 回転数 100rpm、水 900mL

(結果) 平均溶出時間(T75%): 15mg 製剤 3~5分、25mg 製剤 3~4分

確認試験法 1) 呈色反応: ニンヒドリン試験 (青紫色)

2) 沈殿反応: ドラーゲンドルフ試液 (だいだい色沈殿)

3) 紫外吸収

定量法 日局「液体クロマトグラフ法 (内標準法)」による。

7. 製剤の容器の材質

PTP: ポリ塩化ビニル、アルミ箔

八. 安定性

1. 原薬の安定性

試験	保存条件	保存期間	保存形態	結果	
苛酷試験	温度 50℃、暗所	6 カ月	無色ガラス瓶、密栓	全ての測定項目に変化は認められなかった。	
	湿度	25℃、75%RH、暗所	3 カ月	無色ガラス瓶、開放	全ての測定項目に変化は認められなかった。
		25℃、84%RH、暗所	1 カ月	無色ガラス瓶、開放	保存 15 日で吸湿により水溶液となり、1 カ月では約 0.1%の類縁物質 I*が認められた。
	光 25℃、白色蛍光灯下 (288 万 lux・hr)	30 日	シャーレ+ポリ塩化ビニリデンラップ	全ての測定項目に変化は認められなかった。	
長期保存試験	17~37℃、22~97%RH 室内散乱光下	36 カ月	無色ガラス瓶、密栓	全ての測定項目に変化は認められなかった。	

測定項目：性状、融点（分解）、溶状、確認試験、吸光度、含量、乾燥減量、類縁物質、光学異性体比 *類縁物質 I [強制分解による生成物の項参照]

強制分解による生成物

0.1N 塩酸試液に溶かし、80℃で1日保存した結果、類縁物質 I、II、IIIが認められた。

0.1N 水酸化ナトリウム試液に溶かし、80℃で1日保存した結果、類縁物質 I、II、IVが認められた。

水に溶かし、80℃で1日保存した結果、類縁物質 I、IIが認められた。

類縁物質	化学名
I	(±)- <i>cis</i> -1-phenyl-3-azabicyclo[3.1.0]hexane-2-one
II	Diethylamine
III	(±)- <i>cis</i> -2-aminomethyl-1-phenylcyclopropane carboxylic acid
IV	(±)- <i>cis</i> -2-diethylamino-1-phenyl-3-azabicyclo[3.1.0]hex-2-ene

2. 製剤の安定性

試験項目		製剤	試験条件			試験結果
			保存条件	期間	保存形態	
苛酷試験	温度	15mg	60℃、暗所	3 カ月	無色ガラス瓶、密栓	類縁物質 I*が約 0.8%認められたが、その他の測定項目に変化は認められなかった。
	湿度		25℃、84%RH、暗所	2 カ月	シャーレ、開栓	吸湿による重量増加、苦み、崩壊時間の延長を認め、類縁物質 I*が約 0.2%認められた。その他の測定項目に変化は認められなかった。
	光		25℃、白色蛍光灯下 (144 万 lux・hr)	30 日	シャーレ+ポリ塩化ビニリデンラップ	全ての測定項目に変化は認められなかった。
長期保存試験		15mg	25℃、暗所	36 カ月	PTP 包装品をアルミ袋に封入	全ての測定項目に変化は認められなかった。
					PTP 包装品	
加速試験			40℃、75%RH、暗所	6 カ月	PTP 包装品をアルミ袋に封入	全ての測定項目に変化は認められなかった。
					PTP 包装品	2 カ月で外観及び内部がわずかに着色し、苦みが認められた。また、類縁物質 I*が 6 カ月では 1.2~1.3%認められた。その他の測定項目に変化は認められなかった。
		25mg	40℃、75%RH、暗所	6 カ月	PTP 包装品をアルミ袋に封入	全ての測定項目に変化は認められなかった。
					PTP 包装品	2 カ月で外観及び内部がわずかに着色し、苦みが認められた。また、類縁物質 I*が 6 カ月では 0.7~0.9%認められた。その他の測定項目に変化は認められなかった。

測定項目：性状、確認試験、崩壊試験、乾燥減量、含量、類縁物質、溶出率、光学異性体比

* 類縁物質 I [強制分解による生成物の項参照]

二. 毒性

総括

毒性試験の概要を表二—1に示した。

1. 急性毒性（国内実施試験[^]）

急性毒性はラット及びサルで検討した。一般状態では薬理作用に関連すると思われる発赤、流涎、眼瞼下垂（半眼）、自発運動減少がラットで、散瞳、嘔吐、眼瞼下垂（半眼）、自発運動減少がサルで出現し、高用量では痙攣が見られた。死因は中枢神経興奮作用に基づく痙攣による呼吸不全と考えられた。性差、種差及び遅発毒性は示唆されなかった。ラットのLD₅₀値は経口投与で♂223 mg/kg、♀213mg/kg、静脈内投与で♂47mg/kg、♀51mg/kg、サルの概略致死量は経口投与で約280mg/kgであった。

2. 急性毒性

急性毒性はラットで検討した。一般状態では無関心、振戦、異常姿勢、立毛、眼瞼下垂および流涎が出現し、死亡前に無関心、筋攣縮および呼吸困難または呼吸数減少が認められた。LD₅₀値は経口投与で♂295mg/kg、♀356mg/kg、静脈内投与で♂51.2mg/kg、♀51.2mg/kgであった。

3. 亜急性及び慢性毒性（国内実施試験[^]）

亜急性・慢性毒性はラット及びサルについて、13週間及び52週間投与して検討した。一般状態として、散瞳、眼瞼下垂（半眼）、自発運動減少などがみられた。ラットでは体重の増加抑制が10mg/kg/日から発現し、このため150mg/kg/日では全身状態が悪化して死亡する例が認められた。病理組織学的所見で、10mg/kg/日から肝細胞の空胞変性及び30mg/kg/日で前立腺の発育抑制が認められた。亜急性・慢性毒性における毒性学的無影響量は、ラットでそれぞれ5mg/kg/日、3mg/kg/日、サルでそれぞれ5mg/kg/日、7.9mg/kg/日であった。

4. 亜急性及び慢性毒性

亜急性・慢性毒性はラット及びサルについて、4週間及び26週間投与して検討した。一般状態として、ラットで流涎が、サルで散瞳、眼瞼下垂および嘔吐がみられた。ラットでは10mg/kg/日から、サルでは120mg/kg/日で摂餌量の低下を伴う体重の増加抑制が見られ、ラット、サルともに120mg/kg/日で死亡に至る例もあった。病理組織学的所見では、ラットで35mg/kg/日から、サルでは120mg/kg/日でともに小葉中心性の肝細胞の脂肪化を伴う空胞変性が認められた。

5. 生殖に及ぼす影響（国内実施試験[^]）

生殖に及ぼす影響は、ラット及びウサギについて検討した。親動物に対しては、ラットで体重増加抑制が5mg/kg/日から発現した。生殖能力及び胎児、出生児に対しては、親動物の全身状態の悪化によると考えられる影響が認められた。催奇形性は認められなかった。ラットにおいては、親動物に対する毒性学的無影響量は、妊娠前及び妊娠初期投与試験で雄5mg/kg/日、雌20mg/kg/日、器官形成期投与試験で10mg/kg/日未満、周産期及び授乳期投与試験で2.5mg/kg/日、生殖能力に対しては、それぞれ80mg/kg/日、40mg/kg/日、2.5mg/kg/日であり、胎児に対しては、それぞれ80mg/kg/日、10mg/kg/日、2.5mg/kg/日であった。ウサギによる器官形成期投与試験では母動物に対する一般毒性学的な毒性学的無影響量、生殖能力及び胎児に対する毒性学的無影響量はそれぞれ60mg/kg/日であった。

6. 生殖に及ぼす影響

生殖に及ぼす影響は、ラットについてFDA方式の繁殖試験によって検討した。親動物に対しては、体重増加抑制が15mg/kg/日から発現した。親動物の生殖能力に対しては60mg/kg/日で全身状態の悪化によると考えられる出産率、出生数の減少、出生時死亡児数の増加が認められた。胎児について、催奇形性は認められなかった。生存胎児の周産期、授乳期の死亡率の増加が60mg/kg/日で認められた。また60mg/kg/日で哺育児授乳期間中の軽度の体重増加抑制が認められた。出生児の発育および機能に異常は認められず、生殖能力にも影響は認められなかった。

7. 依存性

依存性はサルについて検討した。身体及び精神依存性は認められなかった。

8. 抗原性

抗原性はマウス、ラット、モルモットを用い、ASA、PCA、PHA反応により検討した。抗原性は認められなかった。

9. 変異原性

変異原性は復帰突然変異、染色体異常及びマウス小核試験により検討した。変異原性は認められなかった。

10. がん原性

がん原性はマウス、ラットについて検討した。がん原性は認められなかった。

11. 主代謝物、分解物及び光学異性体の毒性

主代謝物の脱エチル体の静脈内投与、代謝物・分解物の環化体の経口、静脈内投与および光学異性体のd体、l体の経口投与での概略の致死量はミルナシプランより高用量か同程度であり、所見も共通していた。

亜急性及び慢性毒性、生殖に及ぼす影響の毒性学的無影響量と臨床用量が接近しているが、これはミルナシプランの薬理作用に基づいたアドレナリン並びにセロトニンの作用増強に起因していると推察された。

A. 医薬品毒性試験ガイドラインに従って実施した試験

B. 第I相および第II相臨床試験を実施する際に参考にした海外で実施された試験

表二-1 毒性試験一覧表

試験項目		動物種又は試験条件	投与経路 期間	投与量 (mg/kg/日)	成績
急性毒性		ラット	経口 静脈内	105~659 45.5~54.9	LD ₅₀ 値 ♂:223mg/kg, ♀:213mg/kg LD ₅₀ 値 ♂:47mg/kg, ♀:51mg/kg
		サル	経口	200, 280, 400, 500	概略致死量 ♂, ♀:280mg/kg
急性毒性		ラット	経口 静脈内	100~655.4 39.7~79.4	LD ₅₀ 値 ♂:295mg/kg, ♀:356mg/kg LD ₅₀ 値 ♂:51.2mg/kg, ♀:51.2mg/kg
亜急性・慢性毒性	急性	ラット	経口 (13週+回復)	5, 10, 20, 24, 60, 150	毒性学的無影響量 5mg/kg/日
		サル	経口 (13週+回復)	5, 15, 45	毒性学的無影響量 5mg/kg/日
	慢性	ラット	経口 (52週)	1, 3, 10, 30	毒性学的無影響量 3mg/kg/日
		サル	経口 (52週)	2.5, 7.9, 25	毒性学的無影響量 7.9mg/kg/日
亜慢性・慢性毒性	急性	ラット	経口 (4週)	10, 35, 120	毒性学的無影響量 10mg/kg/日
		サル	経口 (1ヶ月)	10, 35, 120	毒性学的無影響量 10mg/kg/日
	慢性	ラット	経口 (26週)	10, 35, 120	毒性学的無影響量 10mg/kg/日未満
		サル	経口 (26週)	5, 15, 60→40	毒性学的無影響量 15mg/kg/日
生殖に及ぼす影響	Seg I	ラット	経口	5, 20, 80	毒性学的無影響量:親動物の一般毒性 ♂5mg/kg/日, ♀ 20mg/kg/日 親動物の生殖能力及び胎児に対する 80mg/kg/日
	Seg II	ラット	経口	10, 40, 150	毒性学的無影響量:母動物の一般毒性 10mg/kg/日未満 母動物の生殖能力 40mg/kg/日 次世代の発生 10mg/kg/日
		ウサギ	経口	5, 15, 60, 100	毒性学的無影響量:母動物の一般毒性 60mg/kg/日 母動物の生殖能力 60mg/kg/日 胎児に対する 60mg/kg/日
Seg III	ラット	経口	1, 25, 2.5, 5, 20, 80	毒性学的無影響量:母動物の一般毒性 2.5mg/kg/日 母動物の生殖能力 2.5mg/kg/日 出生児に対する 2.5mg/kg/日	
生殖に及ぼす影響	繁殖試験 (FDA方式)	ラット	経口	5, 15, 60	催奇形性なし
依存性	身体依存	サル	経口(50→75各2週) 経口(75 4週)	50→75, 75	陰性
	精神依存	サル	静脈内(自己摂取)	0.125, 0.25, 0.5	陰性
抗原性	ASA	モット	ミナジラン: 経口 週3回 計9回	1, 5(mg/匹)	陰性
	PCA	マウス	ミナジラン-OVA+FCA: 皮下2週1回 計3回	2(mg/匹)	
			ミナジラン: 経口 週3回 計9回 ミナジラン-OVA+FCA 又は+Alu: 皮下3週1回 計3回	50, 250(μg/匹) 10(μg/匹)	
PHA	モット ASAに同じ マウス, モットPCAで得た血清				

表二-1 毒性試験一覧表 (続き)

試験項目	動物種又は試験条件	投与経路 期間	投与量 (mg/kg/日)	成績	
変異原性	復帰突然変異	サルモネラ菌 大腸菌	直接法 代謝活性化法	313~5000(μ g/p)	陰性
	染色体異常	ヒレニ-ズ・ハムスター 培養細胞	直接法 代謝活性化法	31.25~400 (mg/ml)	陰性
	小核	マウス	経口 単回	19, 63, 190	陰性
がん原性	マウス	経口 (混餌)	10, 30, 100 (♂104週、♀104週)	陰性	
	ラット	経口 (混餌)	5, 15, 50 (♂104週、♀104週)		
主光 代学 謝異 物性 ・体 分の 解毒 物性	脱アセチル体 (代謝物)	ラット	静脈内	32, 40, 50	概略致死量 ♂♀ 50mg/kg以上
	環化体 (分解物、 代謝物)	ラット	経口	330, 500, 750	概略致死量 ♂♀ 750mg/kg
			静脈内	45, 56, 70	概略致死量 ♂♀ 70mg/kg以上
	メチルシラン d体	ラット	経口	134, 200, 300	概略致死量 ♂♀ 200mg/kg
l体	ラット	経口	134, 200, 300	概略致死量 ♂♀ 200mg/kg	
	ラット	経口	134, 200, 300	概略致死量 ♂♀ 200mg/kg	

A. 医薬品毒性ガイドラインに従って実施した試験

B. 第I相および第II相臨床試験を実施する際に参考にした海外で実施された試験

1. 急性毒性 (国内実施試験^{a)})

(1) ラット急性毒性試験

1) 経口投与

ラットに、ミルナシプランを注射用蒸留水に溶解して強制経口投与した。実験条件並びに得られた成績を表ニ-2に示した。

一般状態では投与15分後から発赤、眼瞼下垂、自発運動減少、流涎、振戦がみられたが、5~9時間後には回復した。体重は投与日、投与7日後および投与14日後に調べたが、高用量の雄で増加抑制が認められた。死亡例は雄では178mg/kgで1例、231mg/kgで2例、300mg/kg以上では全例に、また雌では178mg/kgで1例、215mg/kgで2例、237mg/kgでは全例に認められ、一般状態では上記に加えて間代性痙攣、チアノーゼ、脱力がみられ、呼吸停止により投与後30分~5時間で死亡した。剖検所見では死亡例にのみ胃粘膜の消失と小腸での水様物の貯留がみられた。胃粘膜消失の発生機序は、大量経口投与による胃粘膜血管壁からの透過性亢進であると考えられた。病理組織学的所見では胃粘膜下組織の軽度な浮腫が認められた。

2) 静脈内投与

ラットに、ミルナシプランを注射用蒸留水に溶解して尾静脈内投与した。実験条件並びに得られた成績を表ニ-2に示した。

一般状態では投与1~2分後から発赤、眼瞼下垂、自発運動減少がみられたが、2時間後には回復した。体重には変化は認められなかった。死亡例は雄では46.6mg/kgで3例、47.7mg/kgで3例、48.9mg/kgで4例、50.0mg/kgで全例に、雌では50.0mg/kgで2例、52.4mg/kgで4例、54.9mg/kgで全例に認められ、一般状態では上記に加えて投与直後から痙攣、脱力、呼吸困難がみられ、10~15分後に死亡した。剖検所見では死亡例にのみ肺の剖面からの泡沫液流出、気管内への泡沫液貯留がみられた。病理組織学的所見では肺で軽度の好エオジン性物質の肺胞内への浸出、血管周囲間質の浮腫が認められた。浮腫の発生機序は、死亡に至る過程で末梢の循環不全が生じ、肺毛細血管の内圧上昇及び虚血により毛細血管透過性が亢進したためと推察された。

表ニ-2 ラットにおける急性毒性試験

動物種 (系統、週齢)	投与 経路	投与量 (mg/kg)	性	例 数	成績	
					LD ₅₀ 値 ^{a)} (95%信頼限界)	特記所見 (症状発現投与量)
ラット (Slc:Wistar, 5週齢 体重 ♂:98-126g ♀:76-109g)	経口 (10.98 ml/kg)	105, 137, 178, 231, 300, 390, 507, 659	♂	5	223 mg/kg (181.7~ 279.4)	発赤、眼瞼下垂、自発 運動減少、チアノーゼ (105 mg/kg以上) 振戦 (162 mg/kg以上)
		162, 178, 196, 215, 237	♀	5	213 mg/kg (196.3~ 239.0)	流涎、痙攣 (178 mg/kg以上) 脱力 (231 mg/kg以上)
	静脈内 (6.66 ml/kg)	45.5, 46.6, 47.7, 48.9, 50.0	♂	5	47 mg/kg (45.8~ 48.2)	発赤、眼瞼下垂、自発 運動減少 (45.5 mg/kg以上)
		45.5, 47.7, 50.0, 52.4, 54.9	♀	5	51 mg/kg (48.9~ 52.6)	痙攣、脱力 (46.6 mg/kg以上) 呼吸困難 (47.7 mg/kg以上)

a) Probit法

(2) サルの経口投与急性毒性試験

カニクイザルに、ミルナシプランを強制経口投与した。実験条件並びに得られた成績を表二-3に示した。

一般状態では投与30~50分後から散瞳が、その後翌日にかけて眼瞼下垂、自発運動減少がみられたが、3日後には回復した。体重、摂餌量には大きな変化は認められなかった。死亡は500mg/kgの雄に認められ、投与10分後から散瞳、その後経時的に嘔吐、眼瞼下垂、自発運動減少、結膜及び口腔粘膜の蒼白化がみられ、1時間30分後に死亡した。血液学的及び血液化学的検査では一過性のヘマトクリット値の増加、ヘモグロビン濃度、TG、GPTの増加が認められた。ヘマトクリット値の増加の原因は嘔吐が認められたことから、軽度の血液濃縮による相対性赤血球増加と考えられた。TGの増加は偶発的な変化で、毒性学的に意味のある変化とは考えられなかった。GPTの増加はラット及びサルの反復投与試験の高投与量群に軽度の肝臓障害の所見が認められていることから、本業投与の影響による可能性は否定できないと考えられた。しかし、概略の致死量をこえる極めて高投与量で発現したものであり、また肝臓障害を示唆する他の検査値変動もないことから臨床的には問題ないと推察した。剖検所見では軽度の肺気腫がみられた。臓器重量では前立腺の絶対・相対重量の増加、脾臓の絶対重量の増加が認められたが偶発的な変化で、毒性学的に意味のある変化とは考えられなかった。病理組織学的所見では特記すべき変化は認められなかった。

表二-3 サルにおける急性毒性試験-I

動物種、年齢、体重	カニクイザル、3~7才、 ♂ : 4.12、4.14 kg ♀ : 3.08、3.51 kg			
投与方法(投与経路)	注射用蒸留水に溶解、4 ml/kg (強制経口投与)			
投与量 (mg/kg)	200		500	
動物数	♂ 1	♀ 1	♂ 1	♀ 1
死亡数	0	0	1	0
一般状態	(30分~2日目) 散瞳 (2~6時間) 眼瞼下垂	(30分~2日目) 散瞳 (2時間~翌日) 自発運動減少	(10分以降) 散瞳 (40分) 空吐 (50分以降) 眼瞼下垂、 自発運動減少 (1時間以降) うずくまり状態、 結膜・口腔粘膜 蒼白化 (1時間20分以降) 鎮静、仰臥位、嘔吐 (1時間30分) 死亡	(30分~2日) 散瞳 (2時間) 嘔吐
体重	—	↓軽度 (投与翌日)	—	—
摂餌量	—	—	—	—
血液学的検査	ヘマトクリット値↑ (1日目)	—	—	ヘマトクリット値↑ ヘモグロビン濃度↑ (軽度)
血液化学的検査	TG↑	TG↑	—	GPT↑
剖検	—	—	肺気腫	—
臓器重量	前立腺↑(4.3g)	脾臓↑(9.1g)	—	—
病理組織学的検査	—	—	—	—
概略の致死量	約500mg/kg			

— : 特記すべき所見なし、 ↑ : 増加、 ↓ : 減少

[追加試験]

カニクイザルに、ミルナシبرانを強制経口投与した。実験条件並びに得られた成績を表ニ-4に示した。

一般状態では投与15分～1時間後から散瞳が、その後、空吐、自発運動減少、腹臥位、半眼、嘔吐、坐位、横臥位、鎮静がみられたが、4日後には回復した。体重は400mg/kgの雄で投与翌日に増加抑制がみられた。摂餌量は280mg/kg及び400mg/kgの雄で投与日～投与翌日に減少がみられた。死亡は280mg/kg及び400mg/kgの雌に認められ、投与15分後から散瞳、その後経時的に半眼、空吐、自発運動減少、鎮静、坐位、横臥位、腹臥位、傾眠、強直性痙攣、昏睡、あえぎ様呼吸がみられ、1時間15分～約2時間後に死亡した。剖検所見では異常は認められなかった。

表ニ-4 サルにおける急性毒性試験-Ⅱ (追加試験)

動物種、年齢、体重	カニクイザル、4～5才、 ♂ : 4.68、4.92 kg ♀ : 2.28、2.28 kg			
投与方法 (投与経路)	注射用水に溶解、4 ml/kg (強制経口投与)			
投与量 (mg/kg)	280		400	
動物数	♂ 1	♀ 1	♂ 1	♀ 1
死亡数	0	1	0	1
一般状態	(30分) 空吐 (45分～2日目) 散瞳 (45分～1時間) 自発運動減少 (2～3時間) 腹臥位、半眼 (2時間) 嘔吐 (2時間、 4～6時間) 坐位	(15分～ 1時間59分) 散瞳 (1時間) 自発運動減少、 半眼、坐位、 横臥位、 あえぎ様呼吸、 (1時間59分) 死亡	(1時間～3日目) 散瞳 (3時間) 嘔吐	(15分～ 1時間15分) 散瞳 (30分～ 1時間15分) 半眼 (30分) 空吐、 自発運動減少 (45分～1時間) 鎮静 (1時間) 坐位 (1時間～ 1時間15分) 腹臥位、傾眠 強直性痙攣、 昏睡、あえぎ 様呼吸 (1時間15分) 死亡
体重	—	—	↓ (投与翌日)	—
摂餌量	↓ (投与日～ 投与翌日)	—	↓ (投与日～ 投与翌日)	—
剖検	—	—	—	—
概略の致死量	280 mg/kg (前試験結果とあわせて評価)			

— : 特記すべき所見なし、 ↓ : 減少

(3) まとめ

ミルナシبرانの急性毒性試験で認められた中毒症状は、散瞳、眼瞼下垂 (半眼)、自発運動減少、痙攣などであり、死因は中枢神経興奮作用に基づく痙攣による呼吸不全と考えられた。発赤の発生機序は、本薬の薬理作用がセロトニン (5-HT) の再取り込み部位に結合し、その再取り込みを阻害しシナプス間隙での5-HT濃度を増大させ5-HT神経系を賦活することにより、セロトニンには末梢血管の拡張作用が知られていることから、皮膚末梢血管拡張によると考えられた。散瞳の発生機序は、本薬は高投与量においてノルアドレナリン取り込み阻害作用から、ノルアドレナリン作動性神

経を刺激することに基づいて瞳孔散大筋を収縮させることによると考えられた。急性毒性に特に性差は認められず、種差も大きくないと推定された。また、出現した症状は比較的早く回復しており、一般状態はラットでは投与日は投与直後からほぼ症状がみられなくなるまで、その後は投与14日後まで1日2回観察し、サルでは投与日は投与直後より6時間まで、その後は投与14日後まで1日2回観察したが、遅発毒性は示唆されなかった。

2. 急性毒性

(1) ラット急性毒性試験

1) 経口投与

ラットに、ミルナシプランを毒性試験に多く用いられる懸濁剤の0.5%カルボキシメチルセルロースを用いて調製して強制経口投与した。実験条件並びに得られた成績を表ニ-5に示した。

一般状態は投与後14日間毎日1回観察した。160mg/kg以上を投与したほとんどの動物で無関心、振戦、異常姿勢、立毛、眼瞼下垂（半眼）および流涎が、数例に筋攣縮、呼吸困難、歩行異常およびカタレプシーが、少数例に血管拡張、呼吸促進、体温下降および麻痺性歩行がみられた。これらの毒性症状の発現ピークは投与後1~4時間で全生存動物は24時間以内に回復した。体重は1日目の投与前、投与8日及び投与15日に調べたが、溶媒投与群と比較して、体重増加に顕著な作用は認められなかった。死亡は雄では256mg/kgで投与1時間50分後に1例、409.6mg/kg以上では投与1時間10分~4時間後に全例に、雌では409.6mg/kgで投与1時間10分~4時間後に4例、655.4mg/kgでは投与50分~1時間40分後に全例に認められた。剖検所見では死亡例に死戦期の浮腫と死後変化の複合によると考えられる大腸管腔内の出血がみられたが生存例には異常は認められなかった。

2) 静脈内投与

ラットに、ミルナシプランを0.9%滅菌生理食塩水に溶解して尾静脈内投与した。実験条件並びに得られた成績を表ニ-5に示した。

一般状態は投与後14日間毎日1回観察した。生存動物では軽度の無関心および呼吸数減少が認められ、投与1時間後には眼瞼下垂も認められたが、投与2時間後までには顕著な毒性症状は消失した。50mg/kgでは死亡前に無関心、振戦、呼吸困難または呼吸数減少が認められ、63mg/kgでは投与直後に死亡した。体重は1日目の投与前、投与8日及び投与15日に調べたが、溶媒投与群と比較して、体重増加に顕著な作用は認められなかった。死亡は雌雄ともに50mg/kgで2例、63mg/kg以上では全例に、いずれも投与10分以内に認められた。剖検所見では死亡例、生存例ともに異常は認められなかった。

(2) まとめ

ミルナシプランの急性毒性試験で認められた毒性症状は、振戦、眼瞼下垂、呼吸困難等であった。症状の発現ピークは経口投与では投与後1～4時間で24時間以内には回復し、静脈内投与でも投与2時間後までには顕著な症状は消失し、以降14日間の観察期間中に症状が認められなかったことから遅発毒性はないと考えられた。毒性症状およびLD₅₀値に雌雄差は認めらず、急性毒性に性差はないと推察された。

3. 亜急性及び慢性毒性（国内実施試験^A）

（1）ラット13週間投与試験及び4週間回復試験

ラットに、ミルナシブランを13週間反復強制経口投与した。実験条件並びに得られた成績を表二-6に示した。投与量は急性、亜急性および慢性毒性試験（二-1、16、18）の成績から、体重増加抑制などが認められる150mg/kg/日を高用量に、以下公比約2.5で60、24、10mg/kg/日とした。

150mg/kg/日でミルナシブランの投与によると思われる死亡がみられた。一般状態では24mg/kg/日から発赤、流涎、眼瞼下垂、自発運動減少、外部泌尿器汚損、痙攣、振戦、運動麻痺が用量の増加とともにみられた。体重は投与期間中は10mg/kg/日から増加抑制が認められ、150mg/kg/日では回復期間後も対照群の値まで戻らなかった。摂餌量は投与期間中は10mg/kg/日から用量の増加とともに減少を示した。摂水量は10、24mg/kg/日では減少が、60、150mg/kg/日では増加が認められた。尿検査では尿量の増加、浸透圧の低下が散見されたが、回復性が認められた。眼科学的検査に異常は認められなかった。

血液学的検査では150mg/kg/日で赤血球数、白血球数に軽度の減少が認められた。血液化学的検査では10mg/kg/日からALPの上昇、総タンパクの減少、A/G比の上昇が認められた。ALPの変化は軽度で、回復性が認められ、加えて病理組織学的所見では肝実質細胞及び胆道系組織には異常はみられなかった。総タンパクの減少とA/G比の上昇も回復性が認められた。

剖検所見に変化はみられなかった。臓器重量では、顎下腺、盲腸の増加、脾臓、胸腺、精巣上体、卵巣及び子宮の減少が認められたが、減少については相対重量の動きから体重減少に伴う発育不良が原因と考えられた。脾臓の減少は用量の増加とともに認められる変化で、摂餌量低下による栄養状態の悪化に伴う変化と考えられた。

病理組織学的には用量の増加とともに肝細胞の空胞変性がみられた。この所見は回復期間後にはみられなかった。また150mg/kg/日では、胸腺皮質及び髄質リンパ球の変性がやや強くみられたが、摂餌量低下による栄養状態の悪化に伴う変化と考えられた。

上記のとおり、本試験では低用量から体重増加抑制などがみられ、毒性学的無影響量を明らかにし得なかったため、投与量を減じ下記の追加試験を実施した。

[追加試験]

実験条件並びに得られた成績を表二-7に示した。投与量は前試験の低用量を中間用量とし、その上下の20、5mg/kg/日とした。

一般状態では特記すべき症状はみられなかった。体重は10mg/kg/日で2週目に増加抑制がみられたが、20mg/kg/日では影響は認められなかった。摂餌量、摂水量に特記すべき変化は認められなかった。

血液学的検査では、血小板数の減少が認められた。血液化学的検査ではクレアチニンと α グロブリン分画の低下が認められたが、クレアチニンの低下は用量に伴わない変化で、 α グロブリン分画の低下は他のグロブリン分画には変化が認められなかった。また総タンパクの動きは小さく、雌雄で一定の傾向は示さなかった。尿検査では変化は認められなかった。

表二-6 ラット13週間投与試験-I

動物種、系統、週齢、性、体重	Slc:Wistarラット、5週齢、♂131 ~158 g ♀ 99 ~116 g				
投与量設定根拠	急性毒性および亜急性試験(ニ-1, 16, 18)成績から、体重増加抑制などが認められる150mg/kg/日を高用量に、以下60、24、10mg/kg/日とした。				
投与方法(経路)	注射用蒸留水に溶解、5 ml/kg (強制経口投与)				
投与量 (mg/kg/日)	対 照	10	24	60	150
動物数	投与群	♂12 ♀12	♂12 ♀12	♂12 ♀12	♂12 ♀12
	回復群	♂ 5 ♀ 5	/		♂ 5 ♀ 5
死亡数	♂ 0 ♀ 0	♂ 0 ♀ 0	♂ 2 ^{a)} ♀ 0	♂ 1 ^{a)} ♀ 1 ^{a)}	♂ 9 ♀ 7
一般状態	—	—	発赤、流涎	発赤、流涎、眼瞼下垂、自発運動減少	発赤、流涎、眼瞼下垂、自発運動減少、外部泌尿器汚損、痙攣、振戦、運動麻痺
体重	—	↓(散発的)	↓(散発的)	↓(散発的)	↓** (顕著)
摂餌量	—	↓(散発的)	↓(♂、散発的♀)	↓**	↓**
摂水量	—	↓(散発的)	↓(散発的♀)	↑*(散発的♂)	↑(♂**、散発的♀)
眼科学的検査	—	—	—	—	—
尿検査	—	—	—	尿量↑**、浸透圧↓**	
血液学的検査	—	—	—	—	白血球↓** 赤血球↓**(♂)
血液化学的検査	—	軽度ALP↑** (♀) 総タンパク↓** A/G↑*		ALP↑** 総タンパク↓** A/G↑**	
剖検	—	—	—	—	—
臓器重量	—	脾臓↓** 精巣上部↓* 顎下腺↑**(♀)	脾臓↓**(♀) 顎下腺↑** 副腎↓**(♀) 盲腸↑**(♀)	脾臓↓** 精巣上部↓* 子宮↓** 顎下腺↑**(♀) 副腎↓**(♀) 盲腸↑**(♀)	脾臓↓**(♀) 卵巣↓* 子宮↓** 胸腺↓** 盲腸↑**(♀)
病理組織学的検査	—	肝細胞空胞変性 (♀:3例)	肝細胞空胞変性 (♂:2例、♀:5例)	肝細胞空胞変性 (♂:11例、♀:6例)	肝細胞空胞変性 (♂:5例)、胸腺リンパ球変性
回復試験(4週間)	—	/			上記所見に回復傾向が認められた
毒性学的無影響量	10 mg/kg/日 未滿				

—: 特記すべき所見なし、a) 誤投与による死亡、↑: 増加、↓: 減少 * : p<0.05、** : p<0.01 (t 検定)

剖検所見に著変はなく、臓器重量では精巣上体の減少が全投与群で認められたが、病理組織学的には異常は認められず、また生殖・発生試験(ニ-4)で授精能に異常は認められなかった。10mg/kg/日から脾臓重量の減少が認められた。病理組織学的には10mg/kg/日から肝細胞の空胞変性がみられた。脾臓重量の減少は病理組織学的変化を伴わず、体重増加抑制に伴う二次的な変化と推察される。

以上の両試験の成績から、毒性学的無影響量は5mg/kg/日と推定された。

本薬の導入及び第I相臨床試験の開始にあたり、外国で既に実施されていた毒性試験のデータを参考に安全性を判断した。それらのうちラットでの試験はSD系で行われた。一方、国内ガイドラインに従ってその後実施した毒性試験には、旭化成工業(株)ではSD系での試験経験がなく背景値がなかったためにWistar系のラットを試験動物として用いた。Wistar系はSD系に比べ同一週齢でも体重が少なく、体重増加率が低い事が知られており、なかでもSLC Wistar系はその傾向が強い事が知られている。本薬のラットにおける毒性の特徴は摂餌量の低下を伴う体重増加抑制であり、こうした系統差が亜急性毒性試験等で外国データに比べ、毒性学的無影響量が低くなった理由であると推察される。

表ニ-7 ラット13週間投与試験-II(追加試験)

動物種、系統、週齢、性、体重	Slc:Wistarラット、5週齢、♂ 124 ~ 143 g ♀ 104 ~ 119 g			
投与量設定根拠	前試験の低用量を中間用量とし、その上下の20、5mg/kg/日とした。			
投与方法(経路)	注射用蒸留水に溶解、5 ml/kg (強制経口投与)			
投与量(mg/kg/日)	対 照	5	10	20
動物数 投与群	♂10 ♀10	♂10 ♀10	♂10 ♀10	♂10 ♀10
死亡数	♂ 0 ♀ 0	♂ 0 ♀ 0	♂ 0 ♀ 0	♂ 1 ^{a)} ♀ 0
一般状態	—	—	—	—
体重	—	—	↓*(軽度♂、2週)	—
摂餌量	—	↓** (軽度♂、1-3週)	—	—
摂水量	—	—	—	—
尿検査	—	—	—	—
血液学的検査	—	—	—	血小板(♀) ↓**
血液化学的検査	—	クレアチン ↓** α ₁ グロブリン(♀) ↓*	クレアチン(♂) ↓**、総カルパク(♂) ↑*、 (♀) ↓**、α ₁ グロブリン ↓**、 α ₂ グロブリン(♀) ↓**	—
剖検	—	—	—	—
臓器重量	—	精巣上体 ↓** 下垂体 ↑** (♀)	精巣上体 ↓** 脾臓 ↓*(♂) 腎臓 ↑*(♂) 卵巣 ↓*	精巣上体 ↓** 脾臓 ↓*(♂) 顎下腺 ↑** (♂) 盲腸 ↑*(♂)、** (♀)
病理組織学的検査	—	—	肝細胞空胞変性 (♂♀各1例)	肝細胞空胞変性 (♂:3例、♀:1例)
毒性学的無影響量	5mg/kg/日			

—: 特記すべき所見なし、 a): 誤投与による死亡 ↑: 増加、↓: 減少

*: p<0.05、 **: p<0.01(t検定)

(2) サル13週間投与試験及び4週間回復試験

カニクイザルに、ミルナシプランを13週間反復強制経口投与した。実験条件並びに得られた成績を表ニ-8に示した。

死亡は認められなかった。一般状態では15mg/kg/日から散瞳、眼瞼下垂、嘔吐がみられた。体重、摂餌量に変化は認められなかった。眼科学的検査、心電図検査、血圧、肝機能検査及び尿検査に異常は認められなかった。

血液学的検査では白血球数に低値が認められたが、個別値は試験施設の背景値の範囲で異常はなかった。骨髓検査、血液化学的検査に異常は認められなかった。

剖検所見、臓器重量に異常はなかった。

病理組織学的所見では、45mg/kg/日で精細管、精巣上体及び前立腺の発育抑制 (immature) 所見が観察されたが、慢性毒性試験では認められなかった。

以上の成績から、本試験における毒性学的無影響量は5mg/kg/日と推定された。

表ニ-8 サル13週間投与試験

動物種、系統、年齢、性、体重	カニクイザル、3~8歳、♂ 3.05 ~ 4.77 kg ♀ 2.41 ~ 3.94 kg							
投与量設定根拠	急性、亜急性毒性試験(ニ-1, 17, 19)成績から確実中毒量と推定される45mg/kg/日を高用量とし、以下15、5mg/kg/日とした。							
投与方法(経路)	注射用蒸留水に溶解、4 ml/kg (強制経口投与)							
投与量 (mg/kg/日)	対 照		5		15		45	
動物数	投与群	♂3 ♀3	♂3 ♀3	♂3 ♀3	♂3 ♀3	♂3 ♀3	♂3 ♀3	♂3 ♀3
	回復群	♂2 ♀2	—	—	—	—	♂2 ♀2	♂2 ♀2
死亡数	♂0 ♀0	♂0 ♀0	♂0 ♀0	♂0 ♀0	♂0 ♀0	♂0 ♀0	♂0 ♀0	♂0 ♀0
一般状態	—		—		散瞳(♂、♀各1例、投与開始4日間)		散瞳、眼瞼下垂、嘔吐	
体重	—		—		—		—	
摂餌量	—		—		—		—	
眼科学的検査	—		—		—		—	
心電図検査	—		—		—		—	
血圧	—		—		—		—	
肝機能検査	—		—		—		—	
尿検査	—		—		—		—	
血液学的検査	—		—		—		白血球↓*(♀)	
骨髓検査	—		—		—		—	
血液化学的検査	—		—		—		—	
剖検	—		—		—		—	
臓器重量	—		—		—		—	
病理組織学的検査	—		—		—		精細管、精巣上体、前立腺発育抑制(中等~高度1例)	
回復試験(4週間)	—		/		/		精細管、精巣上体、前立腺発育抑制(軽度1例)、精囊重量↑(2例)	
毒性学的無影響量	5 mg/kg/日							

—: 特記すべき所見なし、↑: 増加、↓: 減少、*: p<0.05、**: p<0.01 (Dunnet検定)

(3) ラット52週間投与試験

ラットに、ミルナシブランを52週間反復強制経口投与した。実験条件並びに得られた成績を表二-9に示した。

ミルナシブラン投与によると思われる死亡は認められなかった。一般状態には異常はみられなかった。体重は10mg/kg/日の雌、30mg/kg/日の雌雄で増加抑制が認められた。摂餌量は30mg/kg/日で投与期間の後半に僅かな低下が認められた。眼科学的検査に異常は認められなかった。尿検査では、10mg/kg/日以上雄で有意な尿量の増加と比重の低下が認められた。これらの変化は極めて軽度であり、尿中、血中電解質には変化はみられなかった。尿量の変化は国内や海外で実施した反復投与毒性試験の結果を合わせて考えると、薬理作用の流涎によって水分が軽度に失われたことによる摂水量の軽度の増加が要因と推察された。血液学的検査では変化は認められなかった。

血液化学的検査では、10mg/kg/日以上雄で尿素窒素の有意な増加が、また30mg/kg/日の雄でGOT、LDHの有意な低下が認められた。尿素窒素の増加に関連した腎臓の病理組織学的変化は認められなかった。従って尿素窒素の増加は、摂餌量の減少を伴う体重増加抑制が長期に続いたため、低栄養状態を引き起こしたことが原因と推察された。

剖検所見に変化はみられなかった。臓器重量では、精巣上体、精囊及び脾臓の減少がみられた。精巣上体、精囊重量の減少は病理組織学的変化を伴っていないことから、摂餌量低下による体重増加抑制に伴う栄養状態の悪化による二次的な軽度な変化と推察された。

病理組織学的には、雄で小葉中心帯を主とする肝細胞の空胞変性がみられ、前立腺に発育抑制を示唆する所見が認められた。

以上の成績から、本試験での毒性学的無影響量は3mg/kg/日と推定された。

(4) サル52週間投与試験 添付資料二-3

カニクイザルにミルナシブランを52週間反復強制経口投与した。実験条件並びに得られた成績を表二-10に示した。

死亡は認められなかった。一般状態では25mg/kg/日で、投与初期に散瞳がみられた。また流涎、嘔吐が単発的にみられた。体重は25mg/kg/日の雄でわずかな増加抑制が認められた。摂餌量に異常は認められなかった。眼科学的検査、心電図検査、血圧、肝機能検査、尿検査、血液学的検査に異常は認められなかった。骨髄検査では、雄で好塩基球比率に高値が認められたが、軽度の変化で顆粒球系細胞比率やG/Bに異常はなかった。血液化学的検査では変化は認められなかった。

剖検所見に異常はみられなかった。臓器重量では、雄に肝臓の重量の増加が認められたが、いずれも個別値では背景値の範囲内であった。病理組織学的には、ミルナシブラン投与に関連すると考えられる変化は認められなかった。

以上の成績から、本試験での毒性学的無影響量は7.9mg/kg/日と推定された。

(5) まとめ

ミルナシブランの投与により、薬理作用によると考えられる散瞳、眼瞼下垂(半眼)、自発運動減少が見られた。散瞳の発生機序は、本薬は高投与量においてノルアドレナリン取り込み阻害作用から、ノルアドレナリン作動性神経を刺激することに基づいて瞳孔散大筋を収縮させることによると考えられた。ラットでは体重の増加抑制が低用量から発現した。摂餌量の低下も同様に認められ、高用量では発育不全を示し、全身状態が悪化し死亡に至る例もあった。血液学的、血液化学的及び骨髄検査で変化を示す項目が認められたが、対応する病理組織学的所見はなく、また長期試験で変化が進行する傾向はなかった。臓器重量ではラットで脾臓、肝臓、副生殖器系、サルで肝臓に影響がみられたが、病理組織学的に変化が観察されたのはラットでの肝細胞の空胞変性とラット、サルでの雄性副生殖器系の発育抑制であった。肝細胞の空胞の内容は脂質であると考えられた。空胞が

発生した投与量では体重増加抑制が認められ、また血液化学検査で総ケパクとGOTの低下がみられていた。従って肝細胞の空胞のメカニズムは肝臓での代謝障害による脂質の蓄積による脂肪肝であると考えられた。前者は軽度で回復性があり、後者のうちラットの前立腺での変化は発育抑制作用によって臓器の加齢性変化が抑制されyoung adultの像を示したもので、増殖性を示唆する所見はみられなかったことから、本薬の一次的影響ではなく、本薬投与による発育不全に起因する二次的影響と考えられた。またサルの雄性副生殖器の発育抑制は、本薬の男性生殖器に対する直接的な影響による萎縮ではなく、発育度や性成熟度が標準より低い実験動物に対する体重増加抑制による性成熟遅延作用が原因であったと考えられ、長期試験（表二-10）や海外で実施された試験では変化が認められないことから、特に問題とする変化ではないと考えられた。

表二-9 ラット52週間投与試験

動物種、系統、週齢、性、体重	Slc:Wistar ラット、6週齢、 ♂144 ~ 172 g ♀113 ~ 129 g				
投与量設定根拠	亜急性毒性試験(ニ-2)で10mg/kg/日以上で体重増加抑制などの変化が認められたことから、30mg/kg/日を最高用量に、以下10、3、1mg/kg/日とした。				
投与方法(経路)	注射用蒸留水に溶解、2.5ml/kg (強制経口投与)				
投与量(mg/kg/日)	対 照	1	3	10	30
動物数	♂15 ♀15	♂15 ♀15	♂15 ♀15	♂15 ♀15	♂15 ♀15
死亡数	1 ^{a)} 0	0 0	1 ^{b)} 0	0 0	0 0
一般状態	—	—	—	—	—
体重	—	—	—	↓** (軽度♀)	↓(♀**, ♂)
摂餌量	—	—	—	—	↓(♀**, ♂)
眼科学的検査	—	—	—	—	—
尿検査	—	—	—	尿量↑**(♂) 比重↓(♂)	尿量↑**(♂) 比重↓**(♂)
血液学的検査	—	—	—	—	—
血液化学的検査	—	—	—	BUN↑*(♀)	BUN↑**(♀) GOT↓*(♂)、 LDH↓**(♂)
剖検	—	—	—	—	—
臓器重量	—	—	—	唾液腺↑** (♂)、 精巣上体↓** 精囊↓** 脾臓↓** (♀)	精巣上体↓** 精囊↓** 脾臓↓**
病理組織学的検査	—	—	—	肝細胞空胞変性(♂2例、軽微)	肝細胞空胞変性(♂10例、軽度)、 前立腺(発育抑制)
毒性学的無影響量	3 mg/kg/日				

—：特記すべき所見なし、a)：一般状態著変なし、肺暗赤色および軽度鬱血、心臓軽微限局性心筋炎を認めたが死因は明らかではなかった、b)：誤投与による死亡、
↑：増加、↓：減少 *：p<0.05、**：p<0.01 (Dunnet検定)

表二-10 サル52週間投与試験

動物種、系統、年齢、性、体重	カニクイザル、3~7歳、 ♂3.33 ~ 5.08 kg ♀2.34 ~ 4.15 kg			
投与量設定根拠	サルでの亜急性毒性試験(ニ-3)から、毒性量と毒性学的無影響量の等比中項に近い25mg/kg/日を高用量とし、以下7.9、2.5mg/kg/日とした。			
投与方法(経路)	注射用蒸留水に溶解、4 ml/kg (強制経口投与)			
投与量(mg/kg/日)	対 照	2.5	7.9	25
動物数	♂4 ♀4	♂4 ♀4	♂4 ♀4	♂4 ♀4
死亡数	♂0 ♀0	♂0 ♀0	♂0 ♀0	♂0 ♀0
一般状態	—	—	—	散瞳(♂2例♀3例、4日まで) 流涎(♂1例) 嘔吐(♂1例♀1例)
体重	—	—	—	↓(♂12週後、軽度)
摂餌量	—	—	—	—
眼科学的検査	—	—	—	—
心電図検査	—	—	—	—
血圧	—	—	—	—
肝機能検査	—	—	—	—
尿検査	—	—	—	—
血液学的検査	—	—	—	—
骨髓検査	—	—	—	好塩基球比率 ↑* (♂軽度)
血液化学的検査	—	—	—	—
剖検	—	—	—	—
臓器重量	—	肝臓↑** (♂)	—	肝臓↑** (♂)
病理組織学的検査	—	—	—	—
毒性学的無影響量	7.9 mg/kg/日			

—: 特記すべき所見なし、↑: 増加、↓: 減少

*: p<0.05、**: p<0.01 (Dunnet検定)

4. 亜急性及び慢性毒性

(1) ラット4週間投与試験

ラットに、ミルナシプランを4週間反復強制経口投与した。実験条件並びに得られた成績を表ニ-11に示した。

死亡例はみられなかった。一般状態では10mg/kg/日では投与13日から、35mg/kg/日と120mg/kg/日では投与2日から流涎がみられた。体重は35mg/kg/日で軽度の増加抑制が、120mg/kg/日では増加抑制が認められた。摂餌量は35mg/kg/日の雌および120mg/kg/日で軽度の減少を示した。摂水量および眼科学的検査に異常は認められなかった。

血液学的検査では35mg/kg/日および120mg/kg/日の雌にヘモグロビン濃度の上昇が認められた。血液化学的検査では120mg/kg/日にコレステロールの高値が、また雄にグルコースの高値が認められた。

剖検所見、臓器重量および病理組織学的検査では異常は認められなかった。

以上の成績から、本試験では10mg/kg/日で流涎が見られるものの発生頻度が少なく、さらに投与期間中に回復傾向が認められることから、毒性学的無影響量は10mg/kg/日と推定された。

(2) サル1ヶ月投与試験

カニクイザルに、ミルナシプランを1ヶ月間反復強制経口投与した。実験条件並びに得られた成績を表ニ-12に示した。

死亡は120mg/kg/日で投与7日目に雄1例に認められ、また投与25日目に雌1例を切迫屠殺した。一般状態では35mg/kg/日で2例に、120mg/kg/日では全例に散瞳が見られ、また35mg/kg/日で2例に、120mg/kg/日では全例に眼瞼下垂が、さらに120mg/kg/日では全例に投与1週目の投与2~3時間以内に嘔吐がみられた。体重では120mg/kg/日で増加抑制または低下が認められた。摂餌量では120mg/kg/日で顕著な減少が認められた。

心電図では35mg/kg/日および120mg/kg/日で心拍数の顕著な低下が見られ、120mg/kg/日の生存例ではQT間隔とQTc比の変化が、死亡例では死亡直前の検査でT波抑制とP波解離が認められた。生存動物で認められた変化は、顕著な摂餌量低下を伴う体重増加抑制または減少を伴い、代謝率の低下を伴っていたと考えられ、全身衰弱の状態にあったと推察された。死亡動物および切迫屠殺動物で認められた変化は死亡直前にみられたものであることから、心臓に対する直接的な影響ではなく死戦期の変化であると考えられた。従って本試験で認められた心電図の変化は、本薬の心臓に対する毒性作用によるものではなく、代謝率の低下や全身衰弱による徐脈であると考えられた。尿検査に異常は認められなかった。血液学的検査では120mg/kg/日でプロトロンビン時間とフィブリノーゲン値が有意に増加していたが個体値は正常範囲内にあると考えられた。骨髄検査では異常は認められなかった。

血液化学的検査では35mg/kg/日でコレステロールの減少が、120mg/kg/日でコレステロールの減少、GPTの増加、血清アルブミンとNaの減少が認められた。

剖検所見に異常はなかった。臓器重量では120mg/kg/日に甲状腺と肝臓の増加が認められた。

病理組織学的所見では35mg/kg/日で1例に肝細胞の肥大が、120mg/kg/日で数例に小葉中心性の肝細胞空胞変性及び脂肪変性が認められた。

以上の成績から、本試験での毒性学的無影響量は10mg/kg/日と推定された。

(3) ラット26週間投与試験

ラットに、ミルナシプランを26週間反復強制経口投与した。実験条件並びに得られた成績を表二-13に示した。

死亡は対照群で雌1例、120mg/kg/日で雌雄各2例に認められた。このうち対照群と120mg/kg/日の雌2例は血液サンプリング時の麻酔による死亡であった。一般状態では10mg/kg/日以上で流涎が認められた。体重は10mg/kg/日の雄で投与13~26週に有意差を伴わない軽度の増加抑制が、35mg/kg/日の雄で増加抑制が、雌で有意差を伴わない軽度の増加抑制が、120mg/kg/日では顕著な増加抑制が認められた。摂餌量は35mg/kg/日で雄に有意差を伴わない減少が、120mg/kg/日では顕著な減少が認められた。

眼科学的検査は対照と120mg/kg/日についてのみ行ったが異常は認められなかった。尿検査では120mg/kg/日の雄に尿量の増加が認められた。神経学的検査では分節反射、体位の反応、運動能力等に機能障害は認められなかった。

血液学的検査は対照と120mg/kg/日についてのみ行ったが120mg/kg/日で投与25週目のみにヘモグロビン濃度の低下を認めた。血液化学的検査では120mg/kg/日で雌にコレステロールの増加が、主に雄に投与14週までグルコースの増加が、雌雄にALPの増加が認められた。

剖検所見に変化はみられなかった。臓器重量では10mg/kg/日で雌に脾臓と軽度の心臓の減少が、35mg/kg/日で雌に脾臓の減少と甲状腺の増加および雌雄に軽度の心臓の減少が、120mg/kg/日で雌雄に脾臓と軽度の心臓の減少、雌に甲状腺の雄に肝臓の増加がそれぞれ認められた。

病理組織学的には、35mg/kg/日から軽微な小葉中心性の肝細胞腫大と脂肪変性が認められた。

(4) サル26週間投与試験

カニクイザルにミルナシプランを26週間反復強制経口投与した。実験条件並びに得られた成績を表二-14に示した。なお高投与量は最初60mg/kg/日としたが顕著な毒性症状が認められたため、投与40日から40mg/kg/日に減量した。

死亡は対照で3例、5mg/kg/日で1例、15mg/kg/日で2例、60→40mg/kg/日で3例に認められた。このうち対照の1例、5mg/kg/日の1例、15mg/kg/日の1例、60→40mg/kg/日の1例は感染症で、60→40mg/kg/日の2例は吐物の誤嚥による窒息で死亡した。また対照の2例と15mg/kg/日の1例には剖検で重度の急性カタル性腸炎を認めた。

一般状態では嘔吐が5mg/kg/日で3匹に計12回、15mg/kg/日で4匹に計6回、60→40mg/kg/日で9匹に計73回認められた。

体重、摂餌量、眼科学的検査に異常は認められなかった。

心電図検査では60→40mg/kg/日でいずれも有意ではないが4週と13週目に心拍数の軽微な減少が、4週目にのみRR、QT、QTc値の軽度な増加を認めた。

血圧、尿検査、血液学的検査に異常は認められなかった。

血液化学的検査では60→40mg/kg/日で4週目のみにコレステロールの軽度の有意差を持った減少を認めた。

剖検所見に異常はみられなかった。臓器重量では60→40mg/kg/日で雄に肝臓の重量の僅かな増加が認められた。病理組織学的には異常は認められなかった。

(5) まとめ

本薬の反復投与によって一般状態ではラットで流涎が、サルで散瞳、眼瞼下垂および嘔吐が生じた。このうちラットの流涎、サルの散瞳と嘔吐は薬理作用に起因すると考えられる。ラットおよびサルともに体重の増加抑制と摂餌量の低下が見られ、高用量では死亡に至る例もあった。ラットの長期投与で見られた摂水量の増加は尿量の増加に伴う変化と考えられた。

血液学的検査ではラットおよびサルともに高用量でいくつかの変化が認められたが、長期試験で増悪する傾向は見られなかった。また脊髄検査では変化は全く認められなかった。

臓器重量ではラットで脾臓、心臓、甲状腺および肝臓の増加が、サルで甲状腺および肝臓の増加がみられた。このうち、脾臓、心臓および甲状腺は病理組織学的に変化が全く観察されなかった。一方、肝臓では小葉中心性の肝細胞の脂肪化を伴う空胞変性がラット、サルともに認められた事から本薬投与による影響であると考えられた。

以上から、本薬の毒性学的な特徴は摂餌量の低下を伴う体重の増加抑制作用と肝臓に対する軽度の作用であると考えられた。

5. 生殖に及ぼす影響（国内実施試験[^]）

（1）妊娠前及び妊娠初期投与試験（Segment I）

ラットに、ミルナシプランを雄には交配前63日以上及び交配期間中、雌には交配14日前から妊娠7日まで、強制経口投与した。実験条件並びに得られた成績を表ニ-15に示した。

雄親動物について、一般状態では80mg/kg/日で流産がみられた。体重及び摂餌量では20mg/kg/日から体重増加抑制及び連続して見られない散発的な摂餌量の低値傾向が認められた。交尾率、授精率及び剖検所見には異常は認められなかった。臓器重量の精巣上体での変化は対照群に比べて3.6～6.3%の減少であった。本薬は亜急性及び慢性毒性試験において発育期にある動物に体重増加抑制による発育抑制作用を示し、二次的に副生殖器官の成熟を遅延させる。本試験においても、雄への投与期間が長いことによる一般的な毒性的影響が生じたものと考えられた。

雌親動物について、一般状態では雄と同様、80mg/kg/日で流産がみられた。体重及び摂餌量では80mg/kg/日で投与期間中に増加抑制及び連続して見られない散発的な低値がそれぞれ認められた。交尾率、受胎率、黄体数、着床数、剖検所見及び臓器重量では特に異常は認められなかった。

胎児について、各群とも着床前後死亡率の増加はみられず、生存胎児の体重及び性比にも異常は認められなかった。また、外形、内臓及び骨格観察にもミルナシプランによる異常あるいは変異の発現はなく、化骨進行状態にも異常は認められなかった。

以上の成績から、親動物に対する一般毒性学的な毒性学的無影響量は雄で5mg/kg/日、雌で20mg/kg/日、親動物の生殖能力及び胎児に対する毒性学的無影響量は80mg/kg/日と推定された。

表二-15 妊娠前及び妊娠初期投与試験(1)

動物種・系統・週齢		ラット、Jcl:Wistar、♂6週齢(138~153g)♀13週齢(208~244g)				
投与量設定根拠		4週間の亜急性毒性試験及び繁殖試験(FDA方式)の成績(-20)を参考に体重増加抑制が予想される80mg/kgを高用量とし、以下20mg/kgを中用量、5mg/kgを低用量に設定した。				
投与方法		注射用蒸留水に溶解、5ml/kg(強制経口投与) ♂:交配前63日以上、♀:交配14日前から妊娠7日目まで				
投与量(mg/kg/日)		対 照	5	20	80	
動物数	♂	24	24	24	24	
	♀	24	24	24	24	
親動物	死亡数	0	0	0	0	
	一般状態	—	—	—	流涎	
	体 重	—	—	↓*	↓**	
	摂餌量	—	—	↓*(散発的)	↓**(散発的)	
	交尾率(%) ^{c)}	100(24/24)	100(24/24)	100(24/24)	100(24/24)	
	授精率(%) ^{d)}	100(24/24)	95.8(23/24)	100(24/24)	87.5(21/24)	
	♂ 剖 検	—	—	精巣,精巣上体萎縮(1例)	—	
	臓器重量 ^{e)}	—	精巣上体↓** (右:5.5%、左:4.1%)	精巣上体↓* (右:3.6%、左:6.3%)	精巣上体↓* (右:3.9%)	
	親動物	死亡数	0	0	0	0
		一般状態	—	—	—	流涎
体 重		—	—	—	↓**	
摂餌量		—	—	↓**(散発的)	↓**	
交尾率(%) ^{c)}		100(24/24)	100(24/24)	100(24/24)	100(24/24)	
受胎率(%) ^{d)}		100(24/24)	95.8(23/24)	100(24/24)	87.5(21/24)	
♀ 母動物数		24	23	24	21	
黄体数 ^{b)}		15.7±1.1	15.7±1.5	15.6±1.3	15.0±1.2	
着床数 ^{b)}		14.8±1.9	14.9±2.0	14.3±2.4	14.4±1.7	
♀ 剖 検		—	—	—	—	
臓器重量 ^{e)}	—	—	—	卵巣↓*(片側性)		

—:特記すべき所見なし、↑:増加、↓:減少 a) 対照群に対する減少率

b): 平均値 ± 標準偏差、*: p<0.05、**: p<0.01 (t 検定)

c): (交尾動物数/同居動物数) x 100、d): (妊娠動物数/交尾動物数) x 100

e): 重量測定臓器; 雄(精巣、精巣上体)、妊娠雌(卵巣、胎盤)、不妊雌(卵巣、子宮)

表二-15 妊娠前及び妊娠初期投与試験(2)

投与量 (mg/kg/日)		対 照	5	20	80	
胎	着床前死亡率 (%) ^{a)}	5.3	4.7	8.5	4.1	
	着床後死亡率 (%) ^{b)}	23(6.5)	33(9.6)	24(7.0)	23(7.6)	
	生存胎児数	総 数	333	310	319	279
		1 腹当たり ^{d)}	13.9±2.1	13.5±1.8	13.3±2.7	13.3±2.3
	性 比 ^{c)}	1.21	1.17	0.95	0.99	
	生存胎児の 体重 ^{d)} (g)	♂	3.14±0.19	3.24±0.36	3.23±0.19	3.16±0.19
		♀	2.93±0.20	2.98±0.31	3.02±0.21	2.88±0.21
	外表異常	頻度 (%)	0	0	1(0.3)	0
		外鼠径ヘルニア	0	0	1	0
	内 臓 異 常	頻 度 (%)	7(4.4)	6(4.0)	4(2.6)	5(3.8)
胸腺頸部残留		2	2	1	0	
心室中隔欠損		3	2	2	2	
肝臓分葉異常		0	1	0	0	
左臍動脈		2	2	1	3	
骨 格 異 常	頻 度 (%)	0	1(0.6)	0	0	
	頸椎椎弓癒合	0	1 ^{e)}	0	0	
骨 格 変 異	頻度 (%)	5(2.9)	7(4.4)	10(6.1)	6(4.1)	
	頸肋骨	3	3	3	5	
	第1-4肋骨	2	2	7	1	
	胸椎椎体化骨核分離	0	1	0	0	
	胸骨核分離	0	1	0	1	
化 骨 状 態	頸椎椎弓化骨遅延 第6胸骨核化骨率 (%)	0 78 (45.1)	0 107(67.3*)	1 102 (61.8)	0 81 (55.5)	
毒 性 無 学 影 響 的 量	親動物	一般毒性学的	♂: 5 mg/kg/日 , ♀: 20 mg/kg/日			
		生殖能力	80 mg/kg/日			
	胎児	80 mg/kg/日				

一: 特記すべき所見なし、*: p<0.05 (Wilcoxon検定)

a): ((黄体数 - 着床数) / 黄体数) x 100、 b): (死亡胚・胎児数 / 着床数) x 100、

c): 雄生存胎児数 / 雌生存胎児数、 d): 平均値 ± 標準偏差、

e): 頸椎椎弓化骨遅延、胸椎椎体化骨核の化骨不全及び分離を合併

(2) 胎児の器官形成期投与試験 (Segment II)

1) ラットにおける試験

ラットに、ミルナシブランを妊娠7日目から17日まで、強制経口投与した。実験条件並びに得られた成績を表二-16に示した。

母動物について、150mg/kg/日で死亡が1例認められた。一般状態では40mg/kg/日から発赤、150mg/kg/日で流涎、眼瞼下垂、自発運動減少、間代性痙攣及び臍出血がみられた。体重では40mg/kg/日から増加抑制が、摂餌量では10mg/kg/日から抑制が認められた。母動物の黄体数、着床数、剖検所見に異常は認められず、分娩異常も認められなかった。

胎児では、40mg/kg/日から雌雄に体重の低値が、150mg/kg/日で生存胎児数の減少傾向及び着床後死亡率の増加が認められた。また、150mg/kg/日で外表異常としての未熟児の増加、化骨進行度の遅延が認められた。

出生児では、主として150mg/kg/日で分娩率及び出生時生存児数の減少、外表分化の遅延、体重増加抑制及び器官重量の減少が認められたが、機能・行動検査及び生殖能力に異常は認められなかった。

胎児及び出生児で認められたこれらの変化は、母動物での一般症状の悪化、体重増加の抑制の影響であると考えられた。すなわち本薬は一般毒性試験のラット13週間投与試験-I (表二-6) では摂餌量減少を伴う体重増加抑制がみられた動物の血液化学検査で総タンパクの低下が認められている。このような胎児の成長期における母動物の摂餌量の減少や体重の増加抑制は、胎児への栄養供給の低下を生じると推察され、母動物の一般症状の悪化、摂餌量の減少とそれに伴う体重増加の抑制が胎児、出生児に影響を及ぼしたものと考えられた。

以上の成績から、母動物の一般毒性学的な毒性学的無影響量は10mg/kg/日未満であり、生殖に及ぼす影響に関しては40mg/kg/日、胎児または出生児に対しては、10mg/kg投与群で子宮重量の低下がみられたが、40mg/kg投与群では低下に有意差はみられず、150mg/kg投与群においては体重の低下に伴う絶対重量の低下のみがみられたこと、さらに出生児F1の生殖能力にも変化がみられなかったことから10mg/kgでの子宮重量の有意な低下は本薬の影響と考えられず、10mg/kg/日が毒性学的無影響量であると推定された。

表二-16 ラット胎児の器官形成期投与試験 (1)

動物種・系統・週齢		ラット、Jcl:Wistar ♀ 10週齢 (164.7~218.1g)				
投与量設定根拠		非妊娠ラットでの予備試験から、死亡がみられず、摂餌抑制、一般状態異常等の若干の毒性徴候の認められた150 mg/kg/日を高用量とし、以下40、10mg/kg/日とした。				
投与方法		注射用蒸留水に溶解、5ml/kg (強制経口投与) (妊娠7日から17日まで)				
投与量 (mg/kg/日)		対 照	10	40	150	
母	動物数	妊娠20日剖検	24	25	25	24
		自然分娩	15	15	14	15
動物	死亡数	0	0	0	1	
	一般状態	—	—	発赤	発赤、流涎、 眼瞼下垂、 自発運動減少、 間代性痙攣、 臍出血	

表二-16 ラット胎児の器官形成期投与試験(1) (続き)

投与量 (mg/kg/日)		対 照	10	40	150	
母 動 物	体 重	—	—	↓*	↓*	
	摂餌量	—	↓*	↓*	↓*	
	黄体数 ^{a)}	15.0±1.4	15.8±1.8	15.0±1.4	14.7±0.9	
	着床数 ^{a)}	14.0±2.6	14.6±2.6	14.1±2.5	14.2±1.1	
	剖 検	—	—	—	—	
	分娩異常	—	—	—	—	
胎 児 F1	生存胎児数 ^{a)}		12.8±3.1	13.4±2.9	13.3±2.7	11.7±3.0
	着床後死亡数 (%) ^{a, b)}		1.2±3.1 (10.8)	1.2±1.1 (8.9)	0.8±0.6 (6.4)*	2.5±3.2 (17.0)
	性 比 ^{c)}		0.91	1.13	1.27*	1.26
	生存胎児の 体重 (g) ^{a)}	♂	3.05±0.26	3.08±0.21	2.86±0.24*	2.46±0.37*
		♀	2.89±0.19	2.84±0.17	2.58±0.22*	2.23±0.37*
	外表 異常	頻 度 (%)	0.0	0.0	4 (4.0)	18 (10.7*)
		未熟児 ^{d)}	0	0	4	18
	内臓 異常	頻 度 (%)	1 (1.0)	0.0	0.0	0.0
		心室中隔欠損	1	0	0	0
	骨格 異常	頻 度 (%)	0	1 (0.4)	0	1 (0.5)
		胸骨核分離	0	1	0	0
		胸椎椎体分離	0	0	0	1
	骨格 変異	腰肋 (%)	1 (0.4)	5 (2.0)	0.0	8 (3.9*)
化骨進行度		—	—	胸骨核数↓*	胸骨核数、尾 椎数、前肢指 骨数及び後肢 趾骨数↓*	

—: 特記すべき所見なし ↑: 増加、 ↓: 減少

a): 平均値 ± 標準偏差、 * : p<0.05 (t 検定及びWilcoxon検定)

*: p<0.05 (χ²検定)

b): (死亡胚・胎児数/着床数) x 100、 c): 雄生存胎児数/雌生存胎児数

d) 生存胎児で外表奇形はみられず、皮膚が赤みを帯びて透明感があり、鳥肌状に見え、特に鼻端、四肢末端部の赤みが強い、胎児としての成熟徴候を欠くものを「未熟児」と定義した。

表二-16 ラット胎児の器官形成期投与試験(2)

投与量 (mg/kg/日)		対 照	10	40	150	
出 生 児 F1	分娩率 (%) ^{a)}	96.7	92.8	91.9	85.9*	
	出生時生存児数 ^{b)}	13.0±1.3	12.1±1.1	12.3±1.8	10.9±3.1*	
	出生時死亡児数 ^{b)}	0.5±0.7	0.3±0.7	0.3±0.8	0.5±0.7	
	4日生存率 (%) ^{c)}	98.0	82.8	94.8	82.2	
	離乳率 (%) ^{d)}	100.0	99.1	100.0	100.0	
	平均体重	—	—	—	↓*(生後4日~8週)	
	外表異常	無尾	0	1	0	0
	器官重量 (4週齢)	—	子宮↓*	副腎↑*(♂)、 肺↓*(♀)	肺↓*、心臓↓*、 肝臓↓*、腎臓↓*、 脾臓↓*、精巣↓*、 副腎↓*(♀)、 子宮↓*	
	外表分化 (日数)	胸部発毛 眼瞼開裂 歯芽萌出	— — —	↑* — —	— ↑* —	↑* ↑* ↑*
	行動・機能(発達)検査	—	—	—	—	
	授精率 (%) ^{e)}	93.3 (14/15)	100.0 (14/14)	100.0 (14/14)	92.9 (13/14)	
	受胎率 (%) ^{e)}	93.3 (14/15)	100.0 (14/14)	100.0 (14/14)	92.9 (13/14)	
	妊娠母体数	7	7	7	7	
	出 生 児 F2	分娩率 (%) ^{a)}	88.9	94.6*	95.2	90.8
出生時生存児数 ^{b)}		10.6±3.6	11.6±1.3	11.7±2.3	9.4±3.3	
出生時死亡児数 ^{b)}		0.9±2.3	0.7±0.5	0.0	1.3±1.6	
平均体重		—	—	↓*(♂生後3 及び4週)	—	
毒性学的	母動物	一般毒性:10mg/kg/日未満、生殖能力: 40mg/kg/日				
無影響量	胎児・出生児	10mg/kg/日				

—: 特記すべき所見なし、 ↑: 増加、遅延 ↓: 減少

a): $(\text{出生時生存児数} + \text{出生時死亡児数}) / \text{着床数} \times 100$

b): 平均値 ± 標準偏差、 * : $p < 0.05$ (t 検定及びWilcoxon検定)

c): $(\text{出生後4日生存児数} / \text{出生時生存児数}) \times 100$

d): $(\text{離乳時生存児数} / \text{出生後4日調整後生存児数}) \times 100$

e): $(\text{妊娠動物数} / \text{交尾動物数}) \times 100$

2) ウサギにおける試験

ウサギに、ミルナシプランを妊娠6日から18日目まで強制経口投与した。実験条件並びに得られた成績を表二-17に示した。

母動物については、ミルナシプラン投与によると思われる死亡は認められなかった。一般状態では著変はみられなかった。流産が対照群と15mg/kg/日で2及び1例認められた。体重、黄体数、着床数には異常は認められなかった。剖検所見では胎児全数死亡が対照群、60mg/kg/日で各1例認められた。また、分娩異常は認められなかった。

胎児については、着床後死亡率、生存児数に異常は認められなかった。体重は15mg/kg/日から低下傾向が認められ、60mg/kg/日の雄胎児では有意差が認められたが、背景値範囲内の変動であり、ミルナシプランによる変化ではないと推察された。生存胎児数をもとに算出された性比には異常は認められなかった。また、外表、内臓及び骨格観察にも異常あるいは変異の発現はなく、化骨進行状態にも異常は認められなかった。

本試験結果からは母動物に対する明確な毒性所見を把握できなかったが、100mg/kg/日を投与した予備試験ではミルナシプラン投与によると考えられる死亡が3/9例に発現しており、60mg/kg/日を高用量とした本試験により、ウサギにおける器官形成期投与の影響は評価できるものと考えた。

以上の成績から、母動物に対する一般毒性学的な毒性学的無影響量は60mg/kg/日、母動物の生殖能力及び胎児に対する毒性学的無影響量は、60mg/kg投与における雄胎児の体重低下は有意ではあるが背景値の範囲内の軽度の変動であり、また雌胎児の体重には有意差は認められなかったことから総合的には胎児の体重に対する変化は軽度であり本薬の影響ではないものと考え60mg/kg/日と推定された。

表二-17 ウサギ胎児の器官形成期投与試験

動物種(品種)、体重		New Zealand Whiteウサギ ♀ (2.8~3.9kg)			
投与量設定根拠		妊娠ウサギでの予備試験に基づいて決定した。すなわち、予備試験では100、60mg/kgを投与し、100mg/kg投与で摂餌量の減少及び3/9例の死亡がみられたが、生殖能力への影響あるいは催奇形作用は認められなかった。従って、60mg/kgを高用量に、以下15、5mg/kgとした。			
投与方法		注射用蒸留水に溶解、10ml/kg(強制経口投与) (妊娠6日から18日まで)			
投与量(mg/kg/日)		対 照	5	15	60
妊娠動物数/交尾動物数		19/21	17/22	19/21	22/22
母 動 物	死亡数	2 ^{a)}	1 ^{b)}	3	3 ^{c)}
	流産数	1	—	1	—
	一般状態	—	—	—	—
	体 重	—	—	—	—
	黄体数 ^{f)}	12.0±2.4	11.1±2.7	11.3±2.4	10.7±3.0
	着床数 ^{f)}	6.9±2.6	6.7±2.0	8.4±2.8	8.1±3.1
	剖 検	1 ^{d)}	1 ^{e)}	—	1 ^{d)}

表二-17 ウサギ胎児の器官形成期投与試験（続き）

投与量 (mg/kg/日)		対 照	5	15	60	
胎 児	着床後死亡数 (%) ^{a)}	8 (9.2)	7 (8.8)	5 (4.3)	12 (8.2)	
	生存胎児数 (1腹当たり) ^{b)}	95 (6.3±2.7)	93 (6.2±2.2)	121 (8.1±2.6)	134 (7.4±3.1)	
	生存胎児の 体重 (g) ^{c)}	♂	39.6±4.7	39.9±7.0	38.0±2.9	36.0±5.6*
		♀	38.0±6.3	38.4±4.7	37.1±5.9	36.1±5.6
	性比 ^{d)}		0.94	1.27	0.98	1.23
	外表 異常	頻 度 (%)	1(1.1)	0.0	0	1(0.7)
		短尾 腹膜癒合不全	1 0	0 0	0 0	0 1
	内臓 異常	頻 度 (%)	0	0	0	0
		なし	0	0	0	0
	骨格 異常	頻 度 (%)	0	0	0	0
なし		0	0	0	0	
骨格 変異	頭頂、頭頂間骨及 び胸骨核化骨不全 片側及び両側腰肋	各投与群に対し種々の程度にて発現がみられたが、いずれもミルナシプランによる変化ではないと推察された。				
化骨進行度		—	—	—	—	
毒性学的 無影響量	母動物 胎児	一般毒性：60mg/kg/日、生殖能力：60mg/kg/日 60mg/kg/日（予備試験結果とあわせて評価）				

—：特記すべき所見なし a) 1例は流産もみられた b) 後肢障害のため切迫屠殺
 c) 3例中2例は誤投与による死亡 d) 胎児全例死亡 e) 肺障害のため除外
 f)：平均値 ± 標準偏差 *：p<0.05 (t 検定) g)：(死亡胚・胎児数/着床数) x 100
 h)：雄生存胎児数/雌生存胎児数

(3) 周産期及び授乳期投与試験 (Segment III)

ラットに、ミルナシプランを妊娠17日から分娩後21日まで強制経口投与した。実験条件並びに得られた成績を表ニ-18に示した。

母動物について、一般状態では特記すべき症状はみられなかった。体重は20mg/kg/日から増加抑制がみられた。摂餌量は80mg/kg/日で減少が認められた。剖検所見には異常は認められなかった。

母動物の生殖能力について、妊娠期間、着床数、分娩異常例数、出産率にも異常は認められなかった。

出生児 (F₁) について、5mg/kg/日から用量の増加とともに出生時死亡児数 (率) の増加、出生率低下、体重増加抑制、生後4日生存率の低下がみられ、外表分化の遅延傾向が認められた。しかし、行動・機能検査、出生時死亡児及び死亡児の内臓観察所見には異常は認められなかった。また、各群ともF₁母動物の妊娠期間中に低体重推移がみられ、妊娠黄体数、着床数、生存胎児数の減少、80mg/kg/日で卵巣重量の低値傾向も認められた。F₂胎児には特に異常は認められなかった。

以上のとおり、本試験では低用量から母動物の生殖能力及び出生児への影響がみられ、毒性学的無影響量を明らかにし得なかったため、投与量を減じ、下記の追加試験を実施した。

[追加試験]

ラットに、ミルナシプランを妊娠17日から分娩後21日まで強制経口投与した。実験条件並びに得られた成績を表ニ-19に示した。投与量は前試験の結果を参考に、毒性学的無影響量と予想される2.5mg/kgを中用量とし、その上下の5、1.25mg/kgを設定した。

母動物については、一般状態では異常はみられなかった。体重は5mg/kg/日で哺育期間中に有意な低値がみられた。摂餌量、妊娠期間、着床数に異常は認められなかった。

母動物の生殖能力については、分娩成績に異常は認められなかった。

出生児については、体重、生存率、外表分化、生殖能力及び各段階の剖検所見並びに出生時死亡児・死亡児の内臓観察所見に異常は認められなかった。対照値に比較して2.5mg/kg/日のみで出生時死亡児数及び率の高値傾向を認めたが、この値は試験施設における当時の同系統ラットの出生時死亡児率の背景値 (3.6±1.2、最小2.4-最大4.9) (1987年4月-1992年3月) の最大値と比較してわずかに高いものの有意なものではなかった。また出生時死亡児数及び率について一腹を単位に傾向性検定を行った結果にも有意な増加傾向は全く認められなかった。さらに出生時死亡児数及び率の関連事象としての体重の低下や外表分化の抑制も2.5mg/kg/日以下では全く認められなかった。

以上の成績から、母動物に対する毒性学的無影響量、母動物の生殖能力に対する毒性学的無影響量は2.5mg/kg/日と推定された。

(4) まとめ

ミルナシプラン投与の親動物に対する一般的影響としては、体重増加抑制が5mg/kg/日から惹起され、摂餌量も低下していた。生殖能力に対しては直接的な影響は認められないが、上述の作用を介する親動物の全身状態の悪化が、二次的に胎児、出生児に影響を与えた可能性が考えられた。ラット、ウサギを通じて、催奇形性は認められなかった。

表二-18 ラット周産期及び授乳期投与試験-I

動物種・系統・週齢		ラット、Jcl:Wistar、♀11週齢(157~233g)			
投与量設定根拠		ラットを用いた繁殖試験(FDA方式)(ニ-20)並びに妊娠前及び妊娠初期投与試験(ニ-4)の成績を参考に、体重増加抑制が予想される80mg/kgを高用量に、以下20、5mg/kgとした。			
投与方法		注射用蒸留水に溶解、5ml/kg(強制経口投与) (妊娠17日から分娩後21日まで)			
投与量(mg/kg/日)		対 照	5	20	80
動物数		24	24	24	24
母動物	死亡数	0	0	0	0
	一般状態	—	—	—	—
	体 重	—	—	↓**	↓**
	摂 餌 量	—	—	—	↓**
	妊娠期間(日) ^{a)}	22.0±0.0	22.0±0.2	22.0±0.2	22.0±0.4
	着床数 ^{a)}	14.4±2.0	14.6±1.5	14.7±1.6	15.1±1.9
	分娩異常	—	—	—	—
出生児	出産率(%) ^{b)}	100.0	100.0	100.0	100.0
	出生時死亡児数及び率(%)	9(2.9)†	22(7.5)**	27(8.7)	44(13.5)**
	出生率(%) ^{c)} [出生率 ^{a)}]	90.7 [90.7 ±8.4]	83.9 [83.9 ±13.5]	83.5* [82.7 ±18.1]	78.2** [78.8 ±14.3]
	4日生存率(%) ^{d)} [4日生存率 ^{a)}]	84.1 [85.3 ±28.9]	81.5 [81.5 ±25.8]	84.1* [80.3 ±24.7]	21.2** [19.8 ±33.6]
	離乳率(%) ^{e)}	94.0	96.9	97.0	93.9
	性 比(♂/♀) ^{f)}	1.18	1.27	1.10	1.14
	体 重	—	↓**	↓**	↓**
F1	外表分化 (頻度%) ↑:高値 ↓:低値	—	切歯萌出↓* (生後11日)	精巣下降↓* (生後21日)	下腹部毛生↓* (生後11日) 切歯萌出↓** (生後11日) 眼瞼開裂↑** (生後14日)
	外表異常	—	—	—	—

表二-18 ラット周産期及び授乳期投与試験-I (続き)

投与量 (mg/kg/日)		対 照	5	20	80	
出 生 児	内臓観察 所見 ^{a)}	出生時 死亡児及 び死亡児	出生時死亡児、死亡児に胸腺頸部残留、肝臓分葉異常、左臍動脈を、更に死亡児に重複奇静脈を散在して認めたが、発現率に有意差はなかった。			
	出生時 死亡児の 内臓異常	観 察 数	9	22	27	44
		内臓異常児数 (%)	0	2 (9.1)	3 (11.1)	2 (4.5)
		胸腺頸部残留 (%)	0	0	1 (3.7)	0
		肝臓分葉異常 (%)	0	1 (4.5)	2 (7.4)	1 (2.3)
		左臍動脈 (%)	0	1 (4.5)	0	1 (2.3)
	死亡児の 内臓異常	観 察 数	55	50	38	190
		内臓異常児数 (%)	1 (1.8)	4 (8.0)	1 (2.6)	5 (2.6)
		胸腺頸部残留 (%)	0	0	0	2 (1.1)
		肝臓分葉異常 (%)	1 (1.8)	0	1 (2.6)	1 (0.5)
左臍動脈 (%)		0	4 (8.0)	0	0	
重複奇静脈 (%)		0	0	0	2 (1.1)	
F1	行動・機能(発達)検査	—	—	—	—	
	交 尾 率 (%) ^{b)}	95.0 (19/20)	100.0 (20/20)	100.0 (21/21)	100.0 (7/7)	
	受 胎 率 (%) ^{c)}	94.7 (18/19)	100.0 (20/20)	90.5 (19/21)	100.0 (7/7)	
	妊娠期間中体重	—	増加抑制傾向		↓**	
	帝王切開所見	—	妊娠黄体数↓*、着床数↓*、 生存胎児数↓*		妊娠黄体数↓** 着床数↓** 生存胎児数↓**	
	帝王切開時剖検所見	横隔膜ヘル ニア(1例)	—	腎盂拡張及び 腎肥大(1例)	卵巢重量低値 傾向	

表二-18 ラット周産期及び授乳期投与試験-I (続き)

投与量 (mg/kg/日)		対 照	5	20	80
胎 児	体 重	対照群と各投与群との間に有意差を認めなかった。			
	性 比 (♂/♀) ¹⁾	0.95	1.18	1.10	0.77
F2	外表異常 (%)	0	0	1 (0.4)	0
母動物	出生児	一般毒性: 5mg/kg/日、 生殖能力: 5mg/kg/日 未満 5mg/kg/日 未満			

- : 特記すべき所見なし †: 増加 ‡: 減少 a): 平均値 ± 標準偏差
 b): (生児出産雌数/妊娠雌数) x 100 c): (出產生児数/着床痕数) x 100
 d): (出生後4日生存児数/出生時生存児数) x 100
 e): (離乳時生存児数/出生後4日調整後生存児数) x 100 f): 雄生存児数/雌生存児数
 g): 内臓観察臓器; 頭部 (舌、口蓋、鼻中隔、眼瞼、角膜、網膜、嗅脳、硬膜、大脳、間脳、側脳室、第3脳室、中脳、内耳)、頸部 (食道、甲状腺、気管、頸動脈)、胸部 (胸腺、肺、横隔膜、心臓、大血管)、腹部 (肝臓、胃、脾臓、膵臓、腸管、副腎、腎臓、腎盂、尿管、膀胱、生殖器、臍動脈)
 h): (交尾動物数/同居動物数) x 100 i): (妊娠動物数/交尾動物数) x 100
 j): 雄生存胎児数/雌生存胎児数
 **: p<0.01 (t 検定) *: p<0.05, **: p<0.01 (Wilcoxon検定)
 † 対照群の出生時死亡児数及び率 (%) は試験施設における背景値範囲内であった。

表ニ-19 ラット周産期及び授乳期投与試験-II (追加試験)

動物種・系統・週齢		ラット、Jcl:Wistar、♀11週齢 (162~214g)				
投与量設定根拠		前試験の結果を参考に、毒性学的無影響量と予想される2.5 mg/kg を中用量とし、その上下の5、1.25mg/kgを設定した。				
投与方法		注射用蒸留水に溶解、5ml/kg (強制経口投与) (妊娠17日から分娩後21日まで)				
投与量 (mg/kg/日)		対 照	1.25	2.5	5	
動物数		24	24	24	24	
母動物	死亡数	0	0	0	0	
	一般状態	—	—	—	—	
	体 重	—	—	—	↓*	
	摂 餌 量	—	—	—	—	
	妊 娠 期 間 (日) ^{a)}	22.0±0.3	22.0±0.2	22.0±0.1	22.0±0.1	
	着 床 数 ^{a)}	14.7±3.1	15.2±1.3	15.0±1.3	15.0±1.3	
	分娩異常	—	—	—	—	
出生児	出 産 率 (%) ^{b)}	100	100	100	100	
	出生時死亡児数 及び率 (%)	13(4.2)†	8(2.4)	16(5.1)	8(2.5)	
	出 生 率 (%) ^{c)}	87.5	92.9*	89.7	89.2	
	4日生存率 (%) ^{d)}	84.4	84.0	94.6	90.8	
	離 乳 率 (%) ^{e)}	96.2	94.1	99.4	95.5	
	性 比 (♂/♀) ^{f)}	1.03	1.14	0.98	1.10	
	体 重	♂ ♀	— —	— —	↑* (生後28日) —	— —
F1	外表分化 (頻度)	精巣下降 臍開口	— —	— —	↑** (生後21日) —	↑** (生後21日) ↓* (生後35日)
	外表異常 (%)	痕跡尾	1 (0.3)	0	0	1 (0.3)
	内臓観察 所見 ^{g)}	出生時 死亡児及び 死亡児	出生時死亡児に胸腺頸部残留、心室中隔欠損、重複奇静脈、左臍動脈を、死亡児に心室中隔欠損、重複奇静脈、腎盂拡張、左臍動脈を散在して認めたが、発現率に有意差はなかった。			

表二-19 ラット周産期及び授乳期投与試験-II (追加試験) (続き)

投与量 (mg/kg/日)		対 照	1.25	2.5	5
出 生	交尾率 (%) ^{h)}	100.0 (20/20)	100.0 (20/20)	95.5 (21/22)	95.2 (20/21)
	受胎率 (%) ⁱ⁾	90.0 (18/29)	95.0 (19/20)	95.2 (20/21)	100.0 (20/20)
児	妊娠期間中体重	—	—	—	—
	帝王切開所見	—	—	—	—
F1	帝王切開時剖検所見	—	—	—	卵巣重量↓* (片側)
毒性学的無影響量		母動物, 出生児共に2.5mg/kg/日 (前試験結果を含む)			

—: 特記すべき所見なし、 ↑: 高値、 ↓: 減少、低値 a): 平均値 ± 標準偏差

b): (生児出産雌数/妊娠雌数) x 100 c): (出産生児数/着床痕数) x 100

d): (出生後4日生存児数/出生時生存児数) x 100

e): (離乳時生存児数/出生後4日調整後生存児数) x 100 f): 雄生存児数/雌生存児数

g): 内臓観察臓器; 頭部 (舌、口蓋、鼻中隔、眼瞼、角膜、網膜、嗅脳、硬膜、大脳、間脳、側脳室、第3脳室、中脳、内耳)、頸部 (食道、甲状腺、気管、頸動脈)、胸部 (胸腺、肺、横隔膜、心臓、大血管)、腹部 (肝臓、胃、脾臓、膵臓、腸管、副腎、腎臓、腎盂、尿管、膀胱、生殖器、臍動脈)

h): (交尾動物数/同居動物数) x 100 i): (妊娠動物数/交尾動物数) x 100

*: p<0.05 (t 検定) **: p<0.05, **: p<0.01 (Wilcoxon検定)

† 対照群の出生時死亡児数及び率 (%) は試験施設における背景値範囲内であった。

6. 生殖に及ぼす影響

(1) ラットにおける繁殖試験 (FDA方式)

ラットに、ミルナシプランを雄には交配前70日及び交配期間中(最長14日間)、雌には交配前14日間、交配期間中投与し、さらに約半数には妊娠20日目まで、残りの半数には分娩及び授乳期間中(21日間)経口投与した。約半数の母動物を妊娠20日目に屠殺して胎児の臓器および骨格の観察を行い、残りの母動物はそのまま分娩させて新生児の発育および生殖能力に対する検討を行った(図二-1)。離乳後は各同腹児より雌雄各2匹のF1哺育児を選別し、80~90日の生育期間後に交配させた。受胎したF1雌は妊娠20日に屠殺した。実験条件並びに得られた成績を表二-20に示した。

雄親動物について、死亡は交配前に5mg/kg/日で1例、60mg/kg/日で4例に認められた。体重では15mg/kg/日で軽度の、60mg/kg/日で顕著な体重増加抑制が認められた。雌親動物について、死亡は交配前に15mg/kg/日で1例、60mg/kg/日で3例に、妊娠中に5mg/kg/日と60mg/kg/日で各1例に、授乳中に60mg/kg/日で1例に認められた。体重では60mg/kg/日で増加抑制が認められた。

胎児について、催奇形性は認められなかった。

出生児F1について60mg/kg/日で分娩率、出生数が減少し、出生時死亡児数が増加した。

出生児F1について周産期、授乳期の死亡率の増加が15mg/kg/日では軽度に60mg/kg/日では顕著に認められた。また60mg/kg/日では授乳期間中に哺育児に軽度の体重増加抑制が認められた。発育、その他には機能などに異常は認められず、生殖能力にも影響は認められなかった。

7. 依存性

(1) 急性行動効果

1) 方法

雌雄各1匹のカニクイザル(2~4歳、体重2.72~4.43kg)に、ミルナシプラン25、50、75及び100mg/kgをそれぞれ経口的に単回経口投与し、行動変化を観察した。

2) 成績

25mg/kgで立毛が投与後30~40分間観察されたが、50mg/kgでは何ら変化を認めなかった。75mg/kgでは雌でむかつき、嘔吐及び流涎が、雄で眼瞼下垂、自発運動減少及び落ち着きのなさが投与後90分間観察された。100mg/kgにおいては立毛、嘔吐、自発運動減少及び落ち着きのなさが投与後3時間みられた。体温が75及び100mg/kgの雌雄で低下し、低用量においてもその傾向が認められた。

(2) 身体依存性試験

1) 方法

雌雄各3匹のカニクイザル(2~4歳、体重2.23~4.28kg)を実験に用いた。動物はミルナシプラン投与群(雌雄各2匹)及びジアゼパム投与群(雌雄各1匹)に分け、それぞれ最初の2週間は50mg/kg、5.0mg/kg、後半の2週間は75mg/kg、10mg/kgに増量し、1日2回4週間経口投与した。1週間の休業後、更に4週間それぞれ75mg/kg、10mg/kgを同様に投与した。なお、ジアゼパム群は後半の2週間は15mg/kgに増量した。その後1週間休業して動物の禁断症状を観察した。また、ベンゾジアゼピン系拮抗薬Ro15-1788を投与4週及び9週目に単回投与して退薬症状の進行を観察した。

2) 成績

①初回4週間投与

ミルナシプラン投与群では散瞳が投与1~8日目にかけて全例に観察され、嘔吐及び眼瞼下垂が散見された。しかしながら体重及び体温には変化を認めなかった。ジアゼパム投与群では全例に中枢神経抑制及び歩行失調が観察され、体重増加及び体温低下を認めた。Ro15-1788投与により、ミルナシプラン投与群では4例中1例に軽度の立毛を認めた以外は退薬症状を示さなかった。これに対しジアゼパム群では全例に振戦、運動機能障害及び嘔吐からなる中等度の退薬症状を示した。

②2回目4週間投与

ミルナシプラン投与群では眼瞼下垂が全例に散見され、嘔吐が投与再開時に一過性に認められた。また軽度の体重増加がみられたが、体温には変化を認めなかった。ジアゼパム投与群ではほぼ全例に運動失調、また全例に自発運動減少及び落ち着きのなさが観察され、15mg/kgに増量後はそれらに加え1例に無関心並びに攻撃性がみられた。また体重増加及び体温の明らかな低下が観察された。Ro15-1788投与により、ミルナシプラン投与群では4例中3例に軽度の立毛が認められ、ジアゼパム投与群では全例に振戦及び運動機能障害、また1例に嘔吐からなる中等度の退薬症状を示した。

③休業期間(5及び9週目)

ミルナシプラン投与群では5週目に軽微な立毛1例、9週目に立毛を、また立毛、不安、攻撃性及び発声を示したものがそれぞれ1例にみられた以外は特記すべき症状を示さなかった。また、体重は減少傾向ないし減少がみられたが、体温はわずかな低下であった。ジアゼパム投与群では、雌雄共不安、振戦、刺激過敏及び運動機能障害からなる軽度ないし中等度の退薬症状を示した。更に体重は減少したものの、体温については変化を認めなかった。

3) 結論

立毛はサルでしばしば認められる所見であり、他の症状が現れていないことから退薬症状ではないと考えられた。また、ミルナシプラン投与群の休薬期間中に不安、攻撃性及び発声が1例見られたが、他の3例には発現がなく、ベンゾジアゼピン系薬物で一般に発現する症状と出現状況が異なること及びRo15-1788処置で退薬症状がみられないことから身体依存形成ではないと判断した。

よってミルナシプランはカニクイザルに対して身体依存性を有しないと考えられた。

(3) 精神依存性試験

1) 方法

雌雄各2匹のカニクイザル(2~4歳、体重2.59~3.70kg)に静脈カニューレを埋め込み、投与装置を介してミルナシプラン0.125、0.25及び0.5mg/kgをそれぞれ段階的に連続自由摂取させ、一般状態を観察した。更に0.5mg/kg投与後なお自己投与のみられない場合、そのサルにミルナシプラン0.5mg/kgの強制投与を行い、再び一般状態を観察した。また、別の投与装置より対照溶液(0.9%生理的食塩水)のみを投与できるようにした。

2) 成績

各投与量において、いずれの動物も薬物欲求症状を示さなかった。0.5mg/kg強制投与において、雄1例に投与期間終了直前にレバー押し行動の増加が観察された。

3) 結論

0.5mg/kg強制投与において、終了直前に観察されたレバー押し行動の増加は、同時に対照溶液と接続されたレバー押し行動の増加も伴っており、更に自己投与の頻度は強制投与を中止することにより減少したことから、精神依存性を示すものではないと考えられた。よってミルナシプランはカニクイザルに対して精神依存性を有しないと考えられた。

(4) まとめ

サルを用いてミルナシプランの身体依存性及び精神依存性について検討したが、いずれにおいても薬物依存性を示唆する結果は認められず、ミルナシプランは薬物依存性を有しないものと考えられた。

8. 抗原性

ミルナシプランの抗原性を、(1)マウス-ラット系受身皮膚アナフィラキシー反応(PCA反応)、(2)モルモットを用いた全身アナフィラキシー反応(ASA反応)及びPCA反応、並びに(3)マウス、モルモットの感作血清を用いた受身赤血球凝集反応(PHA反応)により検討した。実験条件並びに得られた成績を表二-21~23に示した。

試験結果から、ミルナシプラン単独感作群、ミルナシプラン単独惹起群では陰性であり、ミルナシプランの感作原性及び誘発原性は認められなかった。

表二-21 マウス-ラット系PCA反応試験

動物種 : BALB/cマウス 8週齢 雄 24.4~27.4g SDラット 10週齢 雄 311~380g			
群	免疫投与方法	検出抗原	成績 ¹⁾
I	ミルナシブラン 50 μ g/0.2ml/匹 経口投与(3回/週x3)	ミルナシブラン-OVA 1mg/ml/匹 静脈内投与	0/6
II	ミルナシブラン 250 μ g/0.2ml/匹 経口投与(3回/週x3)	同上	0/6
III	ミルナシブラン-OVA+Alu 10 μ g/0.3ml/匹 皮下投与(1回/3週x3)	ミルナシブラン-OVA 2mg/ml/匹 静脈内投与	0/6
IV	ミルナシブラン-OVA+Alu 10 μ g/0.1ml/匹 皮下投与(1回/3週x3)	同上	0/6
V	OVA+Alu 10 μ g/0.3ml/匹 皮下投与(1回/3週x3)	OVA 1mg/ml/匹 静脈内投与	6/6

1) 陽性匹数/検査匹数

OVA:卵白アルブミン Alu:水酸化アルミニウムゲル ミルナシブラン-OVA:ミルナシブラン卵白アルブミン結合体

表二-22 モルモットを用いたASA及びPCA反応試験

動物種 : Hartleyモルモット 6週齢 雄 413~465g				
群	免疫投与方法	検出抗原	成績 ¹⁾	
			ASA	PCA
I	ミルナシブラン 1mg/2ml/匹 経口投与(3回/週x3)	ミルナシブラン-OVA 2mg/ml/匹 静脈内投与	0/6	0/6
II	ミルナシブラン 5mg/2ml/匹 経口投与(3回/週x3)	同上	0/6	0/6
III	ミルナシブラン-OVA+FCA 2mg/0.5ml/匹 皮下投与(1回/2週x3)	同上	0/6	0/6
IV	OVA+FCA 2mg/0.5ml/匹 皮下投与(1回/2週x3)	OVA 2mg/ml/匹 静脈内投与	6/6	6/6

1) 陽性匹数/検査匹数 OVA:卵白アルブミン FCA:Freund完全アジュバント

ミルナシブラン-OVA:ミルナシブラン卵白アルブミン結合体

表二-23 マウス、モルモットの感作血清を用いたPHA反応試験

動物種 : BALB/cマウス 8週齢 雄 24.4~27.4g Hartleyモルモット 5週齢 雄 340~364g			
群 ¹⁾	被験血清(マウス)	血球感作抗原	成績 ²⁾
I	マウス-ラット系PCA反応で 得られたマウス血清	ミルナシブラン-OVA 4ng/ml	0/6
II			0/6
III			6/6
IV			6/6
V			6/6
群 ¹⁾	被験血清(モルモット)	血球感作抗原	成績 ²⁾
I	モルモットASA、PCA反応で 得られた血清	ミルナシブラン-OVA 8ng/ml	0/6
II			0/6
III			6/6
IV			6/6

1) 各群は試験(1)、(2)の群に同じ 2) 陽性匹数/検査匹数

ミルナシブラン-OVA:ミルナシブラン卵白アルブミン結合体

9. 変異原性

細菌を用いる復帰突然変異試験、哺乳類の培養細胞を用いる染色体異常試験、マウスを用いる小核試験を実施した。

(1) 復帰突然変異試験

実験条件並びに得られた成績を表二-24に示した。指示菌として大腸菌のWP2uvrA⁻株、ネズミチフス菌のTA98、TA100、TA1535、TA1537株を使用した。ミルナシブランはいずれの用量でも復帰変異コロニー数の陰性対照の2倍以上の、用量に伴った増加を示さなかった。

表二-24 細菌を用いる復帰突然変異試験

試験方法		プレインキュベーション (48時間培養)					
直 接 法	試験物質	用量 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	復帰変異コロニー数/プレート (2枚の平均)				
			TA100	TA1535	WP2uvrA ⁻	TA98	TA1537
直 接 法	蒸留水	—	56	3.5	140(13) ^{b)}	23(18) ^{b)}	6.5
	ミルナシ ブラン	313	49	4.5	157(14.5)	29.5(19.5)	12.5
		625	41	9.5	159(14)	18.5(17.5)	5.5
		1250	47.5	8.5	128(15)	17.5(20)	7.0
		2500	38.5	4.5	134(17.5)	18(13)	9.0
		5000	34.5	7.5	133(13)	21(16)	6.5
	AF2 ^{a)}	0.01	878.5	—	819.5(123.5)	—	—
		0.1	—	—	—	44(258)	—
		SA ^{a)}	0.5	—	246.5	—	—
	ICR ^{a)}	1	—	—	—	—	1571
代 謝 活 性 化 法	蒸留水	—	55	9.5	142.5(18)	20.5	10.5
	ミルナシ ブラン	313	61	9	123.5(16)	21.5	11.5
		625	61	11	154.5(18.5)	16.5	12
		1250	61.5	5	120.5(16.5)	23.5	7
		2500	45.5	6	136(17)	24.5	10
		5000	36.5	6	143.5(11)	21.5	7
	2AA ^{a)}	0.5	—	—	—	536	—
		1	816	—	—	—	—
		2	—	177.5	—	—	305
		20	—	—	871(452.5)	—	—

a) 陽性対照物質 (溶媒: DMSO(ジメチルスルホキシド)) —: 実施せず

b) 追試成績: WP2uvrA⁻では自然復帰変異率が高かったため、TA98では陽性対照物質における変異率が低かったため、それぞれ追加試験を行った。

AF2: 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド SA: アジ化ナトリウム

ICR191: ミュタゲン ICR191 2AA: 2-アミノアントラセン

(2) 染色体異常試験

実験条件並びに得られた成績を表二-25に示した。指示細胞としてチヤインズ・ハスター Don D-6培養細胞系を使用した。ミルナシブランは、直接法、代謝活性化法のいずれの場合においても溶媒対照群における出現率と比較し、用量の増加に伴った有意な増加を示さなかった。

表二-25 哺乳類の培養細胞を用いる染色体異常試験

使用細胞		チャイニーズ・ハムスター由来 Don D-6細胞					
直 接 法	試験物質	濃度 ($\mu\text{g/ml}$)	暴露時間 (hr)	観察 細胞数	構造異常細胞 出現頻度(%)		倍数性細胞 出現頻度(%) ^{b)}
					TAG ^{c)}	TA ^{d)}	
直 接 法	蒸留水	—	16	100	9	7	—
	ミルナシ プラン	31.25			5	5	—
		62.5			6	5	—
		125			8	8	—
		250			9	8	—
	EMS ^{e)}	500	50		23	—	
	蒸留水	—	32		6	5	2.75
	ミルナシ プラン	31.25			7	5	2.25
		62.5			6	5	2.5
		125			8	7	1.25
250		8		7	1.5		
EMS ^{e)}	500	76	55	3.75			
代 謝 活 性 化 法	S 9 Mix 非 添 加						
	蒸留水	—	4-16 ^{e)}	100	6	6	—
	ミルナシ プラン	50			7	7	—
		100			6	5	—
		200			5	3	—
		400			7	6	—
	B(a)P ^{e)}	100			7	6	—
	S 9 Mix 添 加						
	蒸留水	—	4-16 ^{e)}	100	8	6	—
	ミルナシ プラン	50			5	4	—
		100			11	10	—
		200			9	7	—
		400			8	7	—
	B(a)P ^{e)}	100			25	14	—

a) 陽性対照物質、EMS:イチルメタンサルネト B(a)P:アゾ(ア)ピレン(溶媒:ジメチルスルホキシド)
 b) 観察細胞数は400、c) TAG(ギャップを含む)、d) TA(ギャップを除く)
 e) 回復時間 ー:実施せず

表二-26 マウスを用いた小核試験

使用動物		Swiss Randomマウス、雌雄、各5匹/群				
投与量(mg/kg)		19、63および190 (190はLD ₅₀ の80%)				
投与経路・回数		強制経口投与、単回				
対照物質		シクロフォスファミド、水、腹腔内投与				
標本作成時期		24、48および72時間				
試験群		水	シクロフォスファミド	ミルナシプラン		
投与量(mg/kg)		—	100	19	63	190
小核を有する 多染性赤血球 出現頻度(%) ^{a)}	24時間	0.30±0.049	2.31±0.284**	0.27±0.065	0.41±0.090	0.24±0.047
	48時間	—	—	0.23±0.037	0.54±0.107	0.25±0.081
	72時間	—	—	0.23±0.050	0.34±0.091	0.20±0.041
全赤血球に対 する網状赤血 球出現頻度(%)	24時間	75	65	65	65	65
	48時間	—	—	65	55	50
	72時間	—	—	55	60	80

ー:実施せず a) 平均±標準偏差 ** : p<0.01 (t 検定)

(3) マウス小核試験

実験条件並びに得られた成績を表ニ-26に示した。ミルナシブランは、顕著な骨髓細胞の増殖抑制作用も、溶媒対照群における小核出現率と比較し有意な増加も示さなかった。

(4) まとめ

以上の成績から、ミルナシブランは変異原性を有しないものと考えられた。

10. がん原性

(1) マウス104週間がん原性試験

マウスを、ミルナシブランの1日当たりの摂取量が10、30及び100mg/kgとなる割合に混和した飼料で、104週間連続飼育した。なお、投与期間は80週での生存率が高かった(63~90%)ため104週間に延長した。対照群は母集団から動物を抽出して実験群を構成した際に、抽出に片寄りがなかったことを検証するために2群を設定し、それらの動物にはミルナシブラン無添加飼料を与えた。実験条件並びに得られた成績を表ニ-27に示した。

総計304例(雄180、雌124)が途中死亡あるいは殺処分された。一般状態、体重、摂餌量に影響は認められなかった。

血液学的検査、血液化学的検査にもミルナシブランによると考えられる影響は認められなかった。

剖検所見に特記すべき変化はなかった。臓器重量では100mg/kg/日で肝臓の重量が軽度の増加傾向を示した。病理組織学的検査では、非腫瘍性病変及び腫瘍性病変が対照群を含む各投与群に認められたが、いずれもこの系統のマウスで自然発生が知られているもので、その程度も高用量群と対照群に差はなかった(表ニ-28)。

以上のことから、ミルナシブランにこの試験系でのがん原性は示唆されなかった。

(2) ラット104週間がん原性試験

ラットを、ミルナシプランの1日当たりの摂取量が5、15及び50mg/kgとなる割合に混和した飼料で104週間連続飼育した。対照群は母集団から動物を抽出して実験群を構成した際に、抽出に片寄りがないことを検証するために2群を設定し、それらの動物にはミルナシプラン無添加飼料を与えた。実験条件並びに得られた成績を表二-29に示した。

総計246例（雄136、雌110）が途中死亡あるいは殺処分された。一般状態には特記すべき変化はなかった。体重は投与初期に全投与群の雄で、その後は15及び50mg/kg/日で対照群を下回った。摂餌量は50mg/kg/日で対照群を下回った。

血液学的検査に影響はみられなかった。血液化学的検査ではASTとALTの減少が、52週から用量の増加とともに認められた。また、104週に15及び50mg/kg/日の雄でコレステロールの低値が認められた。

病理学的検査では、剖検所見には特に変化はなかった。臓器重量では、5及び50mg/kg/日の雄で甲状腺の絶対重量増加が認められた。病理組織学的検査では、非腫瘍性病変として肝臓での小葉中心性肝細胞空胞化が50mg/kg/日の雄の約半数に、好酸性細胞小増殖巣が15及び50mg/kg/日の雌雄に認められた。腫瘍性病変としては、甲状腺C細胞腺腫が対照群と比べ50mg/kg群の雌で低頻度に、雄では有意に高頻度で認められた。しかし背景値（表二-31）と比べると、この試験の対照群の甲状腺C細胞腺腫の出現頻度は異常に低いために有意な差が生じたものと考えられた（表二-30）。

以上のことから、ミルナシプランにこの試験系でのがん原性は示唆されなかった。

(3) まとめ

マウス、ラットでのがん原性試験の成績から、ミルナシプランはがん原性を有しないものと考えられた。

1 1. 主代謝物、分解物及び光学異性体の毒性

主要な代謝物の脱エチル体、代謝物・分解物の環化体について、ラットに各被験物質を単回経口あるいは静脈内投与し、急性毒性を検討した。実験条件並びに得られた成績を表二-32に示した。なお、環化体は0.5%メチルセルロースに懸濁または生理食塩液に溶解し、脱エチル体は生理食塩液に溶解し、ミルナシプラン、光学異性体のd体及びl体は注射用水に溶解し投与した。

各被験物質にみられた共通所見はミルナシプランの急性毒性で認められたものであり、被験物質に起因するものと考えられた。死因は呼吸不全と推定された。

脱エチル体で認められた症状は比較的早期に消失した。

環化体の経口投与では自発運動減少が投与後比較的早期に発現した。また、高用量ではこれらが持続する傾向を示したが、これが体重増加に影響したものと推定された。静脈内投与では、特記すべき所見はみられなかった。脱エチル体、環化体ともミルナシプランに比べ毒性は弱かった。なお環化体の生成過程でジエチルアミンが生じるが、ジエチルアミンの毒性は低く、ラットにおけるLD₅₀値は経口投与で540mg/kgであった(表-4)。

d体、l体ともミルナシプランと同程度の毒性であった。

表二-32 ラットにおける急性毒性試験成績

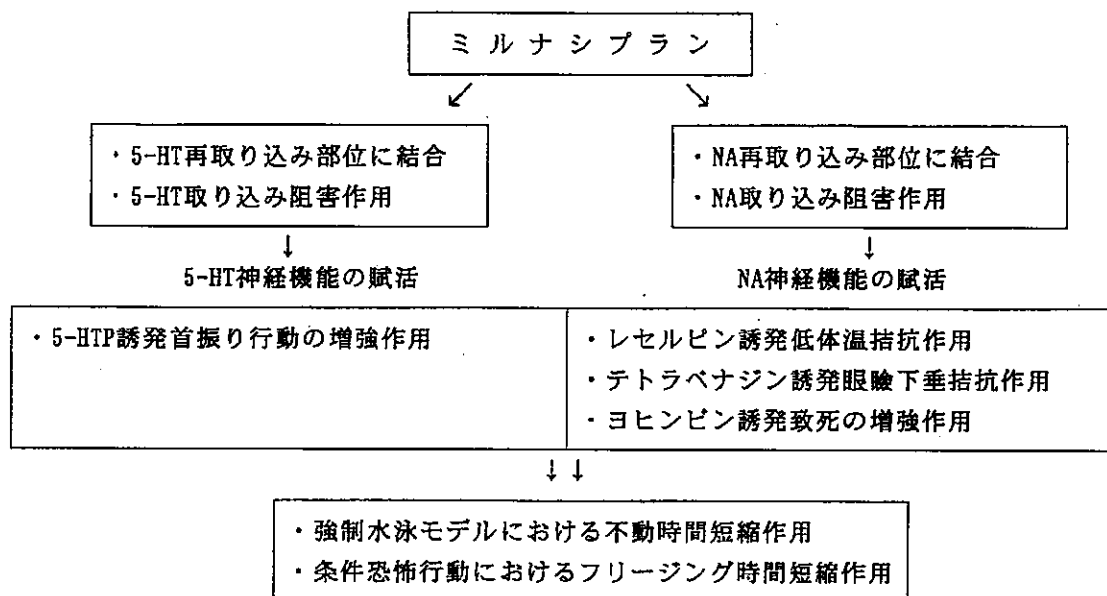
被験物質	動物種 (系統、週齢、 体重)	投与 経路	投与量 (mg/kg)	性、 例数	成績		
					概略の致死量 (mg/kg)	特記所見	
脱エチル体 (代謝物)	ラット (Slc: Wistar, 5週齢 体重 ♂:123-151 ♀:102-116)	静脈内 (4.5~7 ml/kg)	32 40 50	♂5 ♀5	50以上	一過性脱力症状	
環化体 (分解物 及び 代謝物)	ラット (Slc: Wistar, 5週齢 体重 ♂:105-121 ♀:87-100)	経口 (6.6 ~12.5 ml/kg)	330 500 750	♂5 ♀5	750	流涙、半眼、閉眼、 うずくまり、歩行異 常、傾眠傾向、もだ え、転倒、頻呼吸、 呼吸緩徐、体重増加 抑制	
	ラット (Slc: Wistar, 5週齢 体重 ♂:129-155 ♀:100-123)	静脈内 (6.43 ~10 ml/kg)	45 56 70	♂5 ♀5	70以上	なし	
光学 異性体	ラット (Slc: Wistar, 5週齢 体重 ♂:102-129 ♀:84-98)	経口 (13.4 ~30 ml/kg)	134 200 300	♂5 ♀5	ミルナシプラン	眼瞼下垂、自発運動 減少、痙攣、発赤	
					200	d体	眼瞼下垂、自発運動 減少、痙攣、発赤、 7/7-7
					200	l体	自発運動減少、痙攣

ホ. 薬理作用

1. 効力を裏付ける試験

総 括

ミルナシプランの効力を裏付ける薬理試験成績のまとめを、図ホー1、表ホー1～7に示した。

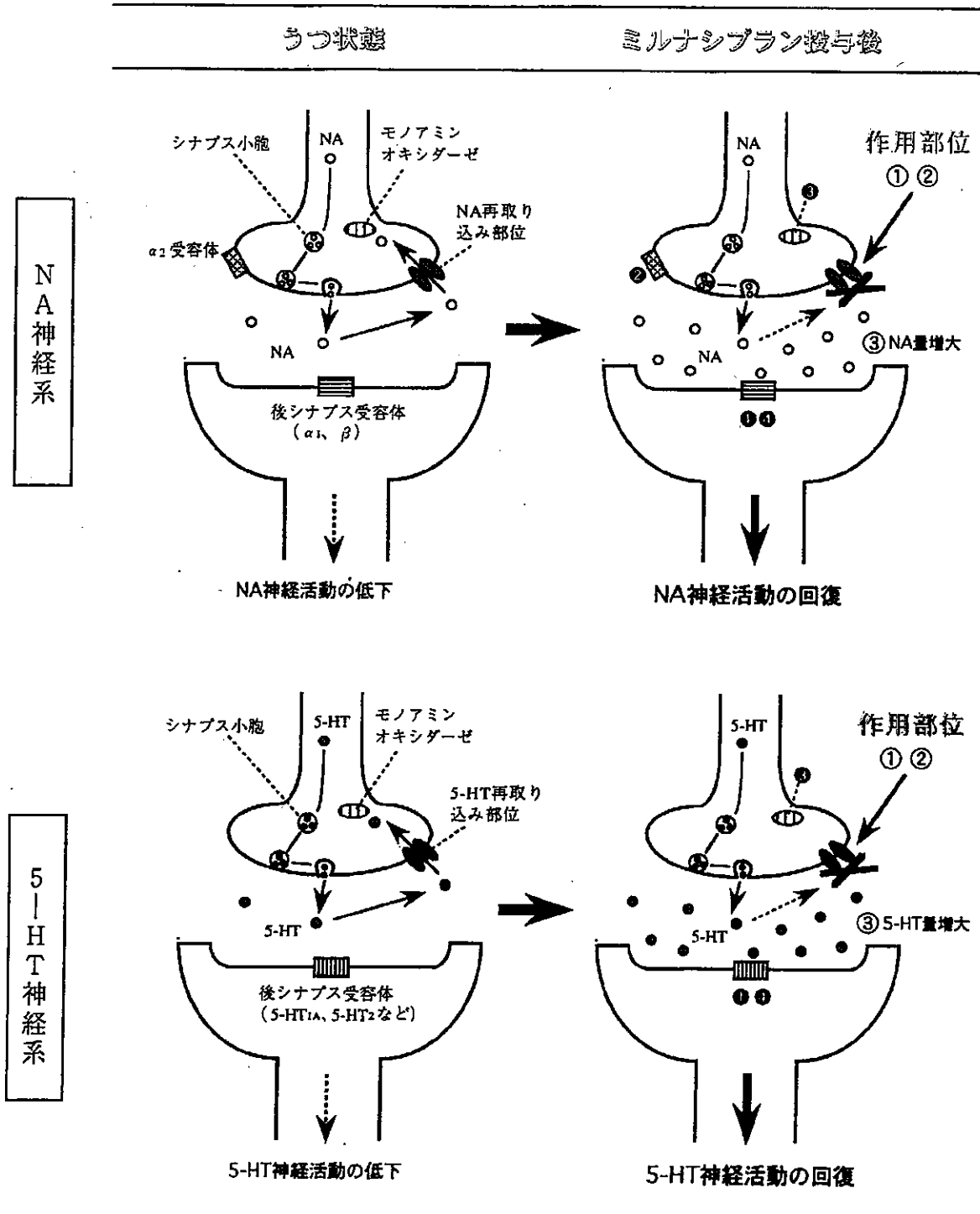


図ホー1 ミルナシプランの効力を裏付ける薬理試験成績のまとめ

(1) 効力を裏付ける薬理試験

ミルナシプランの抗うつ薬としての効果を裏付けるために、抗うつ薬の薬効評価モデルにおいて、その作用を検討した。薬物誘発による諸症状を指標とした試験では、1)マウスを用いたレセルピン2mg/kg及び5mg/kg投与により誘発した低体温試験において、各々1mg/kg以上及び3mg/kg以上の経口投与で有意な低体温拮抗作用、2)マウスを用いたテトラベナジン誘発眼瞼下垂試験において、1mg/kg以上の経口投与で有意な眼瞼下垂拮抗作用、3)マウスを用いたヨヒンビン誘発致死試験において、10mg/kg以上の経口投与で有意なヨヒンビン誘発致死増強作用、4)5-HTP誘発首振り行動に対し、30mg/kgの経口投与で有意な増強作用を示した。これらの結果から、ミルナシプランはモノアミン神経系(主にノルアドレナリン(NA)及びセロトニン(5-HT)神経系)を賦活することが示唆された。また、動物の行動を指標とした試験では、ラットあるいはマウスを用いた強制水泳試験において、絶望状態の指標である不動時間を、30mg/kg以上の経口投与で有意に短縮し、また、恐怖・不安の指標であるラットの条件恐怖行動(フリージング行動)に対し、60mg/kgの経口投与で有意なフリージング行動時間短縮作用を示した。効力を裏付けるこれらの試験における同効薬との比較ではミルナシプランは、レセルピン誘発低体温及びヨヒンビン誘発致死試験においてイミプラミンより低用量、テトラベナジン誘発眼瞼下垂試験では同用量からモノアミン神経系に対する賦活作用を示し、また強制水泳モデルの不動時間及び条件恐怖行動におけるフリージング行動時間に対してイミプラミンより低用量(条件恐怖行動:イミプラミンは無効)、ミアンセリンと同用量で有意な短縮作用を示すことが明らかとなった。

以上、ミルナシブランは、イミプラミンなどの抗うつ薬の効果発現に大きく貢献していると考えられているモノアミン神経系に対する賦活作用をイミプラミンより低用量又は同用量で示すと共に、行動薬理学的変化を指標とした抗うつ薬評価モデルにおいても絶望あるいは恐怖状態の指標となる動物行動の時間をイミプラミンより低用量、ミアンセリンと同用量で短縮したことから、抗うつ薬としての有用性が期待された。

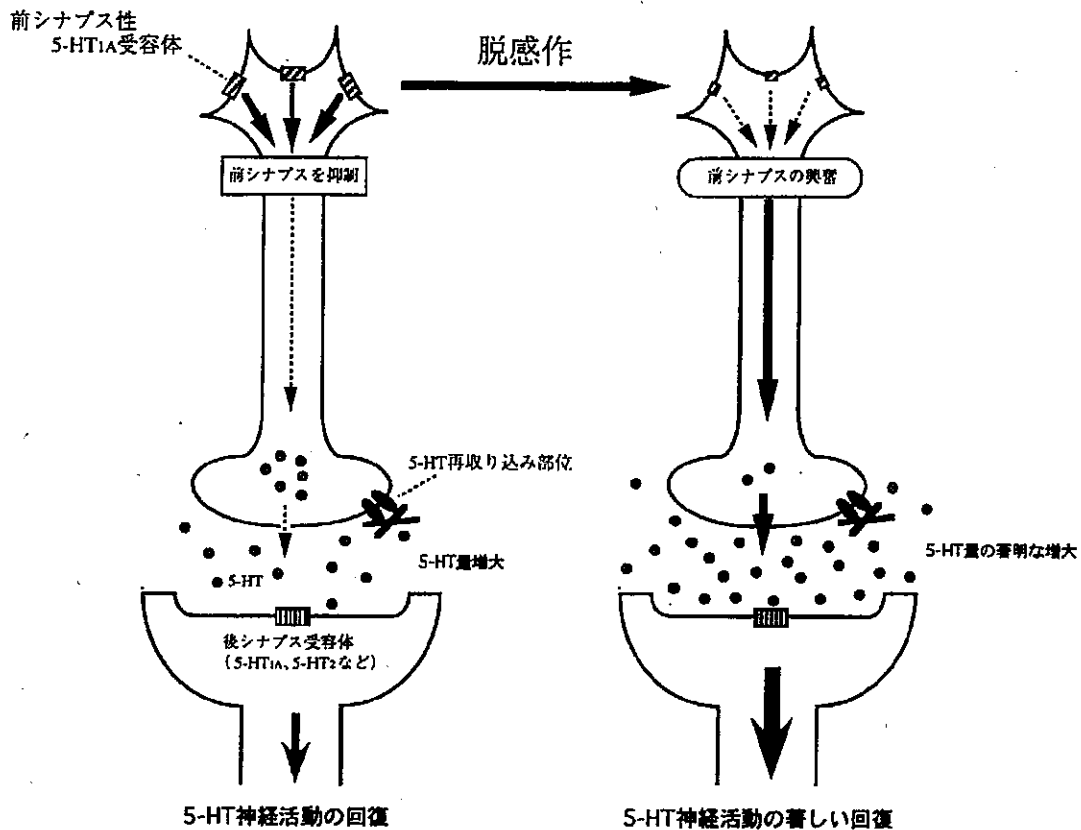


図中①～③は、ミルナシブランが薬理作用を示した事項
 図中●～●は、ミルナシブランが薬理作用を示さなかった事項

図ホー2 ミルナシブランの作用機序(1)

単回投与^{注)}

反復投与



注) 図ホ-2 5-HT神経系、ミルナシプラン投与後に相当する。

図ホ-3 ミルナシプランの作用機序(2)

(2) 作用機序

ミルナシプランのモノアミン神経系に対する効果を系統的に検証した。ミルナシプランは、ラット脳ホモジネート標品においてNA及び5-HTの再取り込み部位に対し各々Ki値で31nM、8.5nMの親和性を示し(図ホ-2-①)、またラット大脳皮質シナプトソーム標品においてNA及び5-HTの取り込みを各々IC₅₀値で29.6nM、28.0nMで阻害した(図ホ-2-②)ことから、NA及び5-HTの再取り込み部位に結合し、その取り込みを阻害することが示唆された。各種脳内受容体などへの親和性がないことから、両取り込み部位への選択性が確認された。ミルナシプランのNA及び5-HTの再取り込み部位への親和性はイミプラミンとのKi値の濃度比で1.7、1.4、取り込み阻害能は、イミプラミンとのIC₅₀値の濃度比で1.3、1.5 (Na⁺依存性取り込み)、0.4、2.9 (Na⁺依存性+Na⁺非依存性取り込み)であった。

In vivo においてラット前頭前野内側部の細胞外NA及び5-HT濃度の変化を測定したところ、ミルナシブランは腹腔内(10mg/kg)及び経口(10, 30mg/kg)いずれの投与経路でもNA及び5-HTの細胞外濃度を有意に増加させたことから、ミルナシブランによりシナプス間隙でのNA及び5-HT濃度が増大することが示唆された(図ホ-2-③)。細胞外NA及び5-HT濃度増加作用は、イミプラミンの同用量の最大変化率との比で腹腔内投与では各々0.9及び1.4、経口投与(30mg/kg)では各々0.9及び2.0であった。ミルナシブランは、NAと5-HTのどちらの濃度も同程度増加させた(30mg/kg経口投与での最大変化率は各々352%、317%)。しかし、イミプラミンは経口投与では5-HTの濃度増加がNAの約1/2と弱く、ミルナシブランとは機序に相違が認められた。これらの検証から、ミルナシブランは「NA及び5-HT再取り込み部位に選択的に作用して両部位に阻害効果を示す、しかも臨床投与経路からの投与によってもシナプス間隙でのNA及び5-HT濃度を同程度増大させる」というSNRI(選択的セロトニン・ノルアドレナリン再取り込み阻害薬)としての薬理学的性質を有することが示唆された。

さらに、臨床での効果発現時期に関する機序を検証した。ミルナシブラン(30mg/kg)は、前シナプス性5-HT神経の5-HT_{1A}受容体を7及び14日間の反復投与により脱感作させた(図ホ-3)。しかし、後シナプスの5-HT_{1A}受容体機能には影響を及ぼさなかった。よって、ミルナシブランは7日という短期間の反復投与により前シナプスからの5-HT遊離の増加という新たな薬効が発現し、本来持っている5-HT取り込み阻害の効果及びそれに伴う5-HT神経系の賦活効果がさらに高められることが示唆された。しかも、本作用はイミプラミン(30mg/kg)の14日間投与では認められなかったことから、臨床ミルナシブランの抗うつ効果がイミプラミンよりも早期に発現したことに関係していると考えられる。

一方、ミルナシブランは、イミプラミンあるいはミアンセリンが薬理作用を示した以下の事項に対しては薬理作用を示さなかった。

1) NA及び5-HTの後シナプス受容体(イミプラミン: α_1 、5-HT₂、ミアンセリン: 5-HT₂、 α_1 、5-HT_{1A}) (図ホ-2-①)、自己受容体(ミアンセリン: α_2) (図ホ-2-②)及び脳内の各種受容体(イミプラミン: H₁、m-ACh、シグマ、ミアンセリン: H₁、D₁-like)への親和性(IC₅₀<10³nM)。

2) モノアミンオキシダーゼ(MAO)A及びB活性に対する阻害作用(イミプラミンは、A:>10⁻⁵M, B:>10⁻⁶M、ミアンセリンは、A:>10⁻⁴M, B:>10⁻⁵Mで各々10%以上阻害)(図ホ-2-④)。

3) イミプラミンに代表される三環系抗うつ薬の性質として知られている反復投与(14日間)による β 及び5-HT₂受容体数の減少(図ホ-2-⑤)。

よって、ミルナシブランは、モノアミンの代謝酵素や脳内のNA、5-HT及び各種受容体のいずれにも影響を及ぼさなかったことから、イミプラミンやミアンセリンとは異なりNA及び5-HTの再取り込み部位に選択的に作用する薬物であることが示唆された。また、ミアンセリンは α_2 受容体の阻害によるNA放出の促進が主な機序として報告されていることから、ミルナシブランとは作用機序を異にすると考えられた。

以上、ミルナシブランは、「NA及び5-HTの両再取り込み部位に結合してその取り込みを阻害することを一次作用点として、シナプス間隙でのNA及び5-HT濃度を増大させてNA及び5-HT神経系を同程度賦活する」、「第一世代(イミプラミン)や第二世代(ミアンセリン)よりも作用部位に対する選択性が高い」という2つの特徴からSNRIであることが示唆された。

さらに7日間反復投与により前シナプス性5-HT_{1A}受容体脱感作による5-HT遊離増加とそれに伴う5-HT神経の賦活という新たな薬効が認められた。これが臨床ミルナシブランの抗うつ効果発現機序及びイミプラミンより早期に臨床効果が発現する機序として考えられた。

うつ状態ではモノアミン神経系(主にNA及び5-HT)の活動の低下が指摘されている。ミルナシブランは選択的にNA及び5-HT神経系に作用してその活動を同程度賦活することにより、うつ状態で低下しているNA及び5-HT神経系の活動をともに回復させる(特に反復投与では早期に5-HT神経を一層賦活させる)という従来の抗うつ薬とは異なる機序により優れた抗うつ効果を発揮すると考えられた。

(3) 選択的セロトニン再取り込み阻害薬(SSRI)との比較試験

ミルナシプランの主な薬理学的特性を最近海外の治療指針において第一選択薬として記載されたSSRIと比較検討した。

ミルナシプランの最も大きな作用機序の特性である「反復投与による前シナプス性5-HT神経の5-HT_{1A}受容体脱感作作用」をSSRI(フルボキサミン)で検証したが、フルボキサミンは60mg/kg(ミルナシプランの倍量)7日間の反復投与でも5-HT_{1A}受容体を脱感作させなかった。よって、ミルナシプランはフルボキサミンより早期に5-HT_{1A}受容体の脱感作を引き起こし、5-HT遊離の増大に伴う5-HT神経系の賦活効果をもたらすことが示唆された。

抗うつ薬の薬効評価モデルによる検証では、ラット、マウスを用いた強制水泳試験においてフルボキサミンは絶望状態の指標である不動時間に対してミルナシプランの倍量でもほとんど作用を示さなかった。しかし、不安・恐怖の指標であるラットの条件恐怖行動(フリージング行動)に対しミルナシプラんと同用量で有意なフリージング行動時間短縮作用を示した。

以上、ミルナシプランはSSRIと比較して、1)前シナプス性5-HT神経の5-HT_{1A}受容体脱感作をフルボキサミンより早期に引き起こすこと、2)フルボキサミンが無効であった絶望状態の指標である強制水泳試験においても抗うつ効果を示したことに薬理学的相違が認められた。よって、SSRIによる5-HT選択的な再取り込み阻害よりもSNRIであるミルナシプランによる5-HTとNA再取り込み両阻害の方が、より早くまた幅広い薬理学的効力を持つことが示唆された。

(4) その他の薬理試験

マウスにおけるフィソスチグミン誘発致死及びオキソトレモリン誘発振戦に対してミルナシプランは、60mg/kgの腹腔内投与でも抑制作用を示さなかったが、イミプラミンはいずれも30mg/kgの腹腔内投与から有意な抑制作用が認められた。よって、ミルナシプランは、イミプラミンとは異なり薬効用量では抗コリン作用に基づく副作用を発現しないと考えられた。また、モルモット摘出心房の収縮及び律動数あるいはウサギ摘出心房自発収縮及び電気駆動収縮に対してイミプラミンは、 10^{-5} Mより律動数あるいは自発収縮力の抑制作用を発現したが、ミルナシプランは、 10^{-4} Mの濃度においても抑制作用がほとんど認められなかった。よって、ミルナシプランは、イミプラミンに比べて心機能に対する影響の少ない薬物であることが示唆された。

(5) 脱エチル体及び環化体の効力についての薬理試験

主要代謝物である脱エチル体並びに代謝物及び分解物である環化体は、NA及び5-HT取り込み阻害作用をほとんど示さず、またその他の効力を裏付ける試験でも作用が認められなかった。

(6) 光学異性体の効力についての薬理試験

光学異性体のd体及びl体は、いずれもNA及び5-HTの取り込み阻害作用を示し、テトラベナジン誘発眼瞼下垂に対する拮抗作用と強制水泳モデルでの不動時間の短縮作用が認められた。作用の発現は、d体はミルナシプランとほぼ同用量(同濃度)、l体はミルナシプランより高用量(高濃度)で認められた。

ミルナシプランの特徴は以下のようにまとめることができる。

ミルナシプランは、NA及び5-HTの再取り込み部位だけに選択的に結合してその再取り込みを阻害する。そして、NA及び5-HT神経系を同程度賦活することを機序として抗うつ効果を発揮する我が国ではじめてSNRIに分類される薬物である。

ミルナシプランは、従来の抗うつ薬(イミプラミン、ミアンセリン及びフルボキサミン)と比較して5つの薬理学的特徴があると考えられた。

- 1) 行動を指標とした抗うつ薬評価モデルにおいてフルボキサミンが無効であった強制水泳試験(有効投与量はイミプラミンより低用量でミアンセリンと同用量)、イミプラミンが無効であった条件恐怖行動試験(有効投与量はミアンセリンと同用量)の両モデルで有効であること。
- 2) 作用機序はin vitroではイミプラミンに類似するが、経口投与では5-HT神経系への賦活効果が弱いイミプラミンとは異なり、NA及び5-HT神経系を十分かつ同程度賦活できる。なおかつ、各種受容体に対する親和性が極めて低いことなど作用部位に対する選択性がイミプラミン、ミアンセリンより高い。また、ミアンセリンとは機序を異にする。これらの機序の相違から、SNRIとして位置づけられること。
- 3) イミプラミン、フルボキサミンには認められない特徴として、反復投与(7日間)による前シナプス性5-HT_{1A}受容体脱感作用を有しており、早期に一層の5-HT神経系賦活効果が発現すること。
- 4) イミプラミンが示すような抗コリン及び心機能抑制の副作用を反映する薬理作用が極めて弱い薬物であること。

また上記ミルナシプランの薬理作用の特徴は、次のように臨床上の知見に反映されている。

- 1) 国内臨床試験でミルナシプランの改善率がイミプラミン及びミアンセリンに劣らないこと。
- 2) イミプラミンより1週全般改善度が有意に高く、効果発現が早いこと。
- 3) 国内臨床試験の副作用の発現で見ると、ミルナシプラン(467例中)、イミプラミン(65例中)及びミアンセリン(95例中)において、抗コリン作用(m-ACh受容体)が関連する副作用は、口渇7.5%、32.3%、12.6%、便秘5.8%、13.8%、8.4%、 α_1 受容体が関与する副作用は、起立性低血圧1.5%、6.2%、0%、めまい2.8%、13.8%、6.3%、H₁受容体が関連する副作用は、眠気4.1%、4.6%、23.2%、倦怠感1.3%、1.5%、7.4%と、そのほとんどで下回ったこと。
- 4) 海外臨床試験でミルナシプランはSSRIより有効性が高く、効果発現が早いこと。
- 5) MAO阻害薬とは併用禁忌であるが切り替えに際しては、明らかなMAO阻害活性を有するイミプラミンやミアンセリンよりも阻害作用の極めて弱いミルナシプランの方が心循環器などの相互作用の影響が少ないと考えられること。

以上、ミルナシプランは我が国で初のSNRIであり、従来の抗うつ薬とは異なる新しい薬理学的特徴を持つ抗うつ薬である。その薬理学的プロフィール及び効力から、ミルナシプランは抗うつ薬としての有用性が期待できる。

表ホ-1 効力を裏付ける薬理試験成績一覧表

試験項目	動物種	適用経路	投与量 (mg/kg)	試験成績
薬物誘発による諸症状に対する作用				
①レセルピン誘発低体温に対する作用	マウス	経口	0.3 1 3, 10, 30	作用なし レセルピン2mg/kg誘発 低体温に拮抗 レセルピン2及び5mg/kg 誘発低体温に拮抗
②テトラベナジン誘発眼 瞼下垂に対する作用	マウス	経口	0.3 1, 3, 10	作用なし 眼瞼下垂に拮抗
③ヨヒンビン誘発致死に 対する作用	マウス	経口	3 10, 30, 60	作用なし ヨヒンビン誘発致死を増強
④5-HTP誘発首振り行動 に対する作用	マウス	経口	3, 10 30	作用なし 首振り行動を増強
強制水泳モデルにおける 不動時間に対する作用	ラット	経口 単回 7日間	10 30, 60 10 30, 60	作用なし 不動時間を短縮 作用なし 不動時間を短縮
	マウス	経口	10 30, 60	作用なし 不動時間を短縮
条件恐怖行動に対する作 用	ラット	経口	10, 30 60	作用なし フリージング 行動時間を短縮

表ホ-2 作用機序試験成績一覧表

試験項目	動物種	適用経路	投与量 (mg/kg)	試験成績
脳内モノアミン再取り込み部位への親和性	ラット	in vitro		各部位への親和性(Ki値) NA再取り込み部位:31nM 5-HT再取り込み部位:8.5nM DA再取り込み部位:>10 ⁴ nM
脳内モノアミン取り込み阻害作用 ①Na ⁺ 依存性取り込み ②Na ⁺ 非依存性を含む取り込み	ラット	in vitro		NA、5-HT及びDAの取り込み阻害作用(IC ₅₀ 値) NA:29.6nM 5-HT:8.0nM DA:>10 ⁴ nM NA:11.4nM 5-HT:43.9nM
脳内の細胞外モノアミン濃度に対する作用	ラット	腹腔内	10	細胞外モノアミン濃度増加 最大 NA:267% 5-HT:258% DA:191% モノアミン代謝物濃度 には影響なし
	ラット	経口	10 30	細胞外モノアミン濃度増加 最大 NA:223%、5-HT:256% NA:352%、5-HT:317%
脳内各種受容体に対する親和性	ラット	in vitro		いずれの受容体に対しても親和性は極めて低い(IC ₅₀ 値>10 ⁴ nM)
モノアミンオキシダーゼ(MAO)活性に対する作用	ラット	in vitro		脳ホモジネートのMAO(A, B)活性に対し、10 ⁻⁴ Mまで作用なし
前シナプス性5-HT神経の5-HT _{1A} 受容体機能に対する反復投与の影響	ラット	経口	30 3日間 7日間 14日間	5-HT感受性: 低下傾向(p<0.1) 低下 低下
後シナプス性5-HT神経の5-HT _{1A} 受容体機能に対する反復投与の影響	ラット	経口	30 14日間	5-HT感受性: 変化なし
反復投与による脳内β及び5-HT ₂ 受容体数に対する作用	ラット	経口	60 14日間	β及び5-HT ₂ 受容体数: 変化なし

表ホ-3 その他の薬理試験成績一覧表

試験項目	動物種	適用経路	投与量 (mg/kg)	試験成績
抗コリン作用				
①フィソスチグミン誘発致死に対する作用	マウス	腹腔内	10, 30, 60	作用なし
②オキシトレモリン誘発振戦に対する作用	マウス	腹腔内	10, 30, 60	作用なし 増強
心機能に対する作用				
①摘出心房収縮及び律動数に対する作用	モルモット	in vitro	10^{-6} ~ 10^{-4} M	作用なし
②摘出心房自発収縮及び電気駆動収縮に対する作用	ウサギ	in vitro	10^{-7} ~ 10^{-4} M	10^{-6} M以上で心房収縮力及び律動数が増加

表ホ-4 脱エチル体及び環化体の薬理試験成績一覧表

試験項目	動物種	適用経路	被験化合物	試験成績
脳内NA及び5-HT取り込みに対する作用	ラット	in vitro	脱エチル体	阻害作用なし IC ₅₀ 値 NA:10000nM 5-HT:9580nM
			環化体	阻害作用なし IC ₅₀ 値 NA:>10 ⁴ nM 5-HT:>10 ⁴ nM
テトラベナジン誘発眼瞼下垂に対する作用	マウス	静脈内	脱エチル体	10mg/kg: 作用なし
		経口	環化体	10mg/kg: 作用なし
		経口	環化体	100mg/kg: 作用なし
強制水泳モデルにおける不動時間に対する作用	マウス	静脈内	脱エチル体	10mg/kg: 作用なし
		経口	環化体	10mg/kg: 作用なし
		経口	環化体	100mg/kg: 作用なし

表ホ-5 光学異性体の薬理試験成績一覧表

試験項目	動物種	適用経路	異性体区分	試験成績
脳内NA及び5-HT取り込みに対する作用	ラット	in vitro	d体	阻害作用 (IC ₅₀ 値) NA:19.3nM, 5-HT:17.6nM
			l体	阻害作用 (IC ₅₀ 値) NA:480nM, 5-HT:93.7nM
テトラベナジン誘発眼瞼下垂に対する作用	マウス	経口	d体	1mg/kg以上で眼瞼下垂に拮抗
			l体	10mg/kg以上で眼瞼下垂に拮抗
強制水泳モデルにおける不動時間に対する作用	マウス	経口	d体	30mg/kg以上で不動時間を短縮
			l体	100mg/kgで不動時間を短縮

表ホ-6 同種同効薬との比較試験成績一覧表(1)

測定項目	動物種 (適用 経路)	試験成績		
		ミルナシブラン	イミプラミン	ミアンセリン
レセルピン誘発低体温に対する作用(表ホ-8)	マウス (p.o.)	拮抗 1, 3, 10, 30mg/kg	拮抗 3, 10, 30mg/kg	作用なし (30mg/kgまで)
テトラベナジン誘発眼瞼下垂に対する作用(表ホ-10)	マウス (p.o.)	拮抗 1, 3, 10mg/kg	拮抗 1, 3, 10mg/kg	作用なし (30mg/kgまで)
ヨヒンビン誘発致死に対する作用(表ホ-11)	マウス (p.o.)	増強 10, 30, 60mg/kg	増強 100mg/kg	増強 100mg/kg
5-HTP誘発首振り行動に対する作用(図ホ-4)	マウス (p.o.)	増強 30mg/kg	有意な作用なし	抑制 10, 30, 60mg/kg
強制水泳モデルにおける不動時間に対する作用(図ホ-5, 6)	ラット (p.o.)	短縮 30, 60mg/kg	短縮 60mg/kg	短縮 30, 60mg/kg
	マウス (p.o.)	短縮 30, 60mg/kg	短縮 60mg/kg	短縮 30, 60mg/kg
条件恐怖行動におけるフリージング時間に対する作用(図ホ-7)	ラット (p.o.)	短縮 60mg/kg	作用なし (60mg/kgまで)	短縮 60mg/kg
脳内モノアミン再取り込み部位に対する親和性(表ホ-12)	ラット in vitro	各部位への親和性は、Ki値で NA : 31nM 5-HT : 8.5nM	各部位への親和性は、Ki値で NA : 18nM 5-HT : 6.0nM	—
脳内モノアミン取り込み阻害作用(表ホ-13) ①Na ⁺ 依存性の条件 ②Na ⁺ 非依存性を含む条件	ラット in vitro	各々の阻害作用はIC ₅₀ 値で NA : 29.6nM 5-HT : 28.0nM DA : >10 ⁴ nM	各々の阻害作用はIC ₅₀ 値で NA : 23.1nM 5-HT : 18.5nM DA : >10 ⁴ nM	各々の阻害作用はIC ₅₀ 値で NA : 159nM 5-HT : 3450nM DA : 5350nM
	ラット in vitro	各々の阻害作用はIC ₅₀ 値で NA : 11.4nM 5-HT : 43.9nM	各々の阻害作用はIC ₅₀ 値で NA : 27.7nM 5-HT : 15.2nM	—
脳内の細胞外モノアミン濃度に対する作用 ^{B)} (表ホ-14、 図ホ-8, 9)	ラット (i.p.)	増加、10mg/kg NA : 267% 5-HT : 258% DA : 191%	増加、10mg/kg NA : 300% 5-HT : 191% DA : 262%	増加、10mg/kg NA : 660% 5-HT : 作用なし DA : 272%
	ラット (p.o.)	増加、10, 30mg/kg NA : 223, 352% 5-HT : 256, 317%	増加、10, 30mg/kg NA : 337, 371% 5-HT : 156, 162%	—
脳内各種受容体に対する親和性(表ホ-15)	ラット in vitro	いずれの受容体にもIC ₅₀ 値>10 ⁴ nM	IC ₅₀ 値<10 ³ nMの受容体は、5種 { H ₁ , m-ACh, α ₁ } { 5-HT ₂ , シグマ }	IC ₅₀ 値<10 ³ nMの受容体は、6種 { 5-HT ₂ , α ₂ , H ₁ } { D ₁ -like, α ₁ } { 5-HT _{1A} }
モノアミンオキシダーゼ活性に対する作用(表ホ-16)	ラット in vitro	10 ⁻⁴ MまでMAO-A、 -Bともに影響なし	10 ⁻⁶ M以上でMAO-B 10 ⁻⁵ M以上でMAO-A を抑制	10 ⁻⁵ M以上でMAO-B 10 ⁻⁴ MでMAO-Aを抑制
前シナプス性5-HT神経の5-HT _{1A} 受容体機能に対する反復投与の影響(図ホ-10)	ラット (p.o.)	脱感作: 30mg/kg, 7, 14日間、1日2回	作用なし(30mg/kg, 3, 7, 14日間、1日 2回)	—
反復投与(14日間)によるβ及び5-HT ₂ 受容体数に対する作用(図ホ-12)	ラット	β及び5-HT ₂ 受容体に変化なし 60mg/kg, p.o.	β及び5-HT ₂ 受容体数が減少 10mg/kg, i.p.	—

— : 未検討、p.o. : 経口投与、i.p. : 腹腔内投与、Ki値 : 薬物の受容体に対する親和性を濃度で表したもののIC₅₀値: 50%阻害濃度、注) : 各項目の%表示は、投与前の平均を100とした時の百分率の最大値

表ホ-6 同種同効薬との比較試験成績一覧表(2)

試験項目	動物種 (適用経路)	試験成績	
		ミルナシプラン	イミプラミン
抗コリン作用 ①フィソスチグミン誘発致死に対する作用(表ホ-17)	マウス (i.p.)	60mg/kgまで 抑制作用なし	30mg/kgで抑制
②オキソトレモリン誘発振戦に対する作用(表ホ-18)	マウス (i.p.)	60mg/kgまで 抑制作用なし	30mg/kg以上で抑制
心機能に対する作用 ①摘出心房収縮及び律動数に対する作用(図ホ-17)	モルモット in vitro	10 ⁻⁴ Mまで抑制作用なし	10 ⁻⁵ M以上で律動数減少 10 ⁻⁴ Mで収縮力抑制及び 心房停止
②摘出心房自発収縮及び電気駆動収縮に対する作用(図ホ-18)	ウサギ in vitro	10 ⁻⁴ Mまで抑制作用なし	10 ⁻⁵ M以上で自発収縮力抑制、10 ⁻⁴ Mで自発律動数減少、電気駆動収縮力抑制

i.p.:腹腔内投与

表ホ-7 SSRIとの比較試験成績一覧表

試験項目	動物種 (適用経路)	試験成績	
		ミルナシプラン	フルボキサミン
前シナプス性5-HT神経の5-HT _{1A} 容体機能に対する反復投与の影響(図ホ-13)	ラット (p.o.)	脱感作 30mg/kg, 7日間投与	作用なし (60mg/kg, 7日間投与)
強制水泳モデルにおける不動時間に対する作用(図ホ-14, 15)	ラット (p.o.)	短縮 30, 60mg/kg	作用なし (100mg/kgまで)
	マウス (p.o.)	短縮 30, 60mg/kg	作用なし (60mg/kgまで)
条件恐怖行動におけるフリージング時間に対する作用(図ホ-16)	ラット (p.o.)	短縮 60mg/kg	短縮 60, 100mg/kg

(1) 効力を裏付ける薬理試験

1) 薬物誘発による諸症状に対する作用

うつ病の成因として提唱されている「モノアミン仮説」に基づき脳内のモノアミン神経に作用する薬物を用いたモデルが抗うつ薬評価の一環として繁用されている。そこで、脳内モノアミンの変化によって発現する諸症状に対する作用を指標として、ミルナシプランの脳内モノアミン神経系への効果について検討した。

①レセルピン誘発低体温に対する作用

(方法)

脳内モノアミン神経系(主にNA神経系)の機能低下により体温低下作用を示すレセルピン2mg/kg又は5mg/kgをマウスに皮下投与し、その18時間後にミルナシプラン及び対照薬を経口投与した。マウスの直腸に温度計を挿入し、薬物投与前後の体温を経時的に測定した。

(成績)

ミルナシプランの経口投与では、レセルピン2mg/kgで誘発した低体温に対して1mg/kg以上、レセルピン5mg/kgで誘発した低体温に対して3mg/kg以上で有意な拮抗作用が認められた(表ホ-8, 9)。レセルピン2mg/kgで誘発した低体温の比較で、対照薬のイミプラミンにも3mg/kg以上の経口投与で低体温に対する有意な拮抗作用が認められたが、ミアンセリンは30mg/kgまでの経口投与では影響が認められなかった。なお、本試験における最少有効量1mg/kgは、ミルナシプランの臨床での1回最高投与量50mg(体重60kgとして0.83mg/kg)を反映していると考えられた。本実験結果より、ミルナシプランがNA神経系賦活作用を有することが示唆された。

表ホ-8 レセルピン(2mg/kg)誘発低体温に対するミルナシプラン、イミプラミン及びミアンセリンの作用(1)

薬物	投与量 (mg/kg, p. o.)	例数	マウスの体温(°C)						
			レセルピン 投与前	レセルピン 投与後	薬物投与後の時間				
					1時間	2時間	4時間	6時間	8時間
蒸留水		11	36.84 ±0.47	24.63 ±1.18	24.30 ±1.03	25.08 ±1.87	27.54 ±3.19	30.99 ±2.26	31.97 ±1.37
ミルナシプラン	0.3	11	36.75 ±0.52	24.28 ±0.78	24.25 ±0.72	25.62 ±1.85	29.57 ±3.04	31.96 ±1.68	31.72 ±1.77
	1	11	36.76 ±0.50	24.69 ±1.29	26.05 ±2.37	28.25 * ±3.30	31.74 ** ±2.05	32.68 * ±0.85	32.22 ±0.86
	3	11	36.88 ±0.45	24.15 ±1.21	25.06 ±1.84	27.20 ±3.40	30.77 ** ±2.65	32.17 ±0.97	32.59 ±0.66
	10	11	36.83 ±0.56	24.52 ±1.32	25.76 ±1.92	29.02 ** ±3.45	32.44 ** ±0.98	32.47 ±1.29	32.51 ±1.01
	30	11	36.95 ±0.60	24.19 ±1.57	25.30 ±2.15	27.21 ±2.34	31.93 ** ±1.04	33.17 ** ±0.76	33.26 ±1.06
蒸留水		10	37.10 ±0.62	25.16 ±1.14	24.38 ±1.35	24.82 ±1.84	26.18 ±2.64	28.73 ±2.76	30.81 ±1.50
イミプラミン	1	10	37.48 ±0.37	24.58 ±0.85	24.40 ±0.70	25.10 ±1.40	27.83 ±2.44	29.72 ±2.03	30.41 ±1.52
	3	10	37.24 ±0.62	25.36 ±0.67	26.16 ±1.62	29.34 ** ±1.37	31.62 ** ±0.95	30.78 * ±0.88	29.73 ±1.32
	10	10	37.19 ±0.51	25.23 ±0.74	26.62 * ±1.69	31.05 ** ±1.41	31.77 ** ±0.96	30.54 ±0.94	29.83 ±1.17
	30	11	37.12 ±0.31	25.41 ±0.91	28.20 ** ±2.78	32.83 ** ±1.11	32.68 ** ±0.47	32.04 ** ±0.71	32.05 ±1.01

値は、平均値±標準偏差

*:p<0.05、**:p<0.01(蒸留水投与群に対してのDunnettの多重比較検定)

p. o.:経口投与

表ホ-8 レセルピン(2mg/kg)誘発低体温に対するミルナシプラン、イミプラミン及びミアンセリンの作用(2)

薬物	投与量 (mg/kg, p. o.)	例数	マウスの体温(°C)						
			レセル ^π 投与前	レセル ^π 投与後	薬物投与後の時間				
					1時間	2時間	4時間	6時間	8時間
蒸留水		14	36.91 ±0.42	24.99 ±0.53	26.03 ±1.25	26.66 ±2.28	30.01 ±2.92	31.03 ±1.93	31.11 ±1.57
ミアンセリン	1	15	36.89 ±0.36	25.32 ±0.68	26.01 ±1.13	27.16 ±2.25	30.11 ±2.48	31.25 ±1.76	31.36 ±1.55
	3	15	37.01 ±0.23	25.09 ±0.52	26.02 ±0.76	27.27 ±1.58	30.92 ±1.69	31.88 ±1.23	31.62 ±1.58
	10	16	36.98 ±0.32	25.20 ±0.68	26.31 ±0.92	27.66 ±1.86	31.05 ±2.24	31.68 ±1.85	31.34 ±1.48
	30	15	37.05 ±0.39	24.97 ±0.70	25.91 ±1.04	26.58 ±1.78	29.87 ±1.79	31.01 ±1.55	31.33 ±1.50

値は、平均値±標準偏差
p. o. :経口投与

表ホ-9 レセルピン(5mg/kg)誘発低体温に対するミルナシプラン及びイミプラミンの作用

薬物	投与量 (mg/kg, p. o.)	例数	マウスの体温(°C)							
			レセル ^π 投与前	レセル ^π 投与後	薬物投与後の時間					
					1時間	2時間	3時間	4時間	5時間	6時間
蒸留水		18	37.93 ±0.39	24.06 ±0.61	24.12 ±0.84	24.27 ±1.06	24.76 ±1.40	25.32 ±1.90	25.63 ±2.42	25.96 ±2.76
ミルナシプラン	1	10	38.15 ±0.32	24.26 ±0.74	24.80 ±1.08	25.40 ±2.23	26.31 ±2.87	27.34 ±3.38	27.65 ±3.65	27.90 ±4.02
	3	10	38.29 ±0.37	23.95 ±0.65	24.66 ±0.70	24.91 ±1.24	26.33 ±2.73	27.86 ±3.64	28.98 * ±4.08	29.28 * ±3.52
	10	13	37.90 ±0.34	24.19 ±0.55	24.68 ±0.96	25.39 ±1.69	27.22 * ±2.51	29.30 ** ±2.53	30.62 ** ±2.63	30.62 ** ±2.65
	30	10	37.91 ±0.54	24.07 ±0.74	24.67 ±1.03	26.29 * ±2.35	28.42 ** ±3.31	29.78 ** ±2.80	30.36 ** ±2.61	30.50 ** ±2.51
イミプラミン	30	8	37.84 ±0.33	23.83 ±0.79	25.34 * ±1.32	28.49 ** ±2.99	31.51 ** ±1.98	32.81 ** ±0.82	32.74 ** ±0.45	31.96 ** ±0.85

値は、平均値±標準偏差
*:p<0.05、**:p<0.01(蒸留水投与群に対してのDunnettの多重比較検定)
p. o. :経口投与

②テトラベナジン誘発眼瞼下垂に対する作用

(方法)

脳内モノアミン神経系の機能低下を引き起こすテトラベナジン40mg/kgをマウスに評価の30分前に腹腔内投与し、眼瞼下垂の程度を測定した。眼瞼下垂の評価は、0:完全閉眼、1:3/4閉眼、2:1/2閉眼、3:1/4閉眼、4:正常状態でスコア化して行った。ミルナシプラン及び対照薬は、評価の60分前に経口投与した。

(成績)

ミルナシプランの経口投与では、1mg/kg以上でテトラベナジン誘発眼瞼下垂に対する有意な拮抗作用が認められた(表ホ-10)。一方、対照薬のイミプラミンの経口投与でも1mg/kg以上で有意な拮抗作用が認められた(別途0.3mg/kgが無作用であることは確認した)が、ミアンセリンの経口投与では30mg/kgまで影響が認められなかった。なお、本試験における最少有効量1mg/kgは、ミルナシプランの臨床での1回最高投与量50mg(体重60kgとして0.83mg/kg)を反映していると考えられた。本実験結果より、ミルナシプランがNA神経系賦活作用を有することが示唆された。

表ホ-10 テトラペナジン誘発眼瞼下垂に対するミルナシبران、イミプラミン及びミアンセリンの作用

薬物	投与量 (mg/kg, p.o.)	例数	眼瞼下垂スコア					総合 スコア	有意差 検定
			0	1	2	3	4		
蒸留水		10	7	3				3	
ミルナシبران	0.3	10	2	5	1	2		13	
	1	10	1	3	3	2	1	19	*
	3	10		2	1	5	2	27	**
	10	10			2	3	5	33	**
イミプラミン	1	10	3	1	6			13	*
	3	10		2	5	3		21	**
	10	10	1	2	4	3		19	**
蒸留水		10	4	6				6	
ミアンセリン	10	10	3	5	2			9	
	30	10	2	6	2			10	

値は、該当するスコアを観察した例数を示す

総合スコアは、各用量におけるスコアの合計を示す

* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$ (蒸留水投与群に対する χ^2 検定)

p.o. : 経口投与

③ヨヒンビン誘発致死に対する作用

(方法)

α_2 受容体遮断作用を有し、NA神経系を賦活するヨヒンビン20mg/kgをマウスに腹腔内投与し、24時間後の死亡数を観察した。ミルナシبران及び対照薬は、ヨヒンビン投与の60分前に経口投与した。

(成績)

ミルナシبرانの経口投与は、ヨヒンビンによるNA神経系を介した致死作用を用量依存的に増強し、10mg/kg以上では有意な死亡数の増加が認められた(表ホ-11)。イミプラミン及びミアンセリンの経口投与でも増強効果を認めたが、有意な効果を示した投与量は、100mg/kgであった。本実験結果より、ミルナシبرانがNA神経系賦活作用を有することが示唆された。

表ホ-11 ヨヒンピン誘発致死に対するミルナシبران、イミプラミン及びミアンセリンの作用

薬物	死亡マウス数/試験マウス数					
	溶媒 投与群	投与量 (mg/kg, p.o.)				
		3	10	30	60	100
ミルナシبران	0/8 ^{a)}	2/8	5/8 **	6/8 **	8/8 **	
イミプラミン		0/8	0/8	2/8	3/8	4/8 *
ミアンセリン	0/8 ^{b)}	0/8	0/8	0/8	3/8	4/8 *

a): 蒸留水投与、b): 0.5%メチルセルロース溶液投与

*: p<0.05, **: p<0.01 (蒸留水又は0.5%メチルセルロース溶液投与群に対しての χ^2 検定)

p.o.: 経口投与

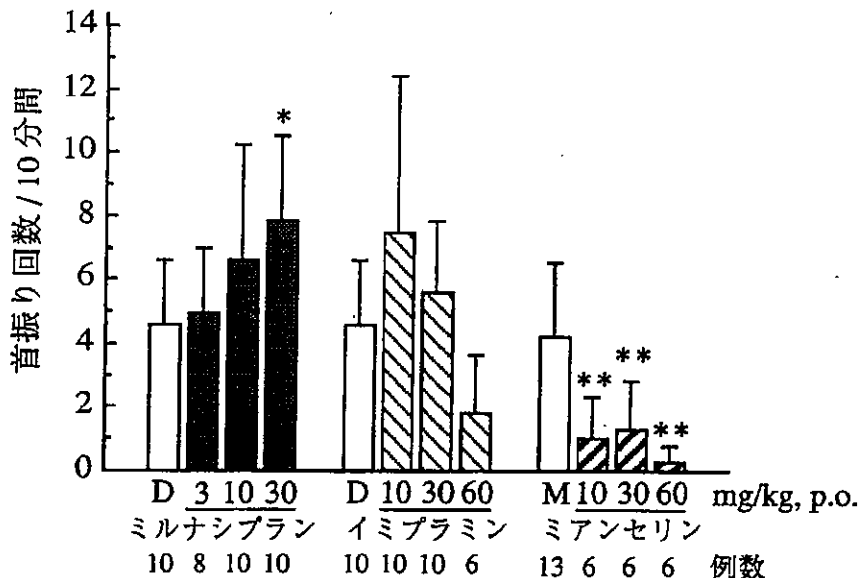
④5-ヒドロキシ-L-トリプトファン(5-HTP)誘発首振り行動に対する作用

(方法)

マウスに5-HTの前駆物質である5-HTP200mg/kgを腹腔内投与し、その10分後からの10分間に観察される首振り行動の回数を測定した。ミルナシبران及び対照薬は、首振り行動観察開始の60分前に経口投与した。

(成績)

ミルナシبرانの経口投与により、首振り行動の回数は用量依存的に増加し、30mg/kgで有意な増強作用を示した(図ホ-4)。一方、イミプラミンには有意な効果は認められず、ミアンセリン(10mg/kg以上)は、首振り行動を有意に抑制した。本実験結果より、ミルナシبرانが5-HT神経系賦活作用を有することが示唆された。また、ミアンセリンの抑制効果は、5-HT₂受容体に対する直接の遮断作用によるとの報告がある。



値は平均値±標準偏差

D: 蒸留水、M: 0.5%メチルセルロース溶液、p.o.: 経口投与

*: p<0.05, **: p<0.01 (蒸留水又は0.5%メチルセルロース溶液投与群に対してのDunnettの多重比較検定)

図ホ-4 5-HTP誘発首振り行動に対するミルナシبران、イミプラミン及びミアンセリンの作用

2) 強制水泳モデルにおける不動時間に対する作用

強制水泳による絶望状態モデルは、多くの抗うつ薬が絶望状態の時間を短縮する効果を示すことから繁用されている実験系である。そこで、動物における絶望状態に対するミルナシプランの作用を強制水泳モデルを用いて検討した。

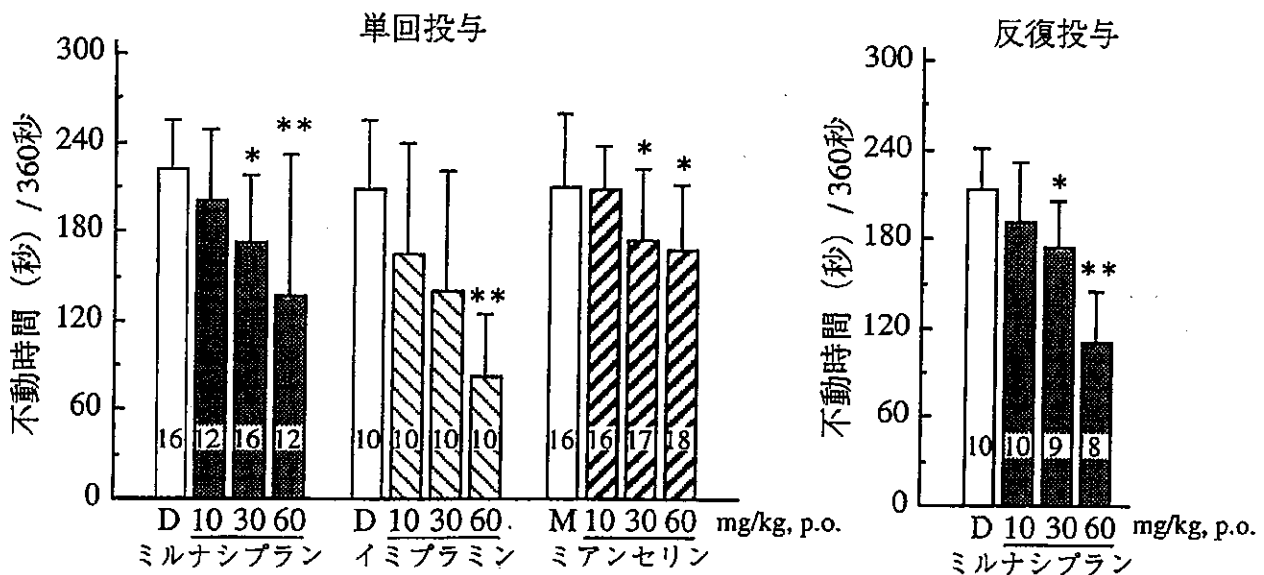
(方法)

動物(ラット又はマウス)を25°に保温した水の入った水槽内に入れて6分間の試験中に認められる不動時間を測定した。ラットは、試験前日に水槽内に入れて10分間馴らし試行を行った。ミルナシプラン及び対照薬は、強制水泳開始60分前に経口投与した。なお、本試験は試験系の特性を考慮して対照薬の有効投与量に近接する用量を用いたが、薬物動態を考慮すると臨床の有効用量の範囲内であると判断された。

(成績)

ラット(図ホ-5)：ミルナシプランの経口投与によって、不動時間は用量依存的に短縮され、その作用は、30mg/kg以上で有意であった。また、7日間反復投与試験でも不動時間短縮作用は同様に認められた。対照薬であるイミプラミン及びミアンセリンの経口投与でも同様に、用量依存的に不動時間は短縮され、各々60mg/kg、30mg/kg以上で有意な効果が認められた。

マウス(図ホ-6)：ミルナシプランの経口投与によって、不動時間は用量依存的に短縮され、その作用は、30又は60mg/kg以上で有意であった。対照薬であるイミプラミン及びミアンセリンの経口投与でも同様に、用量依存的に不動時間は短縮され、各々60mg/kg、30mg/kg以上で有意な効果が認められた。

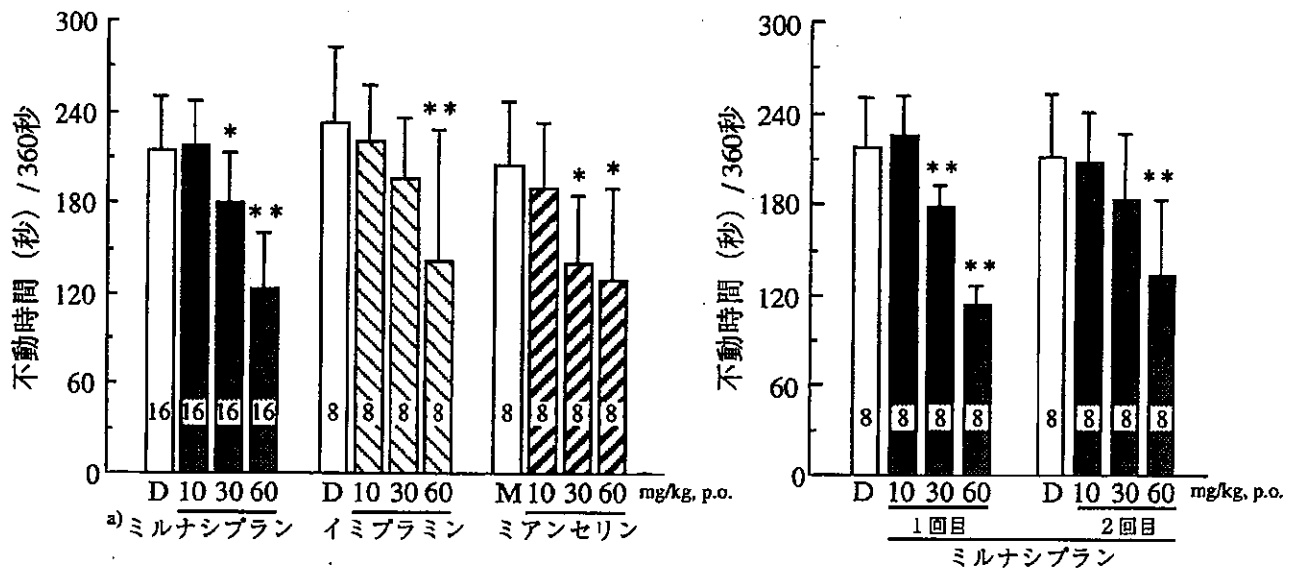


値は平均値±標準偏差、カラム内の数字は例数

D: 蒸留水、M: 0.5%メチルセルロース溶液、p.o.: 経口投与

: $p < 0.05$ 、: $p < 0.01$ (蒸留水又は0.5%メチルセルロース溶液投与群に対するDunnettの多重比較検定)

図ホ-5 ラット不動時間に対するミルナシプラン、イミプラミン及びミアンセリンの作用並びに7日間反復投与のミルナシプランの作用



値は平均値±標準偏差、カラム内の数字は例数

a) : 8例×2回の合計の結果を示す(各々の内訳は右の図のとおり)

D: 蒸留水、M: 0.5%メチルセルロース溶液、p.o.: 経口投与

* : p<0.05、** : p<0.01 (蒸留水又は0.5%メチルセルロース溶液投与群に対するDunnettの多重比較検定)

図ホ-6 マウス不動時間に対するミルナシبران、イミプラミン及びミアンセリンの作用

3) 条件恐怖行動に対する作用

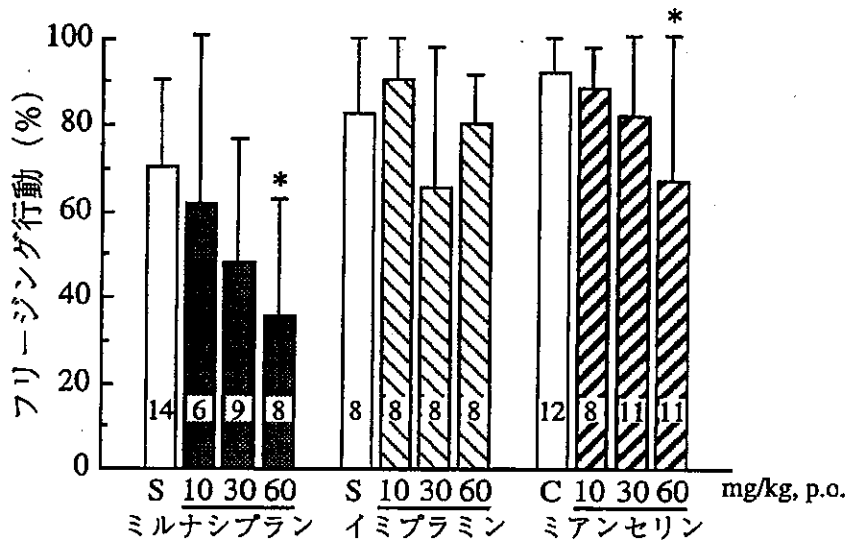
電撃による恐怖を条件づけられたラットがその条件提示(場所、音など)により発現するフリージング行動(骨格筋とヒゲに観察し得る動きのない状態)は、心理的情動ストレスのモデルと位置づけられている。情動の表現型としては恐怖・不安を反映するが、本モデルはセロトニン選択的取り込み阻害薬が有効なことから、セロトニン神経系の機能低下に関連する神経・精神障害(うつ、不安など)の指標となると考えられる。そこで、動物における心理的情動ストレスに対するミルナシبرانの作用をラットのフリージング行動を指標にして検討した。

(方法)

ラットを電撃箱に入れ、2.5mAのスクランブル・ショック(30秒、30回)を与えた。24時間後、再びラットを電撃箱に入れて(電撃は与えない)行動を5分間観察し、フリージング行動の認められた時間を百分率で算出した。ミルナシبران及び対照薬は、観察開始の90分前に経口投与した。なお、本試験は試験系の特性を考慮して対照薬の有効投与量に近接する用量を用いたが、薬物動態を考慮すると臨床の有効用量の範囲内であると判断された。

(成績)

ミルナシبرانの経口投与により、フリージング行動の時間は用量依存的に短縮され、60mg/kgで有意差が認められた(図ホ-7)。ミアンセリンの経口投与によってもフリージング行動の時間は短縮したが、イミプラミンは60mg/kgの経口投与でもフリージング行動に影響を及ぼさなかった。



値は平均値±標準偏差、カラム内の数字は例数
 S：生理食塩液、C：0.5%カルボキシメチルセルロース溶液、p.o.：経口投与
 *：p<0.05 (生理食塩液又は0.5%カルボキシメチルセルロース溶液投与群
 に対するDunnettの多重比較検定)

図ホ-7 ラットフリージング行動に対するミルナシبران、イミプラミン及びミアンセリンの作用

以上、ミルナシبرانは、薬物誘発モデルにおいてレセルピン誘発低体温及びテトラベナジン誘発眼瞼下垂に対する拮抗作用、ヨヒンビン誘発致死に対する増強作用を示したことからNA神経系の賦活作用を有すること、また5-HTP誘発首振り行動を増強したことから5-HT神経系の賦活作用を有することが明らかとなった。その作用用量は、レセルピン誘発低体温、ヨヒンビン誘発致死でイミプラミンより低用量、テトラベナジン誘発眼瞼下垂でイミプラミンと同用量であった。よって、ミルナシبرانは、うつ病で低下しているとされるモノアミン神経系に対しイミプラミンと同様に賦活する効果が期待された。

さらに、強制水泳モデルにおいてイミプラミンより低用量、ミアンセリンと同用量で絶望状態の動物の不動時間を有意に短縮すること、また条件恐怖行動モデルにおいてミアンセリンと同用量(イミプラミンは作用なし)でフリージング行動時間を有意に短縮することが明らかとなった。強制水泳モデルは、第一及び二世代の抗うつ薬(特にイミプラミンを代表とする三環系抗うつ薬)で、条件恐怖行動モデルは、第三世代の抗うつ薬(セロトニン取り込み阻害薬)でその有効性が知られており、ミルナシبرانの両モデルでの効果はうつ病の治療に対するミルナシبرانの有用性を支持すると考えられた。

(2) 作用機序

1) 脳内モノアミン再取り込み部位への親和性

ミルナシبرانの一次作用点の探索を目的として脳内モノアミン再取り込み部位への親和性について検討した。

(方法)

ラットより摘出した脳の大脳皮質又は線条体に緩衝液を加えホモジナイズした後、遠心、懸濁操作を経て膜標品を調製した。ミルナシبران又は対照薬を緩衝液に溶解し、モノアミン再取り込み部位のリガンド存在下で反応させた(NA:[³H]ニソキセチン(20°, 60分)、5-HT:[³H]パロキセチン(20°, 45分)、DA:[³H]BTCF(4°, 90分))。反応液をワットマン GF/Cフィルターで吸引ろ過し、フィルター残渣放射能を測定した。非特異的結合の測定は、各々デシプラミン、フェモキセチン及びGBR-12909存在下で行った。

(成績)

ミルナシبرانは、NA及び5-HT再取り込み部位に対してKi値で各々31及び8.5nMの親和性を示した(表ホ-12)。DA再取り込み部位に対するIC₅₀値は、10⁴nM以上であり親和性がないと考えられた。一方、対照薬のイミプラミンのKi値は、各々18及び6.0nMであった。本実験結果から、ミルナシبرانは、脳内NA及び5-HT再取り込み部位に対し、Ki値比でイミプラミンの1.7及び1.4倍の濃度で親和性を示すことが明らかとなった。

表ホ-12 脳内モノアミン再取り込み部位に対するミルナシبران及びイミプラミンの親和性(Ki値:nM)

薬物	[³ H]ニソキセチン (NA再取り込み部位)	[³ H]パロキセチン (5-HT再取り込み部位)
ミルナシبران	31 ± 1.8	8.5 ± 1.1
イミプラミン	18 ± 1.8	6.0 ± 0.55

値は、平均値±標準偏差(例数=3)

Ki値は、薬物の受容体に対する親和性を濃度で表したもので、以下の式から算出。

$$Ki = IC_{50} / (1 + L/K)$$

IC₅₀: 50%阻害濃度(コンピュータプログラムSIMPLEXより算出)

L: [³H]リガンドの濃度

K: [³H]リガンドの解離定数(Scatchard解析より算出、[³H]ニソキセチン 0.946nM、[³H]パロキセチン 0.0721nM)

2) 脳内モノアミン取り込みに対する作用

ミルナシبرانが脳内モノアミン再取り込み部位に親和性を示すことから、結合後の再取り込み部位への効果を明らかにすることを目的として、ラット脳シナプトゾームにおけるモノアミン取り込みに対するミルナシبرانの効果を検討した。

(方法)

ラットより摘出した脳の脳皮質又は線条体をシヨ糖溶液中にてホモジナイズした後、遠心、懸濁操作を経てシナプトゾーム標品を調製した。ミルナシبران又は対照薬を溶解した緩衝液中でシナプトゾーム標品に $[^3\text{H}]\text{NA}$ 、 $[^3\text{H}]\text{5-HT}$ 又は $[^3\text{H}]\text{DA}$ を加え、 37° で5分間取り込ませた。反応液をワットマンGF/Cフィルターで吸引ろ過し、フィルター残渣放射能を測定した。なお、非特異的な取り込みを除外するために、(1) Na^+ 存在下と非存在下で測定を行いその差から Na^+ 依存的な取り込みを、(2) 37° と 0° で測定を行いその差から温度依存的な取り込みを算出した。

(成績)

Na^+ 非存在下での取り込みを非特異的な取り込みとし、取り込み部位の Na^+ 依存性を考慮した実験条件(1)では、ラット脳の脳皮質シナプトゾーム標品における $[^3\text{H}]\text{NA}$ 及び $[^3\text{H}]\text{5-HT}$ の取り込みに対してミルナシبرانは、各々 IC_{50} 値29.6及び28.0nMで阻害作用を示した(表ホ-13)。線条体シナプトゾーム標品における $[^3\text{H}]\text{DA}$ の取り込みに対してミルナシبرانは、阻害作用を示さなかった。ミルナシبرانの NA 及び 5-HT の取り込みに対する阻害能は、濃度比で各々イミプラミンの1.3及び1.5倍の IC_{50} 値であった。また、対照薬間の IC_{50} 値を比較すると、イミプラミン:デシプラミン:ミアンセリンは、 NA 取り込みでは1:0.05:6.9、 5-HT 取り込みでは1:20.6:186であった。

0° での反応を非特異的な取り込みとした実験条件(2)では、ミルナシبرانのイミプラミンに対する IC_{50} 値の濃度比は、 NA 取り込みで0.4倍、 5-HT 取り込みで2.9倍であった。また、Moretらも視床下部切片標本でミルナシبرانが、 IC_{50} 値の比でイミプラミンの0.4倍及び0.6倍の濃度で NA 及び 5-HT の取り込みを阻害することを報告している(参ホ-1)。これらの事実から、ミルナシبرانは、イミプラミンとの濃度比1前後で NA 及び 5-HT の神経終末への取り込みを阻害することが示唆された。

表ホ-13 脳内モノアミン取り込みに対するミルナシبران、イミプラミン、デシプラミン及びミアンセリンの阻害作用(IC_{50} 値:nM)

- (1) モノアミンの Na^+ 非依存性取り込みを除外し、モノアミン取り込み部位の Na^+ 依存性の性質を考慮した実験条件
~ Na^+ 非存在下での取り込みを非特異的な取り込みとし、特異的な取り込みを算出

薬物	$[^3\text{H}]\text{NA}$	$[^3\text{H}]\text{5-HT}$	$[^3\text{H}]\text{DA}$
ミルナシبران	29.6±2.6	28.0±2.9	>10 ⁴
イミプラミン	23.1±2.0	18.5±1.9	>10 ⁴
デシプラミン	1.26±0.28	382±90	3580±150
ミアンセリン	159±23	3450±570	5350±1300

値は、平均値±標準偏差(例数=3)、 IC_{50} 値は、50%阻害濃度を表す

- (2) モノアミンの Na^+ 非依存性取り込みが含まれた実験条件
~ 0° での取り込みを非特異的な取り込みとし、特異的な取り込みを算出

薬物	$[^3\text{H}]\text{NA}$	$[^3\text{H}]\text{5-HT}$	$[^3\text{H}]\text{DA}$
ミルナシبران	11.4±3.9	43.9±14.9	>10 ⁴
イミプラミン	27.7±8.0	15.2±3.1	>10 ⁴

値は、平均値±標準偏差(例数=4)、 IC_{50} 値は、50%阻害濃度を表す

3) 脳内の細胞外モノアミン濃度に対する作用

ミルナシプランが脳内NA及び5-HTの取り込み阻害作用を有することから、その取り込み阻害によるモノアミン(NA、5-HT、DA)神経系への影響をin vivoで明らかにすることを目的として、脳内微小透析法により脳内でのNA、5-HT及びDA細胞外濃度に対する効果を腹腔内投与により検討した。さらに、臨床投与経路(経口投与)での薬理作用をイミプラミンと比較する目的でNA及び5-HTの細胞外濃度を経口投与により検討した。

(方法)

ラット前頭前野内側部に直管型脳内微小透析プローブを挿入した。その翌日に人工脳脊髄液を流速 2 μ l/分で灌流し、30分間の灌流液を1試料とした。試料は、ミルナシプラン及び対照薬の腹腔内あるいは経口投与前に3回、投与後からは経時的に回収を行った。透析液中のモノアミン濃度はHPLC-ECDを用いて測定し、結果を薬物投与前の3試料の平均値に対する百分率で表示した。

(成績)

腹腔内投与(表ホ-14)：ミルナシプランは、10mg/kgの腹腔内投与によりモノアミン代謝物であるDOPAC、HVA及び5-HIAAの細胞外濃度に影響を及ぼすことなくNA、5-HT及びDAの細胞外濃度を有意に増加させた。一方、対照薬も、10mg/kgの腹腔内投与によりイミプラミンがNA、5-HT及びDA、またミアンセリンがNA及びDAの細胞外濃度を有意に増加させた。同様の方法で測定した参ホ-3の試験でもミルナシプランは、NA、5-HT及びDAの細胞外濃度をいずれも200%以上に増加させており、本実験結果を支持すると考えられた。ミルナシプラン及びイミプラミンによる細胞外NA、5-HT及びDAの増加は、いずれもNA及び5-HT再取り込み阻害作用に基づく作用、またミアンセリンによる細胞外NA及びDAの増加は、主にミアンセリンの α_2 受容体阻害作用を介したNA及びDAの放出促進に基づく作用であると考えられた。ミルナシプランの脳内NA及び5-HTの細胞外濃度増加作用を機序の類似するイミプラミンと比較すると同用量の最大変化率の比で各々0.9及び1.4であった。本実験結果より、ミルナシプランは、無麻酔無拘束ラットにおいて脳内モノアミンの細胞外濃度を増大させたことから、脳内モノアミン神経系をin vivoにおいても賦活することが示唆された。

経口投与(図ホ-8、9)：ミルナシプランは、10mg/kg以上の経口投与によりNA及び5-HTいずれの細胞外濃度とも有意に増加させた。薬物投与前との比較で最大変化率(各々NA vs 5-HT)は、10mg/kgの時223% vs 256%、30mg/kgの時352% vs 317%であった。一方、対照薬のイミプラミンは、10mg/kgの経口投与ではNAの細胞外濃度のみを、30mg/kgではNA及び5-HTの細胞外濃度を有意に増加させた。薬物投与前との比較で最大変化率(各々NA vs 5-HT)は、10mg/kgの時337% vs 156%、30mg/kgの時371% vs 162%であり、明らかにNAよりも5-HTの細胞外濃度に対する効果の方が弱いと考えられた。本実験結果より、ミルナシプランはラットへの経口投与によりNA及び5-HT両者の再取り込み阻害効果を反映して脳内でNA及び5-HTの細胞外濃度をともに増加させること並びにその効果はNAと5-HTで同程度であることが明らかとなった。またその効果をイミプラミンと比較すると30mg/kgの最大変化率の比でNAが0.9、5-HTが2.0であり、NA神経系の賦活効果ではイミプラミンと差異はないが、5-HT神経の賦活に関してはイミプラミンの2倍の細胞外濃度増加作用があることが示唆された。

表ホ-14 ラットにおける脳内の細胞外モノアミン及びその代謝物濃度に対する
ミルナシプラン、イミプラミン及びミアンセリンの作用

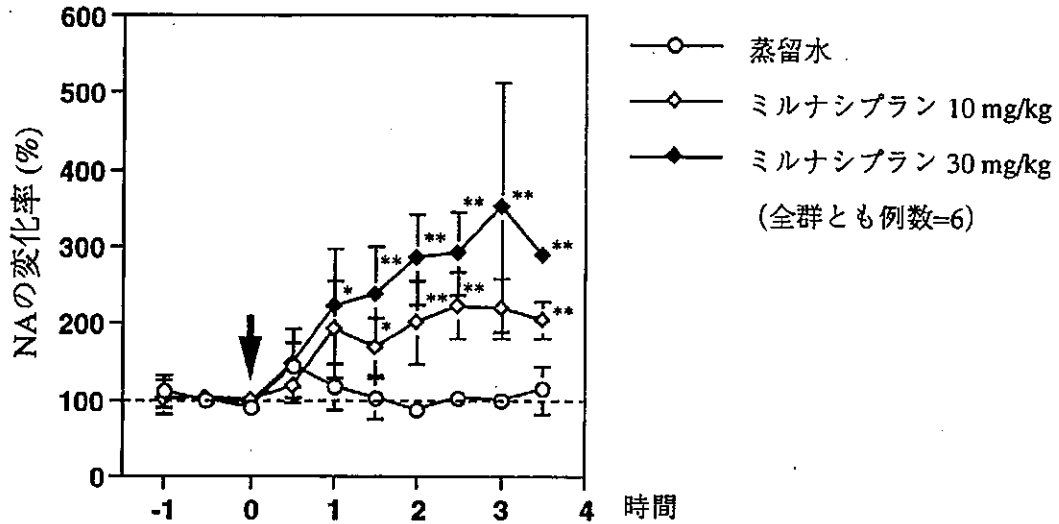
薬物及び投与量	測定物質	例数	薬物投与前3試料の平均を100とした薬物投与後の変化率(%)						
			0.5時間	1時間	1.5時間	2時間	2.5時間	3時間	
生理食塩液	NA	6	84±19	69±17	80±21	87±40	83±40	76±26	
	5-HT	9	104±24	101±25	92±20	89±26	95±30	93±17	
	DA	8	108±26	90±22	88±11	83±15	93±31	78±20	
	DOPAC	9	103±12	102±14	100±15	98±17	95±21	94±24	
	HVA	9	102±7	102±10	104±9	105±9	103±7	101±9	
	5-HIAA	9	100±11	99±8	100±5	100±6	100±4	99±8	
	NA	6	236±64	267±98	238±42 *	238±53 *	246±51	209±48 **	
	5-HT	9	258±141**	224±64 **	201±65 **	208±90 **	189±99 **	166±79 *	
	DA	8	183±40	191±34 *	170±38	162±37	151±44	134±38	
ミルナシプラン 10 mg/kg, i.p.	DOPAC	9	106±10	94±9	88±11	87±11	84±14	84±15	
	HVA	9	105±10	104±9	100±8	98±10	97±9	96±9	
	5-HIAA	9	106±8	107±9	103±10	102±21	99±19	97±23	
	イミプラミン 10 mg/kg, i.p.	NA	5	225±66	270±92	276±120**	300±119**	288±131*	268±87 **
		5-HT	6	191±48	165±33 *	172±55 **	168±68 *	172±95 *	150±62
		DA	7	202±71 *	248±77 **	241±84 **	262±144**	250±122**	232±90 **
		DOPAC	7	103±5	95±10	94±14	93±14	96±14	91±11
		HVA	7	103±4	106±6	105±8	104±9	108±10	105±12
		5-HIAA	7	101±2	96±5	93±5	92±5	95±6	92±6
ミアンセリン 10 mg/kg, i.p.		NA	5	578±331**	660±308**	500±138**	403±116**	391±157**	312±95 **
		5-HT	8	112±19	99±28	93±35	91±27	85±20	90±37
		DA	8	222±106**	272±122**	264±106**	226±85 **	190±84 *	182±88 *
	DOPAC	8	105±9	97±12	95±9	95±8	95±10	94±10	
	HVA	8	102±5	100±7	96±5	96±5	97±7	96±8	
	5-HIAA	8	98±4	99±5	101±7	103±10	103±15	99±15	

値は、平均値±標準偏差

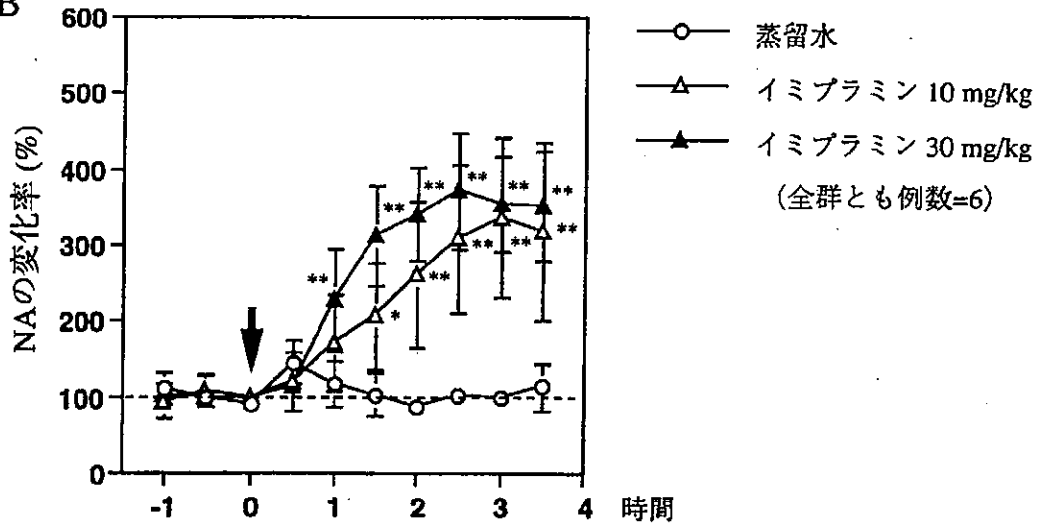
*:p<0.05、**:p<0.01 (生理食塩液投与群に対してのDunnettの多重比較検定)

i.p.: 腹腔内投与

A



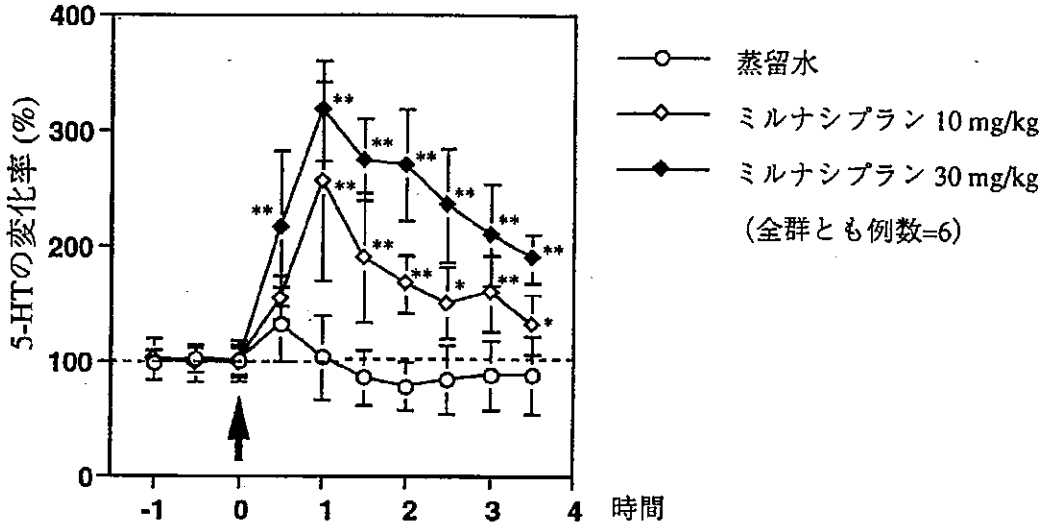
B



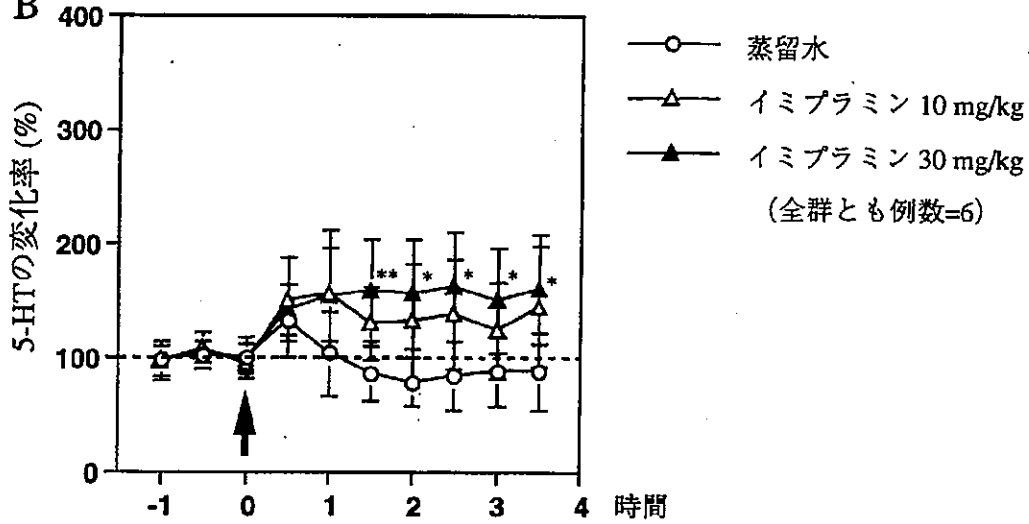
値は平均値±標準偏差、矢印は薬物投与時期を示す
 *: p<0.05, **: p<0.01 (蒸留水投与群に対するDunnettの多重比較検定)

図ホ-8 ラットにおける脳内の細胞外NA濃度に対するミルナシبران及びイミプラミンの経口投与による作用

A



B



値は平均値±標準偏差、矢印は薬物投与時期を示す

*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ (蒸留水投与群に対してのDunnnettの多重比較検定)

図ホ-9 ラットにおける脳内の細胞外5-HT濃度に対するミルナシプラン及びイミプラミンの経口投与による作用

4) 脳内各種受容体に対する親和性

ミルナシプランが薬理学的に重要な脳内神経受容体に対し親和性を示すか否かを明らかにし、ミルナシプランが他の神経受容体を介した抗うつ効果あるいは副作用を発現する可能性を探ることを目的として各種脳内受容体結合実験を行った。

(方法)

ラットより摘出した小脳を除く全脳、大脳皮質、海馬及び線条体のいずれかを緩衝液中でホモジナイズした後、遠心、懸濁操作を経て膜標品を調製した。ミルナシプラン及び対照薬を緩衝液に溶解し、16種の受容体について各々の表ホ-14に示したリガンドと共に反応させ、反応液をワットマンGF/Cフィルターを用いてろ過し、フィルター残渣放射能を測定した。

(成績)

ミルナシプランは、各種脳内神経受容体に対し親和性が極めて弱かった(表ホ-15)。一方、対照薬であるイミプラミンは、H₁、m-ACh、α₁、5-HT₂、シグマの5種類、またミアンセリンは、作用機序に関与するα₂以外にも5-HT₂、H₁、D₁-like、α₁、5-HT_{1A}の5種類の受容体に親和性(IC₅₀値<10³nM)を示した。本実験結果から、ミルナシプランは、NA及び5-HT再取り込み部位に選択的に作用する薬物であり、測定した16種の脳内神経受容体を直接介した薬理作用を発現しないことが示唆された。

表ホ-15 脳内各種神経受容体に対するミルナシプラン、イミプラミン及びミアンセリンの親和性(IC₅₀値:nM)

リガンド	受容体	ミルナシプラン	イミプラミン	ミアンセリン
[³ H]ブラゾシン	α ₁	>10 ⁴	200	200
[³ H]ラウオルシン	α ₂	>10 ⁴	1600	70
[³ H]DHA	β	>10 ⁴	10000	3200
[³ H]8-OH-DPAT	5-HT _{1A}	>10 ⁴	>10 ⁴	620
[³ H]ケタンセリン	5-HT ₂	>10 ⁴	280	6.1
[³ H]SCH 23390	D ₁ -like	>10 ⁴	1400	190
[³ H]YM 09151-2	D ₂ -like	>10 ⁴	2400	7300
[³ H]QNB	m-ACh	>10 ⁴	130	5700
[³ H]ピリラミン	H ₁	>10 ⁴	12	7.7
[³ H]ヒスタミン	H ₂ 、H ₃	>10 ⁴	>10 ⁴	>10 ⁴
[³ H]Ro15-4513	ベンゾジアゼピン	>10 ⁴	>10 ⁴	>10 ⁴
[³ H]GABA	GABA _A	>10 ⁴	>10 ⁴	>10 ⁴
[³ H]バクロフェン	GABA _B	>10 ⁴	>10 ⁴	>10 ⁴
[³ H]MK-801	NMDA	>10 ⁴	>10 ⁴	>10 ⁴
[³ H]DTG	シグマ	>10 ⁴	310	3300
[³ H]ナロキソン	オピオイド	>10 ⁴	>10 ⁴	>10 ⁴

膜標品は、5-HT_{1A}:海馬、D₁-like及びD₂-like:線条体、シグマ及びオピオイド:小脳を除く全脳、その他:大脳皮質を用いた。

値は、平均値(例数=2)

IC₅₀値は、50%阻害濃度を表す

5) モノアミンオキシダーゼ(MAO)活性に対する作用

脳内の細胞外NA及び5-HT濃度は、その分解酵素であるMAOの活性によっても影響されることが考えられることから、ミルナシプランのMAO活性に対する作用を検討した。

(方法)

ラットより摘出した脳を用いて脳ホモジネートを調製し、緩衝液と $[^{14}\text{C}]$ 5-HTあるいは $[^{14}\text{C}]$ β-フェニルエチルアミンを加え、37°で10分間反応させた。生じた分解物を各々エーテル層あるいはヘプタン層に抽出し、その放射能を測定した。酵素活性は、高濃度のクロルジリン又は(-)-デプレニル存在下の値を差し引いて特異的活性値を算出した後、被験薬非存在下での特異的活性値に対する百分率で示した。

(成績)

ミルナシプランはMAO-A及びMAO-B活性に対して影響を及ぼさなかった(表ホ-16)。よって、ミルナシプランのモノアミンの細胞外濃度の増加作用は、モノアミン分解(MAO活性)の阻害に基づくものではないことが明らかとなった。一方、対照薬のイミプラミンは、 10^{-6}M よりMAO-Bに対する弱い阻害を、 10^{-5}M 以上でMAO-A及びMAO-B活性に対する明らかな阻害作用を示した。ミアンセリンは、 10^{-5}M 以上でMAO-Bに対する明らかな阻害が、 10^{-4}M でMAO-Aに対する弱い阻害が認められた。

表ホ-16 ラット脳ホモジネートのモノアミンオキシダーゼ活性に対するミルナシプラン、イミプラミン及びミアンセリンの作用

薬物	濃度 (M)	MAO活性 (%)	
		MAO-A	MAO-B
ミルナシプラン	10^{-5}	95.9 ± 4.7	98.4 ± 1.8
	10^{-5}	97.9 ± 2.3	94.8 ± 3.5
	10^{-4}	95.2 ± 2.6	92.9 ± 4.3
イミプラミン	10^{-6}	91.9 ± 1.2	81.9 ± 5.5
	10^{-5}	77.2 ± 11.9	55.8 ± 13.0
	10^{-4}	57.0 ± 5.8	22.0 ± 6.8
ミアンセリン	10^{-6}	91.6 ± 7.6	92.7 ± 6.5
	10^{-5}	90.3 ± 2.7	80.0 ± 8.0
	10^{-4}	86.2 ± 0.6	56.8 ± 6.9

値は、平均値 ± 標準偏差 (例数=3)

6) 前シナプス性5-HT神経の5-HT_{1A}受容体機能に対する反復投与の影響

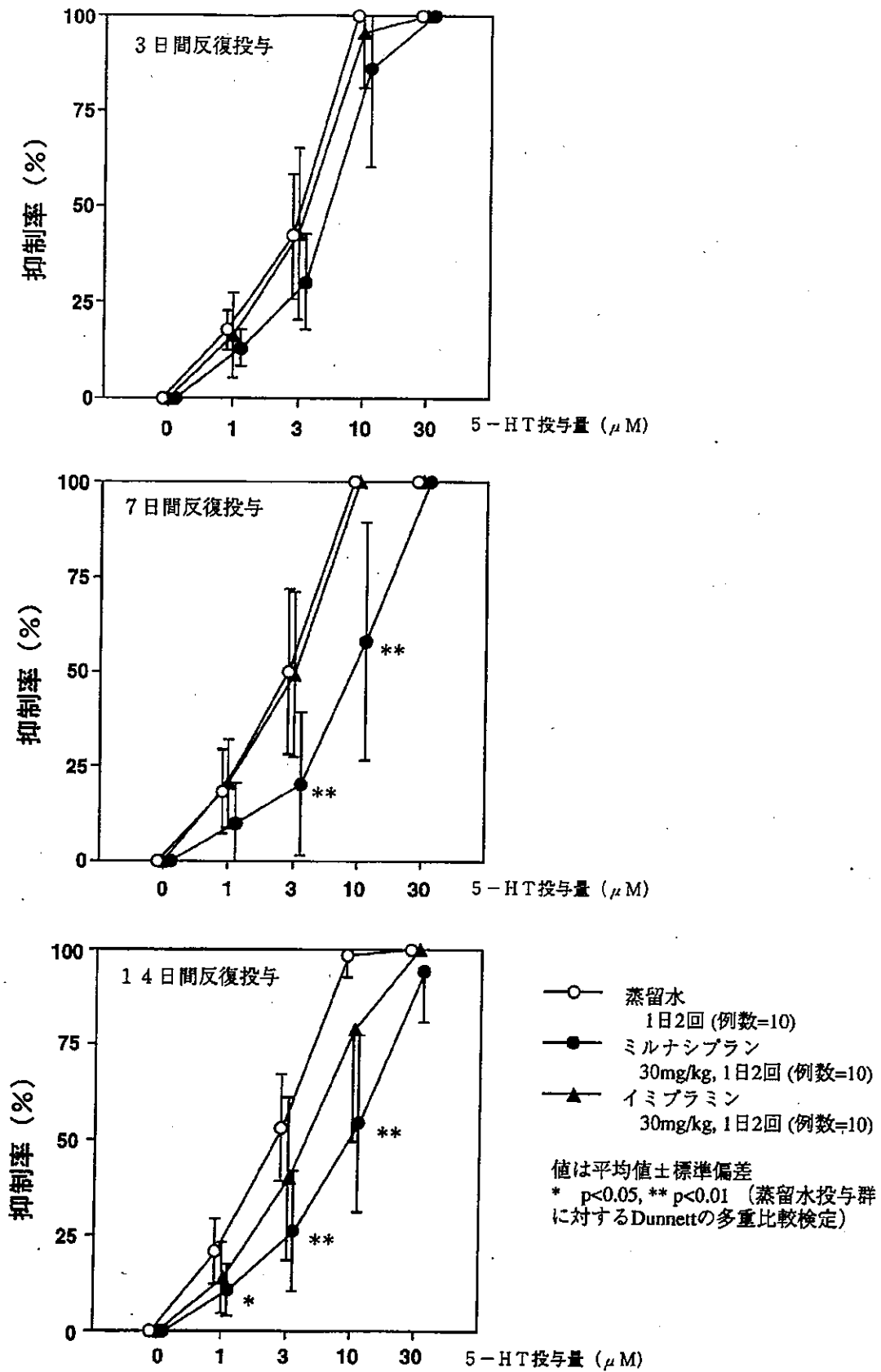
5-HT神経系は、5-HTの遊離を調節している前シナプス神経とその5-HTにより刺激を受けて情報を伝える後シナプスに分けられる。前シナプス上の5-HT_{1A}受容体は、5-HT遊離を抑制的に調節している。抗うつ薬は反復投与により5-HT_{1A}受容体の脱感作を引き起こし、5-HT遊離を増大させる。これが臨床上の抗うつ効果発現に関与すると指摘されている。そこで、前シナプスの5-HT_{1A}受容体機能の指標として広く用いられている背側縫線核の発火頻度測定によって5-HTに対する感受性の変化を検討した。

(方法)

ラットにミルナシبران又はイミプラミンを30mg/kg、1日2回の経口投与処置を3、7及び14日間行った。最終投与の15~18時間後に脳を摘出してピプラトームにより厚さ約350 μ mの背側縫線核を含む前額面切片を作成した。単一ユニット電位は、縫線核上に設置したガラス微小電極より増幅装置を介して導出し、コンピューターにて10秒あたりの発火数として経時的に記録した。発火頻度が安定した後、5-HTを1、3、10、30 μ Mの濃度で順に適用し、適用前の発火頻度に対する抑制率を算出した。

(成績)

ミルナシبران(30mg/kg、1日2回経口投与)は、3日間の反復投与で既にラット背側縫線核の5-HT感受性の低下傾向(5-HT10 μ Mの比較で、 $p < 0.1$)を引き起こし、7及び14日間反復投与では有意に5-HT感受性を低下させた(図ホ-10)。これに対してイミプラミン(30mg/kg、1日2回経口投与)の反復投与では、3、7及び14日間いずれも有意な感受性の変化は認められず、14日間投与で感受性の低下傾向(5-HT10 μ Mの比較で、 $p < 0.1$)が観察されたにすぎなかった。この成績から、ミルナシبرانは7日以上の反復投与により前シナプス神経の5-HT_{1A}受容体に脱感作現象を引き起こし、イミプラミンより早期に5-HT遊離の増大とそれに伴う5-HT神経系の賦活効果をもたらすことが示唆された。



図ホ-10 背側縫線核神経（前シナプス性5-HT神経）の5-HT_{1A}受容体における5-HT感受性に対するミルナシブラン及びイミプラミンの3, 7, 14日間反復投与の作用

7) 後シナプス性5-HT神経の5-HT_{1A}受容体機能に対する反復投与の影響

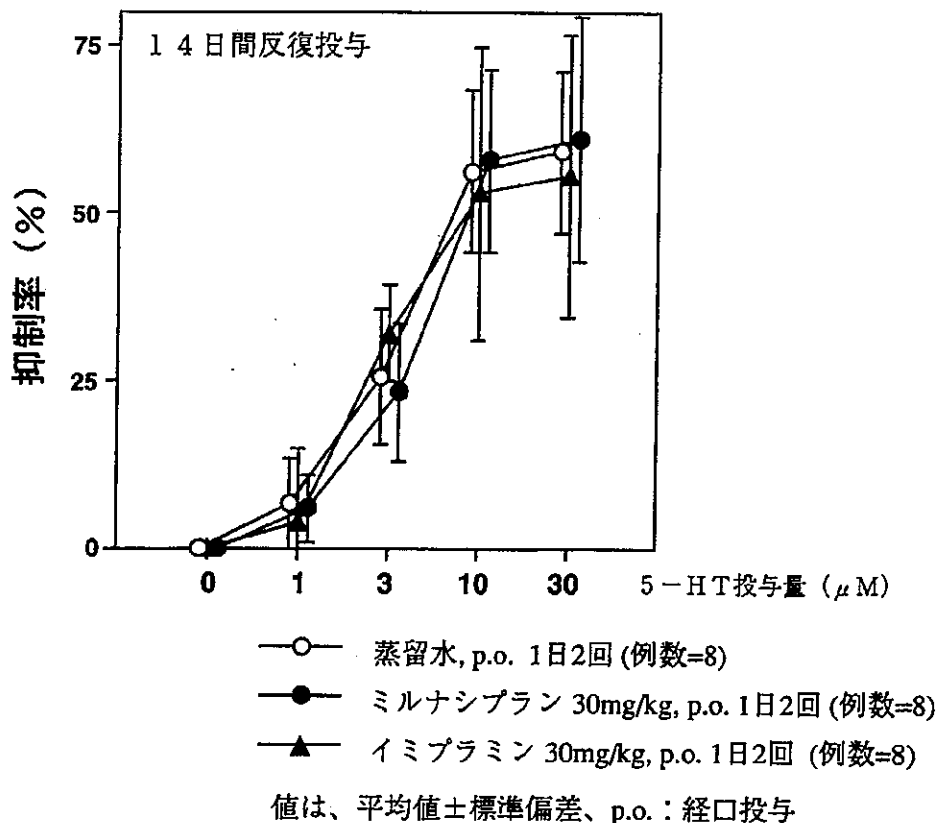
後シナプスに存在する5-HT_{1A}受容体は、抗うつ作用の発現に関与していると考えられている。ミルナシプランの反復投与による5-HT神経賦活効果が抗うつ作用に結びつくためには、その機能が保持されていることを検証する必要がある。そこで、ミルナシプランの反復投与による後シナプス(海馬)の5-HT_{1A}受容体機能に対する影響を検討した。

(方法)

ラットにミルナシプラン又はイミプラミンの30mg/kg、1日2回の経口投与処置を14日間行った。最終投与の15~18時間後に脳を摘出してピプラトームにより厚さ約400 μ mの海馬切片を作成した。CA₃野からの入力繊維を刺激することにより発生する電場電位を海馬CA₁野に設置したガラス微小電極より増幅装置を介して導出し、コンピューターにて8回の平均波形として経時的に記録した。電位振幅が安定した後、5-HTを1, 3, 10, 30 μ Mの濃度で順に適用し、適用前の振幅に対する抑制率を算出した。

(成績)

ミルナシプラン(30mg/kg, 1日2回経口投与)を14日間反復投与しても海馬のCA₁野の細胞において5-HT適用による抑制効果には全く影響が認められなかった(図ホ-11)。イミプラミンも同条件では全く影響を与えなかった。この成績から、ミルナシプランは反復投与しても後シナプス上の5-HT_{1A}受容体機能は保持されており、5-HTによってもたらされる情報は後シナプスにそのまま伝達されると考えられた。



図ホ-11 海馬(後シナプス性5-HT神経)の5-HT_{1A}受容体における5-HT感受性に対するミルナシプラン及びイミプラミンの14日間反復投与の作用

8) 反復投与による脳内 β 及び5-HT₂受容体数に対する作用

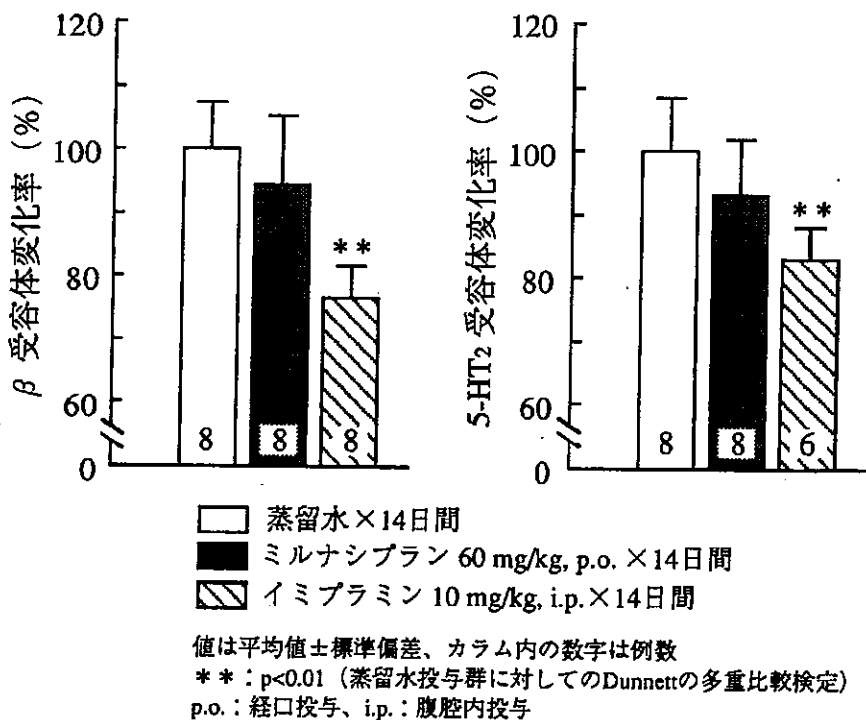
数種の抗うつ薬では、反復投与後に後シナプスの β 受容体数及び5-HT₂受容体数が減少することにより、NA及び5-HT神経系の活動が影響を受けるとの報告がある。また、臨床もうつ病患者において β 及び5-HT₂受容体数の増加を示唆する知見がある。しかし、現在のところこれらの受容体数を増加させたモデルは見いだされていないため、 β 及び5-HT₂受容体数に対する影響は正常ラットへの抗うつ薬の反復投与でのみ評価されている。そこで、正常ラットへのミルナシプランの反復投与による β 受容体数及び5-HT₂受容体数に対する作用を検討した。

(方法)

ラットにミルナシプラン60mg/kgを経口投与にて、イミプラミン10mg/kgを腹腔内投与にて14日間処置し、最終投与の24時間後に脳を摘出して大脳皮質より膜標品を調製した。膜標品を³H CGP 12177あるいは³H ケタンセリンの存在下で37°、20又は15分間反応させた。反応液をワットマンGF/Bフィルターで吸引ろ過し、フィルター残渣放射能を測定した。非特異的結合の測定は、各々アルプレノロール及びメチセルギド存在下で行った。

(成績)

ミルナシプラン60mg/kgを14日間反復経口投与しても β 及び5-HT₂受容体数に有意な変化は認められなかった(図ホ-12)。一方、イミプラミン10mg/kg投与群においては β -受容体と5-HT₂受容体共に、有意な受容体数の減少が認められた。また、添付資料ホ-6の試験結果においてもミルナシプランは、10mg/kgの2回/日を腹腔内に3週間反復投与しても β 及び5-HT₂受容体数に変化を与えなかったのに対し、イミプラミンは、同条件で既に1週間後から両受容体数を有意に減少させ、2週間後には β 、5-HT₂受容体数を生理食塩液群の各々71%及び67%まで低下させた。本実験及び添付資料ホ-6の結果からミルナシプランは、反復投与によって β 及び5-HT₂受容体数に変化を与えない薬物であることが示唆され、イミプラミンとは異なる性質を示すと考えられた。



図ホ-12 ミルナシプラン及びイミプラミンの反復投与による脳内 β 及び5-HT₂受容体数に対する作用

以上、ミルナシプランの作用機序は以下のように考えられた。

In vitroにおけるミルナシプランのNA及び5-HT再取り込み部位への親和性は、イミプラミンのKi値を1とした濃度比で1.7、1.4、取り込み阻害能は、イミプラミンのIC₅₀値を1とした濃度比で1.3、1.5 (Na⁺依存性取り込み)、0.4、2.9 (Na⁺依存性+Na⁺非依存性取り込み)であったことから、ミルナシプランは両部位に対して十分な阻害効果があると考えられた。また、NA及び5-HT取り込み阻害能 (IC₅₀値)は各々29.6nM、28.0nMと近似しており、in vitroでミルナシプランはNA及び5-HTのいずれの再取り込みも同程度阻害すると考えられた。一方、抗うつ効果あるいは副作用を含めて中枢神経系の活動に大きな影響を及ぼすと考えられるNA及び5-HTの後シナプス受容体、他の脳内神経受容体への親和性及びMAO活性に対する作用を検討したが、ミルナシプランは、いずれに対しても影響を及ぼさなかった。それに対しNA及び5-HTの後シナプス受容体では、イミプラミンが α_1 及び5-HT₂、ミアンセリンが5-HT₂、 α_1 及び5-HT_{1A}受容体に親和性を示し、その他の脳内神経受容体ではイミプラミンがH₁、m-ACh及びシグマ、ミアンセリンが α_2 、H₁及びD₁-like受容体に親和性を示した。また、MAO-A及びB活性に対してイミプラミンは、A:10⁻⁵M以上、B:10⁻⁶M以上、ミアンセリンは、A:10⁻⁴M以上、B:10⁻⁵M以上で各々10%以上の阻害作用が認められた。従って、第一、二世代の抗うつ薬とは異なり、ミルナシプランはNA及び5-HT再取り込み部位への選択性が非常に高い薬物であることが示唆された。In vivoにおけるミルナシプランの脳内NA及び5-HT細胞外濃度増加作用は、30mg/kgの腹腔内投与では最大で各々267%、258%、30mg/kgの経口投与では最大で各々352%、317%であった。即ち、投与経路にかかわらずNA及び5-HTの脳内細胞外濃度を十分かつ同程度増加させることが証明された。一方、イミプラミンのNA及び5-HT濃度に対する作用は、30mg/kg経口投与の最大で各々371%、162%であり、経口投与では5-HT濃度への作用が弱く(ミルナシプランの約1/2程度)、ミルナシプランとは機序に相違が生じると考えられた。このようにミルナシプランは「NA及び5-HT再取り込み部位に選択的に作用して、NA及び5-HT両神経系を同程度賦活することを作用機序とする」SNRIと称される抗うつ薬に分類されることが証明された。

また、ミルナシプランの反復投与(7, 14日間)により縫線核(前シナプス性)細胞の5-HTに対する感受性が有意に低下した。従って、ミルナシプランは反復投与することで前シナプスに存在する5-HT_{1A}受容体を脱感作させて5-HT遊離の増加をもたらすという新しい薬効が生じ、本来持っている取り込み阻害作用の効果がさらに増大すると推定された。抗うつ作用の発現に関わる後シナプス(海馬)の5-HT_{1A}受容体機能には変化は認められなかったことから、その増大した5-HTの情報はそのまま後シナプスに伝達されて抗うつ作用の発現に寄与すると考えられた。一方、同時に検討したイミプラミンは、14日間の反復投与でも有意な影響は認められなかった。よって、ミルナシプランは前シナプス細胞の5-HT_{1A}受容体の脱感作を経て発現する5-HT神経系の賦活作用という点でイミプラミンとは異なる薬理学的特性を持つことが示唆された。このことから、「臨床試験においてミルナシプランが反復投与後に抗うつ効果を発現する機序は、前シナプス性5-HT_{1A}受容体の脱感作による5-HT遊離の増加とそれに伴う5-HT神経系の賦活にある」、また「本作用をイミプラミンより早期に発現することが临床上イミプラミンより早く治療効果を発現することに関係している」と考えられた。

イミプラミンの作用機序の1つとして提唱されている反復投与による β 及び5-HT₂受容体数の減少は、イミプラミンには認められたが、ミルナシプランでは認められない点では異なっていた。一方、ミアンセリンは、NA取り込み阻害作用を示したが5-HT取り込み阻害が弱かったこと、また α_2 受容体に対する阻害によるNA放出の促進が主な機序として報告されていることから、ミルナシプランとは作用機序を異にすると考えられた。

よって、ミルナシプランは、一次作用点としてNA及び5-HT再取り込み部位に選択的に結合し、かつ経口投与でも両者に同程度に作用して抗うつ効果を発揮するSNRIであること、また反復投与では前シナプス性5-HT_{1A}受容体を脱感作することでイミプラミンより早期に5-HTの遊離とそれに伴う5-HT神経系の賦活効果が一層高まること、さらに、イミプラミン及びミアンセリンとは異なり受容体への直接作用やMAO阻害を介した薬理作用は極めて弱いことが薬理学的特徴として示唆された。

(3) 選択的セロトニン再取り込み阻害薬(SSRI)との比較試験

最近、海外の「うつ病性障害」に対する治療指針において、SSRIが第一選択薬として記載されている。従って、临床上SSRIの有用性は、広く認知されている。そこで、このSSRIと比較検討することは、SNRIであるミルナシプランの薬理学的特徴を明らかにする上で重要であると考え、以下の薬理試験を行った。

1) 前シナプス性5-HT神経の5-HT_{1A}受容体機能に対する反復投与の影響・・・添付資料追ホー4

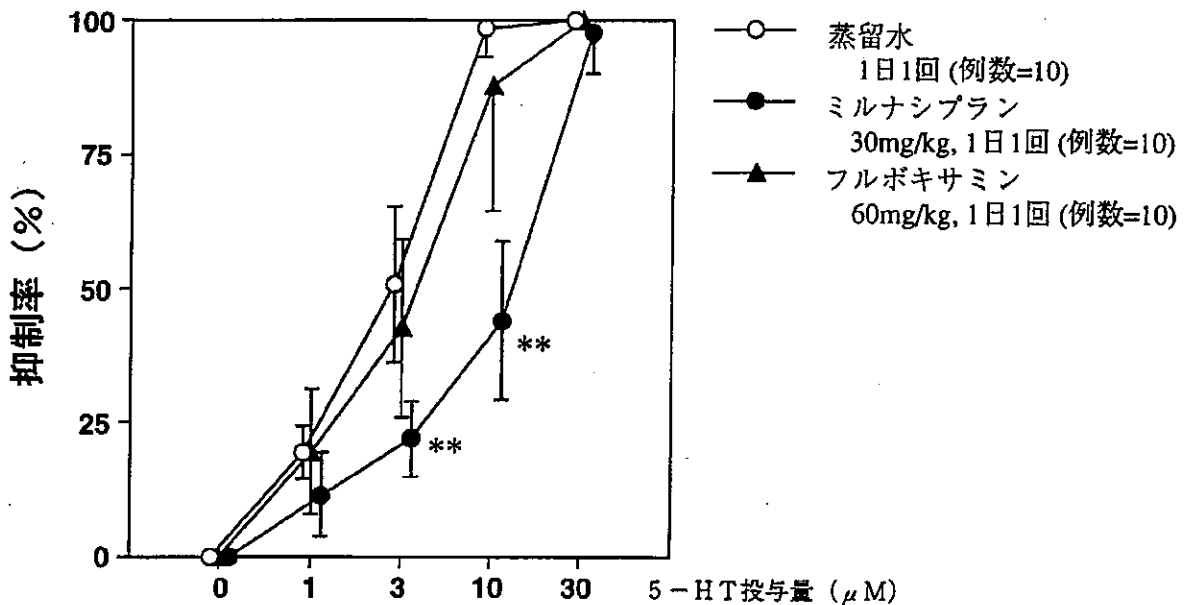
前シナプス上で5-HT遊離を抑制的に調節している5-HT_{1A}受容体は、継続的に強い刺激を受け続けると脱感作されることが報告されている。その結果、5-HT遊離が増大して後シナプスへの5-HTによる刺激が高められる。この現象が临床上の抗うつ効果発現に関与していると指摘されている。そこで、前シナプスの5-HT_{1A}受容体機能の指標として広く用いられている背側縫線核の発火頻度測定によってフルボキサミン反復投与後の5-HTに対する感受性の変化をミルナシプランと比較検討した。

(方法)

資料概要181頁に準ずる。

(成績)

ミルナシプラン(30mg/kg, 1日1回経口投与)は、7日間の反復投与でラット背側縫線核の5-HT感受性を有意に低下させた。これに対してフルボキサミン(60mg/kg, 1日1回経口投与)の7日間反復投与では、5-HT感受性に変化は認められなかった(図ホー13)。この成績から、ミルナシプランはフルボキサミンよりも早期に前シナプス性5-HT受容体に脱感作現象を引き起こすことが示唆された。



値は平均値±標準偏差

* p<0.05, ** p<0.01 (蒸留水投与群に対するDunnettの多重比較検定)

図ホー13 背側縫線核神経(前シナプス性5-HT神経)の5-HT_{1A}受容体における5-HT感受性に対するミルナシプラン及びフルボキサミンの7日間反復投与の作用

2) 強制水泳モデルにおける不動時間に対する作用

強制水泳による絶望状態モデルは、多くの抗うつ薬が絶望状態の時間を短縮する効果を示すことから繁用されている実験系である。そこで、動物における絶望状態に対するフルボキサミンの作用を検討し、ミルナシブランと比較した。

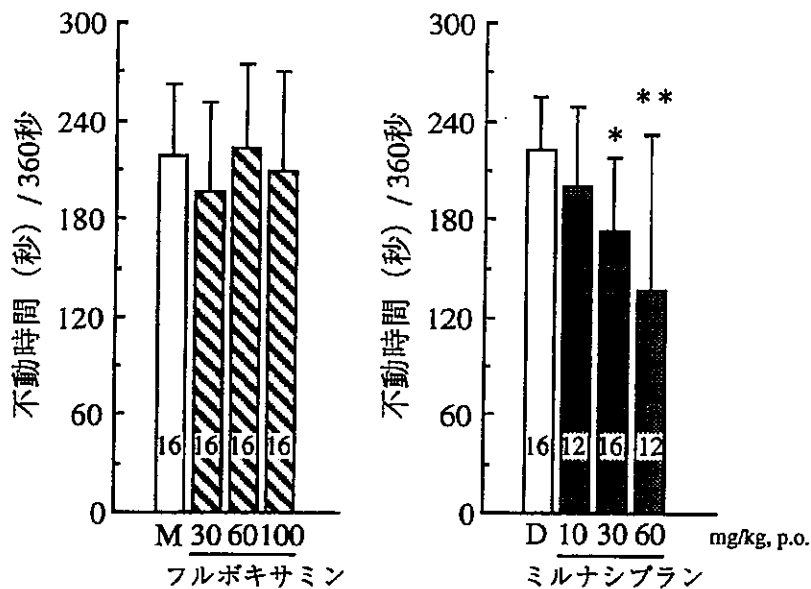
(方法)

資料概要170頁に準ずる。

(成績)

ラット(図ホ-14)：ミルナシブランの経口投与では、30mg/kg以上で有意な不動時間短縮作用が認められたのに対して、フルボキサミンは100mg/kgの経口投与でもほとんど影響を及ぼさなかった。

マウス(図ホ-15)：ミルナシブランの経口投与では、30mg/kg以上で有意な不動時間短縮作用が認められたのに対して、フルボキサミンは60mg/kgの経口投与でもほとんど影響を及ぼさなかった。

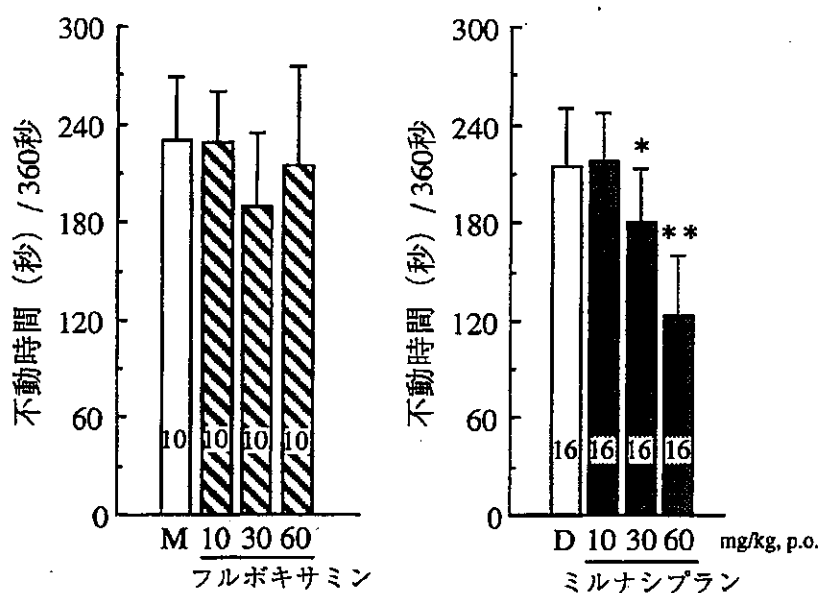


値は平均値±標準偏差、カラム内の数字は例数

D：蒸留水、M：0.5%メチルセルロース溶液、p.o.：経口投与

*：p<0.05、**：p<0.01 (蒸留水ならびに0.5%メチルセルロース溶液投与群に対するDunnettの多群検定)

図ホ-14 ラット不動時間に対するミルナシブラン及びフルボキサミンの作用



値は平均値±標準偏差、カラム内の数字は例数
 D: 蒸留水、M: 0.5%メチルセルロース溶液、p.o.: 経口投与
 *: p<0.05、** : p<0.01 (蒸留水ならびに0.5%メチルセルロース溶液投与群
 に対してのDunnettの多群検定)

図ホ-15 マウス不動時間に対するミルナシブラン及びフルボキサミンの作用

3) 条件恐怖行動に対する作用

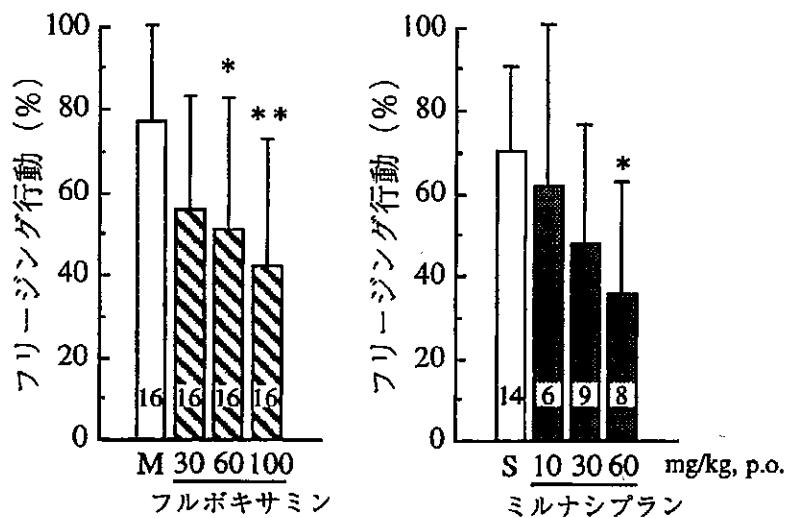
電撃による恐怖を条件づけられたラットがその条件提示(場所、音など)により発現するフリージング行動は、心理的情動ストレスのモデルと位置づけられている。情動の表現型としては恐怖・不安を反映するが、本モデルはSSRIが有効なことから、5-HT神経系の機能低下に関連する神経・精神障害(うつ、不安など)の指標となると考えられる。そこで、動物における心理的情動ストレスに対するフルボキサミンの作用を検討し、ミルナシブランと比較した。

(方法)

資料概要171頁に準ずる。

(成績)

ミルナシブラン及びフルボキサミンの経口投与により、フリージング行動の時間は用量依存的に短縮され、いずれも60mg/kgで有意差が認められた(図ホ-16)。



値は平均値±標準偏差、カラム内の数字は例数
 S：生理食塩液、M：0.5%メチルセルロース溶液、p.o.：経口投与
 * p<0.05, ** p<0.01 (生理食塩液ならびに0.5%メチルセルロース溶液投与群
 に対してのDunnettの多重比較検定)

図ホ-16 ラットフリージング行動に対するミルナシプラン及びフルボキサミンの作用

以上、ミルナシプランとSSRIとの比較試験において以下のことが明らかとなった。

ミルナシプラン(30mg/kg)は、ラット背側縫線核の発火頻度を指標とした前シナプス性5-HT_{1A}受容体機能を7日間の反復投与により脱感作させた。これに対してフルボキサミンは、倍量を7日間反復投与してもこのような変化は認められなかった。従って、フルボキサミンは前シナプス性5-HT_{1A}受容体の脱感作する効果が弱いあるいはさらに長期間の反復投与を要すると考えられた。このことから、ミルナシプランはフルボキサミンよりも早期に前シナプス性5-HT_{1A}受容体脱感作による5-HT遊離の増加とそれに伴う後シナプスへの5-HT刺激の増大をもたらすことが示唆された。本作用は、臨床上の抗うつ効果発現と関係していると指摘されていることから、ミルナシプランはフルボキサミンよりも早期に抗うつ効果を発現することが期待された。

ミルナシプランは、強制水泳及び条件恐怖の両モデルで有意な効果が認められたが、フルボキサミンは条件恐怖モデルでのみ効果を認めた。逆に第一世代を代表するイミプラミンは強制水泳試験でのみ効果を示しており、ミルナシプランは第一世代とSSRIの抗うつ薬の両方の薬理学的特徴を併せ持つことが示唆された。

(4) その他の薬理試験

1) 抗コリン作用

①フィゾスチグミン誘発致死に対する作用

(方法)

ミルナシبران又はイミプラミンの腹腔内投与30分後に、フィゾスチグミン0.6mg/kgを静脈内投与し、その10分後の死亡数を観察した。

(成績)

ミルナシبرانは、60mg/kg腹腔内投与でもフィゾスチグミン誘発による致死率に影響を及ぼさなかった(表ホ-17)。一方、イミプラミンは30mg/kgの腹腔内投与でフィゾスチグミン誘発致死を有意に抑制した。

表ホ-17 フィゾスチグミン誘発致死に対するミルナシبران及びイミプラミンの作用

薬物	投与量(mg/kg, i.p.)	死亡数/動物数
生理食塩液		5/5
ミルナシبران	10	5/5
	30	5/5
	60	5/5
イミプラミン	3	5/5
	10	5/5
	30	2/5 *

*: $p < 0.05$ (生理食塩液投与群に対しての χ^2 検定)

i.p. : 腹腔内投与

②オキシトレモリン誘発振戦に対する作用

(方法)

ミルナシبران又はイミプラミンの腹腔内投与30分後、オキシトレモリン1mg/kgを腹腔内投与し、誘発される振戦をその10分後から5分間観察した。振戦の程度は、0:正常、0.5:断続的な弱い振戦、1:持続的な弱い振戦、1.5:持続的な弱い振戦に加え、断続的な中程度の振戦、2:持続的な中程度の振戦、2.5:持続的な中程度の振戦に加え、断続的な著明な振戦、3:持続的な著明な振戦の7段階でスコア化して評価した。

(成績)

ミルナシبرانの腹腔内投与は、オキシトレモリン誘発振戦に対し抑制作用を示さず、逆に30mg/kg以上で有意な増強作用が認められた(表ホ-18)。一方、イミプラミンの腹腔内投与では、30mg/kg以上でオキシトレモリン誘発振戦は用量依存的かつ有意に抑制された。

表ホ-18 オキソトレモリン誘発振戦に対するミルナシبران及びイミプラミンの作用

薬物	投与量 (mg/kg i.p.)	例 数	振戦スコア						総合 スコア	有意差 検定	
			0.	0.5	1	1.5	2	2.5			3
生理食塩液		5					5			10	
ミルナシبران	10	5			1		4			9	
	30	5					1	1	3	13.5	*
	60	5							5	15	**
イミプラミン	10	5			1		4			9	
	30	5			3	1	1			6.5	*
	60	5		1	4					4.5	**

値は、該当するスコアを観察した例数を示す

総合スコアは、各用量におけるスコアの合計を示す

* : $p < 0.05$ 、** : $p < 0.01$ (生理食塩液投与群に対して χ^2 検定)

i.p. : 腹腔内投与

2) 心機能に対する作用

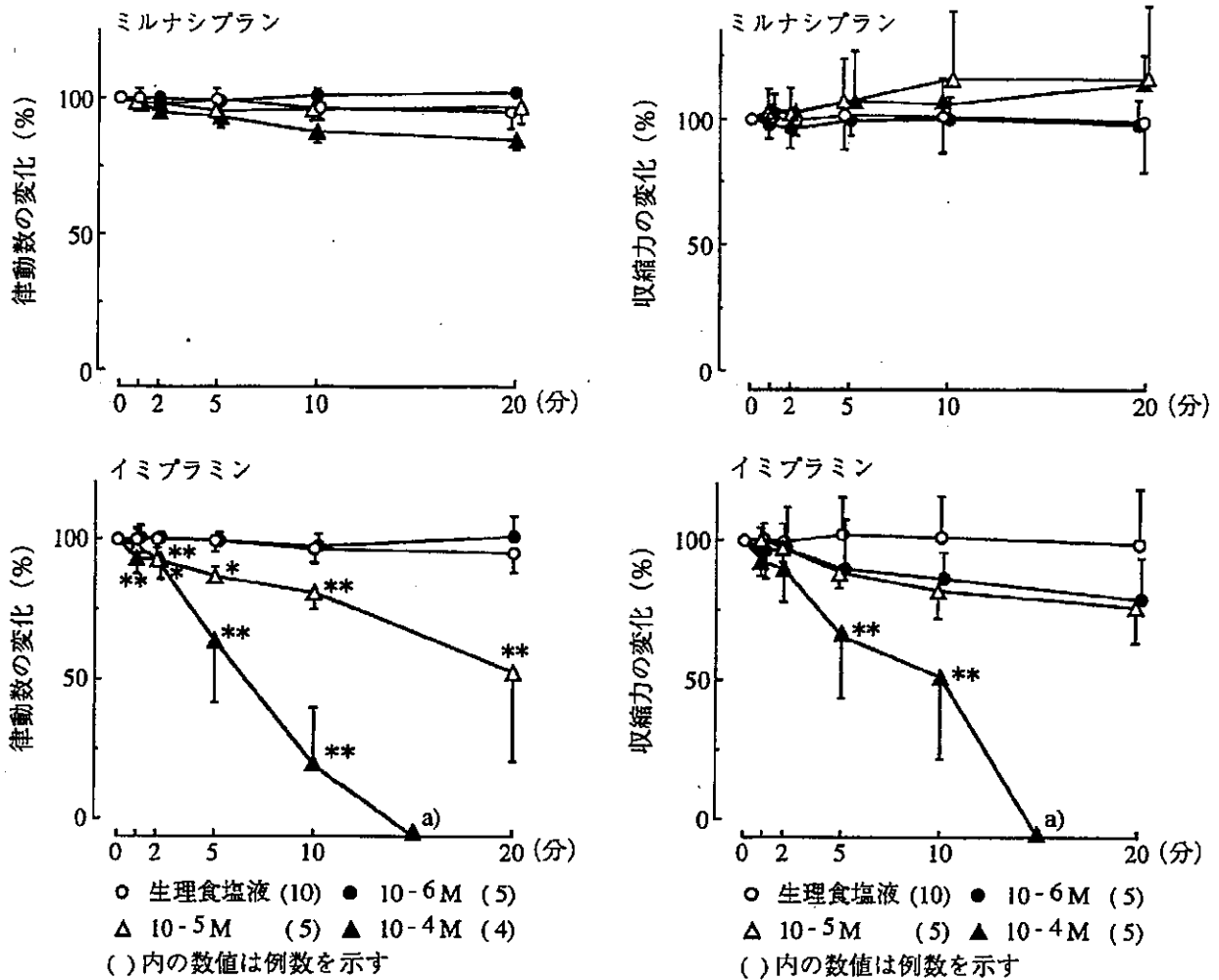
① 摘出心房収縮及び律動数に対する作用

(方法)

モルモットより心臓を摘出し、心房を心室より分離した。心房筋を37° のリンゲル液槽中に懸垂し、自発収縮をFDピックアップを介して、律動数を心拍数計にて測定し、ポリグラフ上に記録した。測定は、被験薬液を適用後20分間行い、値は適用前を100とした経時変化で示した。

(成績)

ミルナシبرانは、 $10^{-6}M$ 及び $10^{-5}M$ の濃度で収縮力及び律動数に影響を及ぼさなかった。 $10^{-4}M$ では、15%の律動数の減少が認められたが有意差は認められなかった(図ホ-17)。イミプラミンは、 $10^{-6}M$ より20%の収縮力の減弱を示し、 $10^{-5}M$ では収縮力の減弱(25%)と律動数の有意な減少を生じ、 $10^{-4}M$ では投与の10~20分後に心房の自動運動が停止した。



値は平均値±標準偏差 a) 10～20分間に心臓停止

* p<0.05, ** p<0.01 (生理食塩液適用群に対してのDunnettの多重比較検定)

図ホー17 モルモット摘出心房収縮及び律動数に対するミルナシبران及びイミプラミンの作用

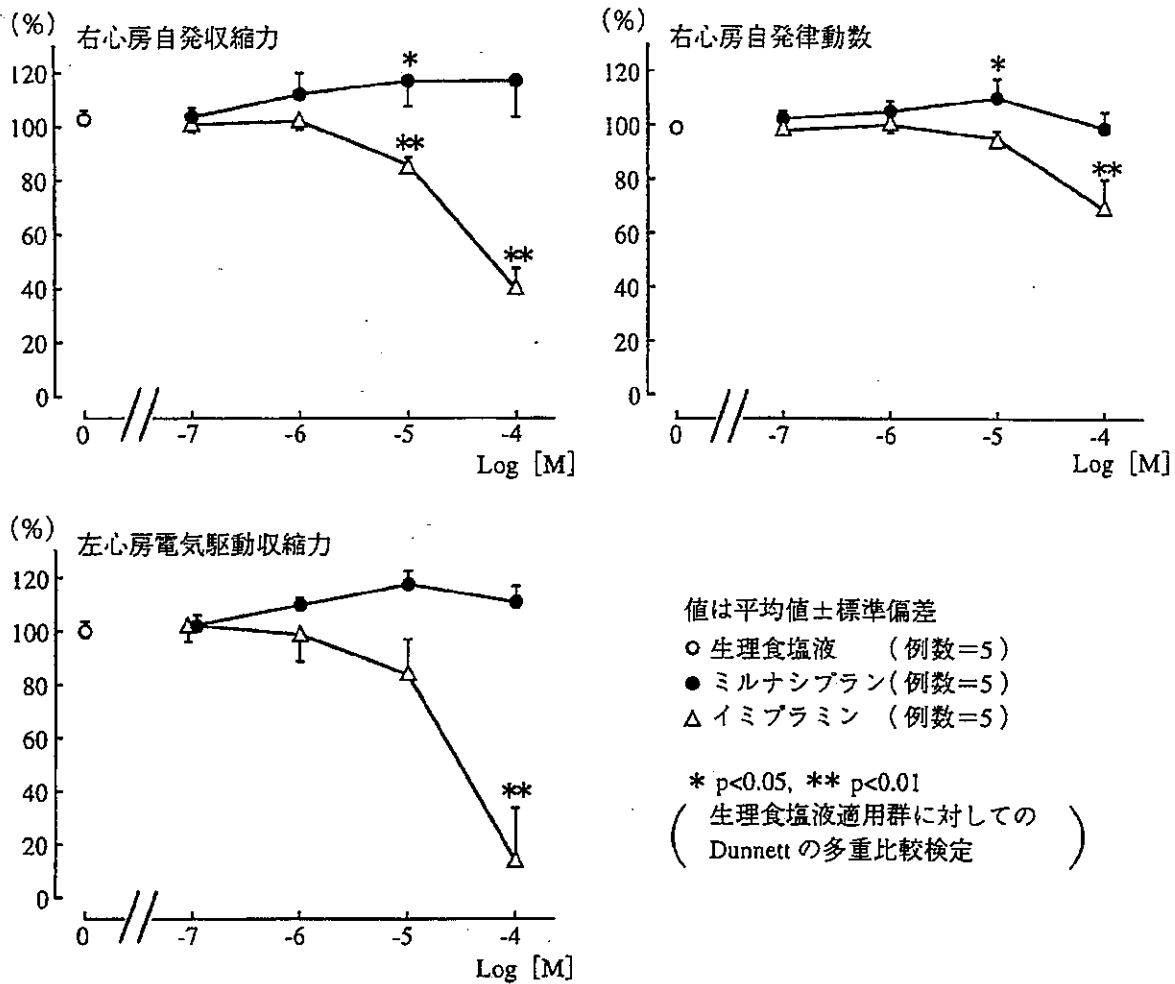
②摘出心房の自発収縮及び電気駆動収縮に対する作用

(方法)

ウサギより心臓を摘出し、左右の心房標本を作成した。心房標本は、心耳端をFDピックアップに接続して、37°のリンゲル液槽内に0.5gの静止張力を負荷して懸垂した。右心房標本は、自発の収縮力及び律動数を、左心房標本は、電気刺激を連続的に加えることにより発生する収縮張力を、歪圧カンプ及び心拍計を介してインク式オシログラフ上に記録した。測定値は、各濃度とも適用10分後の値を適用前を100とした百分率で示した。

(成績)

ミルナシبرانは、右心房標本の自発収縮に対して10⁻⁴Mまで抑制作用を示さず、逆に10⁻⁵M及び10⁻⁴Mで収縮力を各々17%、10⁻⁵Mで律動数を10%増大させた。また左心房標本の電気駆動収縮に対しては、10⁻⁴Mまで明らかな影響を及ぼさなかった(図ホー18)。一方、イミプラミンは、自発収縮力に対して10⁻⁵Mから濃度依存的な収縮力の低下を示し、10⁻⁴Mで収縮力は50%以下となり、律動数も有意に減少した。電気駆動収縮に対しても10⁻⁴Mで収縮の著しい低下が認められた。



図ホ-18 ウサギ摘出心房の自発収縮及び電気駆動収縮に対するミルナシプラン及びイミプラミンの作用

以上、その他の薬理試験において1)フィゾスチグミン及びオキソトレモリンによって発現するコリン作動性の致死及び振戦に対し、イミプラミンは各々30mg/kgの腹腔内投与により明らかな抑制作用を示したが、ミルナシプランには薬効用量の上限(60mg/kg, 腹腔内投与)でも抑制作用は認められなかった。また、Stengerらも、ピロカルピン誘発唾液分泌亢進を指標に抗コリン作用を比較し、本実験と同様の結論を得ている。2)モルモット又はウサギを用いて摘出心房の自発収縮力、律動数及び電気駆動収縮に対し、ミルナシプランは高濃度(10^{-4} M)でも抑制作用をほとんど示さなかった。これに比しイミプラミンは、 10^{-5} Mよりウサギで収縮力、モルモットで律動数の減少をきたし、 10^{-4} Mではモルモットで心停止を起こすなど強い抑制作用を示した。これらの事実からミルナシプランは、イミプラミンよりも抗コリン及び心機能抑制作用に基づく副作用の危険性が少ない薬物であることが示唆された。

(5) 脱エチル体及び環化体の効力についての薬理試験

脱エチル体及び環化体についてモノアミン取り込みに対する作用を検討したが、脱エチル体及び環化体共にほとんどモノアミン取り込み阻害作用を示さなかった(表ホ-19)。その他、テトラベナジン誘発眼瞼下垂及び強制水泳試験について検討したが、脱エチル体及び環化体共に薬理作用は認められなかった(表ホ-20)。

表ホ-19 ラット脳シナプトソームにおける脳内モノアミン取り込みに対する脱エチル体及び環化体の作用(IC₅₀値:nM)

薬物	[³ H]NA	[³ H]5-HT
ミルナシプラン	29.6 ± 2.6	28.0 ± 2.9
脱エチル体	10000 ± 2100	9580 ± 3100
環化体	>10 ⁴	>10 ⁴

値は、平均値±標準偏差(例数=3)
IC₅₀値は、50%阻害濃度を表す

表ホ-20 脱エチル体及び環化体の薬理試験成績

試験項目	動物種(例数)	適用経路	化合物	試験成績
テトラベナジン誘発 眼瞼下垂に対する作用	マウス(10)	静脈内	脱エチル体	10mg/kgで作用なし
		経口	環化体	100mg/kgで作用なし
強制水泳モデルにおける 不動時間に対する作用	マウス(8)	静脈内	脱エチル体	10mg/kgで作用なし
		経口	環化体	100mg/kgで作用なし

(6) 光学異性体の効力についての薬理試験

光学異性体についてモノアミン取り込みに対する作用を検討したところ、d体及びl体は、共にモノアミン取り込み阻害作用を示した(表ホ-21)。取り込み阻害のIC₅₀値は、d体がミルナシプランとほぼ同濃度、l体がミルナシプランより高濃度であった。その他の薬効試験においてもd体及びl体は、テトラベナジン誘発眼瞼下垂に対する拮抗作用、強制水泳試験における不動時間短縮作用を示し、いずれも作用用量は、ミルナシプラン=d体<l体であった(表ホ-22)。

表ホ-21 ラット脳シナプトソームにおける脳内モノアミン取り込みに対する光学異性体の阻害作用(IC₅₀値:nM)

異性体区分	[³ H]NA	[³ H]5-HT
ミルナシプラン	29.6 ± 2.6	28.0 ± 2.9
d体	19.3 ± 3.5	17.6 ± 0.42
l体	480 ± 139	93.7 ± 9.8

値は、平均値±標準偏差(例数=3)
IC₅₀値は、50%阻害濃度を表す

表ホ-22 光学異性体の薬理試験成績

試験項目	動物種 (例数)	適用経路	異性体 区分	試験成績
テトラベナジン誘発 眼瞼下垂に対する作用	マウス(10)	経口	ミルナシプラン d体 l体	1mg/kg以上で拮抗 1mg/kg以上で拮抗 10mg/kgで拮抗
強制水泳モデルにおける 不動時間に対する作用	マウス(8)	経口	ミルナシプラン d体 l体	30mg/kg以上で短縮 30mg/kg以上で短縮 100mg/kgで短縮

2. 一般薬理試験

総 括

ミルナシプランの一般薬理試験をガイドラインに従って実施し、その結果得られた試験成績を、表ホ-23に示した。ミルナシプラン100mg/kgの経口投与により1)一般症状の軽度の変化、2)中枢神経系に対し、睡眠延長、電撃痙攣致死数の増加及び体温下降作用、3)水及び電解質代謝に対して、 Na^+ 排泄量及び Na^+/K^+ 比の増加作用、4)その他の試験で催吐作用が認められた。in vitroでは、 10^{-4}M で自律神経系及び平滑筋に対して、摘出回腸のアセチルコリン及びヒスタミン収縮の10%程度の抑制が認められた。呼吸・循環器系に対して、麻酔イヌへの10mg/kgの静脈内投与により呼吸数増加、血圧下降及びPR間隔の一過性の延長を示した。なお、一般症状において毒性試験(100mg/kg以上の経口投与)で観察された発赤や振戦、流涎(5-HT神経系の賦活作用に基づくと推察される)は、100mg/kg以下の投与量では観察されなかった。催吐作用について拮抗試験を行ったところ、シサブリド(10mg/kg, 経口投与)及びオンダンセトロン(1mg/kg, 腹腔内投与)の前処置により拮抗され、ジメンヒドリナート(30mg/kg, 経口投与)の前処置では拮抗されなかった。また、血圧下降の機序は特定できないが、5-HT取り込み阻害作用を持つ抗うつ薬には共通して認められている。これら以外の一般薬理試験に対してミルナシプランには、有意な影響は認められなかった。

また、脱エチル体、環化体及び光学異性体の一般薬理試験についても検討し、成績を表ホ-24, 25に示した。脱エチル体及び環化体には、神経・筋接合部、呼吸・血圧等の循環器系、摘出心房収縮及び尿量・尿中電解質に対する影響は認められなかった。光学異性体では、d体及びl体が共にウサギ摘出心房に対して 10^{-4}M で自発収縮力を増大させた。呼吸・循環器系に対しては、麻酔イヌへの10mg/kgの静脈内投与でd体が血圧下降を示したが、l体では影響が認められなかった。呼吸、心拍数、血流量及び心電図にはd体及びl体は共に影響が認められなかった。また、水及び電解質代謝に対してl体の100mg/kgの経口投与により Na^+/K^+ 比の増加が認められた。神経・筋接合部に対する影響は、d体及びl体とも認められなかった。

表ホ-23 一般薬理試験成績一覧表

試験項目	動物種 (例数)	適用経路	投与量 (mg/kg)	試験成績
1) 一般症状および行動に 及ぼす影響	マウス(10)	経口	10, 30 100	作用なし 耳介及び尾の紅潮、群居性の消失 1/10例で腹臥位、呼吸緩徐
2) 中枢神経系に及ぼす影響				
①自発運動量に及ぼす影響 (自発運動測定装置)	マウス(8)	経口	10, 30, 100	作用なし
②麻酔増強作用 (チオペンタール麻酔)	マウス(10)	経口	10, 30 100	作用なし 麻酔時間延長
③ペンテトラゾール誘発痙攣に及ぼす影響				
a) 協力作用	マウス(10)	経口	10, 30, 100	作用なし
b) 拮抗作用	マウス(10)	経口	10, 30, 100	作用なし
④最大電撃痙攣に及ぼす影響	マウス(10)	経口	10, 30 100	作用なし 痙攣後の死亡数増加
⑤痛覚に及ぼす影響(圧刺激法)	ラット(10)	経口	10, 30, 100	作用なし
⑥正常体温に及ぼす影響	ラット(10)	経口	10, 30 100	作用なし 体温下降(最大1.1°C)
⑦自発脳波及び脳波覚醒反応 に及ぼす影響	ウサギ(3)	経口	10, 30, 100	作用なし
⑧協調運動に及ぼす影響	マウス(10)	経口	10, 30, 100	作用なし
3) 体性神経系に及ぼす影響				
①神経・筋接合部に及ぼす影響	ラット(5)	静脈内	1, 3, 10	作用なし
②筋弛緩作用(懸垂法)	マウス(10)	経口	10, 30, 100	作用なし
4) 自律神経および平滑筋 に及ぼす影響				
①摘出回腸に及ぼす影響	モルモット (5)	in vitro		10 ⁻⁴ Mで収縮を12%抑制 10 ⁻⁴ Mで収縮を14%抑制 10 ⁻⁴ Mまで作用なし 10 ⁻⁴ Mまで作用なし
a) アセチルコリン刺激				
b) ヒスタミン刺激				
c) パリウム刺激				
d) セロトニン刺激				
5) 呼吸・循環器系に及ぼす影響				
①呼吸運動、血圧、血流量、心拍数 及び心電図に及ぼす影響	麻酔イヌ (3)	静脈内	1, 3 10	作用なし 呼吸数増加、血圧下降、PR間隔の一過性の延長
②摘出心房に及ぼす影響	ウサギ(5)	in vitro		10 ⁻⁵ M以上で自発収縮力及び律動数が増加(最大で各々17%及び10%)
6) 消化器系に及ぼす影響				
①胃腸管内輸送能に及ぼす影響	マウス(10)	経口	10, 30, 100	作用なし
7) 水及び電解質代謝に及ぼす影響	ラット(6)	経口	1, 3, 10, 30 100	作用なし Na ⁺ 排泄及びNa ⁺ /K ⁺ 比が増加
8) その他				
①膀胱収縮に及ぼす影響	麻酔イヌ (3)	静脈内	1, 3, 10	作用なし
②催吐作用の検討	unks (8)	経口	60 100	作用なし 催吐作用あり

表ホ-24 脱エチル体及び環化体の一般薬理試験成績一覧表

試験項目	動物種 (例数)	適用経路	被験化合物	試験成績
1) 体性神経系に及ぼす影響 ①神経・筋接合部に及ぼす影響	ラット(5)	静脈内	脱エチル体 環化体	10mg/kgで作用なし 10mg/kgで作用なし
2) 呼吸・循環器系に及ぼす影響 ①呼吸運動、血圧、血流量、心拍数 および心電図に及ぼす影響	麻酔イヌ (3)	静脈内	脱エチル体 環化体	10mg/kgで作用なし 10mg/kgで作用なし
②摘出心房に及ぼす影響	ウサギ(5)	in vitro	脱エチル体 環化体	10 ⁻⁴ Mで作用なし 10 ⁻⁴ Mで作用なし
3) 水及び電解質代謝に及ぼす影響	ラット(6)	静脈内 経口	脱エチル体 環化体 脱エチル体 環化体	10mg/kgで作用なし 10mg/kgで作用なし 100mg/kgで作用なし 100mg/kgで作用なし

表ホ-25 光学異性体の一般薬理試験成績一覧表

試験項目	動物種 (例数)	適用経路	異性体 区分	試験成績
1) 体性神経系に及ぼす影響 ①神経・筋接合部に及ぼす影響	ラット(5)	静脈内	d体 l体	10mg/kgで作用なし 10mg/kgで作用なし
2) 呼吸・循環器系に及ぼす影響 ①呼吸運動、血圧、血流量、心拍数 および心電図に及ぼす影響	麻酔イヌ (3)	静脈内	d体 l体	10mg/kgで血圧下降 10mg/kgで作用なし
②摘出心房に及ぼす影響	ウサギ(5)	in vitro	d体 l体	10 ⁻⁴ Mで自発収縮力の増大 10 ⁻⁴ Mで自発収縮力の増大
3) 水及び電解質代謝に及ぼす影響	ラット(6)	経口	d体 l体	100mg/kgで作用なし 100mg/kgでNa ⁺ /K ⁺ 比が増加