

2.6.1 非臨床試験の概要文及び概要表の緒言

2.6.1 緒言

エンタカポン ((2*E*)-2-Cyano-3-(3,4-dihydroxy-5-nitrophenyl)-*N,N*-diethylprop-2-enamide) は、ニトロカテコール構造 (図 2.6.1-1) を有する末梢カテコール-*O*-メチル基転移酵素 (COMT) 阻害剤であり、レボドパの薬効を増強・効率化させるパーキンソン病治療薬である。

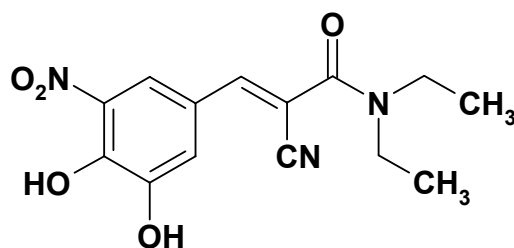


図 2.6.1-1 エンタカポンの構造式

パーキンソン病患者では線条体ドパミン含量が著しく低下していることから、血液脳関門を通過するレボドパの投与が試みられた。レボドパの効果は著明であったが、1日当たり数gという高用量を要し、レボドパから生成されるドパミンは悪心・嘔吐、不整脈、起立性低血圧などの副作用を誘発した。そこで、レボドパの脳内移行の効率化と副作用の軽減を目的に、カルビドパやベンセラジドなどのドパ脱炭酸酵素阻害剤 (DCI) の併用が試みられた。DCIはレボドパの1日当りの投与量を著明に減少させながら副作用も軽減したが、それでもレボドパの脳内移行量は投与量の5-10%程度とされ、さらなる効率化が求められている。

ドパ脱炭酸酵素を阻害すると、COMTによるレボドパから3-*O*-メチルドパ (3-OMD) への代謝経路が優位となり、半減期の長い3-OMDの血中濃度は高いレベルで推移する。レボドパと3-OMDは、血液脳関門に局在する大型中性アミノ酸トランスポーターの基質として相互に競合するため、血中3-OMD濃度が高いとレボドパの脳内移行が制限され、脳内ドパミンの十分な補充が行われない。そこに末梢COMT阻害薬を併用すると、ドパ脱炭酸酵素とCOMTが同時に阻害されるため、レボドパのバイオアベイラビリティが向上するとともに、血中3-OMD濃度の上昇も抑制され、レボドパの脳内移行が効率化すると考えられる。レボドパ/DCIはパーキンソン病に対する最も標準的な薬物治療であるが、レボドパの増強・効率化のため、末梢COMT阻害薬であるエンタカポンの併用は有用と考えられる。

非臨床試験の項では、社内報告書を中心に最近の公表論文も含め、薬効を裏付ける試験、副次的薬理作用、安全性薬理試験、薬力学的薬物相互作用について述べ、さらに薬物動態的な解析を踏まえた安全性評価を行った。

2.6.2 薬理試験の概要文

目次

略号	4
2.6.2.1 まとめ	6
2.6.2.2 薬効を裏付ける試験	8
(1) COMT 阻害作用 (<i>In vitro</i>)	8
1) COMT に対する阻害作用	8
2) 各種カテコールアミン代謝酵素に対する阻害作用	9
(2) 末梢 COMT 阻害作用 (<i>Ex vivo, in vivo</i>)	10
1) 末梢 COMT と線条体 COMT の阻害作用	10
2) レボドパ及び 3-OMD の血清 AUC に関する効果	11
3) レボドパの血中動態に関する効果	12
(3) 線条体レボドパ及びその代謝物含量に対する効果	13
1) レボドパ/カルビドパに対する増強効果	13
2) レボドパ節減効果	15
(4) 線条体ドパミン及びその代謝物の放出に関する効果	16
1) 単独効果	16
2) レボドパとの併用効果	17
3) レボドパ/カルビドパとの併用効果	18
(5) パーキンソン病モデルにおける改善効果	19
1) レセルピン処置マウス	19
2) 片側ドパミン神経破壊ラット	20
3) MPTP 処置マーモセット	23
(6) 幾何異性体(Z 体)の COMT 阻害作用	25
1) <i>In vitro</i> 試験	25
2) <i>Ex vivo</i> 試験	26
2.6.2.3 副次的薬理作用	27
(1) 血小板凝集及びエイコサノイド生成に関する作用	27
(2) 抗消化管潰瘍作用	27
(3) 抗浮腫作用	27
(4) 抗酸化作用	27
(5) 鉄キレート作用	27

(6) 腎保護作用	27
2.6.2.4 安全性薬理試験	29
(1) 中枢神経系に及ぼす影響	29
(2) 呼吸器系に及ぼす影響	29
(3) 心循環器系に及ぼす影響	29
(4) 平滑筋に及ぼす影響	30
(5) 消化管に及ぼす影響	30
(6) 腎臓に及ぼす影響	30
(7) その他の作用	30
(8) 考察	30
1) 体温に対する作用	30
2) アンフェタミン誘発常同行動に対する増強作用	31
3) 鎮痛作用	31
4) ドパミン取込み阻害に関する作用 (<i>in vitro</i>)	31
5) 摘出気管に対する作用	31
6) ノルアドレナリン誘発 dp/dt に対する作用	32
7) アセチルコリン誘発摘出回腸収縮に対する作用	32
2.6.2.5 薬力学的薬物相互作用	33
(1) MAO-B 阻害剤との相互作用	33
2.6.2.6 考察及び結論	35
2.6.2.7 参考文献	38

略号

α_2	adrenergic subtype receptor α_2 : アドレナリンサブタイプ受容体 α_2
AUC	area under the concentration-time curve: 濃度—時間曲線下面積
BA	Bioavailability: バイオアベイラビリティ
BBB	Blood brain barrier: 血液-脳関門
bid	twice daily: 1 日 2 回投与
COMI	catechol <i>O</i> -methyltransferase inhibitor: カテコール- <i>O</i> -メチル転移酵素阻害剤
COMT	catechol <i>O</i> -methyltransferase: カテコール- <i>O</i> -メチル転移酵素
DA	dopamine: ドパミン
DBH	dopamine- β -hydroxylase: ドパミン β 水酸化酵素
DCI	dopa decarboxylase inhibitor: ドパ脱炭酸酵素阻害剤
DDC	dopa decarboxylase: ドパ脱炭酸酵素
DOPAC	3,4-dihydroxyphenylacetic acid: 3,4-ジヒドロキシフェニル酢酸
dp/dt	dp/dt: 収縮期圧上昇速度
dTGR	double transgenic rat: ダブルトランスジェニックラット
EC ₅₀	50%有効濃度
ED ₅₀	50%有効用量
Enta	Entacapone: エンタカポン
4F2hc	4F2 heavy chain: 4F2 重鎖
HPLC/ECD	HPLC/electrochemical detection: 高速液体クロマトグラフィー／電気化学検出
HVA	homovanillic acid: ホモバリン酸
IC ₅₀	50%阻害濃度
i.p.	腹腔内投与
i.v.	静脈内投与
LAT	L-type amino acid transporter: L 体アミノ酸トランスポーター
L-DOPA	levodopa/L-3,4-dihydroxyphenylalanine: レボドパ
LNAT	Large neutral amino acid transporter: 大型中性アミノ酸トランスポーター
MAO	monoamine oxidase : モノアミン酸化酵素
MAO-A	monoamine oxidase-type A : A 型モノアミン酸化酵素
MAO-B	monoamine oxidase-type B : B 型モノアミン酸化酵素

MPTP	1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine: 1-メチル-4-フェニル 1,2,3,6-テトラヒドロピリジン
3-MT	3-methoxytyramine: 3-メトキシチラミン
6-OHDA	6-hydroxydopamine: 6-ヒドロキシドパミン
3-OMD	3- <i>O</i> -methyL-DOPA: 3- <i>O</i> -メチルドパ
p.o.	経口投与
PST	phenolsulfotransferase: フェノールスルホトランスフェラーゼ
Sele	Selegiline: セレギリン
SEM	standard error of mean: 標準誤差
t _{1/2}	消失半減期
TH	tyrosine hydroxylase: チロシン水酸化酵素

2.6.2.1 まとめ

パーキンソン病に対するレボドパ治療の効率化を目的とする末梢カテコール-*O*-メチル転移酵素（以下、COMT）阻害剤のエンタカポンの薬理作用を検討した。

ラットの脳、十二指腸、赤血球及びヒト赤血球 COMT に対するエンタカポンの IC₅₀ 値は 10～33nM, ラット肝 COMT に対する IC₅₀ 値は 160nM であった。COMT 以外のカテコールアミン代謝酵素のチロシン水酸化酵素（TH），ドパミン-β-水酸化酵素（DBH），ドパ脱炭酸酵素（DDC），A 型モノアミン酸化酵素（MAO-A）及び B 型モノアミン酸化酵素（MAO-B）に対する IC₅₀ 値は 48,000nM, あるいは 50,000nM 以上であったことから、本薬は COMT 特異的阻害薬と考えられた。ラットを用いた *ex vivo* 実験において、エンタカポンは、肝、腎、十二指腸、赤血球などの末梢 COMT を強力に阻害したが、線条体の COMT 阻害は一過性かつ軽度であった。このことより、エンタカポンは末梢 COMT を選択的に阻害すると考えられた。ラットの *in vivo* 実験において、エンタカポンは用量依存的に血清中レボドパの AUC を増加させ、3-OMD の AUC を減少させた。エンタカポンは、レボドパのバイオアベイラビリティを 2.9 倍に増加させた。レボドパ/カルビドパとともにエンタカポンをラットに経口投与したとき、用量依存的な線条体のレボドパ、DA、DOPAC の含量増加と 3-OMD の含量低下が示された。レボドパと DA 含量は、エンタカポン投与 2 時間後に最大に達した。また、エンタカポンの併用で、レボドパの投与量が 3 分の 1 に節減された。ラットの *in vivo* マイクロダイアリス実験において、エンタカポンを単独投与した場合、線条体の細胞外 DA 濃度にほとんど影響しなかったが、レボドパとの併用、あるいはレボドパ/カルビドパと併用したとき、DA 濃度上昇は増強された。3 種類のパーキンソン病モデルを用い、エンタカポンの併用効果を検討した。脳内 DA を枯渇させたレセルピン処置マウスでは、エンタカポンはレボドパ/カルビドパ処置による運動活性増加を増強した。ラットの黒質緻密帯に 6-OHDA を注入し DA 神経を破壊したパーキンソン病モデルにおいて、エンタカポンはレボドパ/カルビドパにより誘発される対側回転運動数を増強した。同モデルにおいて、レボドパにエンタカポンを併用すると、レボドパの投与量を半減しても同等以上の効果が示され、2 週間のエンタカポン前処理でも本薬の薬効が減弱することなく耐性形成が生じにくいと考えられた。MPTP 処置マーモセットにおいて、エンタカポンはレボドパ/カルビドパの運動活性増加及び運動機能改善を増強した。

レボドパ/カルビドパにエンタカポンを併用すると、末梢 COMT 阻害作用のため血清中レボドパが増加するとともに 3-OMD も減少するためレボドパの脳内移行は効率化する。脳内に移行したレボドパは、DA ニューロンに取り込まれ細胞内で DA となり、その放出が亢進されるためレボドパの薬効が増強されると考えられた。

幾何異性体（Z体）の COMT 阻害作用を検討したところ、*in vitro* 実験において、Z体の脳、十二指腸、肝及び赤血球 COMT に対する IC_{50} 値はエンタカポン（E体）と同程度であった。*Ex vivo* 実験では、Z体の線条体 COMT に対する阻害率はエンタカポンと同様、あるいはそれ以上に弱いことが示された。血漿中 Z体の AUC は、ヒトにおいて 3～8% (25～800mg 投与時)であることから^{5.3.3.1-1}、主作用、副作用ともに Z体による影響は限定的と推察された。

エンタカポンの副次的薬理作用として、アラキドン酸誘発血小板凝集抑制 ($IC_{50}=36\mu M$, ヒト血小板), ロイコトリエン B_4 ($IC_{50}=192\mu M$, ヒト多形核白血球) とロイコトリエン C_4 ($IC_{50}=70\mu M$, ヒト多形核白血球) の生成抑制, 及びプロスタグランジン E_2 生成増加作用 (ウシ精囊) が示された。エンタカポンは、抗消化管潰瘍作用 (10～100mg/kg ; p.o., ラット), 抗浮腫作用 (200mg/kg ; p.o., ラット), 抗酸化作用 ($IC_{50}=1.3\sim 1.35\mu M$, ラット脳), 鉄キレート作用 (1mM～) ならびに腎保護作用 (30mg/kg ; i.p., bid, 3週間投与, ラット) を示した。

薬力学的薬物相互作用として、6-OHDA 片側 DA 神経破壊ラットを用い MAO-B 阻害剤セレギリンとの相互作用を検討した。エンタカポンは、セレギリンによるレボドパ/カルビドパ増強効果をさらに増幅した (10mg/kg ; p.o., ラット)。

安全性薬理試験において、アンフェタミン誘発常同行動に対する増強作用 (30mg/kg ; p.o., ラット), 鎮痛作用 (10mg/kg ; p.o., マウス), DA 取込阻害作用 (100 μM , ラット線条体), 摘出気管に対する弛緩作用 ($ED_{50}=40\mu M$, モルモット気管), ソブレナリン誘発摘出気管弛緩反応の増強 (1 μM 以上, モルモット気管), ノルアドレナリンによる大腿動脈 dp/dt の減弱 (30mg/kg ; p.o., 麻酔ラット), アセチルコリン誘発摘出回腸収縮に対する抑制 (100 μM , モルモット回腸) などが、また、レボドパ/カルビドパと併用したときの体温低下 (400mg/kg ; p.o., ラット) が示された。これらのほとんどは、高用量もしくは高濃度で見られた作用であり、安全性において問題となる所見ではないと考えられた。ただし、レボドパの作用増強に関連する諸症状が、副作用として現れる可能性は否定できない。

2.6.2.2 薬効を裏付ける試験

(1) COMT 阻害作用 (*In vitro*)

1) COMT に対する阻害作用

ラットの脳、十二指腸、赤血球、肝及びヒト赤血球より可溶性 COMT の酵素標本を調製し、エンタカポンによる COMT 活性阻害を定量化し、組織ごとの IC₅₀ 値を求めた^{4.2.1.1-1}。

ラット標本では、肝を除き IC₅₀ 値は 10 nM～26 nM であった。ヒト赤血球の IC₅₀ 値は 33 nM であった（表 2.6.2-1）。エンタカポンは、ラット肝を除き 10nM オーダーの阻害活性を有する COMT 阻害剤である。

表 2.6.2-1 各種組織 COMT に対するエンタカポンの阻害活性 (IC₅₀)

標本	IC ₅₀ (nM)
ラット脳	10
ラット十二指腸	16
ラット赤血球	26
ラット肝	160
ヒト赤血球	33

2) 各種カテコールアミン代謝酵素に対する阻害作用

主要なカテコールアミン代謝酵素に対するエンタカポンの IC_{50} を検討した^{4.2.1.1-1}。COMT に対する IC_{50} は 10 nM, DBH の IC_{50} は 48,000 nM, TH, DDC, MAO-A 及び MAO-B の IC_{50} は 50,000 nM 以上であった (表 2.6.2-2)。

エンタカポンは他のカテコールアミン代謝酵素群に対し阻害作用を有しない COMT 特異的阻害剤と考えられた。

表 2.6.2-2 各種カテコールアミン代謝酵素に対するエンタカポンの IC_{50}

酵素名	$IC_{50}(nM)$
COMT	10
TH	>50,000
DBH	48,000
DDC	>50,000
MAO-A	>50,000
MAO-B	>50,000

(2) 末梢 COMT 阻害作用 (*Ex vivo, in vivo*)

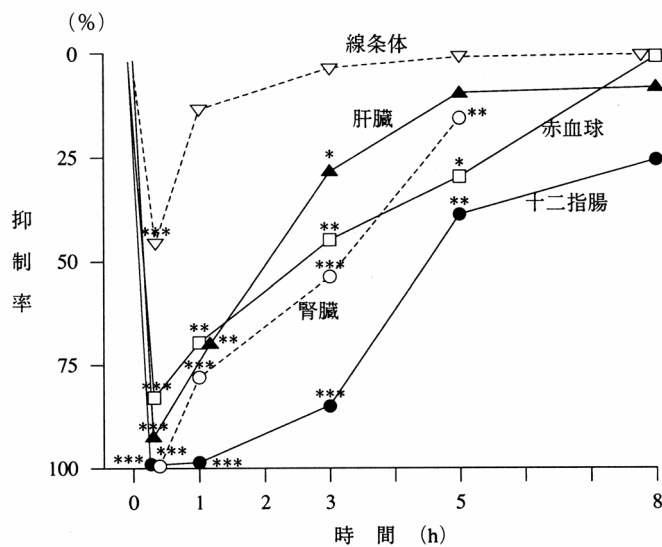
1) 末梢 COMT と線条体 COMT の阻害作用

ラットにエンタカポン (0.3, 1, 3, 10 及び 30mg/kg, p.o.) を投与し, 15 分後, 1 時間後, 3 時間後, 5 時間後及び 8 時間後の線条体, 肝, 十二指腸, 腎及び赤血球の COMT 活性を測定した^{4.2.1.1-2}。エンタカポン投与 1 時間後に採取した各組織から ED₅₀ 値を算出したところ (腎は算出せず), 十二指腸 1.1mg/kg, 肝 6.7mg/kg, 赤血球 5.4mg/kg, 線条体 24.2mg/kg 以上であった (表 2.6.2-3)。エンタカポン 10mg/kg を投与したときのタイムコースを図 2.6.2-1 に示した。エンタカポンの末梢 COMT 阻害は, 線条体に比べ強かった。エンタカポンは, 末梢 COMT を選択的に阻害することが示された。

表 2.6.2-3 エンタカポン経口投与 1 時間後の各組織に対する COMT 阻害作用の ED₅₀ 値

組織	ED ₅₀ (mg/kg)
十二指腸	1.1
肝	6.7
赤血球	5.4
線条体	24.2

図 2.6.2-1 エンタカポン (10mg/kg) によるラット各組織の COMT 活性阻害のタイムコース



各値は溶媒対照群の COMT 活性を 100% とした時のエンタカポン 10mg/kg 経口投与群の COMT 活性。

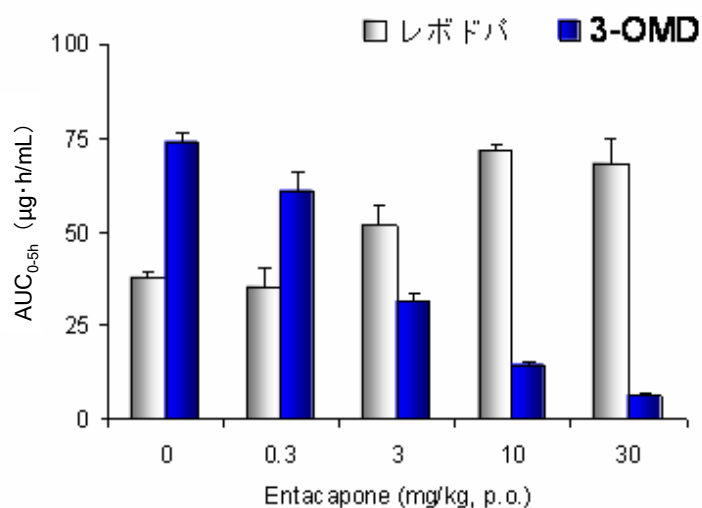
溶媒対照群 n=2-6, エンタカポン群 n=4-6。* p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001 : 溶媒対照群との比較 (Student's t-test)。

2) レボドパ及び 3-OMD の血清 AUC に関する効果

ラットにレボドパ (50mg/kg, p.o.) /カルビドパ (50mg/kg, p.o.) とともにエンタカポン (0.3, 3, 10, 30mg/kg, p.o.) を併用した時の血清レボドパと 3-OMD 濃度を測定し、それぞれの AUC_{0-5h} ($\mu\text{g} \cdot \text{h/mL}$) を算出した^{4.2.1.1-3}。

エンタカポンの投与量に依存し血清レボドパの AUC_{0-5h} は増加し、3-OMD の AUC_{0-5h} は低下した (図 2.6.2-2)。エンタカポンの末梢 COMT 阻害作用により、血清レボドパ AUC の増加と 3-OMD の低下が生じたと考えられる。

図 2.6.2-2 レボドパ (50mg/kg) 及びカルビドパ (50mg/kg) 処置ラットにエンタカポン (0.3, 3, 10, 30mg/kg) を投与した時の血清中レボドパと 3-OMD の AUC_{0-5h} ($\mu\text{g} \cdot \text{h/mL}$)



データは平均値 $\pm$ SEM。溶媒対照群 n=14, エンタカポン群 n=5。

3) レボドパの血中動態に関する効果

カルビドパ (30mg/kg, p.o.) 処理ラットにエンタカポン (30mg/kg, p.o.) を投与し, さらにレボドパ 5mg/kg を静脈内投与, もしくは 10mg/kg を経口投与した時の血清レボドパと 3-OMD の濃度を測定し AUC ($\mu\text{g} \cdot \text{h/mL}$) を算出した。これより, レボドパのバイオアベイラビリティ (BA) と $t_{1/2}$ を求めた^{4.2.1.1-4}。

エンタカポンは, レボドパの $\text{AUC}_{0-\infty}$ を 3 倍, BA を 2.9 倍, $t_{1/2}$ を 2.4 倍とした (表 2.6.2-4)。エンタカポンの末梢 COMT 阻害作用により, レボドパの血中移行が効率化されることが示唆された。

表 2.6.2-4 血清中レボドパの $\text{AUC}_{0-\infty}$ から算出したバイオアベイラビリティと血中半減期

パラメータ	レボドパ 5mg/kg (i.v.) 単独投与 (n=8)	レボドパ 10mg/kg (p.o.)投与	
		単独 (n=5)	エンタカポン併用 (n=6)
$\text{AUC}_{0-\infty}$ ($\mu\text{g} \cdot \text{h/mL}$)	3.37±0.08	6.5±0.5	19.7±1.2
BA (%)	—	99	290
$t_{1/2}$ (h)	1.1±0.0	0.9±0.2	2.2±0.2

平均±SEM。例数は括弧内に示した。

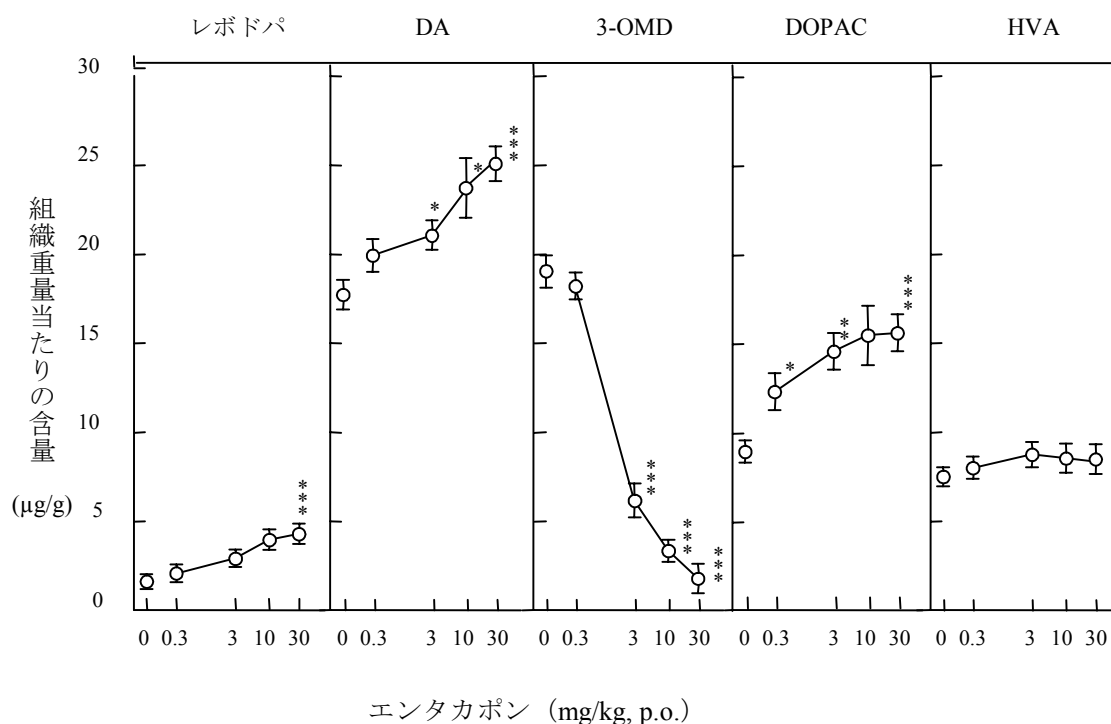
(3) 線条体レボドパ及びその代謝物含量に対する効果

1) レボドパ/カルビドパに対する増強効果

エンタカポンの用量反応を検討するため、カルビドパ (50 mg/kg, p.o.) 投与 30 分後にレボドパ (50 mg/kg, p.o.) と本薬 (0.3, 3, 10 あるいは 30mg/kg, p.o.) をラットに投与し、その 2 時間後に断頭し、線条体を切り出した。薬効の時間依存性 (タイムコース) を検討するため、カルビドパ (50 mg/kg, p.o.) 投与 30 分後にレボドパ (50 mg/kg, p.o.) と本薬 (10mg/kg, p.o.) をラットに投与し、その 1 時間, 2 時間, 3 時間, 4 時間及び 5 時間後に断頭し、線条体を切り出した。切り出した線条体のレボドパ, DA, 3-OMD, DOPAC および HVA 含量を測定した。カルビドパ (50 mg/kg, p.o.) /レボドパ (50 mg/kg, p.o.) 群を対照群とした^{4.2.1.1-3}。

エンタカポンは、用量依存的に線条体レボドパ, DA 含量と DOPAC 含量を増加させ、3-OMD 含量を低下させたが、HVA 含量に影響は見られなかった (図 2.6.2-3)。

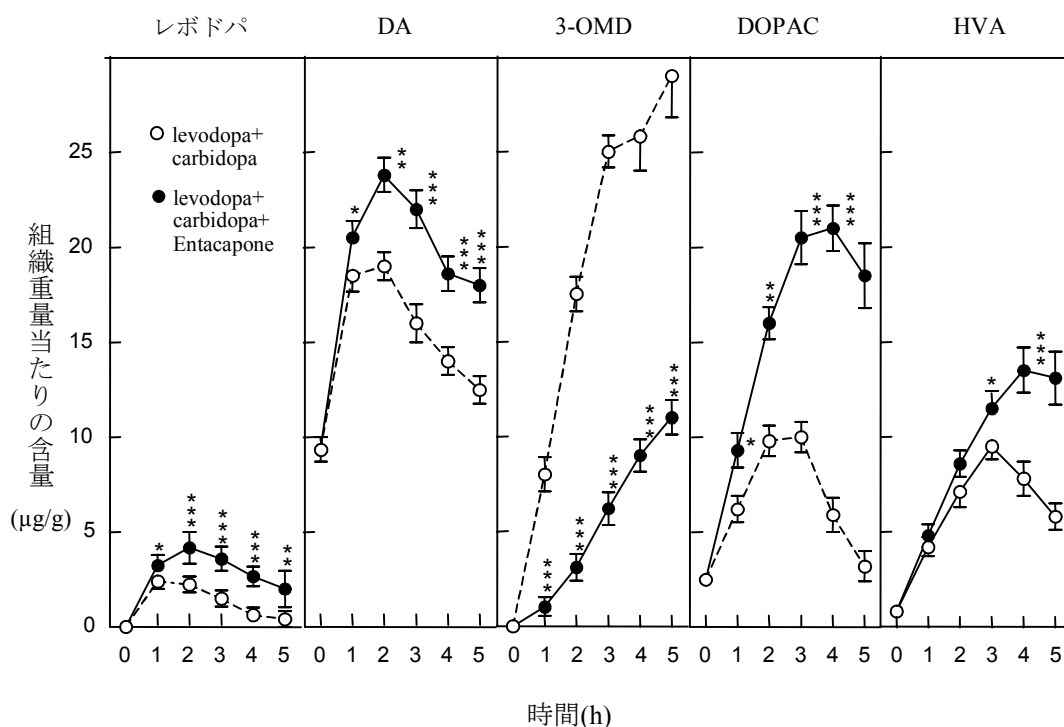
図 2.6.2-3 レボドパ/カルビドパ処置ラットの線条体レボドパ及び代謝物含量に対するエンタカポンの効果



エンタカポン投与 2 時間後の線条体のレボドパ, DA, 3-OMD, DOPAC 及び HVA 含量 (µg/g striatum)。各値は平均±SEM。n=6。* p<0.05 ; ** p<0.01 ; *** p<0.001 (Scheffe's test)。

タイムコースを検討したところ、対照群（レボドパ/カルビドパ群）に比べエンタカポン併用群のレボドパ含量と DA 含量は、投与 1 時間後から有意に上昇し、2 時間後に最大となった。これらは 3 時間以降低下したが、いずれの時点でも対照群より有意に高値であった。エンタカポン併用群の DOPAC 含量と HVA 含量は対照群より高く、3-OMD 含量は対照群より低かった（図 2.6.2-4）。エンタカポンは、用量依存的に線条体のレボドパ含量と DA 含量を増加させ、その効果は少なくとも投与 5 時間まで持続することが示された。

図 2.6.2-4 レボドパ/カルビドパ処置ラットの線条体レボドパ及び代謝物含量に対するエンタカポンのタイムコース



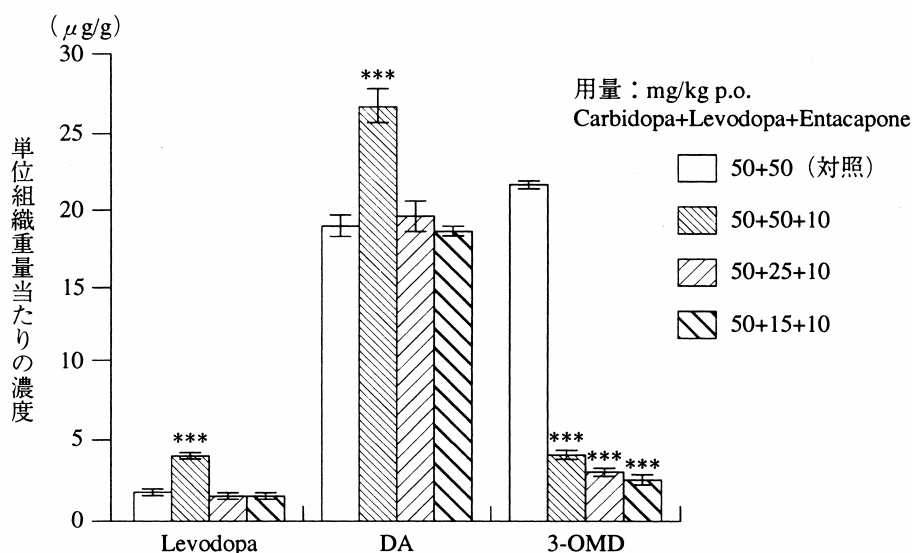
各値は平均±SEM。n=6。* p<0.05 ; ** p<0.01 ; *** p<0.001 (Scheffe's test)。

2) レボドパ節減効果

レボドパ (50, 25, 15 mg/kg, p.o.) /カルビドパ (50 mg/kg, p.o.) 処置ラットにエンタカポン (10 mg/kg) を経口投与し, 3 時間後の線条体レボドパ, DA 及び 3-OMD 含量を測定した^{4.2.1.1-3}。

レボドパ (50 mg/kg) /カルビドパ (50 mg/kg) のみの対照群に比べ、エンタカポン併用群では線条体レボドパと DA 含量は有意に増加し, 線条体 3-OMD 含量は著明に減少した。エンタカポン 10mg/kg を併用すると, レボドパを 25 mg/kg あるいは 15mg/kg に減量しても線条体のレボドパ及び DA 含量は対照群と同程度であった (図 2.6.2-5)。エンタカポンの併用により, レボドパの節減が可能と考えられた。

図 2.6.2-5 カルビドパ/レボドパ処置ラットの線条体レボドパ, DA 及び 3-OMD 含量に対するエンタカポンの節減効果



各値は平均±SEM。n=6。*** p<0.001: 対照群との比較 (Scheffe's test)。

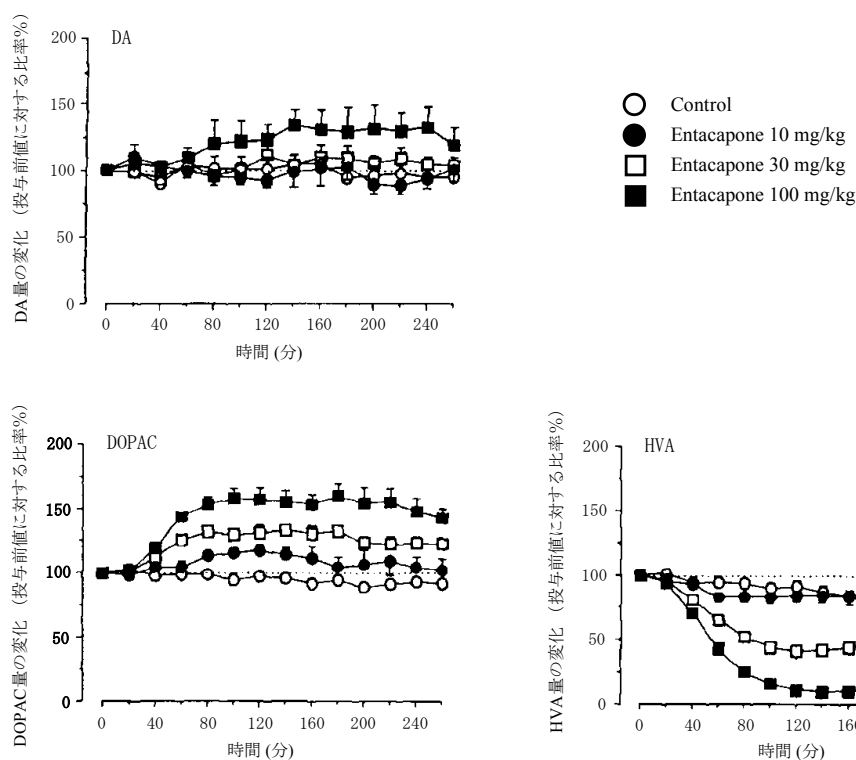
(4) 線条体ドパミン及びその代謝物の放出に関する効果

1) 単独効果

エンタカポン（10, 30, 100mg/kg, i.p.）を単独投与したときのラット線条体 DA とその代謝物（DOPAC, HVA, 3-OMD）の細胞外濃度に関する作用を *in vivo* マイクロダイアリス法で検討した。麻酔下にてラット線条体へマイクロダイアリス用プローブを刺入し、細胞外液を 20 分間隔で回収した。試料中の DA, DOPAC 及び HVA 量を HPLC/ECD 法で測定し、エンタカポンを投与する前の基礎レベルに対する変化率（%）を求めた^{4,2,1,1-5}。

エンタカポン 10mg/kg 及び 30mg/kg 投与群の細胞外 DA 濃度に変化はなかったが、100mg/kg 投与群で軽度な上昇が見られた。これは、わずかに脳内に移行したエンタカポンの直接的な影響の可能性が考えられた（図 2.6.2-6）。一方、用量依存的な DOPAC の増加と HVA の減少は、エンタカポンによる末梢組織における DOPAC と HVA の変化を反映していると考えられた。

図 2.6.2-6 線条体における細胞外 DA, DOPAC 及び HVA 濃度に対するエンタカポンの単独作用



各値は平均±SEM。各群 n=6（100mg/kg 投与群は n=4）。

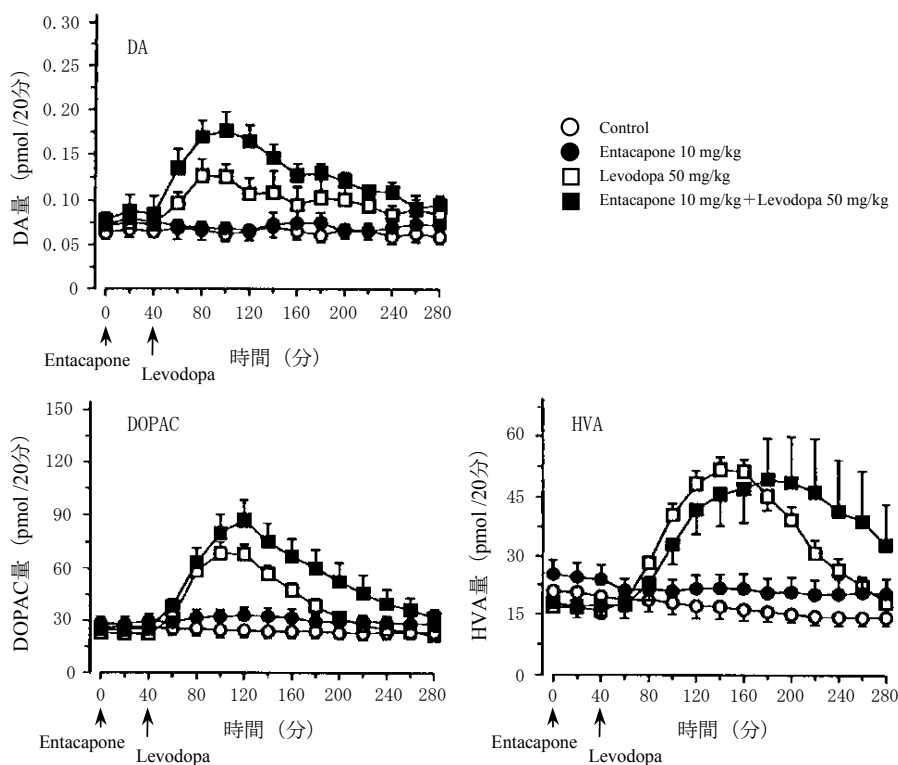
2) レボドパとの併用効果

エンタカポン (10mg/kg, i.p.) 単独, レボドパ単独 (50mg/kg, i.p.), もしくはレボドパ/エンタカポン併用時のラット線条体 DA とその代謝物 (DOPAC, HVA) の細胞外濃度に関する作用を *in vivo* マイクロダイアリス法で検討した^{4,2,1,1-6}。

麻酔下にてラット線条体へマイクロダイアリス用プローブを刺入し, 細胞外液を 20 分間隔で回収した。試料中の DA, DOPAC, HVA 量 (pmol/20 分) を HPLC/ECD 法で測定した。

レボドパは, DA, DOPAC 及び HVA 濃度を上昇させた。エンタカポン単独投与のとき細胞外 DA, DOPAC 及び HVA に変化はなかったが, レボドパにエンタカポンを併用したとき, レボドパの作用は増強された (図 2.6.2-7)。エンタカポンは, DCI 併用のない条件においてもレボドパによる細胞外 DA 濃度上昇作用を増強する。

図 2.6.2-7 線条体における細胞外 DA, DOPAC, HVA 濃度に関するエンタカポンのレボドパ作用の増強効果



各値は平均±SEM。各群 n=8 (エンタカポン単独投与群 n=6)。

3) レボドパ/カルビドパとの併用効果

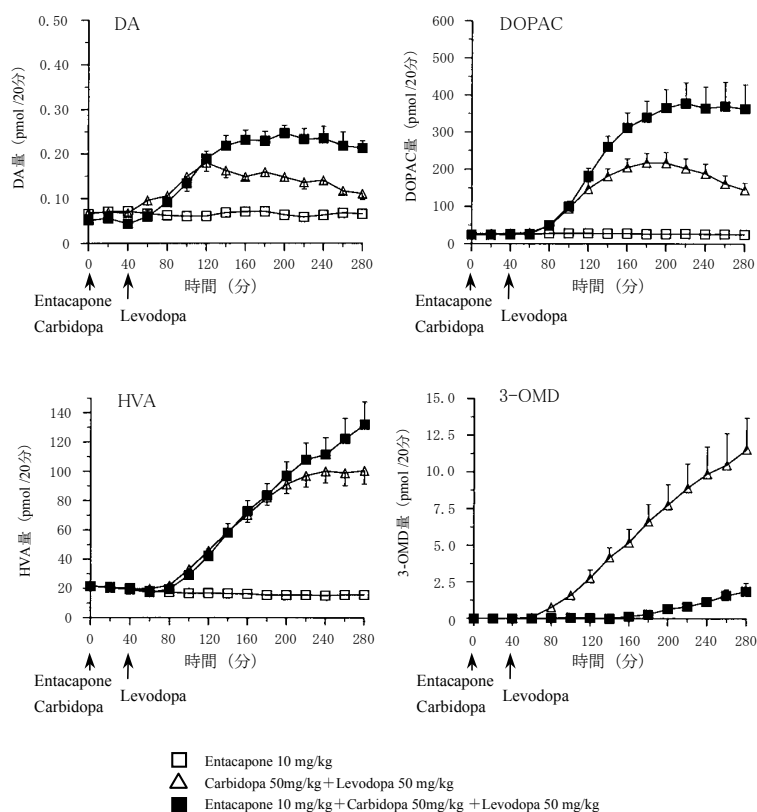
エンタカポン (10mg/kg, i.p.) 単独, レボドパ (50mg/kg, i.p.) /カルビドパ (50mg/kg, i.p.) 併用, レボドパ/カルビドパ/エンタカポン併用時のラット線条体における DA, DOPAC, HVA 及び 3-OMD の細胞外濃度に関する作用を *in vivo* マイクロダイアリス法で検討した^{4.2.1.1-6}。

麻酔下にてラット線条体へマイクロダイアリス用プローブを刺入し, 細胞外液を 20 分間隔で回収した。試料中の DA, DOPAC, HVA, 3-OMD を HPLC/ECD 法で測定した (pmol/20 分)。

エンタカポン単独ではこれらに影響はなかったが, レボドパ/カルビドパ併用群に DA, DOPAC, HVA, 3-OMD の上昇が見られた。レボドパ/カルビドパ/エンタカポン併用群では, DA と DOPAC がさらに上昇し, 3-OMD の上昇は著明に抑制された (図 2.6.2-8)。

エンタカポンは, 末梢のレボドパから 3-OMD への代謝経路を抑制することで脳内の 3-OMD 濃度上昇を抑制するとともにレボドパ/カルビドパによる DA 濃度上昇作用を増強した。

図 2.6.2-8 線条体における細胞外 DA, DOPAC, HVA 及び 3-OMD 濃度に関するエンタカポンのレボドパ/カルビドパの作用に対する増強効果



各値は平均±SEM。各群 n=6。

(5) パーキンソン病モデルにおける改善効果

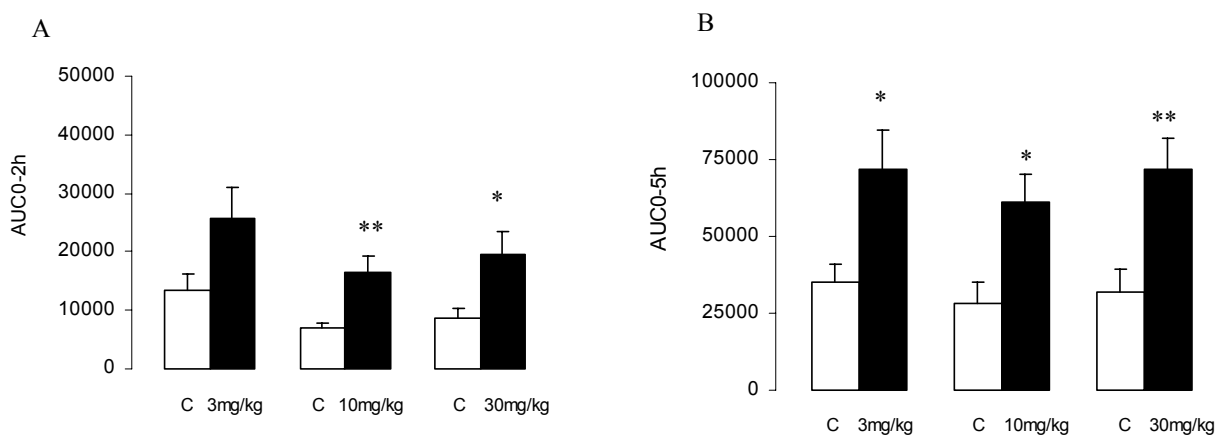
1) レセルピン処置マウス

レセルピン処置マウスをモデル動物として、レボドパ/カルビドパにエンタカポン（3, 10, 30mg/kg, p.o.）を併用投与したときの運動活性を検討した^{4.2.1.1-7}。

レセルピン（5mg/kg, i.p.）処置の 18-20 時間後に、カルビドパ（62.5mg/kg, p.o.）を投与し、その 30 分後にレボドパ（250mg/kg, p.o.）/エンタカポンを投与し、そこから 5 時間運動活性を測定した。投与直後から 2 時間までの AUC_{0-2h} と 5 時間までの AUC_{0-5h} を算出した。

エンタカポンは、レボドパ/カルビドパの運動活性増加を有意に増強した（図 2.6.2-9）。エンタカポンは、パーキンソン病におけるレボドパ/カルビドパの薬効を増強することが示唆された。

図 2.6.2-9 レセルピン処置マウスにおけるレボドパ/カルビドパの運動活性増加作用に関するエンタカポンの効果



レセルピン処置マウスの運動活性に関する AUC_{0-2h} (A) と AUC_{0-5h} (B)。図中の白抜きカラムはレボドパ/カルビドパの対照群 (C)，黒抜きカラムはレボドパ/カルビドパ/エンタカポンの実験群。各値は平均±SEM。n=7~8。

* p<0.05, ** p<0.01：対照群との比較 (Student's t-test)。

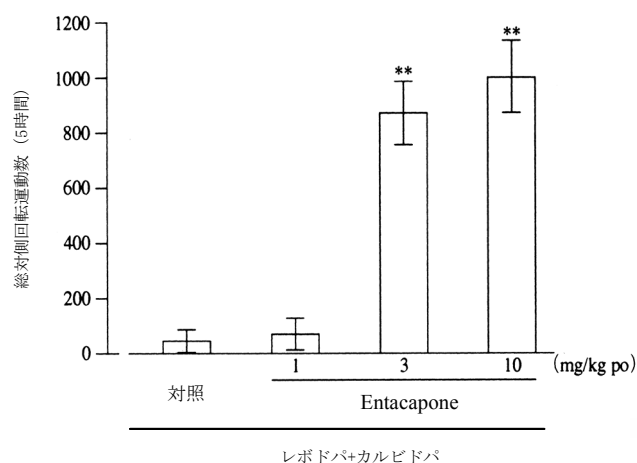
2) 片側ドパミン神経破壊ラット

6-OHDA をラットの左腹側被蓋野に注入し DA 神経を破壊したラットを用い、レボドパ/カルビドパとの併用効果について検討した。ラットの左腹側被蓋野に 6-OHDA を注入し、その 2 週間後アポモルフィンを投与し一定の回転運動数を示した（アポモルフィンテスト）動物を使用した^{4.2.1.1-8}。実験は、アポモルフィンテストの 1 週間後に開始した。レボドパ/カルビドパ投与群とレボドパ/カルビドパ/エンタカポン（1, 3, 10mg/kg）投与群それぞれに、投与終了直後（0 分）から毎分当りの対側回転運動数を 5 時間測定した。データは、5 時間の総回転運動数、もしくは 15 分当りの対側回転運動数を示した。薬物はいずれも経口投与とし、投与量はレボドパ 10mg/kg, カルビドパ 10mg/kg, エンタカポン 1, 3, 10mg/kg とした。

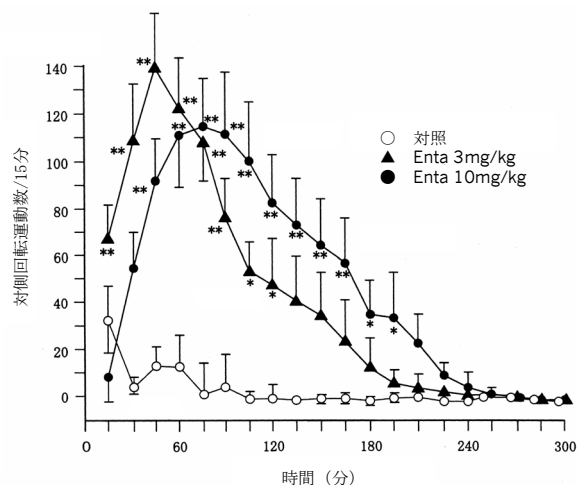
エンタカポン 3mg/kg 及び 10mg/kg 投与群の総対側回転運動数は、レボドパ/カルビドパ投与群（対照）に比べ有意に増大した（図 2.6.2-10A）。タイムコースを見ると、エンタカポン投与群は投与直後より対側回転運動数が著明に増大し、60 分前後をピークとしその後漸減した（図 2.6.2-10B）。エンタカポンは、パーキンソン病におけるレボドパ/カルビドパの薬効を増強することが示唆された。

図 2.6.2-10 片側 DA 神経破壊ラットにおけるレボドパ/カルビドパの対側回転運動に対するエンタカポンの増強作用

A



B



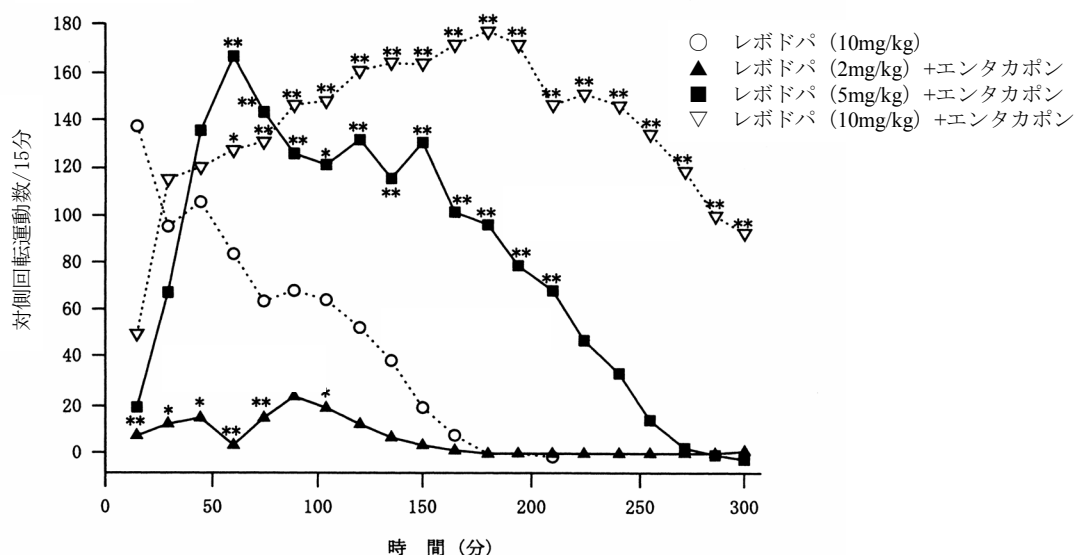
A : 5 時間の総対側回転運動 B : タイムコース（縦軸は 15 分当りの対側回転数）

各値は平均±SEM。n=8。** p<0.01 : 対照群との比較（Duncan's multiple comparison test）。

同じモデルを用いレボドパの節減効果について検討した^{4.2.1.1-9}。この実験では、カルビドパ/レボドパ (10mg/kg) を対照群とし、カルビドパ/レボドパ (2, 5, もしくは 10mg/kg) にエンタカポン (10mg/kg) を併用したときの対側回転運動数を 15 分ごと 5 時間測定した。薬物はいずれも経口投与した。カルビドパ (30mg/kg) は測定の 30 分前に投与した。

レボドパ (5mg/kg) /エンタカポン投与群は、対照群 (レボドパ 10mg/kg) を上回る対側回転運動数を示し、カルビドパ/レボドパ (10mg/kg) /エンタカポン群では一層の増強が見られた (図 2.6.2-11)。エンタカポンを併用した場合、レボドパの投与量が節減できることが示唆された。

図 2.6.2-11 片側 DA 神経破壊ラットモデルにおけるエンタカポンのレボドパ節減効果



各値は平均値。n=8。* p<0.05, ** p<0.01: 対照群との比較 (Duncan's multiple comparison test)。

同モデルを用いエンタカポンの耐性形成について検討した^{4.2.1.4-1}。この実験では、エンタカポン (10mg/kg, p.o.) もしくは溶媒を 2 週間反復処置した動物に、カルビドパを投与し 30 分後に溶媒とレボドパ, もしくはエンタカポンとレボドパを投与し, 毎分当りの対側回転運動数を 5 時間測定した。データは 5 時間当りの総対側回転運動数, もしくは 15 分当りの対側回転運動数を示した。薬物はいずれも経口投与とし, 投与量はカルビドパ 30 mg/kg, レボドパ 10mg/kg, エンタカポン 10mg/kg とした。薬物の反復処置と単回投与スケジュールを表 2.6.2-5 に示した。

溶媒反復処置動物にエンタカポンを単回投与したとき, レボドパ/カルビドパの総対側回転運動数は著しく増強された。エンタカポン反復処置動物にエンタカポンを単回投与した場合でも, レ

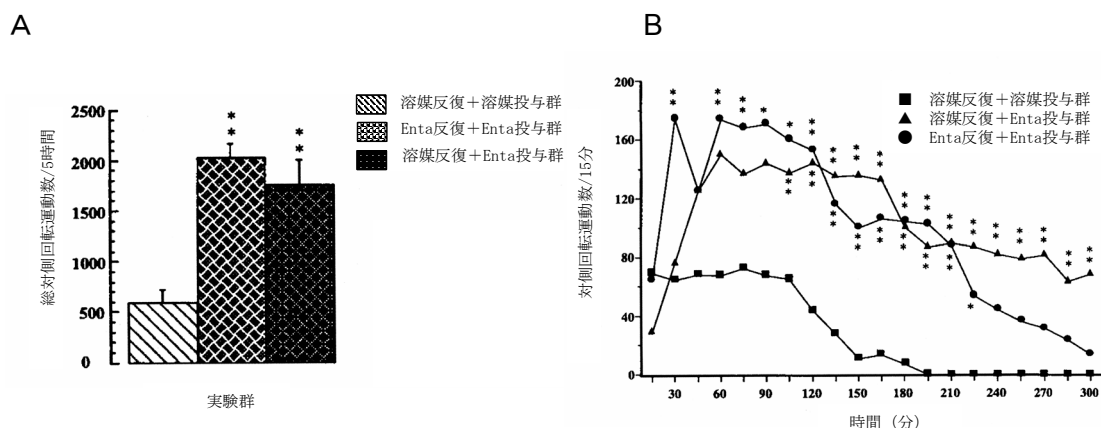
ボドパ/カルビドパに対する増強作用が溶媒反復処置動物の場合と同様に見られた（図 2.6.2-12A）。タイムコースを見ると，エンタカポン投与群ではいずれもレボドパ投与直後から著明な回転運動数の増加が見られ，有意な増加は投与 210 分を超えても見られた（図 2.6.2-12B）。エンタカポンは，反復投与した場合でもレボドパ/カルビドパの薬効に対する増強作用はほとんど影響されず，耐性が形成されにくいと考えられた。

表 2.6.2-5 耐性形成実験の単回投与スケジュール

実験群	反復処置	単回投与スケジュール	
		30 分前	0 分 (時間)
溶媒反復処置+溶媒投与群	溶媒	カルビドパ	溶媒+ レボドパ
溶媒反復処置+Enta 投与群	溶媒	カルビドパ	Enta+レボドパ
Enta 反復処置+Enta 投与群	Enta	カルビドパ	Enta+レボドパ

Enta : エンタカポン

図 2.6.2-12 エンタカポンの 2 週間反復処置後のレボドパ/カルビドパに対する増強効果



A : 5 時間の総対側回転運動数。グラフ中の各値は平均±SEM。B : タイムコース（縦軸は 15 分当りの対側回転運動数） 溶媒反復+溶媒投与群 n=14, 溶媒反復+Enta 投与群 n=11, Enta 反復+Enta 投与群 n=12。

* p<0.05, ** p<0.01 : 溶媒反復+溶媒投与群との比較 (ANOVA+Dunnett's t-test)。

3) MPTP 処置マーモセット

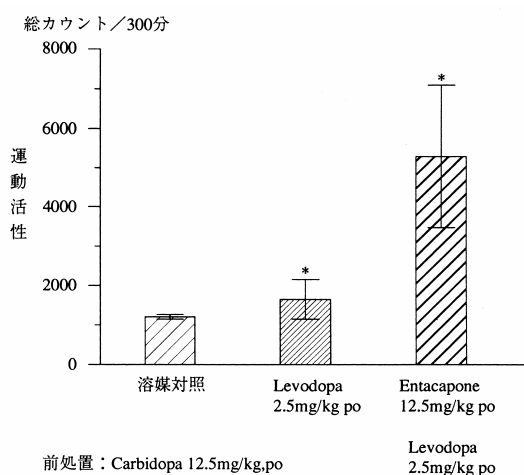
マーモセットに MPTP を投与し、パーキンソン病様の運動機能障害を呈する動物モデルを使用し、エンタカポンの併用効果を検討した^{4.2.1.1-10}。

パーキンソン病様症候を示すマーモセットにカルビドパを投与し (12.5mg/kg, p.o.) , 溶媒対照群には溶媒を, レボドパ群には 60 分後にレボドパ (2.5mg/kg, p.o.) を, レボドパ/エンタカポン群には 30 分後にエンタカポン (12.5mg/kg, p.o.) , 60 分後にレボドパ (2.5mg/kg, p.o.) を投与した。動物の運動活性については自動測定装置を用い 300 分間測定し, 運動機能については 10 分ごとの症状をスコア化し 200 分間記録した。

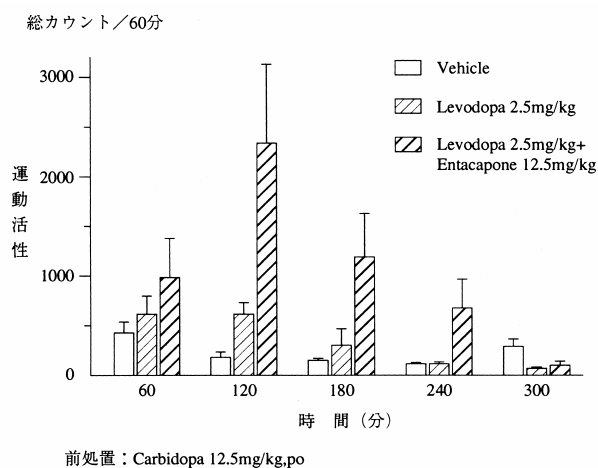
300 分間の累積運動活性に関しては, 溶媒対照群に比べレボドパ群で有意な増加が見られ, レボドパ/エンタカポン群ではさらに増強した (図 2.6.2-13A) 。60 分ごとの運動活性 (タイムコース) を見ると, エンタカポンの増強効果は 240 分後まで認められた (図 2.6.2-13B) 。運動障害スコアを見ると, レボドパ群では投与後 30 分~120 分で改善効果が見られたが, 130 分以降ではその効果は消失した。一方, レボドパ/エンタカポン群の運動障害スコアは投与 30 分後より改善し, いずれのポイントでもレボドパ群を上回る改善効果が認められた (図 2.6.2-14) 。エンタカポンは, パーキンソン病におけるレボドパ/カルビドパの薬効を増強することが示唆された。

図 2.6.2-13 MPTP 処置マーモセットにおけるレボドパ/カルビドパの運動活性に対するエンタカポンの増強作用

A

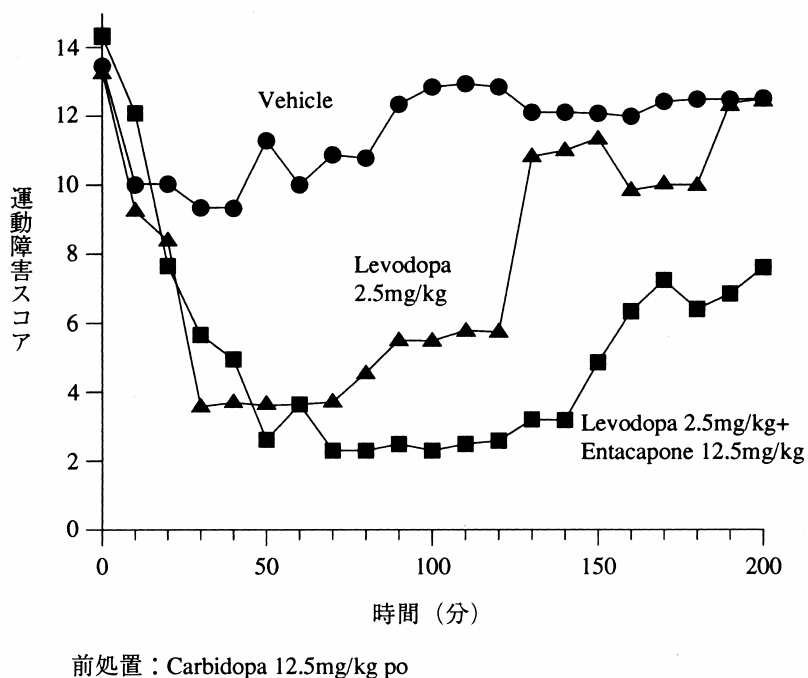


B



300 分間の累積運動活性に関するレボドパの増強効果 (A) と運動活性のタイムコース (B) 。各値は平均値 $\pm$ SEM (各群 n=4) 。* p<0.05 : 溶媒対照群との比較 (Student's t-test) 。

図 2.6.2-14 MPTP 処置マーマセツトにおけるレボドパ/カルビドパの運動機能回復に関する
エンタカボンの増強効果



各値は平均値 (各群 n=4)。

(6) 幾何異性体(Z体)の COMT 阻害作用

1) *In vitro* 試験

エンタカポン（E体）の一部は，生体内で幾何異性体のZ体へと変換される（表 2.6.4-16 参照）。そこでZ体の COMT 阻害活性を検討し^{4.2.1.1-11}，エンタカポンと比較した^{4.2.1.1-1}。

ラットの脳，十二指腸，肝臓，及び赤血球より可溶性 COMT を調製し，エンタカポンとZ体の COMT 活性阻害を定量化し組織ごとの IC₅₀ 値を求めた。

エンタカポンとZ体の IC₅₀ 値は，いずれの組織においても同程度であった（表 2.6.2-6）。

表 2.6.2-6 エンタカポンとZ体のラット COMT 阻害活性（IC₅₀ 値）

	IC ₅₀ 値 (nM)	
	エンタカポン	Z体
脳	10	20
十二指腸	16	24
肝臓	160	280
赤血球	26	33

2) *Ex vivo* 試験

エンタカポン（*E*体）もしくは*Z*体 10mg/kg をラットに経口投与し、その1時間後、線条体、十二指腸、肝臓、及び赤血球の COMT 活性を測定し阻害率（%）を求めた^{4.2.1.1-2, 4.2.1.1-12}。

エンタカポンの肝、十二指腸、及び赤血球の阻害率は 68～98 %であったが、線条体の阻害率は 12 %であった。*Z*体の十二指腸、肝臓、赤血球それぞれの阻害率は、87.7 %、63.5 %、27.4 %であったが、線条体 COMT は阻害されなかった（表 2.6.2-7）。

*Z*体はエンタカポンと同様に、十二指腸や肝臓などの末梢 COMT を強力に阻害するが、線条体 COMT の阻害は軽微であった。*Z*体の血漿中 AUC が、ヒトにおいて 3～8% (25～800mg 投与時) であることから^{5.3.3.1-1}、主作用、副作用ともに*Z*体の影響は限定的と推察される。

表 2.6.2-7 *E*体と*Z*体の COMT 阻害作用

	阻害率 (%)	
	エンタカポン	<i>Z</i> 体
線条体	12±5	0
十二指腸	98±1	87.7±2.3
肝臓	68±6	63.5±4.2
赤血球	68±3	27.4±3.2

各値は平均値±SEM。

2.6.2.3 副次的薬理作用

(1) 血小板凝集及びエイコサノイド生成に関する作用

アラキドン酸誘発血小板凝集^{4.2.1.2-1}、ロイコトリエンB₄生成とロイコトリエンC₄生成^{4.2.1.2-2}、ならびにプロスタグランジンE₂生成^{4.2.1.2-3}に対する作用を検討した。エンタカポンは、ヒト血小板のアラキドン酸誘発凝集抑制作用（IC₅₀ 値：36μM）、ヒト多形核白血球のロイコトリエンB₄（IC₅₀ 値：192μM）及びロイコトリエンC₄（IC₅₀ 値：70μM）の生成抑制作用、及びウシ精囊ミクロソームのプロスタグランジンE₂生成増加作用を示した。

(2) 抗消化管潰瘍作用

ラットのシステアミン誘発十二指腸潰瘍ならびにアセチルサリチル酸、インドメタシン及びエタノール誘発胃潰瘍に対する作用を検討した^{4.2.1.2-4}。エンタカポンは、システアミン誘発十二指腸潰瘍に対し 30mg/kg（p.o.）及び 10mg/kg（bid, p.o.）で効果を示し、腹腔内投与（30mg/kg）で作用はなかった。また、アセチルサリチル酸誘発胃潰瘍（10, 30, 100mg/kg, p.o.）及びエタノール誘発胃潰瘍（30mg/kg, p.o.）に対しそれぞれ効果を示した。

(3) 抗浮腫作用

ラットのカラゲニン誘発足蹠浮腫に対する作用を検討した^{4.2.1.2-5}。エンタカポン（200mg/kg, p.o.）は、抗浮腫作用を示した。

(4) 抗酸化作用

ラット脳ホモジネートを用い抗酸化作用を検討した^{4.2.1.2-6}。*In vitro* 試験におけるエンタカポンの IC₅₀ 値は、マロンジアルデヒド法 1.35μM、化学発光法 1.3μM であったが、エンタカポン 30mg/kg（p.o.）を投与したときの *ex vivo* 試験における抗酸化作用は認められなかった。

(5) 鉄キレート作用

エンタカポンは、*in vitro* 試験において 1mM 以上で鉄キレート作用を示した^{4.2.1.2-7}。

(6) 腎保護作用

ヒトレニンとヒトアンジオテンシノーゲンを過剰発現させたラット（dTGR）を用い、エンタカポンの腎保護作用を検討した^{4.2.1.2-8}。dTGR にエンタカポン（30mg/kg, i.p.）を 1 日 2 回、3 週間反復投与したときの収縮期血圧（mmHg）、24 時間アルブミン尿（mg/日）及び腎障害につい

て評価した。エンタカポンは、血圧上昇に対しほとんど影響しなかったが、24 時間アルブミン尿の上昇を抑制し、腎障害の進展を阻止した。

2.6.2.4 安全性薬理試験

(1) 中枢神経系に及ぼす影響

エンタカポン（30 及び 100mg/kg, p.o.）は、マウスの自発運動量^{4.2.1.1-7}、協調運動、ペンテトラゾール誘発痙攣、エタノール及びヘキシバルビタール誘発睡眠に対し作用を示さなかった^{4.2.1.3-1}。ラットの正常体温に対し、エンタカポンの単回単独投与（400～800mg/kg, p.o.）及び 1 日 2 回 200mg/kg（p.o.）7 日間反復投与は影響を及ぼさなかったが、エンタカポン（400mg/kg, p.o.）をレボドパ/カルビドパと併用すると体温低下が見られた^{4.2.3.7.7-5}。エンタカポン（30mg/kg, p.o.）は、ラットのアンフェタミン誘発常同行動を増強した^{4.2.1.3-2}。エンタカポン（10～100mg/kg, p.o.）は Randall-Selitto 法において痛覚閾値を上昇させる傾向を示し、酢酸 writhing 法では 100mg/kg（p.o.）で鎮痛傾向を、10mg/kg（i.v.）で鎮痛効果を認めた。ホットプレート法では鎮痛作用を認めなかった^{4.2.1.2-5}。ラット線条体スライスを用いた DA 取り込みに関する検討を行ったところ、エンタカポンは 100 μ M で DA の取り込みを阻害した^{4.2.1.3-3}。エンタカポン（10mg/kg, i.p.）は、線条体における水酸化ラジカル（2,3-dihydroxybenzoic acid : 2,3-DHBA）の産生に影響を及ぼさなかった^{4.2.1.3-4}。エンタカポンのヒト α_2 受容体サブタイプ（ α_{2A} , α_{2B} , α_{2C} ）に対する Ki 値はいずれも 100 μ M 以上であった^{4.2.1.3-5}。

(2) 呼吸器系に及ぼす影響

エンタカポンの単独投与（0.2, 1, 5mg/kg, i.v.）は、モルモットの気管支拡張作用・気管支収縮作用を示さず、ヒスタミン誘発気管支収縮に対する作用も見られなかった^{4.2.1.3-6}。摘出気管に対しエンタカポンは単独適用で弛緩作用を（EC₅₀=40 μ M），イソプレナリン誘発弛緩反応に対しては増強作用（1 μ M 以上）を示したが、サルブタモールの弛緩反応に影響はなかった^{4.2.1.3-7}。

(3) 心循環器系に及ぼす影響

エンタカポン（0.003～3mg/kg, i.v.）は、麻酔ラットの血圧、心拍数、dp/dt（大腿動脈）及び心電図に作用を示さなかったが、ノルアドレナリン（1.6nmol/kg, i.v.）による大腿動脈の dp/dt を減弱させた（30mg/kg, p.o.）。チラミン、イソプレナリン、アドレナリン、DA による血圧、心拍数、心電図の反応に影響しなかった^{4.2.1.3-8}。モルモットの摘出大動脈に対し、エンタカポン（0.1～30 μ M）は作用を示さなかった^{4.2.1.3-9}。

(4) 平滑筋に及ぼす影響

エンタカポンの単独投与（0.01～100 μ M）は、モルモットの摘出回腸に影響しなかったが、アセチルコリン誘発収縮は抑制した（100 μ M）^{4.2.1.3-7}。エンタカポン（0.1～30 μ M）は、摘出門脈にも影響しなかった^{4.2.1.3-7}。

(5) 消化管に及ぼす影響

エンタカポン（10～100mg/kg, p.o.）は、ラットの腸管内輸送^{4.2.1.3-10}及び胃液分泌^{4.2.1.2-4}に影響しなかった。

(6) 腎臓に及ぼす影響

エンタカポン（3～100mg/kg, p.o.）は、ラットの尿量，尿浸透圧，尿中電解質に作用を示さず^{4.2.1.3-11}，腎臓の非タンパク性 SH 分子群の含量にも影響なかった^{4.2.1.3-12}。

(7) その他の作用

エンタカポン（0.005～5mM）の肝臓 PST のアイソエンザイム PST-M に対する IC₅₀ 値は 500 μ M 以上，PST-P に対する IC₅₀ 値は 227 μ M であった^{4.2.1.3-13}。

(8) 考察

本剤投与による影響が見られた項目について臨床上の意味について考察した。

1) 体温に対する作用

ラットに本薬を単独投与したとき 800mg/kg でも体温に影響はなかったが，本薬 400mg/kg とレボドパ（10mg/kg）/カルビドパ（20mg/kg）を併用投与したとき，有意な一過性の体温低下がみられた。これは本薬自体の作用ではなく，レボドパの中枢を介する体温低下作用と考えられる。体温調節機構として中枢ドパミン神経系が一定の役割を果たしており，ドパミン D₁ 及び D₂ 受容体，特に D₂ 受容体刺激により体温が低下することが報告されている⁽¹⁾。したがって，本薬及びカルビドパと併用投与されたレボドパが脳内で DA となり，DA が D₂ 受容体を刺激し体温が低下したと考えられる。実験に用いた本薬の投与量は，臨床用量（体重 50kg，1 回あたりの投与量を 200mg とすれば 4mg/kg）の 100-200 倍であり，この点を考慮すれば臨床的に問題となる影響が生じることは考えにくい。

2) アンフェタミン誘発常同行動に対する増強作用

アンフェタミン (10mg/kg, i.v.) が誘発するラットの常同行動に対し、本薬 (30mg/kg, p.o.) は投与 120 分後に一過性の有意な増強作用を示した。このとき、比較薬として中枢移行性の高い COMT 阻害薬 RO-41,0960 も検討した。RO-41,0960 は、投与 60 分後から有意な増強作用を示し、その効果は少なくとも 180 分まで持続した。この実験ではレボドパ/DCI は投与されていない。本薬は末梢選択的 COMT 阻害剤であるが、30mg/kg (i.p.) を投与したとき、本薬の一部が脳内へ移行しレボドパ代謝に影響した可能性が考えられる (考察 2 参照)。すなわち、脳内へ移行した本薬の一部が脳内レボドパから 3-OMD への経路を阻害するため、レボドパから DA への経路が優位となり、神経細胞からの DA 放出が増加したときアンフェタミンによる常同行動が一過性に増強されたと考えられる。患者体重を 50kg とすれば、本薬 30mg/kg は臨床用量として 1500mg に相当する。本薬の 1 回あたりの最大投与量は 200mgであることを考慮すれば、臨床的に問題となる可能性は低いと考えられる。

3) 鎮痛作用

本薬は、Randall-Selitto 法では痛覚閾値を上昇させる傾向を示しながら、酢酸 writhing 法では静脈内投与 (10mg/kg) により有意な鎮痛効果を示した。このように炎症反応が関与する鎮痛作用に対し本薬の効果は一定しない。これは、本薬が抗炎症を意味するロイコトリエン B₄/C₄ 生成抑制作用とともに、炎症メディエーターのプロスタグランジン E₂ 増加作用を有するためと推測される。臨床的には、炎症や痛みに対しそれらを軽減する場合と悪化させる場合の両方が可能性として考えられる。

4) ドパミン取込み阻害に関する作用 (*in vitro*)

ラット線条体標本を用いた *in vitro* 実験において、本薬は 100μM で ³H-ドパミンの取込みを阻害した。これは、本薬の脳内ドパミンの作用増強の機序のひとつを示唆した実験であるが、脳内移行率の低さから考えれば臨床用量範囲で脳内濃度が 100μM に達することは考えにくい。

5) 摘出気管に対する作用

モルモットの摘出気管を用いた *in vitro* 実験において、本薬は単独適用で弛緩作用が認められ、その EC₅₀ 値は 40μM であった。この機序として、気管組織に残存する COMT が本薬により阻害されたことで内因性ノルアドレナリン代謝が阻止され、その結果 β 受容体刺激による気管拡張が生じたと考えられる。本薬は 1μM でイソプレナリンの気管弛緩反応を増強するが、この場合も

気管組織に残存する COMT 活性が阻害され、そのためイソプレナリン分解が抑制されたことが考えられる。臨床では、 β 受容体刺激薬の気管支拡張作用を増強させる可能性などが考えられる。

6) ノルアドレナリン誘発 dp/dt に対する作用

麻酔ラットを用い、チラミン、イソプレナリン、アドレナリン、ドパミン及びノルアドレナリンによる左室収縮機能、拡張機能の指標である dp/dt 増加に対する本薬 30mg/kg (p.o.) の影響を検討した。本薬は、チラミン、イソプレナリン、アドレナリン、ドパミンで誘発した dp/dt 増加に有意な影響を与えることはなく、高用量 (6.4nmol/kg) のノルアドレナリンでも同様であった。しかしながら、ノルアドレナリン低用量 (1.6nmol/kg) による dp/dt 増加を抑制した。この成績には用量依存性がないこと、他のカテコールアミンでは影響を認めなかったことから、薬理学的な解釈は困難であるが、各種カテコールアミンによる左室機能増大に対し、相加的あるいは相乗的效果はないと考えられる。

7) アセチルコリン誘発摘出回腸収縮に対する作用

モルモットの摘出気管において、本薬単独で弛緩作用が認められたが (EC_{50} 値=40 μ M) 、これは組織に残存する COMT 活性が阻害されたことによる内因性ノルアドレナリンの作用増強と考えられる。摘出回腸におけるアセチルコリン誘発収縮反応に対する本薬の拮抗作用 (100 μ M) も、内因性ノルアドレナリンの作用増強がアセチルコリンに対する拮抗として検出された可能性が考えられる。ただし、本薬 100 μ M という濃度は、臨床的に到達する血中濃度としては考えにくい。

2.6.2.5 薬力学的薬物相互作用

(1) MAO-B 阻害剤との相互作用

ラットの左腹側被蓋野に 6-OHDA を注入し、2 週間後アポモルフィンを投与し一定の回転行動数を示した（アポモルフィンテスト）動物に、セレギリン（2mg/kg, p.o.）を 2 週間反復処置した。これらの動物を用いてエンタカボンと MAO-B 阻害剤であるセレギリン（Sele）の相互作用を検討した^{4.2.1.4-1}。薬物の単回投与スケジュールにより、カルビドパ/レボドパ投与群（Sele 反復処置群）、カルビドパ+Sele/レボドパ投与群（Sele 反復+Sele 投与群）、カルビドパ+Sele/レボドパ+エンタカボン投与群（Sele 反復+Sele/Enta 投与群）、及びカルビドパ/レボドパ+エンタカボン投与群（Sele 反復+Enta 投与群）の 4 群を用いた。溶媒対照群として 2 週間の溶媒反復処置後、カルビドパ/レボドパを単回投与した溶媒反復処置群を用意した。薬物投与終了直後（0 分）から毎分当りの対側回転運動数を 5 時間測定し、データとして 5 時間当りの対側回転運動数、もしくは 15 分当りの対側回転運動数を示した。薬物はいずれも経口投与とし、投与量はセレギリン 2mg/kg、カルビドパ 30mg/kg、レボドパ 10mg/kg、エンタカボン 10mg/kg とした。薬物の反復処置と単回投与スケジュールを表 2.6.2-8 に示した。

表 2.6.2-8 セレギリン反復処置ラットを用いた相互作用実験の単回投与スケジュール

実験群	反復処置	単回投与スケジュール	
		30 分前	0 分 (時間)
溶媒反復処置群	溶媒	カルビドパ	レボドパ
Sele 反復処置群	Sele	カルビドパ	レボドパ
Sele 反復+Sele 投与群	Sele	カルビドパ + Sele	レボドパ
Sele 反復+Sele/Enta 投与群	Sele	カルビドパ + Sele	レボドパ + Enta
Sele 反復+Enta 投与群	Sele	カルビドパ	レボドパ + Enta

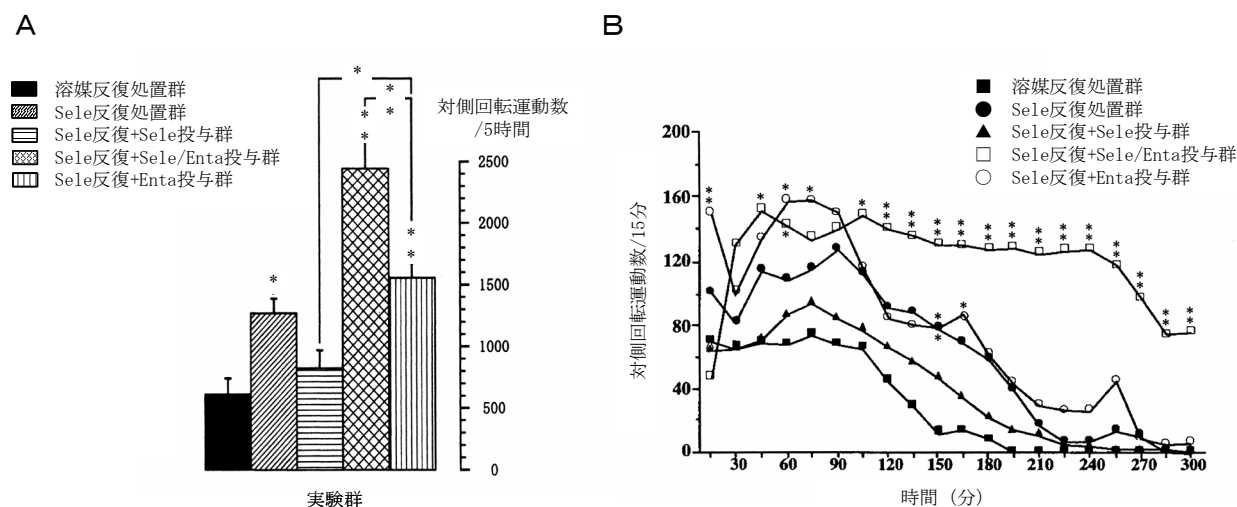
Sele : セレギリン, Enta : エンタカボン

溶媒反復処置群と比べると、セレギリンの反復処置（Sele 反復処置群）によりレボドパ/カルビドパの薬効（回転運動数）は有意に増強した。セレギリン反復処置後にセレギリンを単回投与（Sele 反復+Sele 投与群）したとき、反復処置の増強効果は消失した。一方、セレギリン反復処置後にエンタカボンを単回投与（Sele 反復+Enta 投与群）しても、セレギリン反復処置の増強効果は影響されなかった。セレギリン反復後、セレギリンとエンタカボンを単回併用投与（Sele 反復+Sele/Enta 投与群）したとき、回転運動数は Sele 反復+Enta 投与群と比べても有意に増加した（図 2.6.2-15A）。回転運動数のタイムコースを見ると、Sele 反復処置群（●）と Sele 反復+Enta

投与群 (○) では 90 分後まで高値を維持し、その後漸減した。Sele 反復+Sele/Enta 投与群 (□) では、投与 30 分後から回転運動数は著明に増加し、240 分まで高値を維持した (図 2.6.2-15B)。

エンタカポンは、セレギリンによる反復処置効果に影響せず、単回投与時セレギリン存在下で本薬の増強作用はさらに増幅した。

図 2.6.2-15 セレギリン反復投与後のレボドパ/カルビドパの薬効に関するエンタカポンとセレギリンの作用及び相互作用



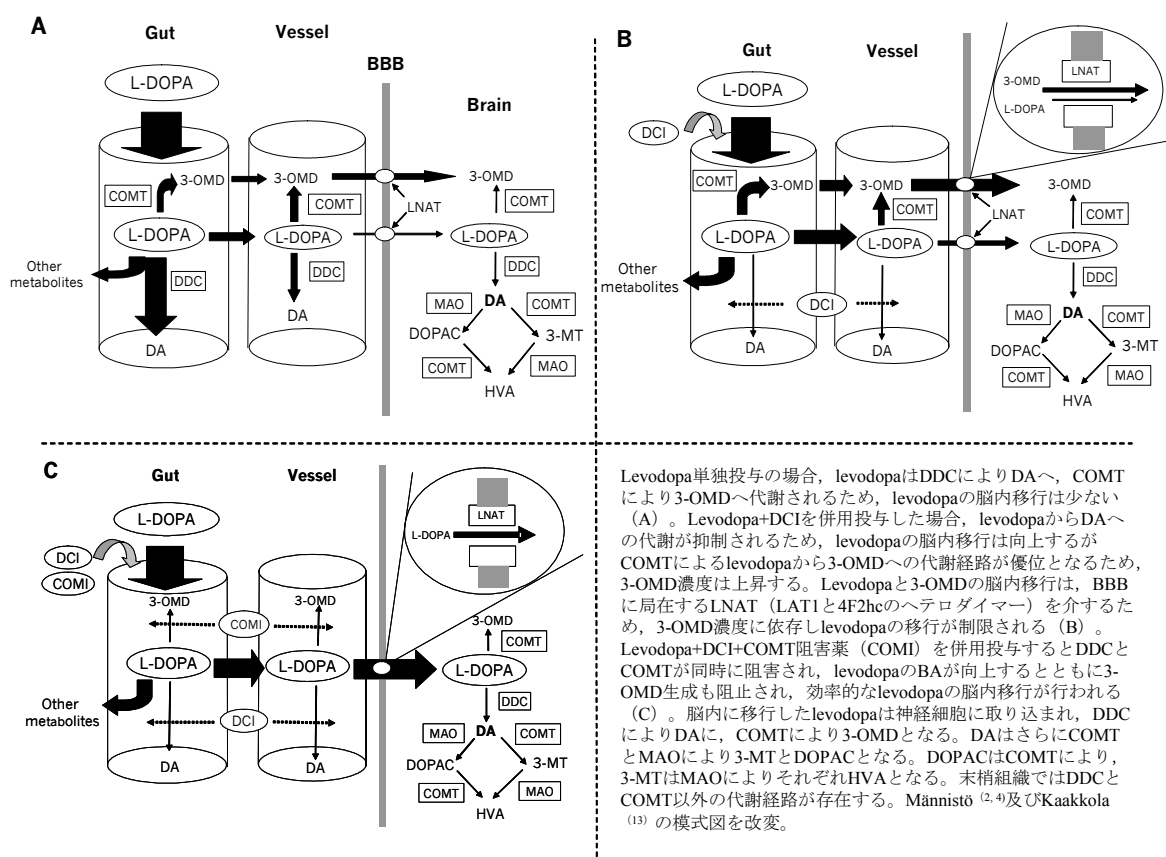
各実験群の5時間当りの対側回転運動数 (A) と投与後5時間までのタイムコース (B)。グラフ A の各値は平均±SEM。Sele 反復+Enta 投与群のみ n=12, 他の実験群は n=14。* p<0.05, ** p<0.01: 溶媒反復対照群との比較。

2.6.2.6 考察及び結論

現在まで多くの DA 受容体刺激薬など様々なパーキンソン病治療薬が上市されたが、レボドパはいまだにその薬物治療の中心に位置する。投与されたレボドパの 50-75%は、消化管のドパ脱炭酸酵素 (DDC) により DA に⁽¹⁾、残りのレボドパも多くは COMT により 3-*O*-メチルドパ (3-OMD) に代謝され、脳内へ移行するレボドパは投与量の 1~数%とされ^(1,2,3)、レボドパ単独の有効性と安全性に関しては、必ずしも満足できる状況ではなかった (図 2.6.2-16A)。そこで、レボドパの脳内移行の効率化と副作用の軽減を目的とし、カルビドパやベンセラジドなどの末梢 DDC 阻害剤 (DCI) が開発・上市された。DCI の登場で有効性の向上とともに DA による副作用が減少し、レボドパも 4 分の 1~5 分の 1 まで節減可能となり、レボドパ/DCI は最も標準的な薬物治療として位置付けられる。

一方、DCI を併用した場合でもレボドパの脳内移行は投与量の 5-10%程度^(2,4)であり、さらにレボドパから DA への代謝経路が阻害されるため、COMT によるレボドパから 3-OMD への経路が優位となり、その結果血中 3-OMD 濃度が上昇する。レボドパの血中半減期が 1.4~2.1 時間であるのに対し、3-OMD の半減期は 13.2~17.3 時間と長く⁽⁵⁾、このため高い血中 3-OMD 濃度が持続する。3-OMD とレボドパは、血液-脳関門 (BBB) に局在する大型中性アミノ酸トランス

図 2.6.2-16 レボドパ単独、DCI 併用及び DCI+COMI 併用によるレボドパの代謝と脳内移行

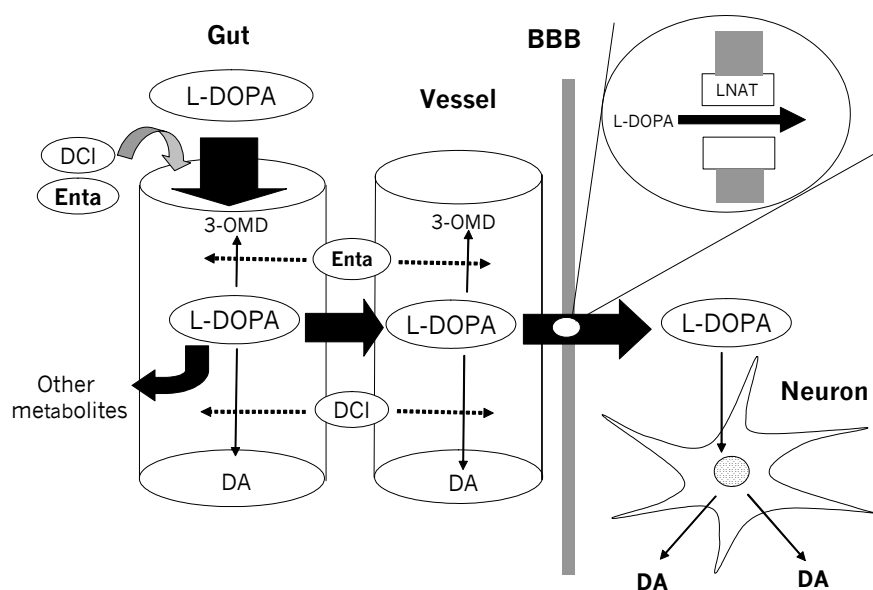


ポーター^(6,7) (LNAT : LAT1 と 4F2hc のヘテロダイマー^(8,9)) の基質として競合することから^(9,10), レボドパの脳内移行は 3-OMD 濃度に依存し制限される⁽¹¹⁾ (図 2.6.2-16B)。従って, DDC とともに COMT を阻害することでレボドパの BA はさらに向上し, 同時に 3-OMD の生成も阻止されるため⁽¹²⁾, レボドパの脳内移行は一層効率化する (図 2.6.2-16C)。

エンタカポンは COMT 特異的阻害薬であり (表 2.6.2-1,-2), 末梢 COMT を選択的に阻害する (表 2.6.2-3, 図 2.6.2-1)。レボドパの BA 増加や (表 2.6.2-4) 3-OMD の AUC 減少 (図 2.6.2-2) は, 本薬の末梢 COMT 阻害作用によると考えられた。レボドパ/カルビドパとともにエンタカポンを投与したとき, 線条体のレボドパ及び DA 含量の増加と 3-OMD 含量の減少が認められ (図 2.6.2-3,-4), レボドパの投与量も減量可能である (図 2.6.2-5)。ラットの *in vivo* マイクロダイアリシス実験では, エンタカポンの単独投与は線条体の細胞外 DA 濃度に影響しないものの (図 2.6.2-6), エンタカポンをレボドパ, あるいはレボドパ/カルビドパと併用投与したとき, 細胞外 DA 濃度上昇は増強され (図 2.6.2-7,-8), 3-OMD 濃度の上昇は抑制された (図 2.6.2-8)。レセルピン処置マウス, 片側 DA 神経破壊ラット, MPTP 処置マーモセットなどのパーキンソン病モデルにおいて, エンタカポンはレボドパ/カルビドパの薬効を増強し (図 2.6.2-9,-10,-13,-14), さらにレボドパの投与量が節減できること (図 2.6.2-11), MAO-B 阻害剤であるセレギリンのレボドパ/カルビドパ増強効果を増幅することが示された (図 2.6.2-15)。

経口投与されたレボドパは, 消化管から血中へ移行し, BBB を通過し脳内に達する。脳内に達したレボドパが DA ニューロンに取り込まれ DA となり, それが神経終末から放出されることでその治療効果が発揮される。従って, 消化管及び血中でのレボドパの DA 及び 3-OMD への代謝経路を阻害し脳内移行性を高めることは, レボドパの薬効を増強するために重要である。末梢 COMT 阻害薬であるエンタカポンをレボドパ/DCI と併用すると, 末梢組織の DDC と COMT が阻害されるためレボドパの BA は改善され, 同時にレボドパの脳内移行に競合する 3-OMD 生成も阻止される。このためレボドパの脳内移行は一層効率化し, 神経細胞から放出される DA 量が増加する。このような作用機序により, エンタカポンはレボドパの治療効果を増強させると考えられる (図 2.6.2-17)。

図 2.6.2-17 エンタカボンの作用機序



2.6.2.7 参考文献

- (1) Cedarbaum JM.: Clinical pharmacokinetics of anti-Parkinsonian drugs. Clin Pharmacokinetics, 1987, 13, 141-178
- (2) Männistö PT, Kaakkola S.: New selective COMT inhibitors: useful adjuncts for Parkinson's disease? Trends in Pharmacol Sci., 1989, 10, 54-56
- (3) Nutt JG, Fellman JH.: Review Pharmacokinetics of Levodopa. Clin Neuropharmacol., 1984, 7, 35-49
- (4) Männistö PT, Kaakkola S.: Rationale for selective COMT inhibitors as adjuncts in the drug treatment of Parkinson's disease. Pharmacol Toxicol, 1990, 66, 317-323
- (5) Jorga K, Fotteler B, Sedek G, et al.: The effect of tolcapone on levodopa pharmacokinetics is independent of levodopa/carbidopa formulation. J Neurol., 1998, 245, 223-230
- (6) Kageyama T, Nakamura M, Matsuo A et al.: The 4F2hc/LAT1 complex transports L-DOPA across the blood-brain barrier. Brain Res., 2000, 879, 115-121
- (7) Matsuo H, Tsukada S, Nakata T et al.: Expression of a system L neutral amino acid transporter at the blood-brain barrier. Neuroreport., 2000, 11, 3507-3511
- (8) Kanai Y, Segawa H, Miyamoto K et al.: Expression cloning and characterization of a transporter for large neutral amino acids activated by the heavy chain of 4F2 antigen (CD98). J Biol Chem., 1998, 273, 23629-23632
- (9) 金井好克：多選択性アミノ酸トランスポーターファミリー：LAT ファミリー 蛋白質核酸酵素 2001, 46, 629-637
- (10) Gomes P, Soares-da-Silva P.: Interaction between L-DOPA and 3-O-methyl-L-DOPA for transport in immortalised rat capillary cerebral endothelial cells. Neuropharmacol., 1999, 38, 1371-1380
- (11) Reches A, Fahn S.: 3-O-methyldopa blocks dopa metabolism in rat corpus striatum. Ann Neurol. 1982, 12, 267-271
- (12) Cedarbaum JM, Leger G.: Reduction of circulating 3-O-methyldopa by inhibition of catechol-O-methyltransferase with OR-611 and OR-462 in cynomolgus monkeys: implications for the treatment of Parkinson's disease. Clin Neuropharmacol., 1991, 14, 330-342
- (13) Kaakkola S.: Clinical pharmacology, therapeutic use and potential of COMT inhibitors in Parkinson's disease. Drugs, 2000, 59, 1233-1250

2.6.3 薬理試験の概要表

目次

2.6.3 薬理試験概要表	4
2.6.3.1 薬理試験：一覧表	4
2.6.3.2 効力を裏付ける試験の成績一覧	11
2.6.3.3 副次的薬理試験	14
2.6.3.4 安全性薬理試験	16
2.6.3.5 薬力学的薬物相互作用試験	19

略号

α_2	adrenergic subtype receptor α_2 : アドレナリンサブタイプ受容体 α_2
AUC	area under the concentration-time curve: 濃度—時間曲線下面積
BA	Bioavailability: バイオアベイラビリティ
bid	twice daily: 1 日 2 回投与
COMT	catechol <i>O</i> -methyltransferase: カテコール- <i>O</i> -メチル転移酵素
DA	dopamine: ドパミン
DBH	dopamine- β -hydroxylase: ドパミン β 水酸化酵素
DDC	dopa decarboxylase: ドパ脱炭酸酵素
DOPAC	3,4-dihydroxyphenylacetic acid: 3,4-ジヒドロキシフェニル酢酸
dp/dt	dp/dt: 収縮期圧上昇速度
EC ₅₀	50%有効濃度
ED ₅₀	50%有効用量
HPLC/ECD	HPLC/electrochemical detection: 高速液体クロマトグラフィー/電気化学検出
HVA	homovanillic acid: ホモバリン酸
IC ₅₀	50%阻害濃度
i.p.	腹腔内投与
i.v.	静脈内投与
MAO-A	monoamine oxidase-type A : A 型モノアミン酸化酵素
MAO-B	monoamine oxidase-type B : B 型モノアミン酸化酵素
MPTP	1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine: 1 -メチル-4-フェニル 1,2,3,6-テトラヒドロピリジン
6-OHDA	6-hydroxydopamine: 6-ヒドロキシドパミン
3-OMD	3- <i>O</i> -methyl-DOPA: 3- <i>O</i> -メチルドパ
p.o.	経口投与
PST	phenolsulfotransferase: フェノールスルホトランスフェラーゼ
SEM	standard error of mean: 標準誤差
s.c.	皮下投与
t _{1/2}	消失半減期
TH	tyrosine hydroxylase: チロシン水酸化酵素

2.6.3 薬理試験概要表

2.6.3.1 薬理試験：一覧表

試験の種類	試験系 又はプロトコール	投与経路	報告書番号	記載箇所 Vol. / section
薬効を裏付ける試験				
(1) COMT 阻害作用(<i>In vitro</i>)				
1) COMT に対する阻害作用	ラットの脳、十二指腸、赤血球、肝及びヒト赤血球より可溶性 COMT 粗標本を調製した。酵素標本に溶媒もしくはエンタカポン（最終濃度 0.005-50 μ M）と基質のジヒドロキシベンゾ酸を添加し反応を開始した。反応生成物は HPLC/ECD 法で定量し、酵素活性は pmol/min/mg protein として算出した。阻害曲線よりエンタカポンの IC ₅₀ 値を求めた。n=3。	In vitro	F-012870152	4.2.1.1-1
2) 各種カテコールアミン代謝酵素に対する阻害作用	各酵素標本の材料と反応基質は以下の通り。COMT（ラット脳/ジヒドロキシベンゾ酸）、DBH（ウシ副腎髄質/チラミン）、TH（ウシ副腎髄質/チロシン）、DDC（ラット脳/レボドパ）、MAO-A（ラット脳ミトコンドリア/5-HT）及び MAO-B（ラット脳ミトコンドリア/ベンジラミン）。各酵素標本に溶媒もしくはエンタカポン（最終濃度 0.005-50 μ M）と基質を添加した。反応生成物は HPLC/ECD 法で定量し、酵素活性は pmol/min/mg protein として算出した。阻害曲線よりエンタカポンの IC ₅₀ 値を求めた。n=3。	In vitro	F-012870152	4.2.1.1-1
(2) 末梢 COMT 阻害作用 (<i>Ex vivo, in vivo</i>)				
1) 末梢 COMT と線条体 COMT の阻害作用	雄性 Wistar ラットに、エンタカポン 10mg/kg もしくは溶媒を経口投与し、15 分、1 時間、3 時間、5 時間あるいは 8 時間後に動物を断頭し、線条体、肝、十二指腸、腎及び赤血球を採取した（タイムコース）。ラットにエンタカポン 0.3, 1, 3, 10, 30mg/kg もしくは溶媒を経口投与し、1 時間後に動物を断頭し、線条体、肝、十二指腸、腎及び赤血球を採取した（用量反応実験）。各組織から COMT 粗標本を調製した。それぞれの酵素標本に基質のジヒドロキシベンゾ酸を添加し COMT 活性（pmol/min/mg protein）を定量した。阻害曲線より組織ごとの ED ₅₀ 値を求めた。統計学的検定は Student's t-test を採用した。n=2~6。	経口	F-012870171	4.2.1.1-2

2.6.3.1 薬理試験：一覧表（続き）

試験の種類	試験系 又はプロトコール	投与経路	報告書番号	記載箇所 Vol. / section
2) レボドパ及び 3-OMD の血清 AUC に関する効果	雄性 Wistar ラットに、カルビドパ (50 mg/kg, p.o.) 投与 30 分後にレボドパ (50 mg/kg) とエンタカボン (0.3, 3, 10, 30 mg/kg) を経口投与し、15 分、1 時間、2 時間、3 時間、及び 5 時間後に採血を行った。血清は遠心分離後-80℃で保存し、血清レボドパ及び 3-OMD 濃度を HPLC/ECD 法で定量し、AUC _{0-5h} (µg·h/mL) を算出した。データは平均±SEM で示した。溶媒対照群 n=14, エンタカボン群 n=5。	経口	F■■012870147	4.2.1.1-3
3) レボドパの血中動態に関する効果	自由飲水、絶食 (18-24 時間) ラットを用いた。カルビドパ (30 mg/kg, p.o.) 処理 30 分後にレボドパ (5mg/kg, i.v.もしくは 10mg/kg, p.o.) を投与した。レボドパ静脈内投与の場合、その 30 分前にエンタカボン (30mg/kg, p.o.) を投与し、採血は 5 分、10 分、15 分、30 分、45 分、1 時間、2 時間及び 3 時間後に行った。。レボドパ経口投与の場合、エンタカボン (30mg/kg, p.o.) はレボドパと同時投与し、15 分、1 時間、2 時間、3 時間、5 時間及び 8 時間後に採血を行った。血清は遠心分離後-20℃で保存し、血清レボドパ及び 3-OMD 濃度を HPLC/ECD 法で定量し AUC _{0-∞} (µg·h/mL) を算出した。データは平均±SEM で示した。レボドパ単独群 n=5, エンタカボン併用群 n=6。	経口	F■■032870214	4.2.1.1-4

2.6.3.1 薬理試験：一覧表（続き）

試験の種類	試験系 又はプロトコール	投与経 路	報告書番号	記載箇所 Vol. / section
(3) 線条体レボドパ及びその代謝物含量に対する効果				
1) レボドパ/カルビドパに対する増強効果	用量反応の実験として、カルビドパ（50 mg/kg, p.o.）投与 30 分後にレボドパ（50 mg/kg, p.o.）とエンタカボン（0.3, 3, 10 あるいは 30mg/kg, p.o.）をラットに投与し、その 2 時間後に断頭し、線条体を切り出した。タイムコースの実験として、カルビドパ（50 mg/kg, p.o.）投与 30 分後にレボドパ（50 mg/kg, p.o.）とエンタカボン（10mg/kg, p.o.）をラットに投与し、その 1 時間、2 時間、3 時間、4 時間及び 5 時間後に断頭し、線条体を切り出した。切り出した線条体のレボドパ、DA、3-OMD、DOPAC および HVA は、HPLC/ECD 法で定量し線条体重量で補正した（ $\mu\text{g/g striatum}$ ）。カルビドパ（50 mg/kg, p.o.）/レボドパ（50 mg/kg, p.o.）群を対照とした。データは平均 $\pm$ SEM で示し、統計学的検定法は Scheffe's test を採用した。n=6。	経口	F■■012870147	4.2.1.1-3
2)レボドパ節減効果	カルビドパ（50 mg/kg, p.o.）投与 30 分後にレボドパ（50, 25 あるいは 10 mg/kg, p.o.）とエンタカボン（10mg/kg, p.o.）をラットに投与し 3 時間後に断頭し、線条体を切り出した。切り出した線条体のレボドパ、DA 及び 3-OMD は、HPLC/ECD 法で定量し線条体重量で補正した（ $\mu\text{g/g striatum}$ ）。カルビドパ（50 mg/kg, p.o.）/レボドパ（50 mg/kg, p.o.）群を対照とした。データは平均 $\pm$ SEM で示し統計学的検定法は Scheffe's test を採用した。n=6。	経口	F■■012870147	4.2.1.1-3

2.6.3.1 薬理試験：一覧表（続き）

試験の種類	試験系 又はプロトコール	投与経路	報告書番号	記載箇所 Vol. / section
(4) 線条体ドパミン及びその代謝物の放出に関する効果				
1) 単独効果	雄性 Sprague-Dawley ラットを用いた。麻酔下にてラット線条体へマイクロダイアリシス用プローブを刺入し、1 μ L/min の速度で灌流を開始した。透析液試料は 20 分ごとに回収した。エンタカポン投与の 1 時間前をベースライン期間とし、投与後 260 分間もしくは 280 分間試料採取を行った。試料中の DA, HVA 及び DOPAC は HPLC/ECD 法で定量し、薬物投与前の基礎レベルに対する変化率 (%) を算出した。エンタカポンは 10, 30 もしくは 100 mg/kg (i.p.) を投与した。データは平均 $\pm$ SEM で示し、統計学的検定法は一元配置分散分析後 Tukey 多重比較テストを採用した。n=6。	腹腔内	Brain Res. 587, 241-249(1992)	4.2.1.1-5
2) レボドパとの併用効果	雄性 Sprague-Dawley ラットを用いた。麻酔下にてラット線条体へマイクロダイアリシス用プローブを刺入し、1 μ L/min の速度で灌流を開始した。透析液試料は 20 分ごとに回収した。エンタカポン投与の 1 時間前をベースライン期間とし、投与後 280 分間試料採取を行った。試料中の DA, HVA 及び DOPAC は HPLC/ECD 法で定量し、pmol/20 分 (平均 $\pm$ SEM) として表示した。エンタカポン 10 mg/kg (i.p, n=6) , レボドパ 50 mg/kg (i.p, n=8) 及びエンタカポン+レボドパ (i.p, n=8) を投与した。データは平均 $\pm$ SEM で示し、統計学的検定法は一元配置分散分析後 Tukey 多重比較テストを採用した。n=8。	腹腔内	J Neurochem. 60, 137-144 (1993)	4.2.1.1-6

2.6.3.1 薬理試験：一覧表（続き）

試験の種類	試験系 又はプロトコール	投与経路	報告書番号	記載箇所 Vol. / section
3) レボドパ/カルビドパとの併用効果	雄性 Sprague-Dawley ラットを用いた。麻酔下にてラット線条体へマイクロダイアリス用プローブを刺入し、1 μ L/min の速度で灌流を開始した。透析液試料は 20 分ごとに回収した。エンタカポン投与の 1 時間前をベースライン期間とし、投与後 280 分間試料採取を行った。試料中の DA, HVA 及び DOPAC は HPLC/ECD 法で定量し pmol/20 分（平均 $\pm$ SEM）として表示した。エンタカポン 10mg/kg (i.p) とカルビドパ 50mg/kg (i.p) を投与し、40 分後にレボドパ 50 mg/kg (i.p) を投与した。統計学的検定法は ANOVA 後の Tukey 多重比較テストを採用した。n=6。	腹腔内	J Neurochem. 60, 137-144 (1993)	4.2.1.1-6
(5) パーキンソン病モデルにおける改善効果 (<i>in vivo</i>)				
1) レセルピン処置マウス	雄性 NMRI マウスを用いた。マウスにレセルピン (5mg/kg, i.p.) の前処置を行うことでモデルを作製した。レセルピン処置の 18-20 時間後にカルビドパ (62.5 mg/kg, p.o.) を、その 30 分後にレボドパ (250mg/kg, p.o.) もしくはレボドパ (250mg/kg, p.o.) /エンタカポン (3, 10 もしくは 30mg/kg, p.o.) を投与し、そこから 5 時間運動活性を測定した。投与直後から 2 時間までの AUC _{0-2h} と 5 時間までの AUC _{0-5h} を算出した。データは平均 $\pm$ SEM で示し、統計学的検定は Student's t-test を採用した。n=7~8。	経口	F-052870082	4.2.1.1-7
2) 6-OHDA による片側ドパミン神経破壊ラット	レボドパ/カルビドパとの併用効果：雄性 Wistar ラットを用いた。ラットの左腹側被蓋野へ 6-OHDA を注入し DA 神経を破壊した。2 週間後アポモルフィン(0.05mg/kg)を皮下投与し 60 分間の対側回転数が 200-500 回に達した動物を使用した。レボドパ(10mg/kg, p.o.) /カルビドパ(10mg/kg, p.o.)群とレボドパ(10mg/kg, p.o.) /カルビドパ(10mg/kg, p.o.) /エンタカポン(1, 3 もしくは 10mg/kg, p.o.)群の毎分当りの対側回転運動数を 5 時間測定し、5 時間当りの総対側回転運動数、もしくは 15 分当りの対側回転運動数を求めた。データは平均 $\pm$ SEM で示し、統計学的検定は ANOVA 後の Duncan's multiple comparison test を採用した。n=8。	経口	F-072870137	4.2.1.1-8

2.6.3.1 薬理試験：一覧表（続き）

試験の種類	試験系 又はプロトコール	投与経路	報告書番号	記載箇所 Vol. / section
2) 6-OHDA による片側ドパミン神経破壊ラット	レボドパ節減効果：カルビドパ(30mg/kg, p.o.)/レボドパ(10mg/kg, p.o.)の群とカルビドパ(30mg/kg, p.o.)/レボドパ(2, 5 もしくは 10mg/kg, p.o.)/エンタカポン(10mg/kg, p.o.)群の毎分当りの対側回転運動数を 5 時間測定し, 5 時間の総対側回転運動数, もしくは 15 分当りの対側回転運動数を求めた。データは平均±SEM で示し, 統計学的検定は ANOVA 後の Duncan's multiple comparison test を採用した。n=8。	経口	F■072870172	4.2.1.1-9
	耐性形成：溶媒もしくはエンタカポン(10mg/kg, p.o.)を 2 週間反復投与した後, 溶媒処置群に溶媒もしくはエンタカポン(10mg/kg, p.o.)を単回投与, エンタカポン処置群にエンタカポン(10mg/kg, p.o.)を単回投与した。いずれの群にも単回投与時にカルビドパ(30mg/kg, p.o.)とレボドパ(10mg/kg, p.o.)を投与した。各群の毎分当りの対側回転運動数を 5 時間測定し, 5 時間の総対側回転運動数, もしくは 15 分当りの対側回転運動数を求めた。データは平均±SEM で示し, 統計学的検定は ANOVA 後の Duncan's multiple comparison test を採用した。n=11-14。	経口	F■041210442	4.2.1.4-1
3) MPTP 処置マーモセット	16 匹のマーモセットに MPTP を投与し, パーキンソン病様症候を誘発した。動物にカルビドパを投与し (12.5mg/kg, p.o.), 溶媒対照群には溶媒を, レボドパ群には 60 分後にレボドパ (2.5mg/kg, p.o.) を, レボドパ/エンタカポン群には, 30 分後にエンタカポン (12.5mg/kg, p.o.), 60 分後にレボドパ (2.5mg/kg, p.o.) を投与した。レボドパ投与後, 運動活性は 300 分間測定し, 運動機能評価は 200 分間行った。運動活性は自動測定装置を用い, 運動機能は 10 分ごとの症状をスコア化し判定した。データは平均±SEM で示し, 運動活性に関する統計学的検定は Student's t-test を採用した。n=4。	経口	Study Report 2939051	4.2.1.1-10

2.6.3.1 薬理試験：一覧表（続き）

試験の種類	試験系 又はプロトコール	投与経 路	報告書番号	記載箇所 Vol. / section
(6) 立体異性体(Z体)の COMT 阻害作用				
1) <i>In vitro</i> 試験	ラットの脳，十二指腸，肝臓，赤血球より可溶性 COMT 粗標本を調製した。酵素標本に，溶媒，エンタカポン（E体）もしくはZ体（最終濃度 0.005-0.5 μ M）と基質であるジヒドロキシ安息香酸を添加し反応させた。反応生成物は HPLC/ECD 法で定量し，酵素活性は pmol/min/mg protein を算出した。阻害曲線より IC ₅₀ 値を求めた。	—	F■■012870152 F■■012870173	4.2.1.1-1 4.2.1.1-11
2) <i>Ex vivo</i> 試験	雄性 Wistar ラットを用いた。エンタカポンもしくはZ体 10mg/kg をラットに経口投与し，1 時間後に動物を断頭し，線条体，十二指腸，肝臓及び赤血球を採取し COMT 粗標本を調製した。それぞれの酵素標本に，基質であるジヒドロキシ安息香酸を添加し反応させた。COMT 活性（pmol/min/mg protein）を算出し，対照群と比較することで阻害率（%）を求めた。n=4-5。	経口	F■■012870171 PT■■011210010	4.2.1.1-2 4.2.1.1-12

2.6.3.2 効力を裏付ける試験の成績一覧

(1) COMT 阻害作用 (*In vitro*)

試験項目	実験材料	実験結果	報告書番号	記載箇所 Vol. / section
1) COMT に対する阻害作用	ラットの脳, 十二指腸, 赤血球, 肝臓及びヒトの赤血球	各組織の IC ₅₀ 値 ラット脳: 10nM, ラット十二指腸: 16nM, ラット赤血球: 26nM, ラット肝: 160nM, ヒト赤血球: 33nM	F■■012870152	4.2.1.1-1
2) 各種カテコールアミン代謝酵素に対する阻害作用	ラット脳 COMT, DDC, MAO-A, MAO-B 及びウシ副腎髄質 DBH, TH	各酵素の IC ₅₀ 値 COMT: 10nM, DBH: 48,000nM, TH: >50,000nM, DDC: >50,000nM, MAO-A: >50,000nM, MAO-B: >50,000nM	F■■012870152	4.2.1.1-1

(2) 末梢 COMT 阻害作用 (*Ex vivo, in vivo*)

試験項目	動物種(性)/ 系統	薬物の投与量 (投与経路)			実験結果	報告書番号	記載箇所 Vol. / section
		エンタカポン	レボドパ	カルビドパ			
1) 末梢 COMT と線条体 COMT の阻害作用	ラット(雄)/ Wistar	0.3, 1, 3, 10, 30mg/kg (p.o.).			投与 1 時間後の ED ₅₀ 値 十二指腸: 1.1mg/kg, 肝: 6.7 mg/kg, 赤血球: 5.4 mg/kg, 線条体: 24.2 mg/kg	F■■012870171	4.2.1.1-2
2) レボドパ及び 3-OMD の血清 AUC に関する効果	ラット(雄)/ Wistar	0.3, 3, 10, 30 mg/kg (p.o.)	50mg/kg (p.o.)	50mg/kg (p.o.)	用量依存的な血清中レボドパ AUC の増加と 3-OMD の AUC の減少。	F■■012870147	4.2.1.1-3
3) レボドパの血中動態に関する効果	ラット(雄)/ Wistar	30mg/kg (p.o.)	5mg/kg (i.v.) 10mg/kg (p.o.)	30mg/kg (p.o.)	レボドパの AUC と BA はそれぞれ約 3 倍に増加し, t _{1/2} は 2.4 倍延長した。	F■■032870214	4.2.1.1-4

(3) 線条体レボドパ及びその代謝物含量に対する効果

試験項目	動物種(性)/ 系統	薬物の投与量 (投与経路)			実験結果	報告書番号	記載箇所 Vol. / section
		エンタカポン	レボドパ	カルビドパ			
1) レボドパ/カルビドパに対する増強効果	ラット(雄)/ Wistar	0.3, 3, 10, 30 mg/kg (p.o.)	50mg/kg (p.o.)	50mg/kg (p.o.)	用量反応性：用量依存的なレボドパ、DA、DOPAC 含量の増加と 3-OMD 含量の低下。	F-012870147	4.2.1.1-3
		10mg/kg (p.o.)	50mg/kg (p.o.)	50mg/kg (p.o.)	タイムコース：レボドパと DA 含量は 2 時間で最大となり 5 時間まで高値持続。3-OMD 含量の増加は著明に抑制。		
2) レボドパ節減効果	ラット(雄)/ Wistar	10mg/kg (p.o.)	15, 25, 50 mg/kg (p.o.)	50mg/kg (p.o.)	レボドパと DA 含量の増加及び 3-OMD 含量の減少。エンタカポン併用でレボドパの節減可能。	F-012870147	4.2.1.1-3

(4) 線条体ドパミン及びその代謝物の放出に関する効果

試験項目	動物種(性)/ 系統	薬物の投与量 (投与経路)			実験結果	報告書番号	記載箇所 Vol. / section
		エンタカポン	レボドパ	カルビドパ			
1) 単独効果	ラット(雄)/ Sprague-Dawley	10, 30, 100 mg/kg (i.p.)			100mg/kg で軽度な細胞外 DA 濃度上昇あり。DOPAC 濃度は上昇し HVA 濃度は減少。	Brain Res. 587, 241-249(1992)	4.2.1.1-5
2) レボドパとの併用効果	ラット(雄)/ Sprague-Dawley	10mg/kg (i.p.)	50mg/kg (i.p.)		レボドパ単独で細胞外 DA 濃度上昇あり。エンタカポンはレボドパの作用を増強。	JNeurochem. 60, 137-144 (1993)	4.2.1.1-6
3) レボドパ/カルビドパとの併用効果	ラット(雄)/ Sprague-Dawley	10mg/kg (i.p.)	50mg/kg (i.p.)	50mg/kg (i.p.)	レボドパ/カルビドパで細胞外 DA 及び 3-OMD 濃度上昇。エンタカポンの併用でレボドパ/カルビドパの DA 濃度上昇作用は増強し、3-OMD 上昇抑制。	JNeurochem. 60, 137-144 (1993)	4.2.1.1-6

(5) パーキンソン病モデルにおける改善効果

試験項目	動物種(性)/系統	薬物の投与量 (投与経路)			実験結果	報告書番号	記載箇所 Vol. / section
		エンタカポン	レボドパ	カルビドパ			
1) レセルピン処置マウス	マウス(雄)/NMRI	3, 10, 30mg/kg (p.o.)	250mg/kg (p.o.)	62.5mg/kg (p.o.)	レボドパ/カルビドパの運動活性増加を増強。	F052870082	4.2.1.1-7
2) 6-OHDA 片側ドパミン神経破壊ラット	ラット(雄)/Wistar	1, 3, 10mg/kg (p.o.)	10mg/kg (p.o.)	10mg/kg (p.o.)	レボドパ/カルビドパの併用効果：対側回転運動数を増強。	F072870137	4.2.1.1-8
	ラット(雄)/Wistar	10mg/kg (p.o.)	2, 5, 10mg/kg (p.o.)	30mg/kg (p.o.)	レボドパ節減効果：エンタカポン併用によりレボドパを10mg/kg から 5mg/kg へ半減しても薬効は維持，増強。	F072870172	4.2.1.1-9
	ラット(雄)/Wistar	10mg/kg (p.o.)	10mg/kg (p.o.)	30mg/kg (p.o.)	耐性形成：エンタカポンの 2 週間反復処置でも増強作用は維持（耐性形成なし）。	F041210442	4.2.1.4-1
3) MPTP 処置マーマーセット	マーマーセット (雄・雌)	12.5mg/kg (p.o.)	2.5mg/kg (p.o.)	12.5mg/kg (p.o.)	運動活性増加及び運動機能改善の増強、延長効果あり。	Study Report 2939051	4.2.1.1-10

(6) 幾何異性体(Z 体)の COMT 阻害作用

試験項目	実験材料もしくは動物種 (性) / 系統/投与量 (投与経路)	実験結果	報告書番号	記載箇所 Vol. / section
1) <i>In vitro</i> 試験	ラットの脳，十二指腸，肝臓，赤血球	エンタカポンの IC ₅₀ 値：脳; 10nM, 十二指腸; 16nM, 肝; 160nM, 赤血球; 26nM Z 体の IC ₅₀ 値：脳; 20nM, 十二指腸; 24nM, 肝; 280nM, 赤血球; 33nM	F012870173	4.2.1.1-11
2) <i>Ex vivo</i> 試験	ラット(雄)/Wistar/10mg/kg (p.o.)	Z 体投与 1 時間後の COMT 阻害率：十二指腸; 87.7 ± 2.3%, 肝; 63.5 ± 4.2%, 赤血球; 27.2 ± 3.2%, 線条体; 0%	PT011210010	4.2.1.1-12

2.6.3.3 副次的薬理試験

試験の種類	動物種 系統/実験 材料	投与方法	投与量/ 適用濃度	性/ n	特記すべき所見	報告書番号	記載箇所 Vol. / section
(1) 血小板凝集及びエイコサノイド生成に関する作用							
アラキドン酸誘発血小板凝集	ヒト血小板	<i>In vitro</i>	20, 40, 80μM	—	凝集抑制(IC ₅₀ 値 : 36μM)	F■■072870142	4.2.1.2-1
ロイコトリエンB ₄ 生成	ヒト多形核 白血球	<i>In vitro</i>	1,10,33,100,333, 1000μM	—	生成抑制(IC ₅₀ 値 : 192μM)	F■■012870175	4.2.1.2-2
ロイコトリエンC ₄ 生成	ヒト多形核 白血球	<i>In vitro</i>	1,10,33,100,333, 1000μM	—	生成抑制(IC ₅₀ 値 : 70μM)	F■■012870175	4.2.1.2-2
プロスタグランジンE ₂ 生成	ウシ精囊	<i>In vitro</i>	33μM	—	生成増加	F■■012870174	4.2.1.2-3
(2) 抗消化管潰瘍作用							
システアミン誘発十二指腸潰瘍	ラット/ Wistar	経口	30mg/kg, 10mg/kg bid,	(雄)/ 8	抑制作用あり (30mg/kg, 10mg/kg bid)。	F■■052870151	4.2.1.2-4
		腹腔内	30mg/kg		作用なし。		
アセチルサリチル酸誘発胃潰瘍	ラット/ Wistar	経口	10,30,100mg/kg	(雄)/ 7 or 8	抑制作用あり (10, 30, 100mg/kg)。	F■■052870151	4.2.1.2-4
インドメタシン誘発胃潰瘍	ラット/ Wistar	経口	10,30mg/kg	(雄)/ 8	作用なし。	F■■052870151	4.2.1.2-4
エタノール誘発胃潰瘍	ラット/ Wistar	経口	10,30,100mg/kg	(雄)/ 8	抑制作用あり (30mg/kg)。	F■■052870151	4.2.1.2-4
(3) 抗浮腫作用							
カラゲニン誘発足趾浮腫に対する 作用	ラット/ Wistar	経口	3,30,100,200 mg/kg	(雄)/ 6~18	抑制作用あり (200mg/kg)。	F■■072870150	4.2.1.2-5
(4) 抗酸化作用							
<i>In vitro</i> 試験	ラット脳	<i>In vitro</i>	0.5~10μM	—	IC ₅₀ マロンシアルデヒド法: 1.35μM 化学発光法: 1.3μM	F■■011210492	4.2.1.2-6
<i>Ex vivo</i> 試験	ラット/ Wistar	経口	30mg/kg	(雄)/ 3	作用なし。	F■■011210492	4.2.1.2-6

2.6.3.3 副次的薬理試験（続き）

試験の種類	動物種 系統/実験 材料	投与方法	投与量/ 適用濃度	性/ n	特記すべき所見	報告書番号	記載箇所 Vol. / section
(5) 鉄キレート作用							
水溶液中の鉄（III）キレート作用	—	<i>In vitro</i>	3~3000μM	—	作用あり（1mM~）。	CR04124013 6	4.2.1.2-7
(6) 腎保護作用							
dTGR の腎障害に対する作用	ラット (dTGR)	腹腔内	30mg/kg, bid, 3 週間投与	(雄)/10	24 時間アルブミン尿の上 昇抑制と腎障害の進展抑 制。	J Hypertens., 21, 2353-2363, 2003	4.2.1.2-8

dTGR：ここではヒトレニン及びヒトアンジオテンシノーゲン遺伝子を導入したダブルトランスジェニックラットを示す。

2.6.3.4 安全性薬理試験

エンタカポン

試験の種類		動物種 系統/実験 材料	投与方法	投与量/ 適用濃度	性/ n	特記すべき所見	報告書番号	記載箇所 Vol. / section
(1) 中枢神経系に及ぼす影響								
自発運動活性		マウス NMRI	経口	30,100mg/kg	雄/5 or 9	作用なし。	F■■052870082	4.2.1.1-7
協調運動に対する作用		マウス NMRI	経口	30,100mg/kg	雄/13	作用なし。	F■■052870083	4.2.1.3-1
ペンテタザール誘発痙攣に対する作用		マウス NMRI	経口	30,100mg/kg	雄/20	作用なし。	F■■052870083	4.2.1.3-1
ヘキソバルビタル誘発睡眠に対する作用		マウス NMRI	経口	30,100mg/kg	雄/10	作用なし。	F■■052870083	4.2.1.3-1
エタナル誘発睡眠に対する作用		マウス NMRI	経口	30,100mg/kg	雄/18	作用なし。	F■■052870083	4.2.1.3-1
体温に対する作用	単回単独	ラット Wistar	経口	400,600,800 mg/kg	雄/5 or 10	作用なし。	F■■071210639	4.2.3.7.7-5
	単回併用(レボト パ+カルビトパ)			400mg/kg	雄/10	体温低下。	F■■071210639	4.2.3.7.7-5
	反復			200mg/kg, bid, 7日間	雄/8	作用なし。	F■■071210639	4.2.3.7.7-5
アムフェタミン誘発常同行動に対する作用		ラット Wistar	経口	3,10,30mg/kg	雄/6 or 10	増強作用 (30mg/kg)。	F■■072870176	4.2.1.3-2

2.6.3.4 安全性薬理試験（続き）

試験の種類		動物種 系統/実験 材料	投与方法	投与量/ 適用濃度	性/ n	特記すべき所見	報告書番号	記載箇所 Vol. / section
鎮痛作用	Randall-Selitto 法	ラット/ Wistar	経口	10,30,100 mg/kg	雄/8 or 9	痛覚閾値上昇の傾向あり。	F072870150	4.2.1.2-5
	酢酸 writhing 法	マウス NMRI	経口	100mg/kg	雄/12	鎮痛効果の傾向あり。	F072870150	4.2.1.2-5
		マウス NMRI	静脈内	3,10,30mg/kg	雄/6	鎮痛効果（10mg/kg）。	F072870150	4.2.1.2-5
	ホットプレート法	マウス NMRI	経口	30,100mg/kg	雄/10	作用なし。	F072870150	4.2.1.2-5
ドパミン取込みに関する作用		ラット線条 体	<i>In vitro</i>	10,30,100μM	—	ドパミン取込み阻害作用あり（100μM）。	F052870087	4.2.1.3-3
線条体の水酸化ラジカル産生に関する作用		ラット Wistar	腹腔内	1,10mg/kg	雄/6	作用なし。	J Neural Transm,108,189 -204,2001	4.2.1.3-4
α ₂ 受容体サブタイプに対する親和性		ヒト受容体 発現細胞	<i>In vitro</i>	1nM~300μM	—	α _{2A} , α _{2B} , α _{2C} のKi値: >100μM	PT011210008	4.2.1.3-5
(2) 呼吸器系に及ぼす影響								
気管支に対する 作用	単独	モルモット Hartley	静脈内	0.2, 1, 5mg/kg	雄/5 or 6	作用なし。	F071210537	4.2.1.3-6
	ヒスタミン					作用なし。		
摘出気管に対す る作用	単独	モルモット Duha	<i>In vitro</i>	0.01~300μM	—	弛緩作用（EC ₅₀ :40μM）	F072870159	4.2.1.3-7
	イソプレナリン			0.1~50μM		弛緩反応の増強（1μM~）		
	サルブタモール			0.1~10μM		作用なし。		

2.6.3.4 安全性薬理試験（続き）

試験の種類		動物種 系統/実験 材料	投与方法	投与量/ 適用濃度	性/n	特記すべき所見	報告書番号	記載箇所 Vol. / section
(3) 心循環器系に及ぼす影響								
心循環器系に対する作用（麻酔ラット）	単独	ラット Wistar	静脈内	0.003~3mg/kg	雄/8	血圧, 心拍数, dp/dt, 心電図に作用なし。	F■■042870091	4.2.1.3-8
	モ/アミンとの相互作用	ラット Wistar	経口 (前処理)	30mg/kg	雄/6~8	カルア [®] レタリンの dp/dt 上昇抑制。チラミン, イソプロレタリン, アト [®] レタリン, ドパミンとの相互作用なし	F■■042870091	4.2.1.3-8
摘出大動脈に対する作用		モルモット Duha	<i>In vitro</i>	0.1~30μM	—	作用なし。	F■■072870100	4.2.1.3-9
(4) 平滑筋に及ぼす影響								
摘出回腸に対する作用	単独	モルモット Duha	<i>In vitro</i>	0.01~100μM	—	作用なし。	F■■072870159	4.2.1.3-7
	アセチルコリン					拮抗作用あり (100μM)。		
	ヒスタミン					作用なし。		
	セロトニン					作用なし。		
摘出門脈に対する作用		モルモット Duha	<i>In vitro</i>	0.1~30μM	—	作用なし。	F■■072870159	4.2.1.3-7
(5) 消化管に及ぼす影響								
腸管内輸送能に対する影響		ラット Wistar	経口	10,30,100mg/kg	雄/8	作用なし。	F■■072870080	4.2.1.3-10
胃液分泌に対する影響		ラット Wistar	経口	10,30,100mg/kg	雄/ 6~13	作用なし。	F■■052870151	4.2.1.2-4

2.6.3.4 安全性薬理試験（続き）

試験の種類	動物種 系統/実験 材料	投与方法	投与量/ 適用濃度	性/ n	特記すべき所見	報告書番号	記載箇所 Vol. / section
(6) 腎臓に及ぼす影響							
水・電解質に対する作用	ラット Wistar	経口	3,30,100mg/kg	雄/8	作用なし。	F072870148	4.2.1.3-11
腎臓の非タンパク性 SH 分子群 (NPSH) 含量に対する作用	ラット CrI:CD®	経口	400,600mg/kg, 14 日間	雄/5+ 雌/5	作用なし。	F091210528	4.2.1.3-12
(7) その他の作用							
肝臓 PST アイソエンザイム (PST-M, PST-P)に対する作用	ラット肝臓	In vitro	0.005-5mM	—	PST-M の IC ₅₀ 値: >500µM PST-P の IC ₅₀ 値: 227µM	F012870170	4.2.1.3-13

2.6.3.5 薬力学的薬物相互作用試験

試験の種類	動物種(性) /系統	投与量 (投与経路)	n	特記すべき所見	報告書番号	記載箇所 Vol. / section
(1) MAO-B 阻害剤との相互作用	ラット(雄)/ Wistar	10mg/kg (p.o.)	n=11-14	セレギリンのレボドパ/カルビドパに対する増強効果を増幅する。	F041210442	4.2.1.4-1