

コレアジン錠 12.5 mg
(テトラベナジン)

第2部 (モジュール2): CTD の概要 (サマリー)

2.6.1 緒 言

2.6.1 緒言

テトラベナジン (TBZ) は、スイス [redacted] 社により合成されたヘキサヒドロ-ジメトキシベンゾキノリジン誘導体であり、ハンチントン病に伴う舞踏運動に対する治療薬として期待される。化学構造式は下記の通りである。

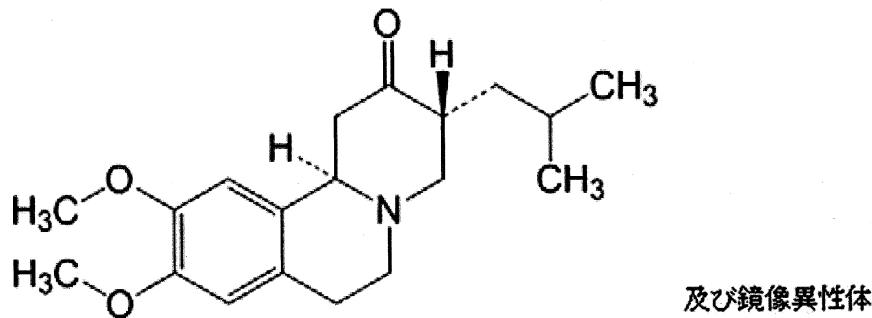


図 2.6.1-1. テトラベナジンの化学構造式

TBZ は、中枢神経の前シナプス小胞において、モノアミン小胞トランスポーター2 (VMAT2) を阻害することによりモノアミン類 (ドパミン、セロトニン、ノルアドレナリン等) のシナプス前小胞への輸送を阻害し、神経終末のモノアミンを可逆的に涸渇させる。モノアミンの中でも線条体ドパミンに対する涸渇作用が最も強い。また、脳に局在するヒトの VMAT2 に対する TBZ の取込み阻害作用の K_i 値は 97 nM であるのに対し、ヒト VMAT1 に対しては 20 μ M でも阻害作用を示さず、TBZ は VMAT2 に対し高い親和性を示す。TBZ は経口投与後、初回通過効果によってジヒドロテトラベナジン (HTBZ: α -HTBZ と β -HTBZ) に速やかに代謝されるが、この HTBZ もヒト VMAT2 に対して阻害作用を示し、その活性は TBZ に匹敵する。

ハンチントン病舞踏運動については、随意運動の制御に関与している大脳皮質-大脳基底核-視床から成る運動系ループ¹⁾において、ハンチントン病には抑制性に働く間接路の選択的神経変性により間接路からの出力が低下する。一方、興奮性に働く直接路の機能は維持されるため直接路優位となり、不随意運動症状が発現すると考えられている (図 2.6.1-1)²⁾。テトラベナジンの抗舞踏運動に関する作用機序は判明していないが、テトラベナジンは、黒質緻密部から線条体へ投射されるドパミン作動性ニューロンにおける VMAT2 阻害作用によって神経終末の神経伝達物質を涸渇させ、直接路を抑制することで、抗舞踏運動作用を発現すると推察される。

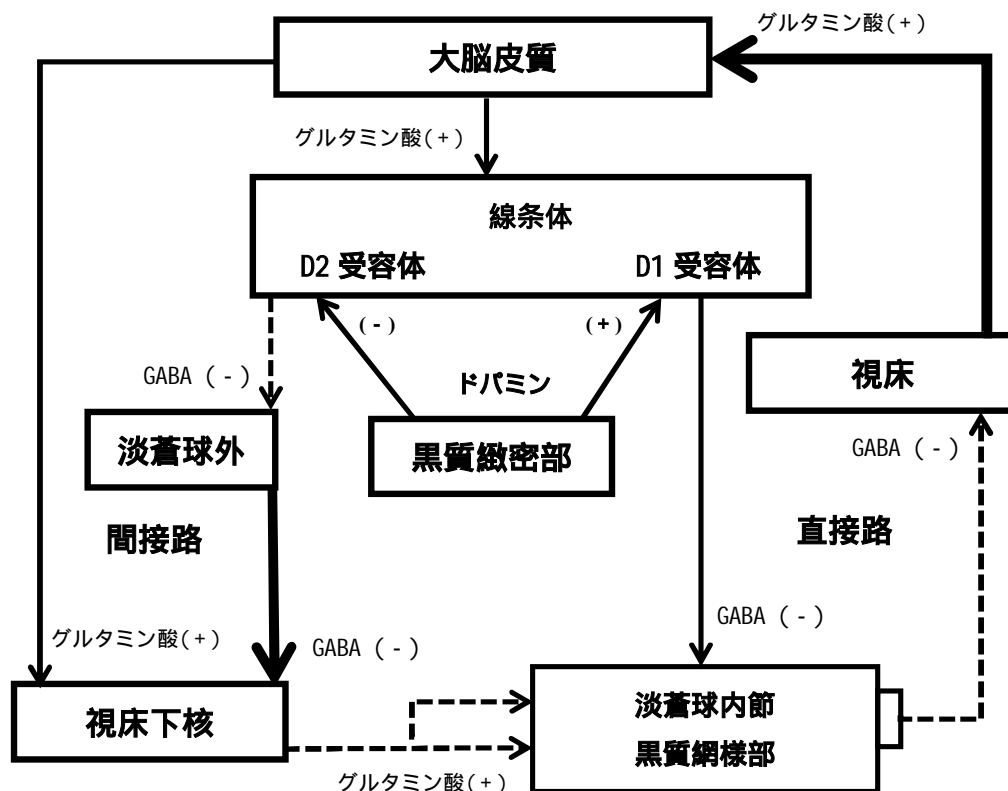


図 26.1-1 ハンチントン病の運動系モデル
 (資料番号：4.3.2)

: 神経伝達物質活性の減少
 : 神経伝達物質活性の増加

申請する効能・効果，用法・用量

【効能・効果】

ハンチントン病に伴う舞踏運動

【用法・用量】

通常，成人にはテトラベナジンとして1日量 12.5 mg (12.5 mg の1日1回投与) から経口投与を開始し，以後，症状に応じて1週毎に1日量 12.5 mg ずつ増量して維持量を定める。

ただし，1日最高量は 100 mg とする。なお，1日量が 25 mg の場合は1日2回，1日量が 37.5 mg 以上の場合には1日3回に分けて投与することとし，1回最高量は 37.5 mg とする。

参考文献

1. Parent A, Sato F, Wu Y, Gauthier J, Lévesque M, Parent M. Organization of the basal ganglia: the importance of axonal collateralization. *Trends Neurosci.* 2000;23:S20-7. [資料番号 : 4.3-1]
2. Poon LH, Kang GA, Lee AJ, Role of tetrabenazine for Huntington's disease-associated chorea. *Ann Pharmacother.* 2010; 44: 1080-9. [資料番号 : 4.3-2]

コレアジン錠 12.5 mg
(テトラベナジン)

第2部 (モジュール2) : CTD の概要 (サマリー)

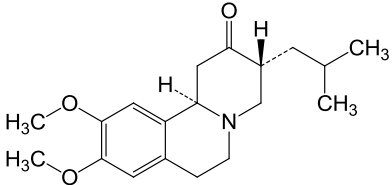
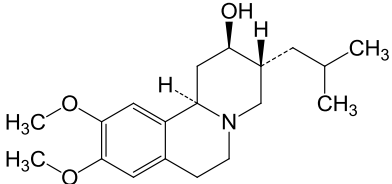
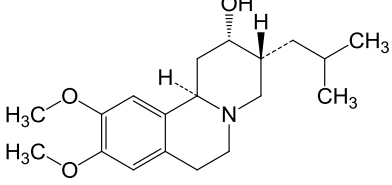
2.6.2 薬理試験の概要文

2.6.3 薬理試験概要表

目 次

2.6.2	薬理試験の概要文.....	7
2.6.2.1	まとめ.....	7
2.6.2.2	効力を裏付ける試験.....	12
2.6.2.2.1	薬効薬理試験.....	12
2.6.2.2.2	<i>In vitro</i> 作用機序試験.....	21
2.6.2.2.3	<i>In vivo</i> 作用機序試験.....	39
2.6.2.3	副次的薬理試験.....	42
2.6.2.4	安全性薬理試験.....	46
2.6.2.4.1	中枢神経系に及ぼす影響.....	46
2.6.2.4.2	心血管系に及ぼす影響.....	54
2.6.2.4.3	呼吸器系に及ぼす影響.....	57
2.6.2.5	薬力学的薬物相互作用試験.....	59
2.6.2.6	考察及び結論.....	68
2.6.2.7	図表.....	78
2.6.2.8	参考文献.....	79
2.6.3	薬理試験概要表.....	81
2.6.3.1	薬理試験：一覧表.....	81
2.6.3.1.1	効力を裏付ける試験.....	81
2.6.3.1.1.1	薬効薬理試験.....	81
2.6.3.1.1.2	<i>In vitro</i> 作用機序試験.....	81
2.6.3.1.1.3	<i>In vivo</i> 作用機序試験.....	82
2.6.3.1.2	副次的薬理試験.....	82
2.6.3.1.3	安全性薬理試験.....	83
2.6.3.1.4	薬力学的薬物相互作用試験.....	84
2.6.3.3	薬理試験：総括表.....	85
2.6.3.3.1	効力を裏付ける試験.....	85
2.6.3.3.1.1	薬効薬理試験.....	85
2.6.3.3.1.2	<i>In vitro</i> 作用機序試験.....	86
2.6.3.3.1.3	<i>In vivo</i> 作用機序試験.....	90
2.6.3.3.2	副次的薬理試験.....	91
2.6.3.3.3	安全性薬理試験.....	92
2.6.3.3.4	薬力学的薬物相互作用試験.....	95

[テトラベナジン] 及び関連物質の化学名, 構造式, 略称 (略号) 及び由来

化学名	構造式	略称 (略号)	由来
テトラベナジン 【化学名 : (3RS,11bRS)-9,10-Dimethoxy-3-(2- -methylpropyl)-3,4,6,7-tetrahydro-1 H-pyrido[2,1-a]isoquinolin-2(11bH)-one】	 及び鏡像異性体	TBZ	原薬
α -ジヒドロテトラベナジン	 及び鏡像異性体	α -HTBZ	代謝物
β -ジヒドロテトラベナジン	 及び鏡像異性体	β -HTBZ	代謝物

略語・略号一覧表

略語・略号	英語	日本語
Ad	adrenaline	アドレナリン
AMPA	alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl propionic acid	α -アミノ-3-ヒドロキシ-5-メチル-4-イソオキサザールプロピオン酸
ANOVA	analyses of variance	分散分析
AT	angiotensin	アンジオテンシン
ATP	adenosine triphosphate	アデノシン三リン酸
BAC	bacteria-artificial chromosome	大腸菌人工染色体
BACHD	bacterial artificial chromosome transgenic model of Huntington Disease	大腸菌人工染色体遺伝子導入ハンチントン病モデル
BK	bradykinin	ブラジキニン
B_{max}	maximum binding	最大結合密度
Bq	becquerel	ベクレル
ChAT	acetylcholine esterase	アセチルコリンエステラーゼ
C_i	Curie	キュリー
C_{max}	maximum concentration	最高血漿中濃度
D_1	dopamine D_1 receptor	ドパミン D_1 受容体
D_2	dopamine D_2 receptor	ドパミン D_2 受容体
DA	dopamine	ドパミン
DAT	dopamine transporter	ドパミントランスポーター
DOPAC	3,4-dihydroxyphenylacetic acid	ジドロキシフェニル酢酸
dP/dt_{max}	maximum dP/dt	左心室圧最大変化率
EC_{50}	50% effective concentration	50%有効濃度
ED_{50}	50% effective dose	50%有効用量
FST	forced swimming test	強制水泳試験
GABA	gamma-aminobutyric acid	γ アミノ酪酸
$GABA_A$	GABA-A receptor	γ アミノ酪酸 A 受容体
$GABA_B$	GABA-B receptor	γ アミノ酪酸 B 受容体
GAD	glutamic acid decarboxylase	グルタミン酸脱炭酸酵素
h	human	ヒト
H_1	histamine H_1 receptor	ヒスタミン H_1 受容体
H_2	histamine H_2 receptor	ヒスタミン H_2 受容体
H_3	histamine H_3 receptor	ヒスタミン H_3 受容体

略語・略号	英語	日本語
HA	histamine	ヒスタミン
HD	Huntington's disease	ハンチントン病
HEK	human embryonic kidney cell	ヒト胎児腎細胞
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid	ヘペス
hERG	human ether-a-go-go-related gene	カリウムイオンチャネル Kv11.1 ヒト遺伝子
HPLC/ECD	High performance liquid chromatography / electronical detection	高速液体クロマトグラフィー／電気化学検 出
5-HT	5-hydroxytryptamine (serotonin)	セロトニン
HTBZ	dihydratetabenazine	ジヒドロテトラベナジン
[³ H]-HTBZ	tritium-labeled dihydratetabenazine	[³ H]-標識ジヒドロテトラベナジン
α -HTBZ	alpha-dihydratetabenazine	α -ジヒドロテトラベナジン
β -HTBZ	beta-dihydratetabenazine	β -ジヒドロテトラベナジン
HVA	homovanillic acid	ホモバニリン酸
IC ₅₀	50% inhibitory concentration	50%阻害濃度
icv	intracerebroventricular administration	脳室内投与
IK _r	rapidly activating delayed rectifier K ⁺ current	急速活性化遅延整流 K 電流
K _d	binding dissociation constant	結合解離定数
K _i	inhibition constant	阻害定数
K _m	Michaelis constant	ミカエリス・メンテン定数
KO	knockout	ノックアウト
LTB ₄	leukotriene B ₄	ロイコトリエン B ₄
LTD	L-threo-dihydroxyphenylserine	L-スレオジヒドロキシフェニルセリン
LTD ₄	leukotriene D ₄	ロイコトリエン D ₄
L-threo-DOPS	L-threo-dihydroxyphenylserine	L-スレオジヒドロキシフェニルセリン
MAO	monoamine oxidase	モノアミン酸化酵素
METH	methamphetamine	メタンフェタミン
MPP ⁺	1-methyl-4-phenylpyridinium	1-メチル-4-フェニルピリジニウム
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-methoxy- tyramine	3-メトキシチラミン
NA	noradrenaline	ノルアドレナリン
NET	Noradrenaline transporter	ノルアドレナリントランスポーター
NK	neurokinin	ニューロキニン
NMDA	N-methyl-D-aspartate	N-メチル-D-アスパラギン酸

略語・略号	英語	日本語
NOS	nitric oxide synthase	一酸化窒素合成酵素
6-OHDA	6-hydroxydopamine	6-ヒドロキシドパミン
PAF	platelet-activating factor	血小板活性化因子
PBS	phosphate-buffered saline	リン酸緩衝生理食塩液
PET	positron emission tomography	ポジトロン断層法
QT _c	corrected QT interval	補正した QT 間隔
r ²	coefficient of determination	決定係数
SD	standard deviation	標準偏差
SDS	sodium dodecyl sulfate	ドデシル硫酸ナトリウム
SE	standard error	標準誤差
SERT	serotonin transporter	セロトニントランスポーター
TBZ	tetrabenazine	テトラベナジン
TBZOH	dihydratetrabenazine	ジヒドロテトラベナジン, HTBZ と同じ
TRH	thyrotropin-releasing hormone	サイトロロピン遊離ホルモン
VIP	vasoactive intestinal peptide	血管作動性小腸ペプチド
VMAT	vesicular monoamine transporter	モノアミン小胞トランスポーター
V _{max}	maximum velocity	最大反応速度
YAC	yeast artificial chromosome	酵母人工染色体
WT	wild type	野生型

2.6.2 薬理試験の概要文

2.6.2.1 まとめ

1) 効力を裏付ける試験

(1) 薬効薬理試験 (資料番号 : 4.2.1.1.1-1 [参考資料] ~-4 [参考資料])

a) モノアミン溜渇作用

テトラベナジン (以下, TBZ) 2 mg/kg (投与量はフリー体に換算) の皮下投与によりラット脳内 (視床下部, 前頭皮質, 線条体) のモノアミン (DA, NA, 5-HT) 量は速やかに減少し, 投与後 15 分ではほぼ最大効果に達した後, その効果は 2 時間に亘って持続した. TBZ のモノアミン溜渇作用は DA に選択的であり, 線条体や視床下部 DA 量は, 対照に比べて 70~75% の低下を示し, かつ用量反応性においても, 対照に比べ 50% の低下を示す用量は, DA が最も低かった. 一方, 視床下部 NA の溜渇作用は最も弱く, 最大で 25% の低下を示したのみであった.

b) 長期投与によるモノアミン溜渇作用への影響

TBZ を 12 ヶ月間飲水投与 (平均用量 6.0~6.7 mg/kg) したラットの線条体 DA 及び HVA 量は, 対照動物に比べ 12 ヶ月間を通して有意に低く, レセルピンとは異なり, 耐薬性が生じ難いことが示唆された.

c) ハンチントン病モデルマウス (BACHD マウス) の常同行動に対する作用

2 ヶ月齢の BACHD マウスに TBZ 2.5 mg/kg を皮下投与すると, WT マウスに比べ高い常同行動スコアが, 投与 40 分後に有意な低下を示した. WT マウスでは有意な影響は認められなかった.

d) ハンチントン病モデルマウス (YAC128 マウス) における運動機能改善作用

加速 Rotarod 試験及び Beam-walking 試験では, 早期投与 (2 ヶ月齢から経口投与) 群では 6 ヶ月齢以降, 後期投与 (6 ヶ月齢から投与) 群では 9 ヶ月齢以降, 対照 YAC マウスに比べて運動障害の改善作用が認められた.

(2) *In vitro* 作用機序試験 (資料番号 : 4.2.1.1.2-1 [参考資料] ~-11 [参考資料])

a) シナプス小胞画分へのモノアミン取り込み阻害作用

マウス脳シナプス小胞画分を用いた [³H]-HTBZ の B_{max} 値及び 5-HT 取り込みの V_{max} 値は線条体で最も高く, 線条体で VMAT2 の分布量が多いことが示唆された. また K_m 値は 0.60~1.10 μM であった. HTBZ の 5-HT 取り込み阻害作用の IC₅₀ 値は脳内各部位で, 2.2~3.0 nM の範囲であった.

b) クロム親和性顆粒細胞膜における HTBZ の作用

ウシ精製クロム親和性顆粒細胞膜を用いた試験で, [³H]-HTBZ の K_d 値は 3.1±0.4 nM であり, B_{max} 値は 62±8 pmol/mg protein であった. また, [³H]-HTBZ 結合部位占有率と ATP 依存性 [³H]-NA

取り込み阻害作用との間に相関関係が認められた。さらに、モノアミン取り込み阻害薬による [³H]-HTBZ とクロム親和性顆粒細胞膜の結合阻害作用から、以下の EC₅₀ 値 (nM) が算出された (TBZ : 1.8~3.0, HTBZ [ラセミ体] : 4.1, α-HTBZ : 6.0, β-HTBZ : 20, レセルピン : 238~300, ハロペリドール : 1071, クロルプロマジン : 1890, 5-HT : 345×10³, NA : 1720×10³)。

c) ヒト VMAT2 に対するテトラベナジンの特異性

[³H]-HTBZ は、ヒト VMAT2 発現細胞において結合能が認められたが、ヒト VMAT1 発現細胞では認められなかった。また TBZ は、ヒト VMAT2 発現細胞における [³H]-5-HT 取り込みに対して阻害作用を示すが、ヒト VMAT1 発現細胞では阻害作用は認められず、ヒト VMAT1 に比べ、ヒト VMAT2 でより高い親和性を示した。モノアミンに対する親和性は 5-HT>DA>Ad>NA>HA の順であった。

d) テトラベナジン, α-ジヒドロテトラベナジン, β-ジヒドロテトラベナジンの各種受容体/トランスポーター等に対する選択性

それぞれ特異的な標識リガンドを用いて、TBZ, α-及びβ-HTBZ の神経伝達物質受容体/トランスポーター, ステロイド, イオンチャネル, セカンドメッセンジャー, プロスタグランジン類, 成長因子/ホルモン, 脳内/消化管内ペプチド等のターゲット分子に対する結合の阻害作用を検討し、β-HTBZ にシグマ受容体 (非特異的) に対する弱い結合阻害作用が認められたが、TBZ, α-及びβ-HTBZ は、阻害作用を示さなかった。

e) マウス脳における HTBZ 特異的結合の分布

マウス脳における [³H]-HTBZ 結合の B_{max} (fmol/mg protein) は、線条体 : 1330, 視床 : 130, 視床下部 : 355, 中脳 : 235, 橋-延髄 : 164, 海馬 : 120, 前頭皮質 : 97, 小脳 : 46 であった。

f) ラット線条体における HTBZ 及びスルピリド特異的結合の分布

ラット線条体における [³H]-HTBZ 結合の B_{max} (fmol/mg protein) は、内側部 : 620±22, 外側部 : 716±24, 背内側部 : 774±25 であり、一方、[¹²⁵I]-ヨードスルピリド結合の B_{max} は、内側部 : 17.34±0.60, 外側部 : 24.93±0.96 であった。

g) ヒト死後脳における HTBZ 特異的結合の分布

ヒト死後脳における [³H]-HTBZ の脳部特異的結合分布は、黒質緻密部, 青斑核, 背側縫線核で高く、腹側被蓋野では中等度, 黒質網様体や A8 では低かった。

h) ドパミン D₂ 受容体への作用

ラット及びブタ脳試料で, [³H]-スピペロンの DA 受容体に対する結合に対する TBZ の阻害作用を検討した結果, K_i は線条体で 5.20±0.80 μM, 脳下垂体前葉で 3.20±0.50 μM であり, 弱い結合阻害作用が示唆された.

i) ハンチントン病モデルマウスのシナプス伝達に対するテトラベナジンの作用

HD モデルマウスにおいて線条体の出力バランスは直接路優位であり, TBZ はシナプス前終末の DA 潤滑作用により D₁ 受容体発現細胞の活動活性を低下させた.

(3) *In vivo* 作用機序試験 (資料番号 : 4.2.1.1.3-1 [参考資料] ~-2 [参考資料])

標識リガンドを用いた脳組織内分布の検討

a) マウスにおける試験

[¹¹C]-TBZ を静脈内投与し, マウス脳内における [¹¹C]-TBZ の薬物動態を検討した結果, 脳内への移行性は速やかで, 投与 2 分後には投与量の 3.2% が移行し, また消失も速やかで, 60 分後の残存量は投与量の 0.21% であった. 投与 10 分後の脳内分布量は線条体, 視床下部, 視床, 海馬, 橋-延髄, 皮質, 小脳の順であった. また, [¹¹C]-TBZ 結合は, 非標識の TBZ で阻害されたが, 選択的 DAT 阻害薬では阻害されなかった.

b) サルにおける試験

サルにおける静脈内投与後の PET 測定でも, [¹¹C]-TBZ は急速な脳内への移行と消失が認められ, 投与 5 分後に脳内濃度は最高となった. 線条体では投与 10 分後に最高濃度に達し, [¹¹C]-TBZ の消失が最も遅かった. [¹¹C]-TBZ 結合は非標識 TBZ で阻害された.

2) 副次的薬理試験 (4.2.1.2-1 [参考資料] ~-3 [参考資料])

副次的薬理試験として TBZ の神経保護作用について検討した.

(1) マウスにおける内因性 DA 誘発線条体ドパミンニューロン傷害に対する保護作用

TBZ はマロン酸二ナトリウム誘発性線条体 DA ニューロン傷害に対し, 神経保護作用を示した.

(2) マウスのパーキンソン病モデルにおける神経保護作用

a) 6-OHDA 誘発黒質線条体ドパミンニューロン傷害に対する作用

TBZ は神経保護作用を示さなかった.

b) MPTP 誘発黒質線条体ドパミンニューロン傷害に対する作用

TBZ は神経保護作用を示さなかった.

3) 安全性薬理試験 (資料番号 : 4.2.1.3-1 [参考資料] ~-14)

(1) 中枢神経系に及ぼす影響

TBZ (40 mg/kg, 皮下投与) はマウスにおいてエタノール及びヘキソバルビタールによる麻酔時間を顕著に延長させた。また, TBZ (40 mg/kg, 腹腔内投与) は, 3.3°Cの体温下降を誘発したが, LTD (200~800 mg/kg, 腹腔内投与) 併用により体温低下作用は用量依存的に抑制 (4 時間持続) された。TBZ の体温下降作用は NA の脳室内投与でも抑制された。さらに, TBZ と LTD を併用することにより, TBZ の脳内 NA 量低下作用が LTD により有意に抑制されることから, TBZ の体温低下作用は脳内 NA の含量低下が関与することが示唆された。

TBZ (40 mg/kg) は, ウサギの自発脳波を徐波化し, 睡眠脳波を誘発した。また, TBZ はラットにおいて 2 mg/kg (腹腔内投与) で脳内自己刺激性報酬効果に対して, 2 及び 4 mg/kg (投与量はフリー体に換算) の腹腔内投与で自然報酬効果に対してそれぞれ抑制作用を示し, TBZ は依存性を示さない可能性が示唆された。

TBZ 投与後のマウス, ラット, ウサギ, イヌ, ネコ, サルにおける一般症状の観察 1) 行動的側面 (運動性, 気分, 認知力), 2) 神経学的側面 (中枢興奮, 反射, 筋緊張), 3) 自律神経系側面 (分泌微候) では, 薬理作用により中枢神経系に及ぼす作用が認められたが, その作用発現用量は薬効量と比較すると高用量であり, またモノアミン涸渇作用に起因する作用以外に非特異的な作用は認められなかった。

(2) 心血管系に及ぼす影響

hERG 試験における TBZ, α -HTBZ 及び β -HTBZ の IC₅₀ 値はそれぞれ 79.1 μ M, 12.0 μ M 及び 6.4 μ M であり, ヒトに 50 mg の TBZ を投与した場合の遊離型 TBZ, α -HTBZ 及び β -HTBZ の C_{max} 値 (血漿タンパク結合率で補正した値) より 100 倍以上高値であった。

また, TBZ (高用量の 20 mg/kg, 経口投与) はイヌの dP/dt_{max} を有意に増加させたが, この作用は頻脈に起因すると推察された。この作用以外に本薬による心血管系への有意な作用は認められなかった。また, 心電図パラメータに関しても, 心拍数増加による RR 間隔の変化以外に著しい変化はなく, QT_c にも影響を及ぼさなかった。

(3) 呼吸器系に及ぼす影響

TBZ (15, 30 mg/kg, 経口投与) はラットの 1 回換気量を有意に増加させたが, 呼吸数と分時換気量に対しては有意な影響を及ぼさなかった。

4) 薬力学的薬物相互作用試験 (資料番号 : 4.2.1.4-1 [参考資料] ~-6 [参考資料])

(1) リチウムとの相互作用

TBZ (5 mg/kg, 皮下投与) 誘発マウス自発運動量低下に対して, 塩化リチウム 200 mg/kg 反復皮下投与により, 運動量回復作用が認められた。

(2) メタンフェタミンとの相互作用

小胞内 DA の局在を変化させる METH 投与 (2 時間間隔で 10 mg/kg を 4 回皮下投与) により, ラット線条体シナプスの DA 取り込みは, *ex vivo* の測定により投与 1 時間後で 65% 低下し, この作用は 24 時間後も持続していた. [³H]-HTBZ 結合も DA 取り込みと同様の低下を示した. TBZ (1, 2, 4 mg/kg) と METH (2 mg/kg) の併用 (共に皮下投与) によるマウス自発運動への影響を検討したところ, 1) TBZ を前投与した場合は, METH による自発運動量増加作用は TBZ の用量に依存して低下した. 2) 両薬物を同時投与した場合は, METH 単独投与の場合に比べ自発運動量は増加したが, 明確な用量依存性は認められなかった. 3) METH による自発運動量増加作用消失後に投与した場合には, 用量依存的な自発運動量増加作用を示した.

(3) MAO 阻害薬との相互作用

ラットに TBZ (3 mg/kg) と MAO 阻害薬クロルギリン (1, 3, 6 mg/kg) (各薬物の投与量はフリー体に換算) を併用投与した結果, TBZ 誘発モノアミン涸渇作用に対してクロルギリンは用量依存的に抑制し, 3 mg/kg 以上の用量では, 対照以上のモノアミン量増加が認められた. さらに, 6 mg/kg では, TBZ 20 mg/kg 誘発モノアミン涸渇作用も抑制した.

(4) 抗うつ薬との相互作用

ラットに選択的 NA 取り込み阻害作用を有するデシプラミン 15 mg/kg を腹腔内前投与することにより, テトラベナジン (3 mg/kg 皮下投与) (各薬物の投与量はフリー体に換算) による皮質 NA 涸渇作用は有意に抑制されたが, 線条体 DA 及び海馬 5-HT の涸渇作用に対しては有意な抑制は認められなかった.

テトラベナジン (5 mg/kg, 皮下投与) 誘発眼瞼下垂に対して, 抗うつ薬は, ほぼ用量依存的な拮抗作用を示し, ED₅₀ 値 (mg/kg) はイミプラミンが 2.7, アミトリプチリンが 26.0, パロキセチンが 34.5 であった.

2.6.2.2 効力を裏付ける試験

2.6.2.2.1 薬効薬理試験

1) モノアミン涸渇作用 (公表論文, 資料番号: 4.2.1.1.1-1 [参考資料])

テトラベナジンのモノアミン涸渇作用における経時変化を検討するため, テトラベナジン (メタンスルホン酸塩, 用量はフリー体に換算して表示) 2 mg/kg を SD 系ラット (雄, 体重 150~200 g) に皮下投与した後 15, 30, 60, 90, 120 分に屠殺して, 脳内のモノアミン量を HPLC/ECD 法により測定した. 対照ラットには溶媒 (水) を皮下投与した後, 視床下部の NA 量, DA 量, 5-HT 量, 前頭皮質の NA 量, 5-HT 量, 線条体の DA 量, 5-HT 量を測定した.

テトラベナジンの投与により, 脳内各部位のモノアミン量は対照に比べ著明に減少し, その効果は投与後 15 分でほぼ最大となり, 2 時間に亘って持続した (図 2.6.2.2.1-1). それぞれの脳部位における対照のモノアミン量 (pmol/mg 組織) は, 視床下部 NA 8.1±0.4, DA 2.6±0.2, 5-HT 3.9±0.3, 前頭皮質 NA 1.00±0.10, 5-HT 0.98±0.06, 線条体 DA 69.0±4.8, 5-HT 2.2±0.2 であった.

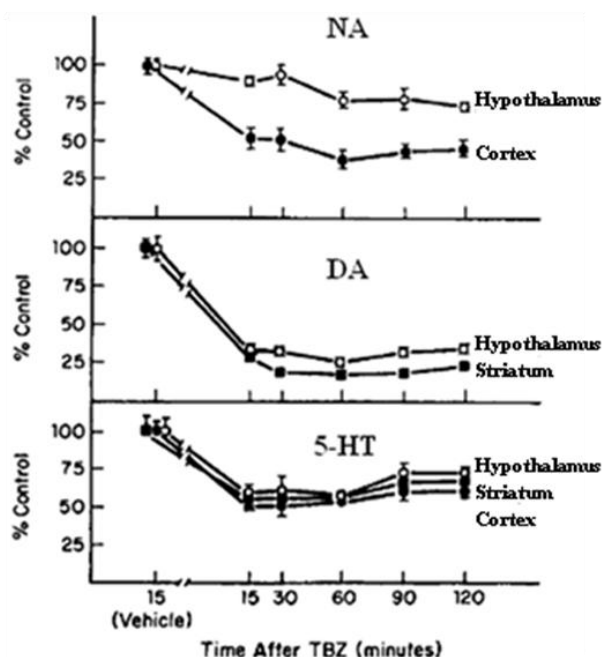


図 2.6.2.2.1-1 テトラベナジン (2 mg/kg, 皮下) 投与後の脳内各部位のモノアミン量の変化

(資料番号 4.2.1.1.1-1 [参考資料] の図 1 を改変)

雄性成熟 SD 系ラットに, テトラベナジン (2 mg/kg) 又は溶媒を皮下投与した後, 図中に示された各時間に屠殺して脳内モノアミン量 (視床下部 NA 量, DA 量, 5-HT 量, 前頭皮質 NA 量, 5-HT 量, 線条体 DA 量, 5-HT 量) を HPLC/ECD 法で測定した. 図中の数値は, 対応する対照群の値に対する% (平均値±SE) を表す.

テトラベナジンのモノアミン (NA, DA, 5-HT) 涸渇作用は DA に選択性が最も高く, 線条体や視床下部における DA 濃度は, 投与後 15 分から, 対照に比べて 70~75% の低下を示した (図 2.6.2.2.1-1). また, テトラベナジンは皮質の NA 量, 及び皮質, 線条体, 視床下部における 5-HT

量に対しても潤渇作用を示したが、視床下部の NA 量に対してはテトラベナジンの作用は弱く、対照に比べ 25% を超える低下を示すことはなかった (図 2.6.2.2.1-1)。

また、テトラベナジンのモノアミン潤渇作用における用量反応性を検討するため、ラットにテトラベナジン (メタンスルホン酸塩、用量は塩基ベースに換算して表示) 0.5, 1, 2, 5, 10 mg/kg を皮下投与し、その 45 分後に屠殺して視床下部の NA 量, DA 量, 5-HT 量, 前頭皮質の NA 量, 5-HT 量, 線条体の DA 量, 5-HT 量を HPLC/ECD 法で測定した。対照ラットには溶媒 (水) を皮下投与した後、同様に脳内モノアミン量の測定を行った。

上記試験と同様、テトラベナジンの作用は DA に対する選択性が最も高く、0.5 mg/kg でも DA 量は 50% 以上の低下が認められた。テトラベナジンは皮質の NA 量、及び皮質、線条体、視床下部の 5-HT 量に対し類似した潤渇作用を示したが、視床下部の NA 量はテトラベナジンの潤渇作用に対する選択性が低く、試験に用いた最高用量 (10 mg/kg) でも、対照の約 30~35% の低下を示しただけであった (図 2.6.2.2.1-2)。それぞれの脳部位における対照動物のモノアミン量

(pmol/mg 組織) は、視床下部 NA 8.7 ± 0.3 , DA 2.6 ± 0.2 , 5-HT 4.8 ± 0.3 , 前頭皮質 NA 1.13 ± 0.04 , 5-HT 1.16 ± 0.07 であった。

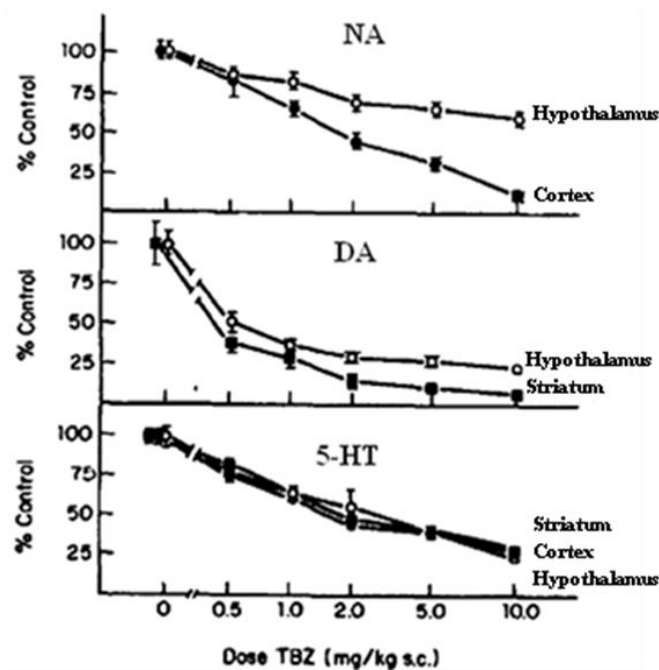


図 2.6.2.2.1-2 テトラベナジンの投与量と脳内各部位のモノアミン量の変化

(資料番号 4.2.1.1.1-1 [参考資料] の図 2 を改変)

雄性成熟 SD 系ラットに、テトラベナジン 0.5, 1, 2, 5, 10 mg/kg 又は溶媒を皮下投与した後 45 分に屠殺して脳内モノアミン量 (視床下部 NA 量, DA 量, 5-HT 量, 前頭皮質 NA 量, 5-HT 量, 線条体 DA 量, 5-HT 量) を HPLC/ECD 法で測定した。図中の数値は、対応する対照群の値に対する % (平均値 \pm SE) を表す。

2) 線条体ドパミン及びホモバニリン酸含量に及ぼすテトラベナジン 12 ヶ月投与の影響 (公表論文, 資料番号: 4.2.1.1.1-2 [参考資料])

テトラベナジンの長期投与によるモノアミン涸渇作用に対する影響を検討するため, 12 ヶ月間飲水投与による線条体内 DA 及びホモバニリン酸 (HVA) 量を測定した. 対照としてレセルピン投与群を置いた. 試験には Wistar 系ラット (雄, 試験開始時体重 218 ± 4 g) を用いた. 薬物は酢酸 (100) に溶解し, 蒸留水で保存液 (投与に使用する薬液の 20 倍の濃度の溶液) を調製した. 保存液の pH は水酸化ナトリウム溶液で約 5 に調整した. 保存液を蒸留水で所定濃度に希釈し, これを飲水として与えた. 1~2 日ごとに薬液 (飲水) を交換し, 最大 12 ヶ月間の投与を行った. 対照動物には蒸留水を飲水として与えた.

投与開始 1, 3, 6, 9, 12 ヶ月時にラットを屠殺後, 脳を取り出して両側線条体を摘出し凍結試料を作製した. 重量測定を行い 0.4 M 過塩素酸内でホモジナイズ後, 4°C で 2000 rpm, 20 分間遠心した. この上清をセファデックス G10 カラムにかけ, 線条体内 DA と HVA に分離して, 蛍光定量法で測定し, 対照動物と比較した. 測定結果は各処置群 (6~8 例) の平均値 \pm SE で表示した.

12 ヶ月間の飲水投与によるテトラベナジンの投与量は $6.0 \sim 6.7$ mg/kg/day であり, レセルピンの投与量は $0.28 \sim 0.30$ mg/kg/day であった. またテトラベナジン又はレセルピンを 12 ヶ月間投与したラットの平均体重はそれぞれ 689 ± 21 g 及び 699 ± 35 g であり, いずれも対照の 758 ± 25 g との間に有意差はなかった.

対照群のラット線条体 DA 及び HVA 含量は, 12 ヶ月間を通して変化はなかった (表 2.6.2.2.1-1). またテトラベナジンを飲水投与したラットの線条体 DA 及び HVA 含量は, 対照動物に比べ, 12 ヶ月間を通して低値を維持した. DA 含量はいずれの測定時点においても対照に比べ有意に低値を示し, 平均で $56.4 \pm 4.3\%$ 低下した (表 2.6.2.2.1-1). 一方, レセルピンを飲水投与したラットの DA 含量は投与 3 ヶ月目と 9 ヶ月目において対照に比べ有意な低値を示したが, その他の月では対照群との間に差はなく, テトラベナジンのように持続的な作用は求められず, 平均低下率も $23.0 \pm 7.6\%$ とテトラベナジンの半分以下であった (表 2.6.2.2.1-1).

このようにテトラベナジンの DA 涸渇作用はレセルピンとは異なり, 耐薬性が生じ難いことが示された.

表 2.6.2.2.1-1 線条体 DA 及び HVA 含量に及ぼすテトラベナジン 12 ヶ月投与の影響
(資料番号 4.2.1.1.1-2 [参考資料] の表 3 を改変)

測定項目	処置群	投与期間 (月)					平均値
		1	3	6	9	12	
DA 含量 a	対照	14.8±1.6	17.3±2.1	15.7±1.4	16.0±0.7	12.0±1.2	15.2±0.9
	TBZ	7.3±1.0* (51)	6.4±0.7* (63)	8.2±2.6* (48)	8.0±1.0* (50)	3.6±0.6* (70)	6.7±0.8# (56.4±4.3)
	レセルピン	12.4±1.3 (16)	8.3±1.1* (52)	13.7±1.7 (13)	12.1±0.9* (24)	10.8±0.4 (10)	11.5±0.9# (23.0±7.6)
HVA 含量 b	対照	1033±86	920±73	1020±97	992±125	1156±157	1024±38
	TBZ	205±41*	388±47*	810±166	163±14*	296±153*	372±116#

表中の数値はそれぞれの測定時期の動物 (6~8 例) の平均値±SE を表す。() 内の数値は DA 含量の低下率を示し、12 ヶ月間を通じた平均低下率は TBZ が 56.4±4.3 (%)、レセルピンが 23.0±7.6 (%) であった。

a : DA 含量の単位は µg/g (組織湿重量), b : HVA 含量の単位は ng/g (組織湿重量) である。

* : p<0.05 (対照群に対して, Student t 検定)

: p<0.05 (対照群に対して, 2 way 分散分析)

3) ハンチントン病モデルマウス (BACHD マウス) の常同行動に対するテトラベナジンの作用 (公表論文, 資料番号 : 4.2.1.1.1-3 [参考資料])

ハンチントン病におけるテトラベナジンの効力を検討するため、ヒトハンチンチン遺伝子の全配列を導入したトランスジェニックマウス (BACHD [bacterial artificial chromosome transgenic model of Huntington Disease] マウス, 雄, 2 ヶ月齢) を用いて検討を行った。このマウスは生後初期において、DA とグルタミン酸伝達の増加により運動亢進を示す。マウスの行動観察は、ビデオテープを用いて、午前 10 時から午後 1 時の間の明期に実施し、グルーミングやスニッフィングなどの反復性常同行動について検討した。スニッフィングは、マウスが感覚毛 (鼻毛) を動かしながら床の探索行動を行っている動作と定義し、グルーミングは、洗顔様行動と前肢をなめる行動と定義して、その時間を計測した。

BACHD マウス及び対照の WT マウスは、1 日 15 分間、5 日間連続してオープンフィールド装置の中に入れて活動量が安定するように馴化訓練を行い、3~5 日目の測定値を平均したものを投与前値とした。次に 6 及び 7 日目にテトラベナジン 2.5 mg/kg をマウスに皮下投与した後 40 分にオープンフィールド装置に入れて測定を行った。この 6, 7 日目の値を平均してテトラベナジンの作用とし、投与前値と比較した。

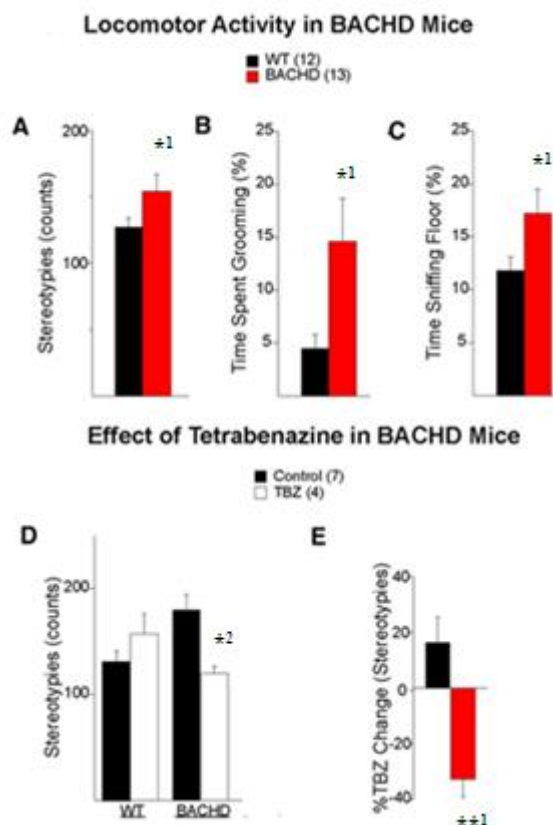


図 2.6.2.2.1-3 BACHD マウスの常同行動に対するテトラベナジンの作用

(資料番号 4.2.1.1.1-3 [参考資料] の図 8 を改変)

2 ヶ月齢の BACHD マウスを用いて常同行動に対するテトラベナジン (2.5 mg/kg, 皮下投与) の作用を検討した。オープンフィールド装置に BACHD マウス及び WT マウス (対照) を入れ、15 分間常同行動のカウント (A) を測定した。また、ビデオカメラを利用して常同行動 (グルーミング及びスニッフィング) に費やす時間 (B 及び C) を測定した。さらに常同行動カウントに及ぼすテトラベナジンの作用 (D 及び E) を検討した。

*1 : $p < 0.05$, **1 : < 0.01 (t 検定, WT マウスとの比較) . *2 : $p < 0.05$ (t 検定, TBZ 投与前後の比較)

2 ヶ月齢の BACHD マウスは WT マウスに比べて常同行動のカウントが有意に高く、グルーミングやスニッフィングに費やす時間も有意に増加していた。しかし、テトラベナジン 2.5 mg/kg を皮下投与すると、WT マウスでは常同行動スコアが増加する傾向が認められたが、BACHD マウスでは WT マウスに比べ高い常同行動スコアが有意に低下した。

4) ハンチントン病モデルマウス (YAC128 マウス) におけるテトラベナジンの運動機能改善作用 (公表論文, 資料番号 : 4.2.1.1.1-4 [参考資料])

酵母人工染色体 (YAC) を用いてヒトハンチンチン遺伝子の全配列を導入した YAC128 マウス (ヘテロタイプ, 雌, 試験開始時 2 ヶ月齢) を用いて、加齢に伴う YAC128 マウスの協調運動機能低下に対する、テトラベナジンの作用について、行動学的検討を行った。ワイルドタイプ (WT) マウスは、YAC128 マウスのバックグラウンドである FVBN/N 系マウスを用いた。

本試験の投与群構成を表 2.6.2.2.1-2 に示す。

表 2.6.2.2.1-2 YAC128 マウスにおけるテトラベナジンの運動機能改善作用群構成
(資料番号 4.2.1.1.1-4 [参考資料] の表 1 を改変)

群番号	投与群	動物数	遺伝子タイプ	1 回投与量 (容量 50 μ L, 週 3 回投与)	用量
1	YAC - Ctrl	15	YAC128	50 μ L PBS (2 ヶ月齢から投与開始)	(50 μ L PBS)
2	YAC - TBZ (Early)	15	YAC128	TBZ 0.125 mg (2 ヶ月齢から投与開始)	TBZ 5 mg/kg [※]
3	YAC - TBZ (Late)	15	YAC128	TBZ 0.125 mg (2-5 ヶ月齢までは PBS を, 6 ヶ月齢からは TBZ 投与)	TBZ 5 mg/kg [※]
4	WT - Ctrl	15	WT	50 μ L PBS (2 ヶ月齢から投与開始)	(50 μ L PBS)
5	WT - TBZ (Early)	15	WT	TBZ 0.125 mg (2 ヶ月齢から投与開始)	TBZ 5 mg/kg [※]
6	WT - TBZ (Late)	15	WT	TBZ 0.125 mg (2-5 ヶ月齢までは PBS を, 6 ヶ月齢からは TBZ 投与)	TBZ 5 mg/kg [※]

マウスが 2 ヶ月齢の時に、YAC128 マウス、WT マウスともそれぞれ 1 群 15 匹の 6 群に分け (総数 90 匹、全て雌)、投与を開始した。投与は週に 3 回、経口で実施した。早期処置群では 2 ヶ月齢から TBZ の投薬を始め、後期処置群では 2 ヶ月齢から 5 ヶ月齢までは 50 μ L の PBS を、6 ヶ月齢からは TBZ の投薬を始めた。対照群には 2 ヶ月齢から 50 μ L の PBS を週 3 回、経口投与した。YAC : YAC128, WT : Wild type, Ctrl : Control, Early : 早期処置群, Late : 後期処置群, ※ : 試験期間を通じたマウスの平均体重を 25 g と仮定した場合の用量。

テトラベナジンは 2% のコーンフラワーと混合し、テトラベナジン 0.125 mg を PBS 溶液 50 μ L を用いて 2.5 mg/mL の濃度に調製した後、50 μ L を週に 3 回経口投与した。YAC128 マウス、WT マウスの対照群は、試験期間 (2~12 ヶ月間) PBS 50 μ L を経口投与した。また、テトラベナジン早期処置群も 2~12 ヶ月間、テトラベナジン 0.125 mg の投与を週 3 回行った。テトラベナジン後期処置群は、2~5 ヶ月間は PBS 溶液 50 μ L を、6 ヶ月以降はテトラベナジン 0.125 mg の投与を週 3 回行った。また、12~13 ヶ月間は休薬期間とした。

マウスの協調運動能力は、2 ヶ月齢 (投与開始前)、6、9、11 ヶ月齢 (投与期間中)、13 ヶ月齢 (薬物 wash out 時) 時に、「加速 Rotarod 試験」及び「Beam-walking 試験」により検討した。

加速 Rotarod 試験は、Economex rotarod 装置を用いて実施した。それぞれの試験実施時期に、マウスを回転棒に乗せ、200 秒間に停止状態から 40 回/分まで加速させ、1 日 2 回、3 日間安定した基準値が得られるまで訓練を行った。本試験では、2 回の試行を行い、両試行における回転棒からの落下時間の平均値を統計解析に用いた。

Beam-walking 試験では、ビームを伝わって箱の中に入るよう訓練した後、本試験を行った。訓練時は、1 日目は 17 mm の円形ビーム、2 日目は 11 mm の円形ビーム、3 日目は 5 mm の正方形ビームを用い、安定した基準値が得られるようになった後に本試験に用いた。本試験は 11 mm の円形ビームと 5 mm の正方形ビームを用いて行った。各試験では 80 cm の長さのビームを渡るの

に必要とする時間 (latency) と、後肢がビームからスリップした (foot slips) 回数を評価した。各試験につき 2 回の試行を行い、その平均値を統計解析に用いた。

加速 Rotarod 試験の結果、2 ヶ月齢では WT と YAC128 マウスの間で有意差は認められなかった (図 2.6.2.2.1-4)。しかし 6, 9, 11, 13 ヶ月齢における YAC128 対照マウス (群番号 1) の回転棒からの落下時間は、WT 対照マウス (群番号 4) に比べて有意に短かった (図 2.6.2.2.1-4)。

回転棒からの落下時間は、テトラベナジンを 2 ヶ月齢から投与した早期処置 WT マウス (群番号 5) では、対照マウス (群番号 4) に比べ 6 ヶ月齢では差はなかったが、9, 11 ヶ月齢では有意に短く、またテトラベナジンを 6 ヶ月齢から投与した後期処置 WT マウス (群番号 6) でも、対照マウス (群番号 4) に比べ 11 ヶ月齢では有意に短かった。

一方、早期処置 YAC128 マウス (群番号 2) では、回転棒からの落下時間が対照 YAC128 マウス (群番号 1) に比べ、6, 9, 11, 13 ヶ月齢で有意に長く、また後期処置 YAC128 マウス (群番号 3) でも、YAC128 対照マウス (群番号 1) に比べ 9, 11, 13 ヶ月齢で有意に長かった (図 2.6.2.2.1-4)。

しかし、テトラベナジンを投与した両 YAC128 マウス群 (群番号 2 及び 3) は、WT マウス (群番号 4~6) に比べ、回転棒からの落下時間が有意に短かった (図 2.6.2.2.1-4)。

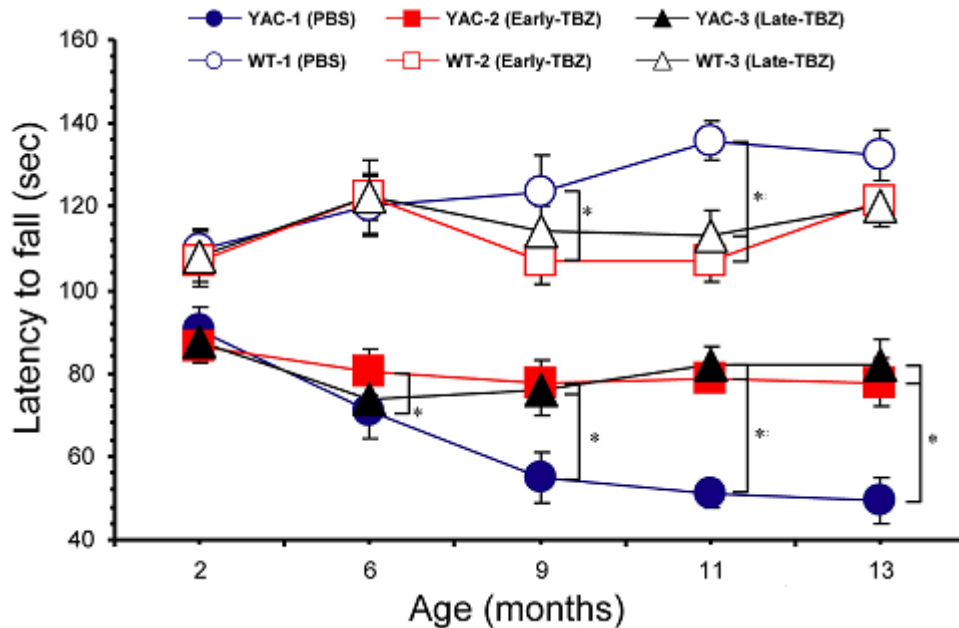


図 2.6.2.2.1-4 YAC128 マウスの加速 Rotarod 試験に対してテトラベナジンの早期又は後期処置が及ぼす影響

(資料番号 4.2.1.1.1-4 [参考資料] の図 1 を改変)

早期処置群では 2 ヶ月齢から 12 ヶ月齢にかけて、後期処置群では 6 ヶ月齢から 12 ヶ月齢にかけて、テトラベナジン (50 μ L の PBS に懸濁) を週に 3 回経口投与した。対照群には PBS を同容量 (50 μ L) 投与した。Rotarod 試験はマウスが 2, 6, 9, 11, 13 ヶ月齢時に実施した。Rotarod 試験評価の指標として加速する回転棒上にマウスが留まることが出来る時間を測定した。図中の数値は 1 群 15 匹の平均値 \pm SE を表す。試験結果の統計解析には SAS 9.13 を用い、分散分析により、遺伝子タイプ、薬物処置、マウスの月齢を要因として、必要に応じて 3 way, 2 way, 1 way 法を使い分けた。分散分析で有意な場合には Tukey 検定又は Student t 検定を用いて解析を行った。
*: $p < 0.05$.

Beam-walking 試験の結果、YAC128 対照マウス (群番号 1) では、WT 対照マウス (群番号 4) に比べ、加齢に伴う Beam-walking 能力の障害 (latency の遅延と foot slips 回数の増加) が進行した。また、YAC128 対照マウス (群番号 1) と WT 対照マウス (群番号 4) の間で、11 mm 円形ビームでは 9, 11, 13 ヶ月齢時 (図 2.6.2.2.1-5 A, B) に、5 mm 正方形ビームでは 6, 9, 11, 13 ヶ月齢時 (図 2.6.2.2.1-5 C, D) に、それぞれ有意差が認められた。

WT マウスでは、テトラベナジンを投与しても Beam-walking 試験で有意な影響は認められなかった (図 2.6.2.2.1-5 A~D)。しかし、YAC128 マウスにテトラベナジンを投与すると Beam-walking 能力の障害進行の抑制が認められ、有意な latency の短縮と foot slips 回数の減少が認められた (図 2.6.2.2.1-5 A~D)。YAC128 対照マウス (群番号 1) と早期テトラベナジン処置 YAC128 マウス (群番号 2) の両群の間で、11 mm 円形ビームでは 9, 11, 13 ヶ月齢 (図 2.6.2.2.1-5 A, B) で、5 mm 正方形ビームでは 6, 9, 11, 13 ヶ月齢 (図 2.6.2.2.1-5 C, D) でそれぞれ latency に有意差が認められた。後期テトラベナジン処置 YAC128 マウスの Beam-walking 遂行能力も、11 mm 円形ビーム (図

2.6.2.2.1-5 A, B) と 5 mm 正方形ビーム (図 2.6.2.2.1-5 C, D) の双方において 9, 11, 13 ヶ月齢で、有意な latency の短縮が認められた。

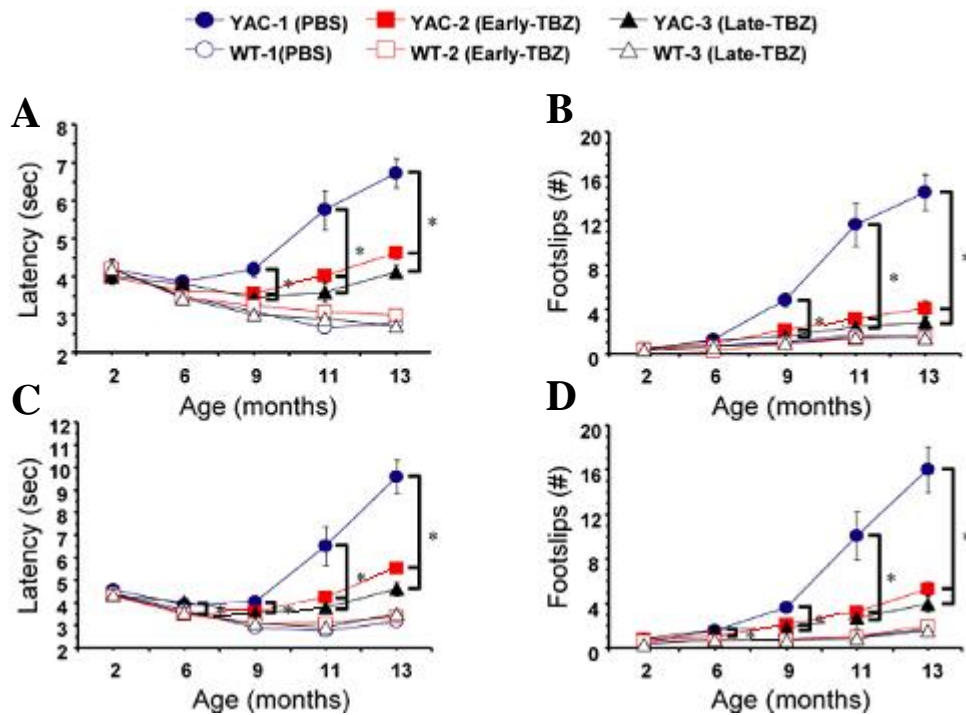


図 2.6.2.2.1-5 YAC128 マウスの Beam - walking 試験に対してテトラベナジンの早期又は後期処置が及ぼす影響

(資料番号 4.2.1.1.1-4 [参考資料] の図 2 を改変)

Beam-walking 試験はマウスが 2, 6, 9, 11, 13 ヶ月齢時に実施した。Beam-walking 試験では 2 種類のビーム (11 mm 円形ビーム, [図中の A, B] と 5 mm の正方形ビーム, [図中の C, D]) を用い、運動能力遂行の指標として、ビームを横切る平均所要時間 (latency, [図中の A, C]) とビーム上で足を滑らす回数 (foot slips, [図中の B, D]) を測定した。図中の数値は 1 群 15 匹の平均値 ± SE で示した。*: p < 0.05。薬物投与群の詳細や試験結果解析方法については図 2.6.2.2.1-4 を参照。

Beam-walking 試験において、数匹の老齢マウスが、胸部と腹部をビームの表面に長時間接触させ、前肢を使いビームに沿って、体を引きずるようにゆっくり移動する動き (腹這い行動) を示した。YAC128 対照マウス (群番号 1) の内 3 匹が 11 及び 13 ヶ月齢時に、11 mm 円形、5 mm 正方形ビーム試験で腹這い行動を示したが、WT マウス (群番号 4~6) やテトラベナジン投与 YAC128 マウス (群番号 5, 6) ではこのような動きは認められなかった。

これら行動学的解析から、テトラベナジンを早期 (2 ヶ月齢から) 又は後期 (6 ヶ月齢から) 投与することにより、YAC128 マウスの加齢による運動機能障害を有意に軽減することが示唆された。

2.6.2.2.2 *In vitro*作用機序試験

1) ジヒドロテトラベナジンによるシナプス小胞画分へのモノアミン取り込み阻害作用（公表論文，資料番号：4.2.1.1.2-1 [参考資料]）

マウスシナプス小胞における，HTBZの親和性，結合量及びモノアミン取り込み阻害作用を検討した。試験にはOF1系マウス（雄，6週齢，体重30～35g）を使用した。マウスを屠殺後，脳を摘出し，小脳，橋-延髄，視床下部，海馬，線条体，前頭皮質の各部分に分離した。この分離した各部位を，4℃のシヨ糖0.3M，HEPES 20mMを含有するシヨ糖緩衝液（pH 7.5）内でホモジナイズした。このホモジネートを，細胞分画法により分画操作を行い，主として膜成分を含むシナプス小胞成分に富んだ画分（P3画分）を調製した。脳各部位由来のP3画分のタンパク濃度は，小脳が0.61，橋-延髄が1.30，前頭皮質が0.25，視床下部が0.33，海馬が1.40，線条体が0.56 mg/mLであった。

このP3画分を用いて ^3H -HTBZ結合，5-HT取り込み及びHTBZの取り込み阻害作用について検討した。 ^3H -HTBZ結合試験では，P3画分を種々の濃度の ^3H -HTBZを含むシヨ糖緩衝液（30℃）とインキュベーションし，結合したリガンド量をフィルターろ過と4℃の非標識テトラベナジンシヨ糖緩衝液（100 μM ）洗浄操作後，放射能活性から定量した。

^3H -5-HT取り込み作用は10分間30℃のシヨ糖緩衝液中で試験を実施し，氷冷したシヨ糖緩衝液で洗浄後定量した。またHTBZの取り込み阻害作用を検討する時には，P3画分とHTBZを30℃で2時間プレインキュベーションした後に ^3H -5-HT取り込み試験を行った。なお ^3H -5-HT取り込み試験の場合は，ATP 2.5 mMとMgSO₄ 1.25 mMを同時に添加して試験を実施した。また，HTBZ取り込み阻害試験では種々の濃度のHTBZと2時間インキュベーションした後に，ATP，MgSO₄及び5-HT 0.2 μM を添加した。

脳各部位（橋-延髄，視床下部，海馬及び線条体）由来P3画分における ^3H -HTBZ結合，5-HT取り込み作用，HTBZによる5-HT取り込み阻害作用の結果を表2.6.2.2.2-1に示す。

表 2.6.2.2.2-1 脳各部位由来 P3 画分における ^3H -HTBZ 結合，5-HT 取り込み，HTBZ の取り込み阻害作用（資料番号 4.2.1.1.2-1 [参考資料] の表 2 を改変）

脳部位		橋 - 延髄	視床下部	海馬	線条体
^3H -HTBZ 結合部位 B_{max} (pmol/mg protein)		0.85	1.93	0.39	7.42
5-HT 取り込み	V_{max} (pmol/min/mg protein)	7.0 \pm 1.2	13.5 \pm 2.1	3.2 \pm 0.3	73.5 \pm 4.7
	K_{m} (μM)	0.60 \pm 0.22	1.10 \pm 0.25	0.64 \pm 0.25	1.00 \pm 0.04
HTBZ の 5-HT 取り込み阻害作用 IC_{50} 値 (nM)		2.2	2.8	3.0	2.3

^3H -HTBZ 結合試験は P3 画分と種々の濃度の ^3H -HTBZ を非標識 HTBZ (2 μM) 存在下，又は非存在下でインキュベーションして実施した。 ^3H -HTBZ 結合量は，反応液中の ^3H -HTBZ 濃度と，遊離 ^3H -HTBZ 濃度の差から算出した。5-HT の特異的取り込み量は P3 画分をシヨ糖緩衝液で 2 倍希釈した中で測定した。 K_{m} 値は 4 回の試験の平均値 \pm SE を示す。

脳の各部位におけるシナプス小胞と $[^3\text{H}]$ -HTBZの結合親和性に差はなく ($K_d \sim 2.5 \text{ nM}$), ATP非依存性であった。また, TBZ及びHTBZの $[^3\text{H}]$ -HTBZ結合阻害作用の EC_{50} 値は, それぞれ2及び4 nMであったのに対し, 5-HT及びNAの $[^3\text{H}]$ -HTBZ結合阻害作用の EC_{50} 値はそれぞれ300及び1000 μM であった。 $[^3\text{H}]$ -HTBZ結合部位の B_{max} (pmol/mg protein)は線条体が最も高く, VMATの分布が多いことが示唆されるが, 線条体での K_m 値は $1.00 \pm 0.04 \mu\text{M}$ であり, HTBZの5-HT取り込み阻害作用の IC_{50} 値は2.3 nMであった(5-HT取り込み量 (pmol/min/mg protein)の対照値はそれぞれの脳部位の順に, 1.32, 2.10, 0.59及び10.40であった)。HTBZの5-HT取り込み阻害作用の IC_{50} 値は脳の各部位により2.2~3.0 nMの範囲であり, 脳の各部位における差は認められなかった。

2) 精製クロム親和性顆粒細胞膜におけるジヒドロテトラベナジンの結合特性 (公表論文, 資料番号: 4.2.1.1.2-2 [参考資料]; 公表論文, 資料番号: 4.2.1.1.2-3 [参考資料])

ウシ副腎髄質から精製したクロム親和性顆粒細胞膜を用いて, $[^3\text{H}]$ -標識したジヒドロテトラベナジンの親和性, 結合量及びモノアミン取り込み阻害作用を検討した。

(1) $[^3\text{H}]$ -ジヒドロテトラベナジン結合曲線と結合部位の特性

$[^3\text{H}]$ -ジヒドロテトラベナジン保存液 (80 μM)は100 mM塩酸溶液で作製し, 精製水で希釈した。クロム親和性顆粒細胞膜は, ショ糖密度勾配遠心法にて分画したクロム親和性顆粒細胞を, 浸透圧溶解後調整した。結合試験には遠心ろ過法を用いて, 細胞膜 (5~15 $\mu\text{g protein/mL}$)を, 0.3 M ショ糖/20 mM KOH HEPES 緩衝液 (pH 7.5)に溶解した種々の濃度の $[^3\text{H}]$ -ジヒドロテトラベナジンと25°Cでインキュベートした。

精製クロム親和性顆粒細胞膜に対する $[^3\text{H}]$ -ジヒドロテトラベナジンの結合は, 指数関数的に増加し, 約2時間で1 nMの結合で平衡に達した (図 2.6.2.2.2-1 A)。

$[^3\text{H}]$ -ジヒドロテトラベナジン濃度の増加に伴って得られる特異的結合をScatchard解析すると直線的なプロットが得られ (図 2.6.2.2.2-1 B), 単一の結合部位の存在が示唆された。6回の試験の平均値から, $K_d: 3.1 \pm 0.4 \text{ nM}$, $B_{\text{max}}: 62 \pm 8 \text{ pmol/mg protein}$ という値が求められた。

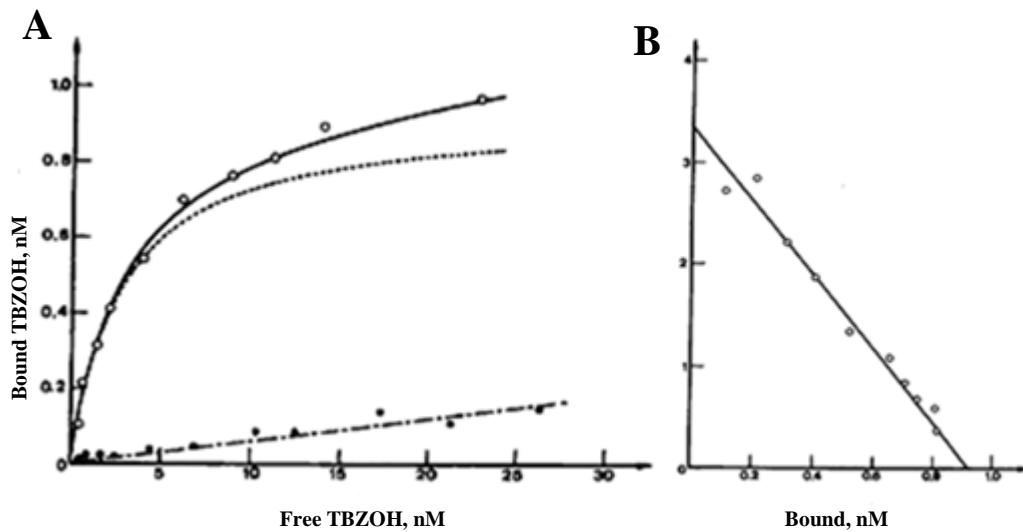


図 2.6.2.2.2-1 $[^3\text{H}]$ -ジヒドロテトラベナジンの精製クロム親和性顆粒細胞膜への結合
(資料番号 4.2.1.1.2-2 [参考資料] の図 1 を改変)

A.飽和曲線：細胞膜 (14 μg protein /mL) を $[^3\text{H}]$ -ジヒドロテトラベナジン (0.5~30 nM) と、10 μM のテトラベナジン非存在下 (○) 又は存在下 (●) で2時間、0.5 mL の最終容量でインキュベーションした。結合 $[^3\text{H}]$ -ジヒドロテトラベナジン量は0.1 mL のサンプルから、duplicate で測定した。図中のそれぞれの測定ポイントは4つの異なる試験の平均値を示す。非特異的結合 (●) の比例定数は、0.0060 であった。実線は総結合の、破線は特異的結合の理論曲線を示す。

B.特異結合の Scatchard プロット： Hill 係数は 1.0 であった。

(2) $[^3\text{H}]$ -ジヒドロテトラベナジン結合とカテコラミントランスポーターとの相互作用

$[^3\text{H}]$ -ジヒドロテトラベナジン結合部位は、主としてクロム親和性細胞とミトコンドリアからなる副腎髄質には認められたが、クロム親和性細胞のない皮質では認められなかった。また、副腎髄質をショ糖密度勾配により分画してさらに検討したところ、 $[^3\text{H}]$ -ジヒドロテトラベナジン結合部位は、クロム親和性細胞の指標である DA β -ヒドロキシラーゼの分布と一致し、ミトコンドリアのチトクローム C 酸化酵素の分布とは関連がなかったことから、 $[^3\text{H}]$ -ジヒドロテトラベナジン結合部位はクロム親和性細胞画分にあることが示唆された。

次にカテコラミンの輸送と $[^3\text{H}]$ -ジヒドロテトラベナジン結合部位との関連を検討したところ、結合部位の占有率とジヒドロテトラベナジンによる ATP 依存性 $[^3\text{H}]$ -標識ノルアドレナリン (以下、NA) 取り込み阻害作用との間に良好な相関関係が認められた (図 2.6.2.2.2-2)。また、 $[^3\text{H}]$ -ジヒドロテトラベナジンとクロム親和性細胞画分との結合に ATP 及び NA (5 μM) は影響せず、 K_d 及び B_{max} 値は、それぞれ 3.2 nM 及び 60 pmol/mg protein であった。

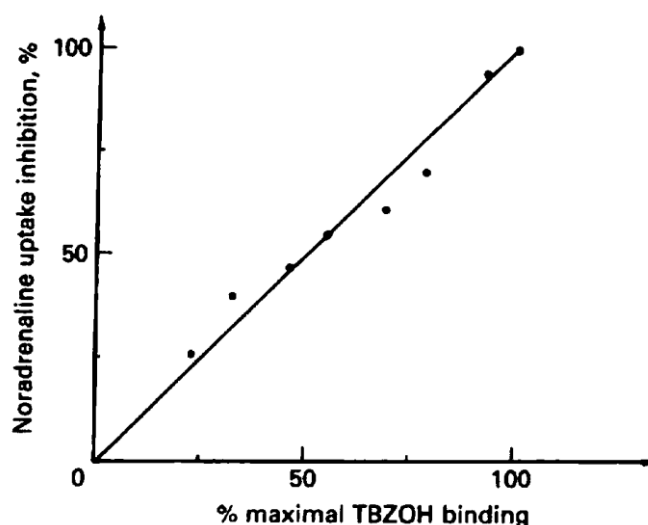


図 2.6.2.2.2-2 $[^3\text{H}]$ -ジヒドロテトラベナジン結合部位の占有率とノルアドレナリン取り込み阻害作用の相関関係

(資料番号 4.2.1.1.2-2 [参考資料] の図 4 を改変)

調製した細胞膜 (11 $\mu\text{g protein/mL}$) を 20 $^{\circ}\text{C}$ で 2 時間, 結合試験の場合は 5 μM の NA と種々の濃度の $[^3\text{H}]$ -ジヒドロテトラベナジン (1, 2, 3, 5, 8, 15, 30, 60 nM) を, 取り込み試験の場合は同濃度の $[^3\text{H}]$ -NA とジヒドロテトラベナジンをそれぞれインキュベーションした. 次に ATP 2.5 mM と MgSO_4 1.25 mM を添加した. $[^3\text{H}]$ -ジヒドロテトラベナジン結合値 (4 回の実験の平均値) は 30 分のインキュベーションを行い算出した. 試験結果は結合部位に対する百分率 (占有率) で表示した. $[^3\text{H}]$ -NA 取り込み率 (2 回の測定の平均値) はインキュベーション 0, 15, 30 分後の取り込み量から計算し, ジヒドロテトラベナジンが存在しない時の比率 (94 pmol/min per mg protein) に対する百分率で表示した.

ジヒドロテトラベナジンが細胞膜の結合部位に対して, $[^3\text{H}]$ -標識体と同等の親和性を示す (図 2.6.2.2.2-3) ことから, $[^3\text{H}]$ -ジヒドロテトラベナジン結合はカテコラミントランスポーター上に存在することが示唆された.

(3) $[^3\text{H}]$ -ジヒドロテトラベナジン結合部位の薬理学的特性

$[^3\text{H}]$ -ジヒドロテトラベナジン結合部位の薬理学的特性を検討するために, トランスポーターを介してモノアミン取り込みを阻害する薬物や基質 (NA 又は 5-HT) と共にインキュベーションして, $[^3\text{H}]$ -ジヒドロテトラベナジン結合の変化を検討した.

細胞膜 (7 $\mu\text{g protein/mL}$: 0.45 nM の $[^3\text{H}]$ -ジヒドロテトラベナジン結合部位を含む) を 60 分間, $[^3\text{H}]$ -ジヒドロテトラベナジン 1 nM 及び種々の濃度のモノアミン取り込み阻害薬や基質と共にインキュベーションした. 基質とインキュベーションする時には ATP 2.5 mM と MgSO_4 1.25 mM を添加した. 結合量は, ろ過法により duplicate で算出した.

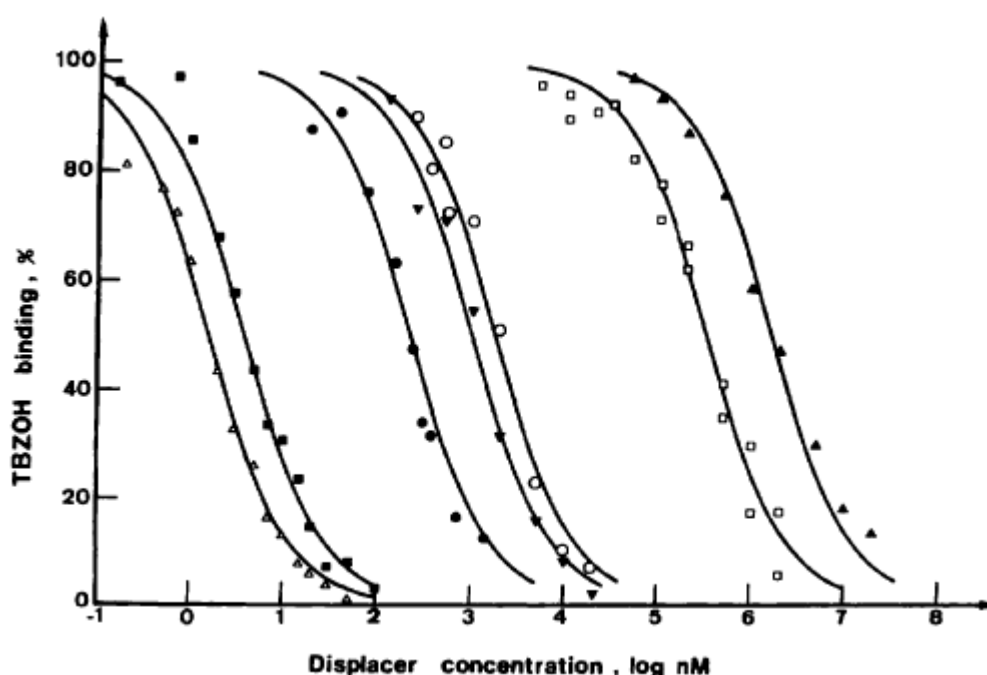


図 2.6.2.2.2-3 モノアミン取り込み阻害薬による $[^3\text{H}]$ -ジヒドロテトラベナジン結合の置換作用
(資料番号 4.2.1.1.2-2 [参考資料] の図 5 を改変)

調製した細胞膜 (7 μg protein /mL) と 60 分間, $[^3\text{H}]$ -ジヒドロテトラベナジン 1 nM 及び種々の濃度のモノアミン取り込みに影響を及ぼす薬物 (Δ : テトラベナジン, \blacksquare : ジヒドロテトラベナジン, \bullet : レセルピン, \blacktriangledown : ハロペリドール, \circ : クロルプロマジン, \square : 5-HT, \blacktriangle : NA) とインキュベーションした (5-HT や NA とインキュベーションする時には ATP 2.5 mM, MgSO_4 1.25 mM を添加した). 結合リガンド量は duplicate で求めた. 最大結合は 0.13 nM であった. 非特異的結合は, 遊離 $[^3\text{H}]$ -ジヒドロテトラベナジン量の変化 (0.8~1.0 nM) が少なかったため一定であったが, この分を差し引いて算出した. 図中の実線は試験で求めた値から算出した理論置換曲線 (Hill 係数: 1.0) である.

$[^3\text{H}]$ -ジヒドロテトラベナジン結合は, トランスポーターを介してモノアミン取り込みを阻害する薬物によって阻害された (図 2.6.2.2.2-3). 図中に実線で示された理論置換曲線 (Hill 係数: 1.0) から各薬物のリガンド結合作用の EC_{50} 値 (nM) と $[^3\text{H}]$ -ジヒドロテトラベナジン結合部位に対する解離定数 K_d (nM) を算出し, さらに同じ膜標本で ATP 依存性 NA 取り込みに対する阻害作用の IC_{50} 値 (nM) を求めた (表 2.6.2.2.2-2).

テトラベナジンとジヒドロテトラベナジンはほぼ同等の $[^3\text{H}]$ -ジヒドロテトラベナジンリガンド結合阻害作用を示した.

テトラベナジン, ジヒドロテトラベナジン, ハロペリドール, クロルプロマジンの各薬物では, 求められた K_d 値と IC_{50} 値は同じオーダーであったが, レセルピンだけはオーダーが異なり, IC_{50} 値は K_d 値の約 1/5 であった. また, 取り込み試験において基質となる 5-HT や NA にも $[^3\text{H}]$ -ジヒドロテトラベナジンリガンド結合の阻害作用が認められた.

表 2.6.2.2.2-2 モノアミン取り込み阻害薬と³H]-ジヒドロテトラベナジン結合部位の相互作用
(資料番号 4.2.1.1.2-2 [参考資料] の表 1 を改変)

化合物	³ H]-HTBZ リガンド結合に対する置換作用の EC ₅₀ 値 (nM)	³ H]-HTBZ 結合部位に対する解離定数 K _d (nM)	ATP 依存性 NA 取り込みに対する阻害作用の IC ₅₀ 値 (nM)
テトラベナジン	1.8/3.0*	1.3	3.2
HTBZ (ラセミ体)	4.1	2.9	3.7
α-HTBZ	6.0*	2.0*	—
β-HTBZ	20*	7.9*	—
レセルピン	238/300*	168	28
ハロペリドール	1071	750	550
クロルプロマジン	1890	1330	2500
5-HT	345×10 ³	240×10 ³	—
NA	1720×10 ³	1200×10 ³	—

HTBZ : ジヒドロテトラベナジン, * : 資料番号 4.2.1.1.2-3 [参考資料] による.

³H]-HTBZ リガンド結合に対する置換作用の EC₅₀ 値は図 2.6.2.2.2-3 のデータから算出した. ³H]-HTBZ 結合部位に対する解離定数 K_d (nM) は EC₅₀ 値から算出した. α-及び β-HTBZ, 5-HT, NA 以外の薬物については, ATP 依存性 NA 取り込みに対する阻害作用から IC₅₀ 値 (nM) を算出した. 取り込み阻害作用試験とリガンド結合に対する置換試験は, 同じ膜標本を用いて同じ試験条件で実施した.

3) ヒト VMAT2 及び VMAT1 発現細胞における³H]-ジヒドロテトラベナジン及びモノアミンの基質特異性 (公表論文, 資料番号 : 4.2.1.1.2-4 [参考資料])

ヒト VMAT2 及び VMAT1 分子に対する HTBZ 及びモノアミンの親和性, 特異性及びモノアミン取り込み阻害作用を検討した. クローニングした hVMAT2 及び hVMAT1 cDNA を Vaccinia virus/bacteriophage T7 hybrid システムを用いて線維芽細胞系 CV-1 細胞に導入し, hVMAT2 及び hVMAT1 発現細胞株を樹立した. この細胞にジギトニン処理して細胞膜の透過化を行った後, ³H]-HTBZ (³H]-TBZOH と同じ, 以下同様) を用いて hVMAT2 及び hVMAT1 に対する結合能を検討した. また, ³H]-5-HT を用いて hVMAT2 及び hVMAT1 による 5-HT 取り込み能を検討した後, さらに³H]-5-HT を用いてモノアミン (5-HT, DA, Ad, NA, HA) 及び VMAT 阻害剤 (テトラベナジン, レセルピン, ケタンセリン) の hVMAT2 と hVMAT1 に対する親和性も比較した. 結合量及び取り込み量の測定は, hVMAT2 及び hVMAT1 発現細胞を氷冷した 1.25 mL の細胞内液類似溶液で 2 回洗浄後, 1% SDS で溶解し, シンチレーションカウンターで行った. hVMAT2 発現細胞, hVMAT1 発現細胞及び hVMAT 非発現細胞 (Mock 細胞) における³H]-HTBZ (³H]-TBZOH) との結合能を図 2.6.2.2.2-4 に, hVMAT2 発現細胞及び hVMAT1 発現細胞における³H]-5-HT の取り込み能を図 2.6.2.2.2-5 に, hVMAT2 発現細胞及び hVMAT1 発現細胞におけるモノアミンの親和性を表 2.6.2.2.2-3 に, VMAT 阻害剤による hVMAT2 発現細胞及び hVMAT1 発現細胞における³H]-5-HT の取り込み阻害を表 2.6.2.2.2-4 に示す.

2.5 nM の³H]-HTBZ に対して, hVMAT2 発現細胞においてのみ結合能が認められ, その反応速度は速く, また 2 μM のテトラベナジンによりその結合は完全に抑制された. 一方, hVMAT1 発現細胞において³H]-HTBZ との結合能は認められず, Mock 細胞と同等の値を示した (図 2.6.2.2.2-4).

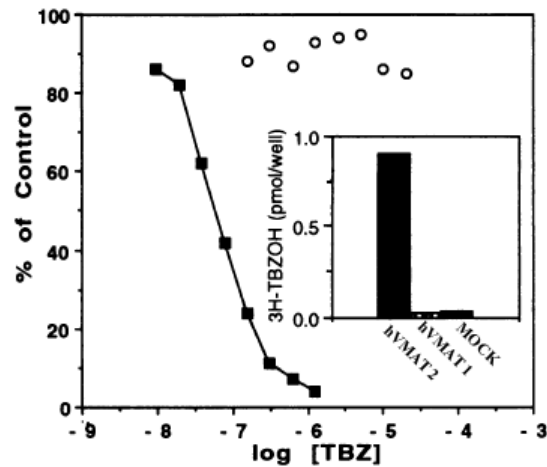


図 2.6.2.2.2-4 hVMAT2 発現細胞, hVMAT1 発現細胞及び Mock 細胞における

$[^3\text{H}]\text{-HTBZ}$ ($[^3\text{H}]\text{-TBZOH}$) との結合能

(資料番号 4.2.1.1.2-4 [参考資料] の図 1)

■ : hVMAT2 発現 CV-1 fibroblasts, ○ : hVMAT1 発現 CV-1 fibroblasts. 図中の数値は Duplicate で行った同じ試験を 2 回繰り返したデータの平均値を表す。

90 nM の $[^3\text{H}]\text{-5-HT}$ 取り込み能に対して, hVMAT2 及び hVMAT1 発現細胞は同様の時間-濃度曲線を示し, 10 分で最大値となり, その値は Mock 細胞の 50 倍であった. この作用は ATP 依存性であり, 移動性イオンキャリアのカルボニルシアニド-p-トリフルオロメトキシフェニルヒドラゾン及び H^+ -ATPase 阻害薬 Tri(n-butyl)tin により阻害された. また 0.09~12 μM の $[^3\text{H}]\text{-5-HT}$ を用いて 2 分間の取り込み能を測定後, Lineweaver-Burk プロット解析を行った結果, hVMAT2 及び VMAT1 の K_m 値は 0.8 及び 1.3 μM で, V_{\max} は 43 及び 37 pmol/min/450,000 cells であった (図 2.6.2.2.2-5).

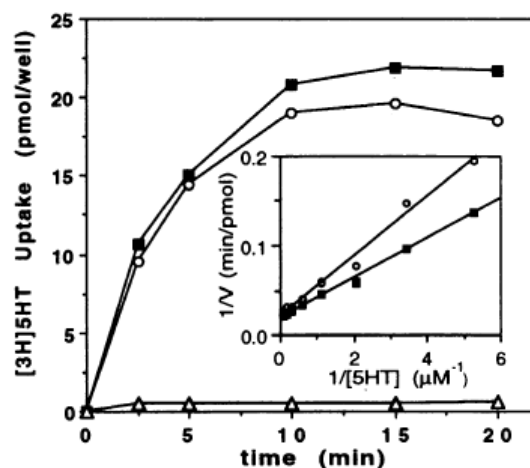


図 2.6.2.2.2-5 hVMAT2 発現細胞及び hVMAT1 発現細胞における $[^3\text{H}]\text{-5-HT}$ の取り込み能

(資料番号 4.2.1.1.2-4 [参考資料] の図 2)

■ : hVMAT2 発現 CV-1 fibroblasts, ○ : hVMAT1 発現 CV-1 fibroblasts, △ : Mock CV-1 fibroblasts. Duplicate で行った同じ試験を 2 回繰り返したデータの平均値を表す。

90 nM の $[^3\text{H}]$ -5-HT 添加 2 分後のモノアミンに対する hVMAT2 及び hVMAT1 の親和性はいずれも 5-HT>DA>Ad>NA>HA の順であり、また、hVMAT2 の親和性はいずれも hVMAT1 より高く、5-HT に対しては 1.6 倍、カテコールアミンに対しては 2.7~4.0 倍、HA に対しては 30 倍以上であった (表 2.6.2.2.2-3)。

表 2.6.2.2.2-3 hVMAT2 発現細胞及び hVMAT1 発現細胞におけるモノアミンの親和性
(資料番号 4.2.1.1.2-4 [参考資料] の表 1 を改変)

モノアミン	hVMAT2 発現細胞における $[^3\text{H}]$ -5HT 取り込み阻害の K_i 値 (μM)	hVMAT1 発現細胞における $[^3\text{H}]$ -5HT 取り込み阻害の K_i 値 (μM)	hVMAT1 K_i 値/hVMAT2 K_i 値 (親和性比)
5-HT	0.9±0.1	1.4±0.2	1.6
DA	1.4±0.2	3.8±0.4	2.7
Ad	1.9±0.2	5.5±0.7	2.9
NA	3.4±0.5	13.7±1.6	4.0
HA	143±12	4696±601	33

K_i 値は Graph Prism software を用いて nonlinear regression により算出した。表中の数値は Duplicate で行った同じ試験を 3 回以上繰り返したデータの平均値±SE を表す。

テトラベナジンは、hVMAT2 発現細胞に対して 97 nM で $[^3\text{H}]$ -5-HT 取り込み阻害作用を示すが、hVMAT1 発現細胞に対しては 20 μM でも阻害作用を示さなかった。一方、レセルピン及びケタンセリンは hVMAT2 及び hVMAT1 発現細胞のいずれに対しても阻害作用を示した (表 2.6.2.2.2-4)。

表 2.6.2.2.2-4 VMAT 阻害剤による hVMAT2 発現細胞及び hVMAT1 発現細胞における
 $[^3\text{H}]$ -5-HT の取り込み阻害
(資料番号 4.2.1.1.2-4 [参考資料] の表 2 を改変)

VMAT 阻害剤	hVMAT2 発現細胞における $[^3\text{H}]$ -5HT 取り込み阻害の K_i 値 (μM)	hVMAT1 発現細胞における $[^3\text{H}]$ -5HT 取り込み阻害の K_i 値 (μM)	hVMAT1 K_i 値/hVMAT2 K_i 値 (親和性比)
テトラベナジン	0.097±0.02	>20	-
レセルピン	0.012±0.003	0.034±0.005	2.8
ケタンセリン	0.54±0.07	1.7±0.2	3.1

K_i 値は Graph Prism software を用いて nonlinear regression により算出した。表中の数値は Duplicate で行った同じ試験を 3 回以上繰り返したデータの平均値±SE を表す。

- 4) テトラベナジン, α -ジヒドロテトラベナジン, β -ジヒドロテトラベナジンの各種受容体/トランスポーター等に対する選択性 (報告書番号: █████-0968, 資料番号: 4.2.1.1.2-5, 報告書番号 █████-1448, 資料番号: 4.2.1.1.2-6)

テトラベナジンとその一次代謝物である α -及び β -ジヒドロテトラベナジンの作用選択性を確認するため、神経伝達物質受容体/トランスポーター、ステロイド、イオンチャネル、セカンドメッセンジャー系、プロスタグランジン類、成長因子/ホルモン、脳内/消化管内ペプチド等のターゲット分子に対する結合の阻害作用について *in vitro* アッセイにおいて検討した。

被験物質（テトラベナジン、 α -及び β -ジヒドロテトラベナジン）の濃度は全てのアッセイ系において 0.1 μ M (duplicate) で行い、阻害率を算出した。

アッセイ項目を以下に示す。

a) 結合阻害作用

- ・神経伝達物質受容体／トランスポーター：アデノシン（非選択的）、アドレナリン（ α_1 -及び α_2 - [非選択的]、 β [非選択的]）、ドパミン（非選択的）、DAT、GABA_A（作動部位）、GABA_A・ベンゾジアゼピン・複合体（ α_1 ）、GABA_B、グルタミン酸（AMPA、カイニン酸、NMDA（NMDA、グリシン））、ストリキニーネ感受性グリシン、ヒスタミン（H₁、H₂及びH₃）、メラトニン（非選択的）、ムスカリン性アセチルコリン（M₁及びM₂）、ムスカリン（非選択的中枢性及び末梢性）、ニコチン性アセチルコリン（ α -ブングアロトキシシン非感受性）、NET、オピオイド（非選択的）、オルファニン、SERT、セロトニン（非選択的）、シグマ（非選択的）
- ・ステロイド：エストロゲン、テストステロン（細胞質）
- ・イオンチャネル：カルシウムチャネルL型（ジヒドロピリジン結合部位）、N型、カリウムATP感受性、カリウム（Ca²⁺活性型）、カリウム（hERG）、ナトリウム（サイト2）
- ・セカンドメッセンジャー系：NOS（ニューロン）
- ・プロスタグランジン類：ロイコトリエン [LTB₄及びLTD₄]、トロンボキサン [TXA₂]
- ・成長因子／ホルモン：コルチコトロピン遊離ホルモン（非選択的）、オキシトシン、PAF、サイロトロピン遊離ホルモン [TRH]
- ・内因性生理活性ペプチド：アンジオテンシン [AT₁及びAT₂]、ブラジキニン [BK₂]、コレシストキニン[CCK₁及びCCK₂]、エンドセリン [ET-A及びET-B]、ガラニン（非選択的）、ニューロキニン [NK₁、NK₂ (NK_A) 及びNK₃ (NK_B)]、血管作動性小腸ペプチド [VIP]（非選択的）、バソプレッシン [V₁]

b) 酵素活性阻害作用

- ・神経伝達物質：コリンアセチルトランスフェラーゼ [ChAT]、アセチルコリンエステラーゼ [ACHASE]、グルタミン酸脱炭酸酵素 [GAD]、モノアミン酸化酵素 [MAO-A 及び MAO-B]（末梢性）

上記アッセイ項目の中で、被験物質（テトラベナジン、 α -及び β -ジヒドロテトラベナジン）の阻害率が 50%を超えたのは β -ジヒドロテトラベナジンのシグマ受容体（非特異的）に対する結合のみであった。それ以外にテトラベナジン、 α -及び β -ジヒドロテトラベナジンは、強い阻害作用を示さなかった。

そこで β -ジヒドロテトラベナジンのシグマ受容体（非特異的）結合について、ハロペリドールを対照薬として追加試験を行った。

試験結果を図 2.6.2.2.2-6 に示す。陽性対照のハロペリドールは、IC₅₀ 値：5.69 nM、K_i 値：5.13 nM、slope は-0.98 であった。これに対して β -ジヒドロテトラベナジンは順に 143 nM、128 nM、-1.02 であった。

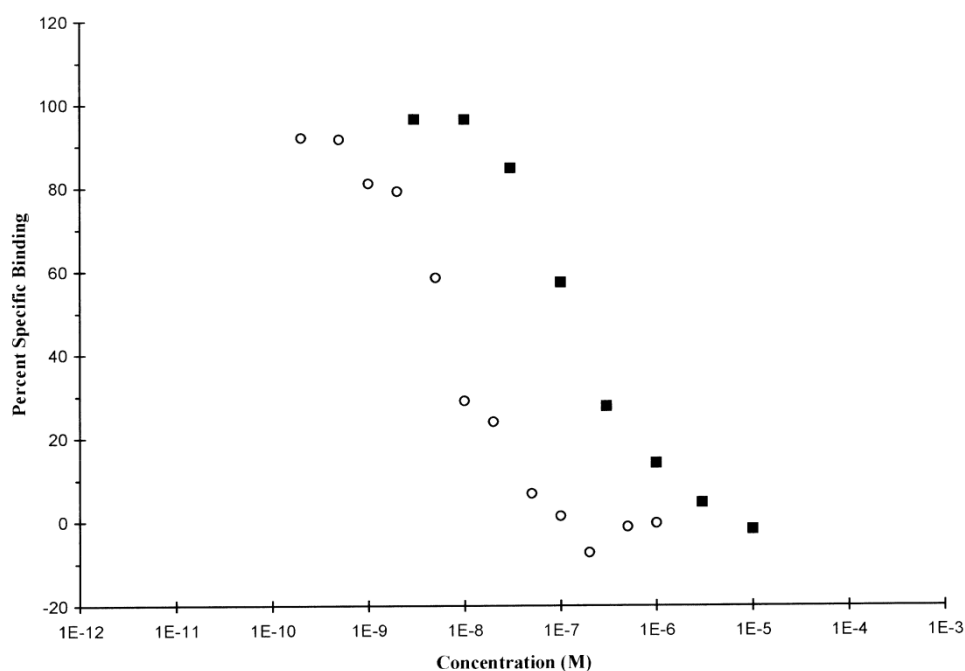


図 2.6.2.2.2-6 β-ジヒドロテトラベナジンのシグマ受容体に対する結合試験

(資料番号 4.2.1.1.2-6Appendix I の図を改変)

○ : ハロペリドール, ■ : β-ジヒドロテトラベナジン. $[^3\text{H}]\text{-DTG}$ をリガンドとして使用し, 種々の濃度 (3 nM ~ 10 μM) の β-ジヒドロテトラベナジンとインキュベーションして結合試験を行った (N=2) .

上記試験結果から, β-ジヒドロテトラベナジンが弱いシグマ受容体阻害作用を示す以外に, テトラベナジン, α-ジヒドロテトラベナジン及びβ-ジヒドロテトラベナジンはアッセイを行った受容体, トランスポーター, イオンチャネル, ホルモン, ペプチド, 酵素に対して阻害作用を示さないことが示唆された.

5) マウス脳におけるジヒドロテトラベナジン特異的結合の分布 (公表論文, 資料番号 :

4.2.1.1.2-7 [参考資料])

マウスの各脳組織内における $[^3\text{H}]\text{-HTBZ}$ 特異的結合の分布量及び親和性を検討した. OF1 マウス (雄, 6 週齢, 体重 30~35 g) を屠殺後, 脳を摘出し, 線条体, 視床, 視床下部, 中脳, 橋-延髄, 海馬, 前頭皮質, 小脳の各部位を切り出した. 脳の各部位を 0.3 M ショ糖/25 mM KOH-HEPES 緩衝液 (pH 7.5) 500 μL 中でホモジナイズ (20,000 rpm, 10~15 秒) し, この試料を試験に使用した.

脳の各部位の試料 8~30 μL を上記緩衝液で 40 μL に調製し, $[^3\text{H}]\text{-HTBZ}$ (11.2 Ci/mmol, 8380 cpm/pmol) 0.6~20 nM と 2 時間インキュベーション後, シンチレーションカウンターにより放射能活性を測定した. $[^3\text{H}]\text{-HTBZ}$ 特異結合は, 2 μM TBZ 含有結合試験の飽和曲線より算出した. $[^3\text{H}]\text{-HTBZ}$ 特異結合の飽和曲線は Scatchard プロットにより, また平衡解離定数 K_d と最大結合密度 B_{max} は回帰直線分析により求めた.

脳の各部位における $[^3\text{H}]$ -HTBZ 結合の平衡解離係数 K_d (nM) と最大結合密度 B_{max} (fmol/mg protein) を表 2.6.2.2.2-5 に示す。

表 2.6.2.2.2-5 マウス脳各部位における $[^3\text{H}]$ -HTBZ 結合の特質
(資料番号 4.2.1.1.2-7 [参考資料] の表 1 を改変)

脳部位	K_d (nM)	B_{max} (fmol/mg protein)
線条体	2.40	1330
視床	2.58	130
視床下部	2.28	355
中脳	3.06	235
橋-延髄	3.03	164
海馬	2.13	120
前頭皮質	2.30	97
小脳	2.73	46

雄性 OF1 マウス (6 週齢, 体重 30~35 g) を用いて脳の各部位を切り出し, 0.6~20 nM の $[^3\text{H}]$ -HTBZ と 2 時間インキュベーションした。平衡解離係数 K_d と最大結合密度 B_{max} は Schatchard プロットした結合曲線の回帰直線分析により求めた。

8 つのマウス脳部位を用いた $[^3\text{H}]$ -HTBZ 特異的結合解析により, 単一結合で K_d 平均値約 2.6 nM の親和性を持つことが示された。マウス脳におけるジヒドロテトラベナジン結合部位の分布は, 線条体 (1330 fmol/mg protein) で最も高く, 以下, 視床下部, 中脳, 橋-延髄, 視床, 海馬, 前頭皮質, 小脳の順であった。

6) ラット線条体におけるジヒドロテトラベナジン及びスルピリド特異的結合の分布 (公表論文, 資料番号 : 4.2.1.1.2-8 [参考資料])

ラットの線条体各部位における $[^3\text{H}]$ -HTBZ 及び $[^{125}\text{I}]$ -ヨードスルピリド (ドパミン D_2 受容体) 特異的結合の分布量を検討した。試験には Wistar 系ラット (雄, 体重 200~250 g) を用いた。

(1) ジヒドロテトラベナジン結合

ラットを屠殺して脳を取り出し, 凍結させて 10 μm の脳切片を作製した。ゼラチンコーティングしたスライドガラスに乗せた脳切片に, 12 nM の $[^3\text{H}]$ -ジヒドロテトラベナジン (15 Ci/mmol) を含む, 0.3 M ショ糖含有 10 mM HEPES (pH 8.0) 溶液を加えて室温で 40 分間インキュベーションした。別の脳切片を用いて 5 μM の非標識テトラベナジンの存在下にインキュベーションして非特異的結合量を求めた。

インキュベーション終了後, 脳切片を 4 $^{\circ}\text{C}$ の Tris-塩酸緩衝液 40 mM (pH 8.0) で 3 分間 2 回洗浄し, さらに精製水で洗浄した。脳切片を拭き取り, 総放射線量を β カウンターで測定した。また, フィルムオートラジオグラフィーにより分布量を測定した。オートラジオグラフィーは脳切片を Hyperfilm- ^3H 上に, 暗室中に室温で 8 週間置くことによって実施した。この後フィルムの吸

光度をイメージアナライザーにより測定して、濃度を算出した。ラット線条体における ^3H -ジヒドロテトラベナジン特異的結合の分布量 (B_{\max}) を表 2.6.2.2.2-6 に示す。

ラット線条体各部位の ^3H -ジヒドロテトラベナジン特異的結合の B_{\max} は内側部で少し低値を示したが、外側部と背内側部ではほとんど同じ値であった。

表 2.6.2.2.2-6 ラット線条体における ^3H -ジヒドロテトラベナジン特異的結合の最大結合密度 (資料番号 4.2.1.1.2-8 [参考資料] の表 3 を改変)

線条体の部位	B_{\max} (fmol/mg protein)
内側部 (Central)	620 ± 22
外側部 (Lateral)	716 ± 24
背内側部 (Mediodorsal)	774 ± 25

N=7, 表中の数値は平均値±SEを表す。ラット線条体各部位別の ^3H -ジヒドロテトラベナジン結合の B_{\max} を求めた。

(2) スルピリド結合

ラットを屠殺して脳を取り出し、凍結させて 10 μm の脳切片を作製した。ゼラチンコーティングしたスライドガラスに乗せた脳切片に、0.1 nM の ^{125}I -ヨードスルピリド (2000 C_i/mmol) を含む、120 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM CaCl_2 , 1 mM Mg Cl_2 及び 5.7 mM アスコルビン酸含有 50 mM Tris-塩酸緩衝液 (pH 7.4) 溶液を加えて室温で 30 分間インキュベーションした。別の脳切片を用いて 2 μM の非標識ハロペリドールの存在下にインキュベーションして非特異的結合量を求めた。インキュベーション終了後、脳切片を 4 $^{\circ}\text{C}$ の同じ緩衝液で 4 分間 2 回洗浄し、さらに精製水で洗浄した。脳切片を拭き取り、総放射線量を γ カウンターで測定した。また、フィルムオートラジオグラフィにより分布量を測定した。また、分布量測定のためオートラジオグラフィを行った。オートラジオグラフィは脳切片を Hyperfilm- ^3H 上に、暗室中に室温で 4 日間置くことによって実施した。この後フィルムの吸光度をイメージアナライザーにより測定して、濃度を算出した。ラット線条体における ^3I -ヨードスルピリド特異的結合の分布量を表 2.6.2.2.2-7 に示す。

ラット線条体における ^{125}I -ヨードスルピリド結合 (ドパミン D_2 受容体) の B_{\max} は、内側部に比べ外側部でやや高値であった。

表 2.6.2.2.2-7 ラット線条体における $[^{125}\text{I}]$ -ヨードスルピリド特異的結合の最大結合密度
(資料番号 4.2.1.1.2-8 [参考資料] の表 4 を改変)

線条体の部位	B_{\max} (fmol/mg protein)
内側部 (Central)	17.34 \pm 0.60
外側部 (Lateral)	24.93 \pm 0.96

N=7, 表中の数値は平均値 \pm SEを表す. ラット線条体各部位別の $[^{125}\text{I}]$ -ヨードスルピリド結合の B_{\max} を求めた.

7) ヒト死後脳におけるジヒドロテトラベナジン特異的結合の分布 (公表論文, 資料番号 :
4.2.1.1.2-9 [参考資料])

ヒトの死後脳を用いてヒト各脳組織内における $[^3\text{H}]$ -HTBZ 特異的結合の分布量及び親和性を検討した. 剖検終了後, 脳を素早く摘出し, 両半球に切り分けた. その片半球を 2 cm の厚さのブロックにカットし, ドライアイスで凍結させて -70°C で保存した. 黒質, 青斑核, 縫線核を含む中脳ブロックから 20 μm の厚さの凍結切片を作製した. この切片をゼラチンコーティングしたスライドガラス上で解凍した後に, 乾燥剤の入った -80°C のボックスで 2 週間以上保存し, $[^3\text{H}]$ -HTBZ 結合試験に使用した. 黒質脳切片を $[^3\text{H}]$ -HTBZ (濃度 0.1~24 nM, 13.7 Ci/mmol) とインキュベーションし, 脳切片を緩衝液で洗浄し, さらに精製水で洗浄した. 総放射線量測定のため, 切片を拭き取り β カウンターで測定した. $[^3\text{H}]$ -HTBZ 非特異的結合は, 1 μM の非標識 TBZ 含有結合試験により算出した. 得られた飽和結合曲線のデータを Scatchard 解析して平衡解離係数 K_d 及び最大結合密度 B_{\max} を求めた. 試験には 2 人のヒト由来の脳切片を使用し, 同じ試験を 2 回繰り返したデータを解析した.

試験結果を図 2.6.2.2.2-7 に示す. Scatchard 解析の結果, K_d : 7 ± 0.2 nM, B_{\max} : 180 ± 11 fmol/mg of protein であった.

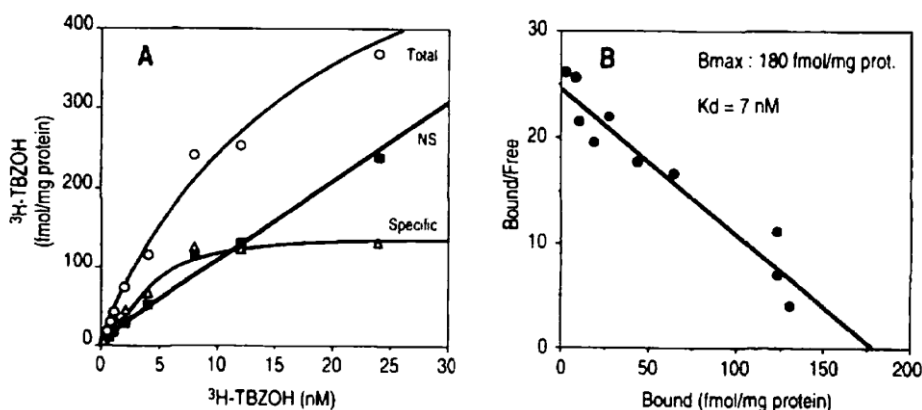


図 2.6.2.2.2-7 ヒト死後脳黒質線条体における $[^3\text{H}]$ -HTBZ 結合特性
(資料番号 4.2.1.1.2-9 [参考資料] の図 2 を改変)

A : $[^3\text{H}]$ -HTBZ 特異的結合飽和曲線の解析 ($[^3\text{H}]$ -HTBZ 濃度を 0.1~24 nM の範囲で変化させた時の特異的, 非特異的及び総結合量, 代表例). B : 結合飽和曲線データの Scatchard 解析 (2 人のヒト由来切片による 2 回の繰り返し実験)

次にヒト死後脳切片を用いて、 $[^3\text{H}]$ -HTBZ 結合部位の脳部位別の分布を検討した。黒質脳切片を $[^3\text{H}]$ -HTBZ（濃度 7 nM）とインキュベーションし、脳切片を緩衝液で洗浄し、さらに精製水で洗浄した。乾燥後オートラジオグラフィを行った。オートラジオグラフィによる測定に際しては、脳切片と ^3H マイクロスケールスタンダードを Hyperfilm- ^3H 上に、X 線カセット中に室温で 3 ヶ月間放置後に定量した。別の脳切片を用いて 1 μM の非標識テトラベナジンの存在下にインキュベーションして非特異的結合量を求めた。

その結果、 $[^3\text{H}]$ -HTBZ 結合は黒質緻密部、青斑核、背側縫線核で高く、腹側被蓋野では中等度の分布が見られ、黒質網様部や A8（カテコラミン作動性細胞）では低かった。

8) ドパミン D_2 受容体への作用（公表論文，資料番号：4.2.1.1.2-10 [参考資料]）

テトラベナジンのドパミン D_2 受容体への作用を検証するために、 $[^3\text{H}]$ -スピペロンの D_2 受容体結合に対するテトラベナジンの作用を検討した。

ラット線条体及びブタ脳下垂体前葉を摘出して、氷冷した緩衝液（15 mM の Tris，120 mM の NaCl，5 mM の KCl，1 mM の MgCl_2 ，2 mM の CaCl_2 ，0.1% のアスコルビン酸塩，12.5 μM のニアミド，0.1 mM の EDTA，pH7.3）の中でポリトロンを用いて組織を破砕した。各組織試料を遠心分離処置して（ブタ脳下垂体前葉の場合はショ糖密度勾配遠心処理を加え）、DA 受容体結合試験用の試料を作製した。

$[^3\text{H}]$ -スピペロン（特異的比活性 51 Ci/mmol）は DA 受容体に対して拮抗作用を示すため、DA 受容体の標識リガンドとして使用した。 $[^3\text{H}]$ -スピペロンの特異的結合は、*d*-ブタクラモール 2 μM 存在下で非特異的結合を測定することにより算出した。

種々の濃度のテトラベナジンを添加して、22~23°C で 1.5 時間反応させた後、結合及び遊離 $[^3\text{H}]$ -スピペロン結合量を液体シンチレーション分光法により定量して、テトラベナジンの IC_{50} を算出した。それぞれの脳組織におけるテトラベナジンの、 $[^3\text{H}]$ -スピペロンの DA 受容体結合に対する見かけの阻害定数 (K_i) を表 2.6.2.2.2-8 に示す。

表 2.6.2.2.2-8 脳組織におけるテトラベナジンの $[^3\text{H}]$ -スピペロン結合置換作用
（資料番号 4.2.1.1.2-10 [参考資料] の表 4 を改変）

脳組織	K_i （見かけの阻害定数）
線条体（ラット）	5.20 ± 0.80 μM
脳下垂体前葉（ブタ）	3.20 ± 0.50 μM

表中の数値は平均値 ± SE を示す。 K_i は次式により算出した。 $K_i = \text{IC}_{50} / (1 + C/K_d)$
 IC_{50} : 50% 阻害濃度 ($[^3\text{H}]$ -スピペロン結合を 50% 阻害する濃度)，C : $[^3\text{H}]$ -スピペロンの濃度， K_d : 解離定数

ラット線条体及びブタ脳下垂体前葉における $[^3\text{H}]$ -スピペロンの K_d 値は Scatchard 解析から 0.1 nM であった。DA 受容体における $[^3\text{H}]$ -スピペロン（0.2~0.4 nM）結合に対するテトラベナジンの IC_{50} から算出した。見かけの阻害定数はラット線条体で 5.20 μM ，ブタ脳下垂体前葉で 3.20 μM であった。

精製クロム親和性顆粒細胞膜において、VMAT に対する $[^3\text{H}]$ -ジヒドロテトラベナジン結合の結合解離定数 K_d が 3.1 nM (2.6.2.2.2 2) (1) 項 p.21 参照) であることより、テトラベナジンの DA 受容体に対する作用は VMAT に対する阻害作用の 1/1000 以下と推察された。

9) ハンチントン病モデルマウスのシナプス伝達に対するテトラベナジンの作用 (公表論文, 資料番号 : 4.2.1.1.2-11 [参考資料])

ヒトハンチンチン遺伝子を導入したトランスジェニックマウス脳における線条体直接路・間接路の活性とテトラベナジンの作用を評価するため、WT, YAC128 及び BACHD マウスの D_1 又は D_2 受容体発現細胞における、自発性シナプス後電流の比較を行い、Paired-Pulse Facilitation によるシナプス機能の変化及びその変化に対するテトラベナジンの作用を検討した。

D_1 又は D_2 受容体プロモーターに緑色蛍光タンパク質 (GFP : Green Fluorescent Protein) を挿入したトランスジェニックマウスと WT, YAC128 及び BACHD マウスを交配させることにより、 D_1 又は D_2 受容体発現細胞を可視化した。1.5~2 ヶ月齢のマウスを屠殺後、脳を摘出して脳切片の作製した。自発性シナプス後電流の測定のため、GFP 発現細胞に膜電位固定下における GABA 受容体阻害薬添加後のグルタミン酸誘発興奮性シナプス後電流、又はグルタミン酸受容体阻害薬添加後の GABA 誘発抑制性シナプス後電流を記録した。1.5 ヶ月齢の WT 及び YAC128 マウスにおける自発性シナプス後電流の比較を図 2.6.2.2.2-8 に示す。

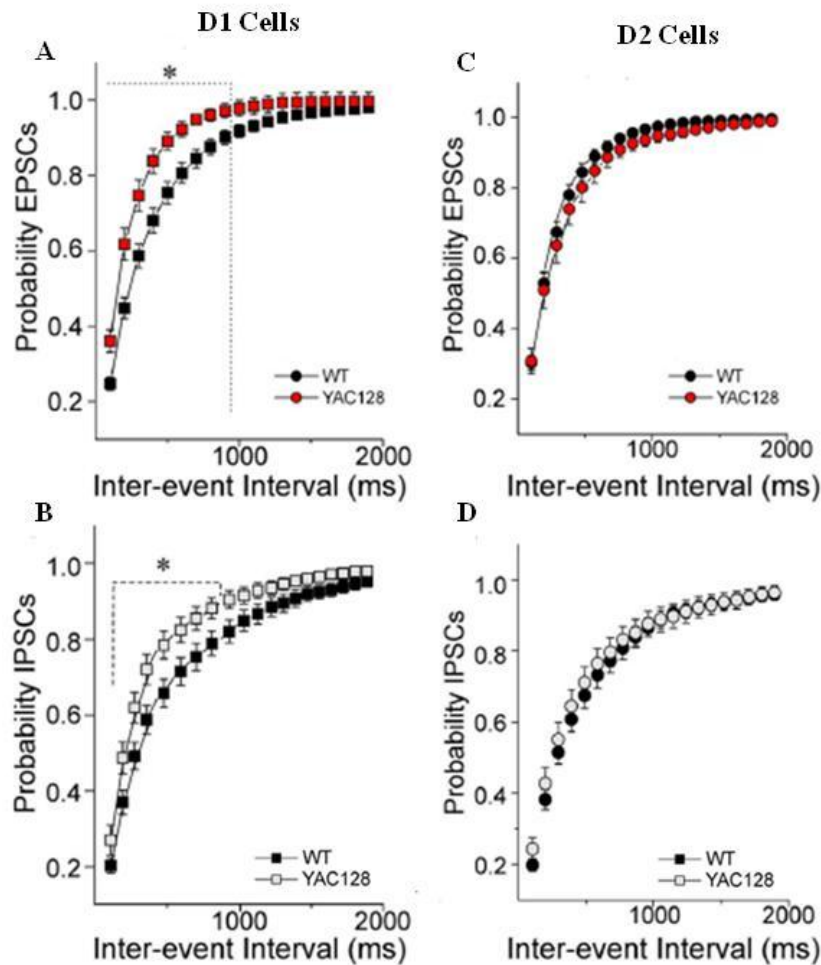


図 2.6.2.2-8 D₁ 及び D₂ 受容体発現 YAC128 細胞における興奮性及び抑制性伝達の変化

(資料番号 4.2.1.1.2-11 [参考資料] の図 1 及び図 2 を改変)

A : D₁ 受容体発現 YAC128 細胞における自発性・興奮性シナプス後電流の発生確率, B : D₁ 受容体発現 YAC128 細胞における自発性・抑制性シナプス後電流の発生確率, C : D₂ 受容体発現 YAC128 細胞における自発性・興奮性シナプス後電流の発生確率, D : D₂ 受容体発現 YAC128 細胞における自発性・抑制性シナプス後電流の発生確率, * ; P<0.05, 反復 2 way-ANOVA 及び Bonferroni t 検定

1.5 ヵ月齢の D₁ 受容体発現 YAC128 細胞におけるグルタミン酸誘発興奮性シナプス後電流及び GABA 誘発抑制性シナプス後電流はワイルドタイプ細胞と比較して増加しており, GABA 及びグルタミン酸の放出増加が示唆された. 一方 D₂ 受容体発現ワイルドタイプ細胞と YAC128 細胞におけるグルタミン酸誘発興奮性シナプス後電流及び GABA 誘発抑制性シナプス後電流に差異は認められなかった. また, 同様の変化は 1.5 ヵ月齢の D₁ 及び D₂ 受容体発現 BACHD 細胞にも認められた. これらの結果よりハンチントン病モデルマウスにおいて線条体直接路・間接路のバランスが変化しており, 直接路が優位であることが示唆された.

また, BACHD マウス脳切片の GFP 発現細胞に膜電位固定下で電気刺激によって誘発される膜電位を記録するため, 脳梁に刺激電極を装着し 2 回の電気刺激で得られるグルタミン酸誘発膜電流を比較した (Paired-Pulse). テトラベナジンの作用を検討するために, Paired-Pulse 試行前の脳

切片を 10 μ M テトラベナジン含有（対照として DMSO）緩衝液内で 2 時間インキュベーションした。2 ヶ月齢のワイルドタイプ及び BACHD マウスの D₁ 及び D₂ 細胞における Paired-Pulse 比の比較及びテトラベナジンの作用を図 2.6.2.2.2-9 に示す。

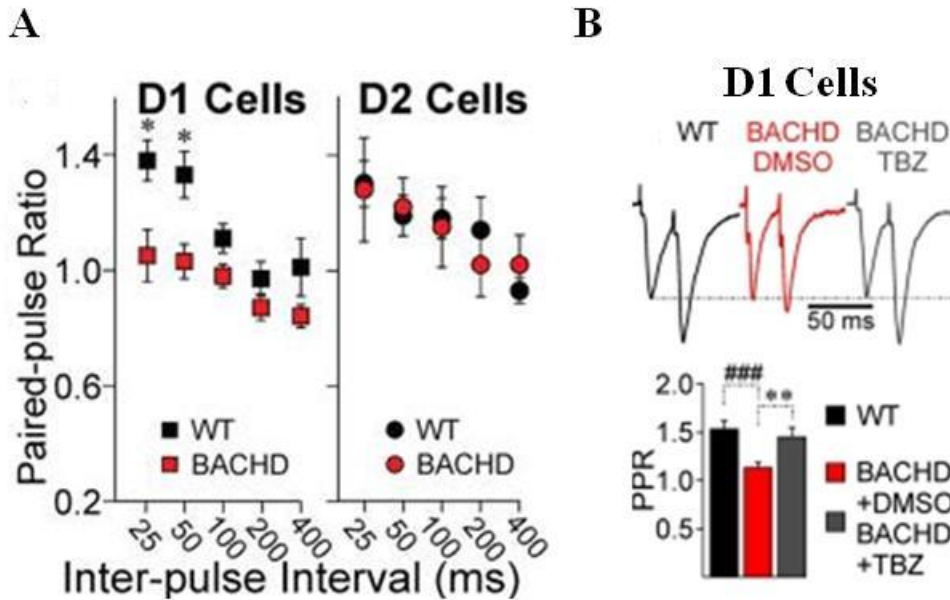


図 2.6.2.2.2-9 D₁ 及び D₂ 受容体発現 BACHD 細胞における Paired-Pulse 比の変化とテトラベナジンの作用

（資料番号 4.2.1.1.2-11 [参考資料] の図 3 及び 5 を改変）

数値；平均値±SE (N=8~17) . A : D₁ 及び D₂ 受容体発現細胞におけ Paired-Pulse 比, B : D₁ 受容体発現細胞における Paired-Pulse 比に対するテトラベナジンの作用, * ; P<0.05, 反復 2 way-ANOVA 及び Bonferroni-t 検定, ** ; P<0.01, Student 検定 (DMSO/テトラベナジンとの比較), ### ; P<0.001, Student 検定 (ワイルドタイプ/BACHD との比較)

ワイルドタイプ D₁ 及び D₂ 受容体発現細胞において、膜電位固定下で 2 回の電気刺激で得られるグルタミン酸誘発膜電流は、1 回目の電気刺激で得られる電流より増大した (Paired-Pulse Facilitation)。これは、1 回目の電気刺激で放出された神経伝達物質が完全にシナプス間隙から除去されずに残存し、2 回目の電気刺激後にシナプス間隙の神経伝達物質濃度が上昇することに起因している。1.5 ヶ月齢の D₂ 受容体発現 BACHD 細胞では、同様の電流増加が認められているが、D₁ 受容体発現 BACHD 細胞では Paired-Pulse Facilitation が有意に抑制された。これはシナプス前終末の変化によりすでに十分量以上の神経伝達物質が放出されていたことにより D₁ 受容体発現細胞の Paired-Pulse Facilitation が抑制されたことが示唆される。さらに VMAT2 阻害剤であるテトラベナジンを BACHD マウス脳切片に 2 時間作用させることにより D₁ 受容体発現細胞の Paired-Pulse Facilitation が認められた。これはシナプス間隙に十分量以上の DA を放出してきたシナプス前終末の神経細胞が、テトラベナジンの DA 涸渇作用によりシナプス間隙内の DA 量を減少させたことによるものと考えられる。

以上の結果から、ハンチントン病モデルマウスにおいて線条体の出力バランスは直接路優位であり、これはシナプス前終末の神経細胞がシナプス間隙に十分量以上の DA を放出していることによるものと示唆された。また、テトラベナジンはシナプス前終末の DA 涸渇作用により D_1 受容体発現細胞の活動活性を下げることで認められた。

2.6.2.2.3 *In vivo*作用機序試験

- 1) 標識リガンドを用いた脳組織内分布の検討 (公表論文, 資料番号: 4.2.1.1.3-1 [参考資料], 公表論文, 資料番号: 4.2.1.1.3-2 [参考資料])

テトラベナジンの脳組織への移行性を検討するため, 標識体テトラベナジンを用いて脳組織内分布を調べた。

- (1) マウスにおける試験 (公表論文, 資料番号: 4.2.1.1.3-1 [参考資料])

CD-1 系マウス (雌, 体重 20~27 g) をエーテル麻酔し, [¹¹C]-テトラベナジン (0.02~0.57 mCi/0.05~0.1 mL) を尾静脈内投与後, 2, 5, 10, 20, 30, 40 又は 60 分後に採血後, 屠殺 (各測定時点につき N=4) して脳, 心臓, 肺, 副腎を摘出した。線条体, 皮質, 海馬, 視床下部, 小脳, 視床, 橋 - 延髄を切り分け, 重量測定後, それぞれのサンプルの ¹¹C 放射活性をガンマカウンターで測定した。

[¹¹C]-テトラベナジン静脈内投与後の, 各時間における脳内各部位分布における薬物動態を図 2.6.2.2.3-1 に示す。

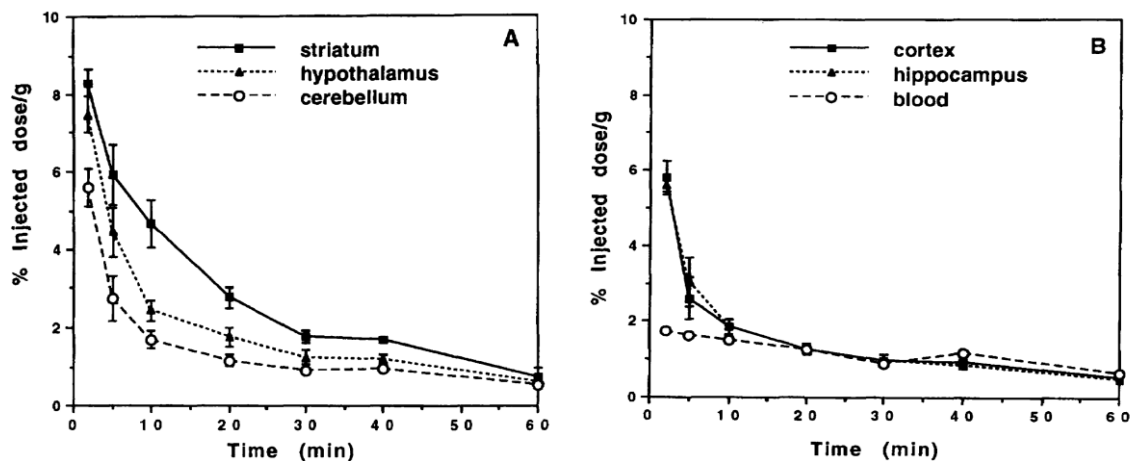


図 2.6.2.2.3-1 [¹¹C]-テトラベナジン静脈内投与後の脳内部位別放射活性のタイムコース

(資料番号 4.2.1.1.3-1 [参考資料] の図 1 を改変)

[¹¹C]-テトラベナジン (0.02~0.57 mCi/0.05~0.1 mL) を尾静脈から静脈内投与し, 2, 5, 10, 20, 30, 40, 60 分後に脳内各部位及び血液中の放射活性を測定して, 単位重量あたりの, 投与用量に対する%で表示した (平均値±SD, N=4)。

[¹¹C]-テトラベナジンの脳内への移行は速く, 2 分後には投与用量の 3.2% が脳組織内に分布した。消失も速やかであり, 60 分後の分布量は投与量の 0.21% であった。 [¹¹C]-テトラベナジンの消失は線条体と視床下部が最も遅く, これらの部位での VMAT 密度が高いことと一致していた。

また [¹¹C]-テトラベナジンの分布特異性を調べるために, [¹¹C]-テトラベナジンと非標識テトラベナジン 10 mg/kg (静脈内投与) を併用投与した場合及び DAT 選択的阻害薬 GBR 12935 (20 mg/kg, 腹腔内投与) を 30 分前に投与した場合の分布量についても検討を行った。非標識テトラベナジン

又は GBR 12935 を併用した場合の、 $[^{11}\text{C}]$ -テトラベナジン静脈内投与 10 分後の脳内及び末梢組織分布量に及ぼす影響を表 2.6.2.2.3-1 に示す。

表 2.6.2.2.3-1 非標識テトラベナジン及び GBR 12935 の併用が $[^{11}\text{C}]$ -テトラベナジンのマウス脳内及び末梢組織分布量に及ぼす影響
(資料番号 4.2.1.1.3-1 [参考資料] の表 1 を改変)

部位/器官		Control (N=32)	非標識テトラベナジンとの併用試験 (N=12)	GBR 12935 との併用試験 (N=4)
部位	線条体	4.96 ± 1.0** ¹	1.54 ± 0.37** ²	5.44 ± 0.57
	皮質	1.91 ± 0.34	1.50 ± 0.35** ²	2.01 ± 0.19
	海馬	2.01 ± 0.36* ¹	1.50 ± 0.36** ²	2.17 ± 0.16
	視床下部	2.96 ± 0.61** ¹	1.40 ± 0.33** ²	3.20 ± 0.41
	小脳	1.76 ± 0.36	1.52 ± 0.37	1.76 ± 0.22
	視床	2.06 ± 0.59* ¹	N.D.	N.D.
	橋 - 延髄	1.96 ± 0.30	1.77 ± 0.25	N.D.
	血液中	1.59 ± 0.26	1.44 ± 0.27	1.72 ± 0.17
器官	脳	2.18 ± 0.41	1.53 ± 0.36** ²	N.D.
	心臓	2.54 ± 0.17	2.52 ± 0.67	N.D.
	副腎	7.30 ± 1.01	6.42 ± 1.74	N.D.
	肺	2.44 ± 0.33	2.86 ± 0.54	N.D.

表中の数値は $[^{11}\text{C}]$ -テトラベナジン静脈内投与 10 分後の数値を示し、部位別の場合には、「単位重量あたりの、投与した用量に対する%」を、また臓器別の場合には、「各臓器について、投与した用量に対する%」を表す。有意差検定には対応のない Student t 検定を用いた。*¹ : $p < 0.05$ (Control 群の小脳に対して), **¹ : $p < 0.01$ (Control 群の小脳に対して), **² : $p < 0.001$ (Control 群に対して), N.D. : 実施せず

マウスにおいて、 $[^{11}\text{C}]$ -テトラベナジン (0.02~0.57 mCi/0.05~0.1 mL) を静脈内投与した 10 分後の脳内分布量は、線条体が最も高く、次いで視床下部、視床、海馬、橋 - 延髄、皮質、小脳の順であった。これは、*in vitro* 試験におけるマウス脳各部位に対するジヒドロテトラベナジン結合の結果と類似していた (2.6.2.2.2 5) 項, p.29 参照)。

$[^{11}\text{C}]$ -テトラベナジン結合は非標識テトラベナジンで阻害されたが、ニューロンにおいて選択的 DAT 阻害作用を示す GBR 12935 では阻害されず (表 2.6.2.2.3-1), $[^{11}\text{C}]$ -テトラベナジンは選択的に VMAT2 に結合することが示唆された。

(2) サルにおける試験 (公表論文, 資料番号 : 4.2.1.1.3-2 [参考資料])

試験には 2 匹のブタオザル (雌, 体重 6.6 kg と 4.6 kg) を用いた。1 匹は 3 年半前に右頸動脈から総量 3 mg/kg の MPTP を投与して、左半身に持続的なパーキンソン病様症状を示すモデル動物であり、もう 1 匹は正常動物である。

試験実施時にはケタミン (15 mg/kg/回, 筋肉内投与, 必要な回数だけ追加) とキシラジン塩酸 (2 mg/kg, 筋肉内投与) で麻酔を維持した。 $[^{11}\text{C}]$ -テトラベナジン (比活性 > 1000 Ci/mmol, 放射化学的純度 > 95%) 4.0~6.0 mCi を静脈内投与後, 40 分まで標識体濃度の測定を PET により行った。また正常動物を用いた結合阻害試験の場合には, 1 mg/kg のテトラベナジンを含む比活性の

低い ^{11}C -テトラベナジンを静脈内投与した1時間後に、 ^{11}C -テトラベナジンを投与し標識体濃度の測定をPETにより行った。 ^{11}C -テトラベナジン静脈内投与後、急速な脳内への移行と消失が認められ、5分後に脳内濃度は最高となった。VMAT密度が最も高い線条体では、投与10分後に ^{11}C -テトラベナジン濃度が最大となり、その消失が最も遅かった。また、非標識テトラベナジン1 mg/kgを投与すると、 ^{11}C -テトラベナジン分布は完全に消失したことから、 ^{11}C -テトラベナジンの線条体への移行は、特異的なVMAT2結合によるものであることが示唆された。

正常動物では左右の両脳半球に対称的に ^{11}C -テトラベナジン分布が観察されたが、右脳半球をMPTPで傷害したサルでは、傷害側線条体の ^{11}C -テトラベナジン特異的分布は消失した。しかし非傷害側の線条体や皮質での ^{11}C -テトラベナジンの分布に変化は認められなかった。

2.6.2.3 副次的薬理試験

1) マウスにおける内因性ドパミン誘発性線条体ドパミンニューロン傷害に対するテトラベナジンの保護作用（公表論文，資料番号：4.2.1.2-1〔参考資料〕）

ミトコンドリア内のエネルギー代謝異常は神経変性疾患（アルツハイマー病，パーキンソン病，ハンチントン病，筋萎縮性側索硬化症）の原因のひとつであり，DA の代謝物が，大脳基底核ニューロンの損傷に関与することが示唆されている．コハク酸脱水素酵素阻害剤のマロン酸二ナトリウムをマウスやラットの線条体に投与すると，ミトコンドリア内の代謝ストレスにより，大量のDA 放出を誘発し，DA 神経終末の変性が生じる．そこで内因性DA 誘発による線条体DA ニューロン変性に対するテトラベナジンの作用を検討した．

Swiss-Webster 系雄性マウスに，生理食塩液又はマロン酸二ナトリウム（4 μmol ）をインフュージョンにより左側線条体内投与した．対照（生理食塩液）又はテトラベナジン 0.1，1.0，10 mg/kg をマロン酸二ナトリウム処置の30分前及び2時間後に腹腔内投与した．テトラベナジンの投与4～7日後にマウスを屠殺して線条体を摘出し，DA 量を HPLC 法により測定した．テトラベナジンのマロン酸二ナトリウム誘発線条体DA 細胞傷害に対する作用を図2.6.2.3-1に示す．

マロン酸二ナトリウム処置によりDA 神経終末の変性が生じ，線条体DA 含量は生理食塩液処置に比べ40%まで低下したが，テトラベナジン 1.0，10 mg/kg を腹腔内に投与した群では，線条体DA 含量低下が抑制され，有意な神経保護作用が認められた．

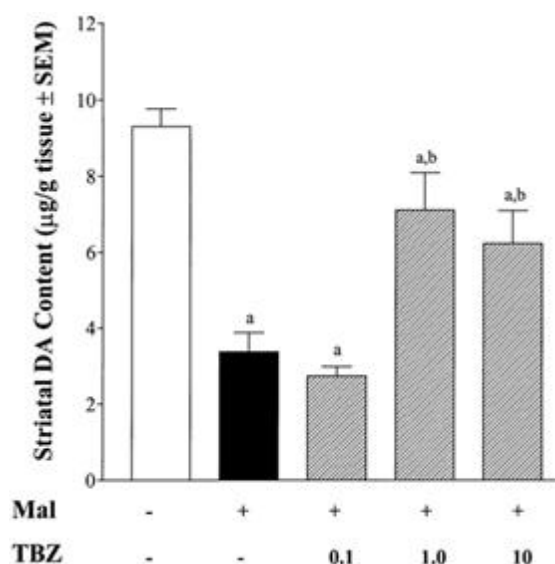


図 2.6.2.3-1 テトラベナジンのマロン酸二ナトリウム誘発線条体DA 細胞傷害に対する作用

（資料番号：4.2.1.2-1，図2を改変）

図中の数値は平均値±SEを表す（N=3～16）．a；P<0.05，Tukeyの検定（生理食塩液/生理食塩液投与群との比較）．b；P<0.05，Tukeyの検定（マロン酸二ナトリウム/生理食塩液投与群との比較）．

マロン酸二ナトリウム誘発性線条体 DA ニューロン傷害モデルにおける DA の役割を調べるため、*in vitro* で SD 系胎児ラットの中脳培養細胞を用いて検討した。培養開始 8 日後、50 mM マロン酸二ナトリウムを加え、24 時間後培地交換を行った。培地交換 3 日後³H]-DA を添加し、細胞内の DA 取り込みを測定した。テトラベナジンのマロン酸二ナトリウム誘発中脳培養細胞傷害に対する作用を図 2.6.2.3-2 に示す。

マロン酸二ナトリウム添加により 40% の DA 取り込みが阻害された。一方、マロン酸二ナトリウムを加える 1 時間前にテトラベナジン (0.01~10 μM) を添加したすると、培養細胞内の DA 取り込み低下が有意に抑制され、DA 神経保護作用が認められた。

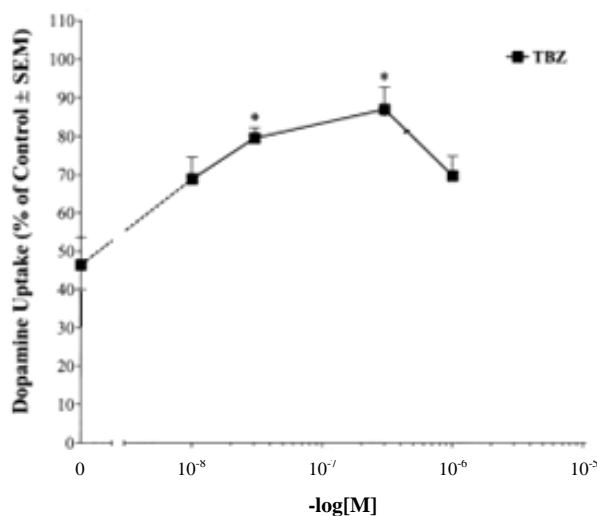


図 2.6.2.3-2 テトラベナジンによるマロン酸二ナトリウム誘発中脳培養細胞傷害に対する作用
(資料番号：4.2.1.2-1, 図 3 を改変)

図中の数値は平均値±SE を表す(N=3~4)。* ; P<0.05, Tukey の検定(マロン酸二ナトリウム処置との比較)。

2) マウスのパーキンソン病モデルにおける神経保護作用

(1) 6-ヒドロキシドパミン誘発性黒質線条体ドパミンニューロン傷害に対するテトラベナジンの作用 (公表論文, 資料番号：4.2.1.2-2 [参考資料])

6-ヒドロキシドパミン (臭化水素酸塩) (6-OHDA) は、DA 作動性ニューロン及び NA 作動性ニューロンを選択的に変性除去する神経毒のひとつで、その酸化過程においてキノン体となり、副産物としてフリーラジカルや H₂O₂ が産生される。6-OHDA を脳室内投与することにより、産生されるフリーラジカルや H₂O₂ による酸化ストレスが惹起され神経変性が生じる。このパーキンソン病動物モデルを用いて、DA 及び DA 代謝物貯蔵量低下に対するテトラベナジンの作用を検討した。

Swiss-CD1 系雄性マウスに、対照 (生理食塩液) 又はテトラベナジン 30 mg/kg を、生理食塩液又は 6-OHDA (50 μg/10 μL) 脳室内投与の 30 分前に皮下投与した。投与 14 日後にマウスを頸

椎脱臼により屠殺して線条体を摘出し、DA 量及び DA 代謝物であるジヒドロキシフェニル酢酸 (DOPAC)、ホモバニリン酸 (HVA)、3-メトキシチラミン (3-MT) 量を HPLC 法により測定した。テトラベナジンの線条体の DA 及び代謝物に及ぼす影響を表 2.6.2.3-1 に示す。

テトラベナジン 30 mg/kg の単回皮下投与では、6-OHDA 誘発性の神経毒性 (DA 及び DA 代謝物量低下) を抑制しなかった。また、チロシンヒドロキシラーゼ 阻害剤 (α -メチル-p-チロシン メチルエステル (塩酸塩))、D₂ アゴニスト (ブロモクリプチン (メタンスルホン酸塩))、D₂ アンタゴニスト (ハロペリドール) も 6-OHDA 誘発性の神経毒性に影響を及ぼさなかった。これらの結果は、6-OHDA 誘発神経毒性に DA 合成、DA シナプス小胞への取り込み、DA 受容体 (D₂) シグナルは関与しないことを示唆している。

表 2.6.2.3-1 テトラベナジンの線条体の DA 及び代謝物に及ぼす影響
(資料番号：4.2.1.2-2 [参考資料]，表 4 を改変)

処置	線条体内量 (ng/mg protein) : %コントロール			
	Dopamine	DOPAC	HVA	3-MT
生理食塩水 ip	99.6 ± 2.1	4.6 ± 0.4	10.9 ± 0.6	3.4 ± 0.3
生理食塩水 icv				
テトラベナジン sc	90.2 ± 2.2 (-9.4)	3.8 ± 0.5 (-16.3)	10.7 ± 0.5 (-0.6)	3.2 ± 0.4 (-7.0)
生理食塩水 icv				
生理食塩水 ip	48.4 ± 4.4* (-51.4)	1.9 ± 0.3* (-59.8)	7.4 ± 0.6* (-32.1)	2.4 ± 0.3 (-30.9)
6-OHDA icv				
テトラベナジン sc	35.2 ± 6.9* (-64.6)	1.5 ± 0.3* (-67.9)	5.1 ± 0.9* (-53.3)	2.3 ± 0.3 (-34.1)
6-OHDA icv				

表中の数値は平均値±SEを表す (N=13) . * ; P<0.05, Dunnett の t 検定 (生理食塩水処置/生理食塩水投与群との比較) . テトラベナジンと 6-OHDA 間の相互作用は認められなかった (2 way ANOVA) .

(2) 1-メチル-4-フェニル-1, 2, 3, 6-テトラヒドロピリジン誘発性黒質線条体ドパミンニューロン傷害に対するテトラベナジンの作用 (公表論文, 資料番号：4.2.1.2-3 [参考資料])

神経毒である 1-メチル-4-フェニル-1,2,3,6-テトラヒドロピリジン (MPTP) は脳内 DA 神経を選択的に傷害し、NA や 5-HT 神経に影響を及ぼすことが知られている。MPTP は MAO B により代謝され、1-メチル-フェニルピリジウム (MPP⁺) になる。MPP⁺ は DA 神経細胞内に選択的に取り込まれた後、ミトコンドリア内電子伝達系の複合体 I の活性を低下させ、その結果、酸化リン酸化反応が抑制される。マウスに MPTP を投与すると、線条体及び黒質内の DA やその代謝物の消失によってパーキンソン病様症状が生じる。このパーキンソン病動物モデルを用いて、DA 及び NA 貯蔵量低下に対するテトラベナジンの作用を検討した。

C57BL/6 系雄性マウスに、溶媒又はレセルピン (5 mg/kg) を腹腔内投与した 30 分後に、溶媒又は MPTP を 1.5 時間間隔で 3 回 (15 mg/kg) 腹腔内投与した。テトラベナジンの場合には、溶媒又はテトラベナジン (25 mg/kg) を腹腔内投与した 30 分後に溶媒又は MPTP を 2 時間間隔で 2 回 (15 mg/kg) 腹腔内投与した。その後、生死について観察を行い、2 週後にマウスを脊椎脱臼により屠殺して線条体と海馬を摘出し、カテコールアミン量を測定した。線条体内 DA 量及び海

馬内 NA 量に及ぼす MPTP, レセルピンとその併用投与の影響を表 2.6.2.3-2 に, テトラベナジンとその併用投与の影響を表 2.6.2.3-3 に示す.

試験期間を通じてテトラベナジン, レセルピン又は MPTP のみを処置したマウス群に死亡例は認められなかった. 対照的に, レセルピンと MPTP を投与した群では, 処置後 48 時間以内に 43% のマウスが死亡したが, テトラベナジンと MPTP を投与した群に死亡例は認められなかった.

MPTP を 1.5 時間間隔で 3 回 (15 mg/kg) 腹腔内投与すると, 2 週後に線条体 DA 量と海馬 NA 量はそれぞれ 80% 及び 41% 低下した. 一方, レセルピンのみを処置したマウス群では, 64% の線条体 DA 量減少が認められたが, 海馬 NA 量に変化はなかった. しかし, レセルピン投与後 MPTP を処置した場合, VMAT 阻害剤による抑制作用は認められず, 線条体及び海馬内カテコールアミン量がさらに減少し, 海馬 NA 量も 71% 低下した. また, テトラベナジン投与後 MPTP を処置した場合も同様に, 抑制作用は認められず線条体 DA 量は減少した.

以上より, テトラベナジンは, パーキンソン病モデルに対して神経保護作用は認められないことが示唆された.

表 2.6.2.3-2 線条体 DA 量及び海馬 NA 量に及ぼす MPTP, レセルピンとその併用の影響
(資料番号: 4.2.1.2-3 [参考資料], 表 1 を改変)

処置	ドパミン	ノルアドリナリン
コントロール	104.4 ± 4.8	3.14 ± 0.58
レセルピン	38.1 ± 3.1	3.60 ± 0.42
MPTP	21.1 ± 8.6	1.84 ± 0.14
MPTP+レセルピン	10.7 ± 2.4	0.92 ± 0.07

表中の数値は湿重量 (nmol/g) の平均値±SE を表す.

表 2.6.2.3-3 線条体 DA 量及び海馬 NA 量に及ぼす MPTP, テトラベナジンとその併用の影響
(資料番号: 4.2.1.2-3 [参考資料], 表 2 を改変)

処置	ドパミン	ノルアドリナリン
コントロール	89.67 ± 2.43	3.31 ± 0.04
テトラベナジン	96.97 ± 1.87	3.23 ± 0.05
MPTP	41.92 ± 1.32* ¹	2.51 ± 0.03* ¹
MPTP+テトラベナジン	24.98 ± 0.45* ²	2.37 ± 0.02* ¹

表中の数値は湿重量 (nmol/g) の平均値±SE を示す. *¹; P<0.05, Dunnett の t 検定 (コントロール群との比較), *²; P<0.05, Dunnett の t 検定 (MPTP 群との比較).

2.6.2.4 安全性薬理試験

テトラベナジンの安全性薬理試験として、中枢神経系、心血管系及び呼吸系に及ぼす影響を検討した。

2.6.2.4.1 中枢神経系に及ぼす影響

1) 麻酔に対する作用

(1) テトラベナジンのエタノール麻酔増強作用（公表論文：資料番号 4.2.1.3-1 [参考資料]）

マウスを用いてテトラベナジン（40 mg/kg）のエタノール麻酔増強作用をレセルピン（2 mg/kg）と比較検討した。テトラベナジン又はレセルピンを皮下投与後、種々の時間においてエタノール（4 g/kg）を腹腔内投与し、各時点 20 匹の睡眠時間を測定した。マウスにおけるテトラベナジン又はレセルピンのエタノール麻酔増強作用を図 2.6.2.4.1-1 に示す。

エタノール単独投与群の睡眠時間は 1 分を超えることはなかった。テトラベナジンはエタノールの麻酔作用を増強し、その作用は 4～5 時間持続した。レセルピンもエタノールの作用を増強したが、その作用は 48 時間以上持続した。

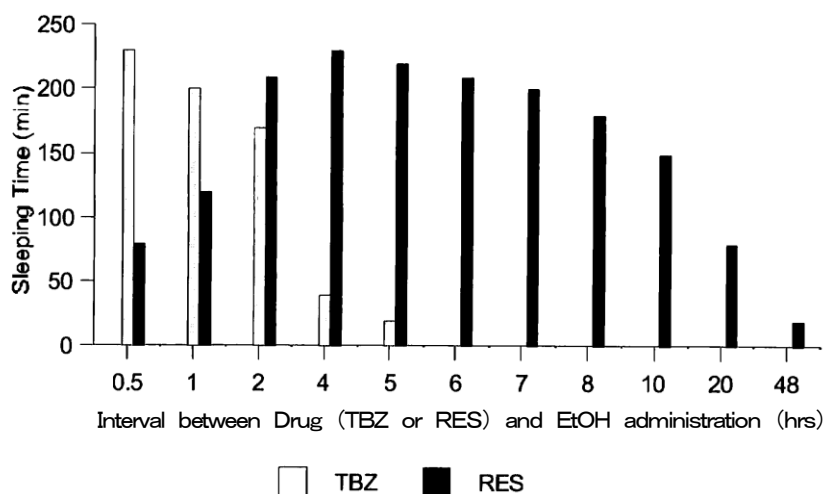


図 2.6.2.4.1-1 マウスにおけるテトラベナジン又はレセルピンによるエタノール麻酔増強作用
（資料番号：4.2.1.3-1，図 3 を改変）

(2) テトラベナジンのヘキソバルビタール麻酔増強作用（公表論文：資料番号 4.2.1.3-2 [参考資料]）

テトラベナジン（10, 20, 40 mg/kg, 腹腔内投与）によるヘキソバルビタール麻酔増強作用を検討した。各群 30 匹のマウスにテトラベナジン投与後、ヘキソバルビタールナトリウム（50 mg/kg）を腹腔内投与し、各群の睡眠時間を測定した。

試験結果を表 2.6.2.4.1-1 に示す。バルビツール酸単独投与群の平均睡眠時間は 28 分であった。テトラベナジンはヘキソバルビタール麻酔増強作用を示し、その作用は用量依存的であった。40 mg/kg 投与群では顕著な増強作用を示した。

表 2.6.2.4.1-1 マウスにおけるテトラベナジンによるヘキソバルビタール麻酔増強作用
(資料番号 4.2.1.3-2 [参考資料] の表 1 を改変)

	ヘキソバルビタール	テトラベナジン		
		10 mg/kg	20 mg/kg	40 mg/kg
動物数	30	30	30	30
平均睡眠持続時間 (分)	28	35	61	160

2) テトラベナジンの体温に及ぼす影響 (公表論文, 資料番号: 4.2.1.3-3 [参考資料], 公表論文)

テトラベナジンの体温下降作用を検討するため NA のプロドラッグである L-threo-DOPS (以下, LTD) を用いて以下の検討を行った. 試験には dd 系マウス (雄, 体重 22~26 g) を用い, 体温センサーを直腸内の一定の所まで挿入後, 一定の温湿度 (24±1℃, 相対湿度 55±5%) の条件下で測定した.

a) テトラベナジンの単独作用及び L-threo-DOPS との併用作用

テトラベナジンは塩酸溶液に溶かした後に精製水で使用濃度に希釈した. LTD は 0.5% メチルセルロース溶液で懸濁して必要濃度に調製した. また, NA は注射用製剤を生理食塩液で使用濃度に希釈して使用した. マウス各群 10 匹にテトラベナジン 40 mg/kg を腹腔内投与し, その直後に LTD (200, 400, 800 mg/kg) 又は溶媒を腹腔内投与し, 薬物投与の直前と薬物投与後 60 分後に直腸温の変化を検討した. 試験結果を表 2.6.2.4.1-2 に示す

表 2.6.2.4.1-2 テトラベナジン誘発体温下降に対する L-threo-DOPS の作用
(資料番号 4.2.1.3-3 [参考資料] の表 2 を改変)

投与群	例数	体温の変化 (℃, 平均値±SE)
対 照	10	-3.3 ± 0.3
L-threo-DOPS	200 mg/kg	-1.0 ± 0.3**
	400 mg/kg	-0.3 ± 0.2**
	800 mg/kg	+0.3 ± 0.4**

** : p<0.01 (対照群との比較, Student t 検定)

対照群ではテトラベナジンの投与により 3.3℃の体温下降が認められたが, LTD は 200~800 mg/kg の用量で, 用量依存的かつ有意にテトラベナジン誘発体温下降を抑制した.

また LTD 400 mg/kg (腹腔内投与) の投与後 4 時間までの経時変化を検討した. 試験結果を図 2.6.2.4.1-2 に示す.

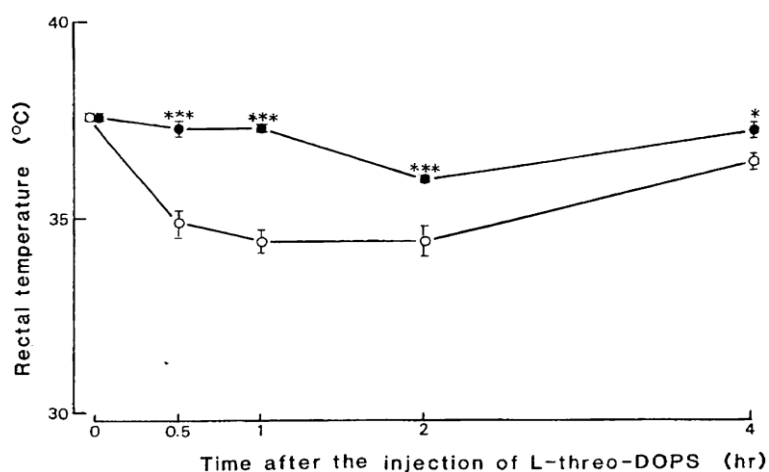


図 2.6.2.4.1-2 テトラベナジン誘発体温下降に対する L-threo-DOPS の作用
(資料番号 4.2.1.3-3 [参考資料] の図 5 を改変)

図中の数値は平均値±SE (N=10) を表す。○：対照群，●：LTDOPS 400 mg/kg 群，*：p<0.05，***：p<0.01 (対照群との比較，Student t 検定)。

LTD は、400 mg/kg (腹腔内投与) の用量で投与後 4 時間までテトラベナジン誘発体温下降に対し有意な抑制作用を示した。

b) ノルアドレナリン脳室内投与の影響

テトラベナジン体温下降における NA の役割を調べるため、マウス各群 8 匹にテトラベナジンの 40 mg/kg を腹腔内投与 30 分後に NA (1 又は 5 µg/0.02 mL/マウス) を脳室内投与 (対照群には生理食塩液) して、その 15, 30, 60 及び 120 分後に体温の測定を行った。試験結果を図 2.6.2.4.1-3 に示す。

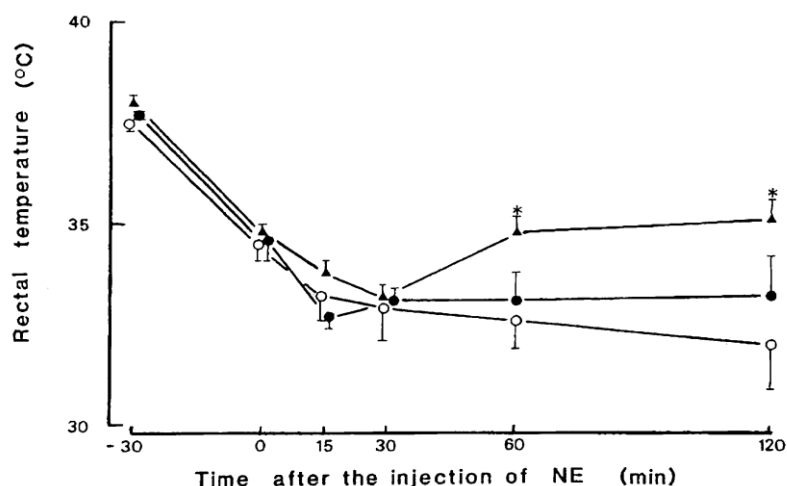


図 2.6.2.4.1-3 テトラベナジン誘発体温下降に対するノルアドレナリンの作用
(資料番号 4.2.1.3-3 [参考資料] の図 6 を改変)

図中の数値は平均値±SE (N=8) を表す。NE：ノルエピネフリン (NA と同義)，○：対照群，●：NA 1 µg/脳室内投与群，▲：NA 5 µg/脳室内投与群，*：p<0.05 (対照群との比較，Student t 検定)。

対照群では生理食塩液脳室内投与後も体温低下は持続したが、NA 1 µg/マウスを脳室内投与群では 30 分後に体温下降が止まり、また NA 5 µg/マウス投与群では 30 分後に体温下降が止まり、その後は上昇に転じ、60 分後以降は対照群に比べて有意な作用が認められた。

c) 脳内ノルアドレナリン量に及ぼすテトラベナジン単独、及び L-threo-DOPS 併用の影響

テトラベナジン投与により体温下降を誘発したマウスにおける脳内 NA 量の変化と、脳内 NA 含量に及ぼす LTD の作用について検討を行った。マウス各群 8 匹にテトラベナジン 40 mg/kg を腹腔内投与（対照群には溶媒）した直後に LTD 400 mg/kg を腹腔内投与（対照群には溶媒を同量投与）し、その 1 時間後にマウスを屠殺して脳を摘出し、脳内 NA 量を測定した。試験結果を表 2.6.2.4.1-3 に示す。

表 2.6.2.4.1-3 テトラベナジン投与マウスの脳内 NA 含量に対する L-threo-DOPS の作用
(資料番号 4.2.1.3-3 [参考資料] の表 4 を改変)

投与群	例数	脳内 NA 含量 (µg/g 組織重量, 平均値±SE)
対 照	8	0.61 ± 0.01
テトラベナジン 40 mg/kg	8	0.08 ± 0.01
テトラベナジン 40 mg/kg+LTD 400 mg/kg 併用	8	0.12 ± 0.01**

** : p<0.01 (テトラベナジン投与群に対して, Student t 検定) .

テトラベナジン 40 mg/kg 腹腔内投与により脳内 NA 量は低下したが、LTD 400 mg/kg (腹腔内投与) の併用により、脳内 NA 含量の低下は有意に抑制された。

以上の結果より、テトラベナジンによる体温下降は、脳内の NA 量の涸渇によることが示唆された。

3) 自発脳波に対する作用 (公表論文, 資料番号 4.2.1.3-4, [参考資料])

ウサギを用いた試験で、テトラベナジン 40 mg/kg の投与により、紡錘波に続く高振幅徐波 (睡眠脳波) が誘発され、その作用は 4 時間持続した。

4) 報酬効果 (条件付け) に対する作用 (公表論文, 資料番号 4.2.1.3-5, [参考資料], 公表論文, 資料番号 4.2.1.3-6 [参考資料])

(1) 脳内自己刺激で誘導された報酬効果に対する作用 (公表論文, 資料番号 4.2.1.3-5, [参考資料])

Wistar 系雄性ラットに、電極埋め込み手術を行った後、レバー押しにより 0.3 秒間脳内に電流が流れる試験系により条件付け (報酬効果) を行った。試験結果を図 2.6.2.4.1-4 に示す。

1 分間に平均 76.8 回レバーを押すように条件付けされたラットに、テトラベナジン 2 mg/kg を腹腔内投与 (N=4) すると、レバー押し回数が 1 分間に平均 3 回と有意に減少した。この作用はテトラベナジン投与後、15~20 分から発現し、少なくとも 2 時間、全個体で持続した。

このテトラベナジンによる報酬効果抑制作用は、*d*-アンフェタミン（硫酸塩）1 mg/kg の腹腔内投与（テトラベナジン投与 30 分後）により拮抗された（1 分間に平均 75.5 回に増加）。

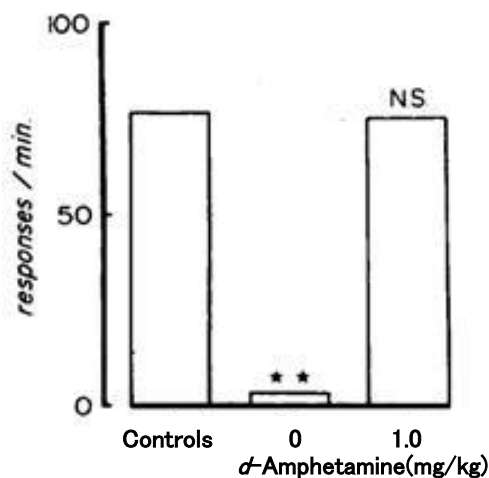


図 2.6.2.4.1-4 テトラベナジンによる報酬効果抑制作用に対する *d*-アンフェタミンの作用

（資料番号：4.2.1.3-5 [参考資料]，図 2 を改変）

縦軸；レバー押し回数の平均値 (N=4)，**； $P < 0.01$ ，Newman-Keuls 検定（コントロールとの比較），NS；有意差なし，Newman-Keuls 検定（コントロールとの比較）。

(2) 自然報酬効果に対する作用（公表論文，資料番号 4.2.1.3-6，[参考資料]）

SD 系雄性ラットをオペラント学習チャンバーに入れ，水を強化因子としてレバー押し訓練をし，水獲得行動を学習させた後，水獲得後 17.5 秒以上待たないと次の水獲得が出来ない条件付けを行った。強化効果を獲得したラットに，試験 1 時間前に生理食塩水又はテトラベナジン（メタンスルホン酸塩）0.25～4 mg/kg（投与量はフリー体に換算）を腹腔内投与し，反応回数率と報酬効果達成率を求め，テトラベナジンの自然報酬効果に対する作用を検討した。その結果を図 2.6.2.4.1-5 に示す。

テトラベナジンの投与量と反応回数率及び報酬効果達成率の間には相関があり ($r^2=0.81$ 及び 0.88)，反応回数率はテトラベナジン 2 及び 4 mg/kg 投与により，それぞれ -20% と -90% に減少した。報酬効果達成率に対しても同様の作用を示した。

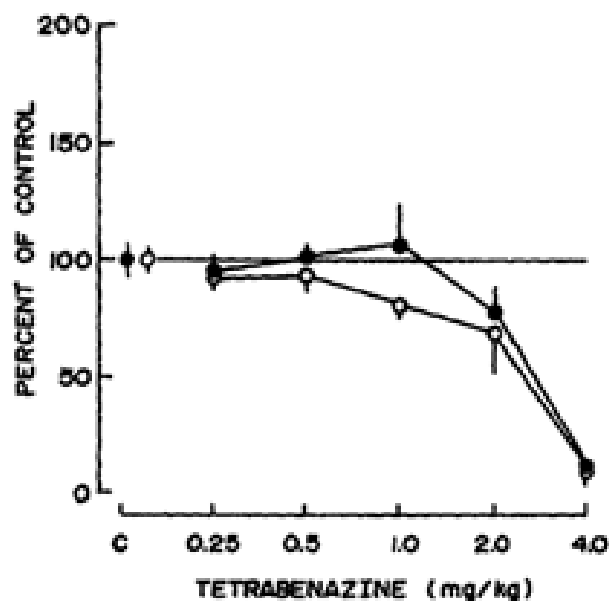


図 2.6.2.4.1-5 テトラベナジンの自然報酬効果に対する作用

(資料番号：4.2.1.3-6 [参考資料], 図 4 を改変)

生理食塩水処置群の反応回数率 (1 分間あたり 3.33 ± 0.04 回) 及び報酬効果達成率 (1 分間あたり 2.20 ± 0.18 回) を 100% として算出した。●; 反応回数率, ○; 報酬効果達成率。図中の数値は平均値 \pm SE を表す。

同じ試験条件でメチルフェニデート (塩酸塩) ($2.5 \sim 20$ mg/kg) や *d*-アンフェタミン (硫酸塩) ($0.375 \sim 3$ mg/kg) を投与した時の自然報酬効果に対する作用を図 2.6.2.4.1-6 に示す。

両薬物の投与量と報酬効果達成率の間には相関があり (メチルフェニデート: $r^2=0.84$, *d*-アンフェタミン: $r^2=0.87$), 報酬効果に対して減少作用を示したが, 反応率は増加したため, レバー押し間隔は短くなった。

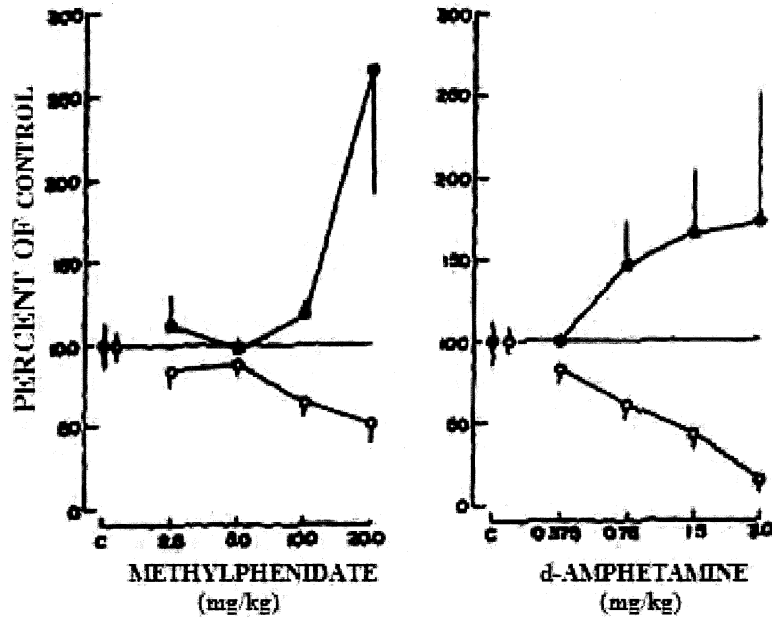


図 2.6.2.4.1-6 メチルフェニデート (2.5~20 mg/kg) 又は *d*-アンフェタミンの自然報酬効果に対する作用

(資料番号 : 4.2.1.3-6 [参考資料], 図 3 を改変)

生理食塩水処置群の反応回数率 (1 分間あたり 3.33 ± 0.04 回) 及び報酬効果達成率 (1 分間あたり 2.20 ± 0.18 回) を 100% として算出した。● ; 反応回数率, ○ ; 報酬効果達成率。図中の数値は平均値 \pm SE を示す。

以上の結果より, テトラベナジンの報酬効果に対する抑制作用が示された。

- 5) 一般症状に及ぼす作用 (公表論文 : 資料番号 4.2.1.3-2 [参考資料], 資料番号 : 4.2.1.3-4 [参考資料], 公表論文, 資料番号 : 4.2.1.3-10 [参考資料], 公表論文, 資料番号 : 4.2.1.3-11 [参考資料] 公表論文, 資料番号 : 4.2.1.3-12 [参考資料], 公表論文, 資料番号 : 4.2.1.3-13 [参考資料], 公表論文, 資料番号 : 4.2.1.3-14 [参考資料], 公表論文, 資料番号 : 4.2.1.4-6 [参考資料], 報告書番号 : ██████████-102, 資料番号 : 4.2.3.2-2, 報告書番号 : ██████████ 19371, 資料番号 : 4.2.3.2-4, 報告書番号 : ██████████ 20730, 資料番号 : 4.2.3.2-5, 報告書番号 : ██████████ 14623, 資料番号 : 4.2.3.7-5)

テトラベナジンの中枢神経系に及ぼす作用 (運動量, 行動変化, 協調性, 感覚・運動反射反応) を検討するため, テトラベナジン投与後のマウス, ラット, ウサギ, イヌ, ネコ, サルにおける一般症状の観察 1) 行動的側面 (運動性, 気分, 認知力), 2) 神経学的側面 (中枢興奮, 反射, 筋緊張), 3) 自律神経系側面 (分泌微候) の評価を行った。一般症状の観察において作用が認められた最大無作用量及び発現用量を表 2.6.2.4.1-4 に示す。

表 2.6.2.4.1-4 一般症状の観察において作用が認められた最大無作用量及び発現用量

一般症状の観察		動物種	投与経路	最大無作用量 (mg/kg)	発現用量 (mg/kg)
行動的	運動量減少	イヌ/ネコ	経口	-	10
		マウス/ラット		10	30
		サル		2.5	10
	鎮静	ラット	腹腔	-	50
神経学的	条件回避 (無刺激)	ラット	腹腔	-	4
	条件回避 (光刺激)			-	4
	条件回避 (音刺激)			-	4
	挙尾	マウス	皮下	60	-
	跳躍	マウス	皮下	60	-
	攻撃行動	ラット	経口	15	30
	自発行動の亢進	ラット	経口	-	15
	音刺激けいれん	ラット	皮下	20	40
	振戦	ネコ	腹腔	15	20
	眼瞼下垂	ラット	皮下	-	5
自律神経系	流涎	イヌ	静脈	-	35
		ウサギ		-	50
		ラット		-	25
		ウサギ		-	50

- : 不明

(1) 行動学的観察

イヌ、ネコに 10~20 mg/kg のテトラベナジンを経口投与した時、運動量の減少が認められ、その作用は 5~6 時間持続した (資料番号 4.2.1.3-10)。マウス、ラット、サルにおいても同様の所見が用量依存的に認められ、マウス、ラットにおいては 30 mg/kg 経口投与により、サルでは 10 mg/kg 経口投与により自発運動の低下が認められ、高用量では意識消失を伴わない無動状態が認められた (資料番号 4.2.3.2-2, 4.2.3.2-4, 4.2.3.2-5, 4.2.3.7-5)。また、ラットの 50 mg/kg のテトラベナジン腹腔内投与により、セロトニン涸渇作用に起因した鎮静作用を誘導した (資料番号 4.2.1.3-14)。さらに、4 mg/kg 腹腔内投与のテトラベナジンはラットにおける無刺激、光刺激及び音刺激による条件回避反応を抑制した (資料番号 4.2.1.3-10)。

(2) 神経学的観察

マウスにおけるテトラベナジン 60 mg/kg 皮下投与は、挙尾や跳躍行動などの興奮作用を誘導しないが (資料番号 4.2.1.3-11 及び 4.2.3.2-2)、ラットのテトラベナジン 30 mg/kg 経口投与後において、攻撃行動を示す個体が認められ (資料番号 4.2.3.2-5)、15 mg/kg 経口投与群において投与直前に自発行動の亢進を示す個体が認められた (資料番号 4.2.3.2-4)。音に対して感受性が高いラットを用いて音刺激けいれんを誘導した場合、テトラベナジン 20 mg/kg 皮下投与ではけいれん増強作用は認められず、40, 80 及び 150 mg/kg 皮下投与は、3/20, 9/20 及び 19/20 の音刺激けいれんを抑制した (資料番号 4.2.1.3-2)。ネコに 5, 10, 15 及び 20 mg/kg 腹腔内投与した場合、20 mg/kg

腹腔内投与群において、投与後 5~10 分以内に自発運動の低下と、30 分以内に体温低下に依存しない振戦誘発作用が認められ、これらの作用は 2.5 時間持続した（資料番号 4.2.1.3-12）。ラットにテトラベナジン 5 mg/kg を皮下投与し、眼瞼下垂の程度（0：完全に開眼（眼球突出を含む）、1：1/4 閉眼、2：1/2 閉眼、3：3/4 閉眼、4：完全閉眼）を評価した場合、投与 10~15 分後から眼瞼下垂が認められ、投与 30~60 分後では全例がスコア 3~4 を示した。このスコアは約 2 時間持続した（資料番号 4.2.1.4-6）。またウサギに 25 mg/kg のテトラベナジン静脈内投与を行い、さらに 50 mg/kg の追加投与を行った場合、自発運動の低下に伴い眼瞼下垂、瞬膜の狭縮及び縮瞳が認められ、この作用は 0.5 mg/kg のニコチン酸により抑制された（資料番号 4.2.1.3-2）。同様の作用はテトラベナジン 25 mg/kg 皮下投与のイヌにおいても認められた（資料番号 4.2.1.3-2）。さらにウサギの 50 mg/kg テトラベナジン静脈内投与は光反射による縮瞳反応に対して増強作用を示した（資料番号 4.2.1.3-13）。ラットにおいてテトラベナジンとレセルピンの筋緊張に対する作用を比較した場合、テトラベナジンは 25 mg/kg の皮下投与により、またレセルピンは 5 mg/kg の皮下投与により筋緊張作用が認められ、その作用はレセルピン投与群が長時間持続した（資料番号 4.2.1.3-4）。

(3) 自律神経系観察

無麻酔下のイヌに 35 mg/kg のテトラベナジンを静脈内投与した場合流涎が認められ、その作用は投与後 1 時間で最大となり約 5 時間後に消失した。また、その作用はクロロイソндаミン（神経節ニコチン受容体遮断薬）により抑制された（資料番号 4.2.1.3-13）。

以上の結果より、テトラベナジンはモノアミン溜渇作用により一般症状の観察において作用を示すが、その作用発現用量は薬効量（0.5~2.5 mg/kg、皮下投与）と比較すると高用量であり、またモノアミン溜渇作用に起因する作用以外に非特異的な作用は認められなかった。

2.6.2.4.2 心血管系に及ぼす影響

1) hERG チャネル阻害作用（報告書番号：██████████、資料番号：4.2.1.3-7）

hERG cDNA (human-ether-a-go-go cDNA) をトランスフェクトした HEK293 細胞を用い、*in vitro* における hERG チャネル電流 (IKr, 急速活性化遅延整流 K 電流) に対するテトラベナジン、 α -HTBZ 及び β -HTBZ の作用を検討した。

テトラベナジンの hERG 電流阻害作用（平均値 \pm SE）は、2.5 μ M (776.4 ng/mL)、27.3 μ M (8664.0 ng/mL)、91.3 μ M (28950.0 ng/mL) 及び 302.9 μ M (96030.0 ng/mL) の濃度において、それぞれ 8.0 \pm 3.0% (N=3)、25.9 \pm 3.8% (N=3)、53.4 \pm 1.5% (N=3) 及び 77.9 \pm 2.3% (N=3) であり、IC₅₀ は 79.1 μ M (25108.7 ng/mL) であった。

α -HTBZ の hERG 電流阻害作用は、2.6 μ M (839.8 ng/mL)、8.1 μ M (2580.0 ng/mL)、25.8 μ M (8237.0 ng/mL) 及び 96.5 μ M (30780 ng/mL) の濃度において、それぞれ 17.5 \pm 1.9% (N=3)、43.5 \pm 0.9%

(N=3), $65.4 \pm 2.8\%$ (N=4) 及び $89.6 \pm 1.8\%$ (N=3) であり, IC_{50} は $12.0 \mu\text{M}$ (3832.8 ng/mL) であった.

β -HTBZ の hERG 電流阻害作用は, $0.8 \mu\text{M}$ (267.0 ng/mL), $2.5 \mu\text{M}$ (797.9 ng/mL), $8.5 \mu\text{M}$ (2719.0 ng/mL) 及び $27.1 \mu\text{M}$ (8648.0 ng/mL) の濃度において, それぞれ $13.5 \pm 0.8\%$ (N=3), $27.0 \pm 1.6\%$ (N=3), $58.5 \pm 0.9\%$ (N=3) 及び $78.9 \pm 1.5\%$ (N=3) であり, IC_{50} は $6.4 \mu\text{M}$ (2044.2 ng/mL) であった.

陽性対照であるテルフェナジン (60 nM) の hERG 電流阻害作用は, $87.2 \pm 2.8\%$ (N=2) であった.

hERG 試験におけるテトラベナジン, α -HTBZ 及び β -HTBZ の IC_{50} 値は, ヒトに 50 mg のテトラベナジンを投与した場合の遊離型テトラベナジン (0.2 ng/mL 未満), α -HTBZ 及び β -HTBZ の C_{max} 値 (血漿タンパク結合率で補正した値 α -HTBZ : 30.8 ng/mL , β -HTBZ : 16.6 ng/mL) より 100 倍以上高かった.

2) 無麻酔下犬におけるテレメトリー法によるテトラベナジンの心血管循環及び心電図パラメータに及ぼす作用 (報告書番号 : No. 2418/001, 資料番号 : 4.2.1.3-8)

無麻酔下ビーグル犬 (雄性, 2~3 年齢, N=4) を用い, テトラベナジンを単回経口投与した時の, 収縮期血圧, 拡張期血圧, 平均血圧, 心拍数, 左心室圧, dP/dt_{max} , 第 II 誘導による心電図パラメータ (RR, QRS, PR, QT, QT_c (Fridericia 法で補正) の各 interval, R 波の高さ, base line との差) に及ぼす作用を, テレメトリー法で検討した. 試験はクロスオーバーで実施し, 少なくとも 7 日間以上の休薬期間を設けた. テトラベナジンはゼラチンカプセルにより 5, 10, 20 mg/kg の 3 用量を経口投与した. プラセボ群には空のゼラチンカプセルを投与した. 心血管循環パラメータ及び心電図パラメータの測定は, 投与前 30 分から投与後 22 時間まで実施した. テトラベナジン 5, 10, 20 mg/kg を無麻酔下で雄性犬に経口投与した時, プラセボ投与群と比較して動脈圧や左心室圧に著しい変化は見られなかった.

5 mg/kg 投与群では, 心血管循環パラメータにおいて著しい変化は認められなかった.

10 mg/kg 群では, 心拍数と dP/dt_{max} に増加が認められた. この増加は投与後 3~4 時間から認められ, 約 5 時間持続した. 心拍数と dP/dt_{max} は投与後 9~10 時間で投与前の値に戻った. この作用はプラセボ群との間に有意差は見られなかった.

20 mg/kg 投与群では投与直後に中等度の心拍数の増加及び dP/dt_{max} の増加が認められた (この作用はプラセボ群にも認められる). 頻脈と dP/dt_{max} の増加は投与 90 分頃から認められ, 投与後約 10 時間まで持続した. 平均 dP/dt_{max} は 3109 mmHg/s の投与前の値から 6119 mmHg/s まで上昇した. dP/dt_{max} の増加は, 左心室圧に有意な増加が認められないことから, 頻脈のためと推察された. この dP/dt_{max} の増加作用はプラセボ群に比べ有意であった.

心電図パラメータではテトラベナジン投与群において心拍数増加による RR 間隔の変化以外に著しい変化はなく, 心電図波形変化も認められなかった. QT_c に対する影響は認められなかった.

無麻酔下犬におけるテレメトリー法によるテトラベナジンの dP/dt_{max} に及ぼす作用を図 2.6.2.4.2-1 に示す。

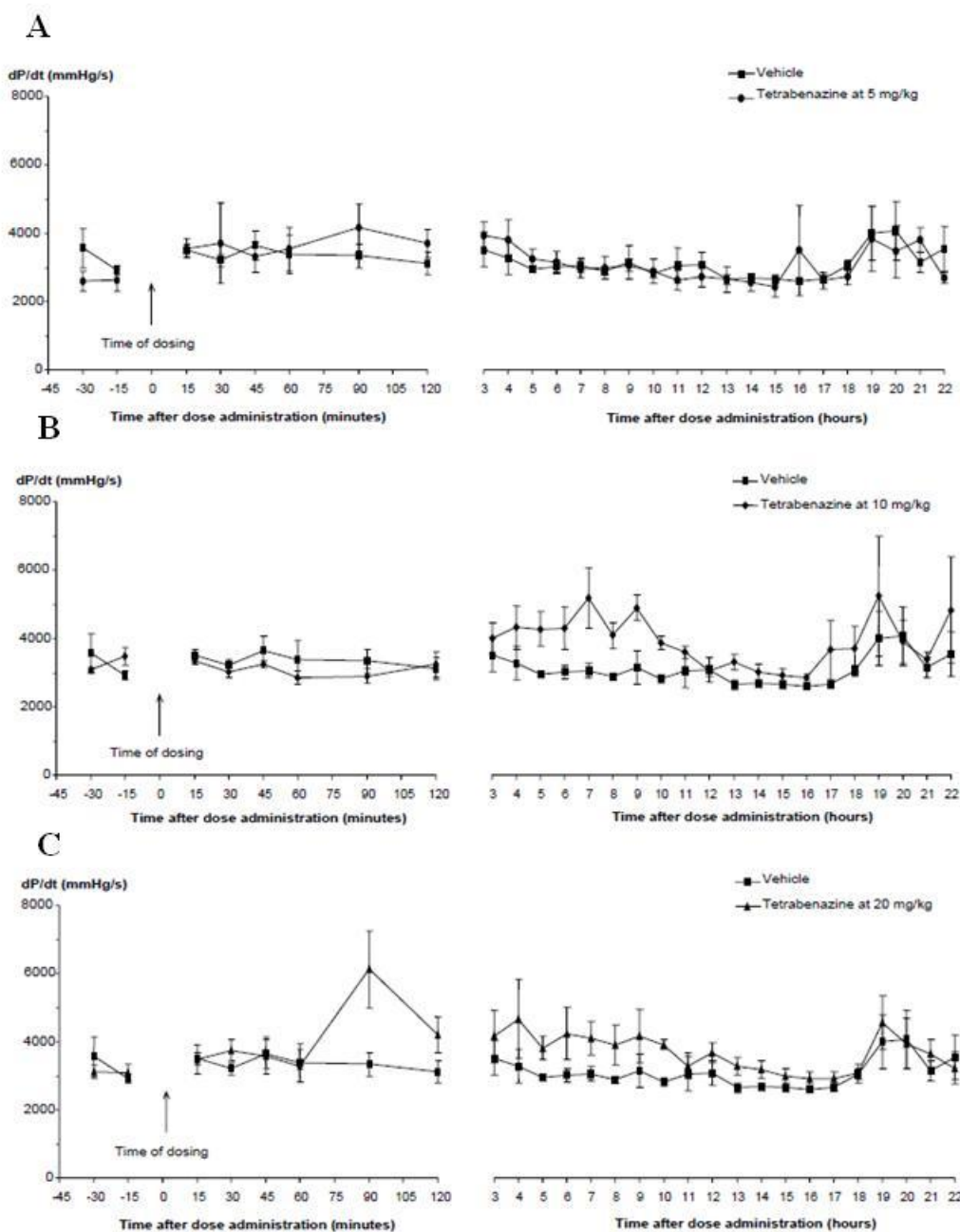


図 2.6.2.4.2-1 テレメトリー法によるテトラベナジンの dP/dt_{max} に及ぼす作用

(資料番号：4.2.1.3-8, 図 7, 8, 9 を改変)

図中の数値は平均値±SE (N=4) を表す。A：テトラベナジン 5 mg/kg, B：テトラベナジン 10 mg/kg, C：テトラベナジン 20 mg/kg

2.6.2.4.3 呼吸器系に及ぼす影響

1) 無拘束ラットにおける全身プレチスモグラフィ法によるテトラベナジンの呼吸機能に及ぼす作用 (報告書番号 : No. 2418/002, 資料番号 : 4.2.1.3-9)

雄性 SD ラット (N=6) を用い、無拘束下において全身プレチスモグラフィ法によりテトラベナジンの呼吸器系に及ぼす作用を検討した。

ラットを試験チャンバーに少なくとも 1 時間以上馴化させた後、テトラベナジン 5, 15, 30 mg/kg の 3 用量を経口投与し、対照には溶媒 (0.1% Tween 80 と 0.5% カルボキシメチルセルロースを含む蒸留水) を投与した。投与 30 分前に 2 回基準値を測定し、4 時間に亘って 15 分間隔で呼吸パラメータ (1 回換気量, 呼吸数, 分時換気量) の測定・記録を行った。投与直後、対照を含む全群において投与前基準値と比較して僅かな 1 回換気量の上昇 (13~25%) が認められた。

5 mg/kg 投与群では対照と比較して、呼吸パラメータに有意な変化は認められなかった。

15, 30 mg/kg 投与群では、1 回換気量の増加 (それぞれ 25%, 45%) と呼吸数の減少 (それぞれ 24%, 20%) が認められ、試験期間中持続した。これらの変化は、分時換気量が全体的に僅かに増加していることによるものと考えられる。

15 mg/kg 群と 30 mg/kg 群の 1 回換気量は、投与前基準値と各時点における測定値の差から算出した曲線下面積を指標とした時、対照群と比較して、いずれも有意に増加した。呼吸数の減少は対照群との間に有意差は認められなかった。

ラットにおける全身プレチスモグラフィ法によるテトラベナジンの 1 回換気量に及ぼす作用を図 2.6.2.4.3-1 に示す。

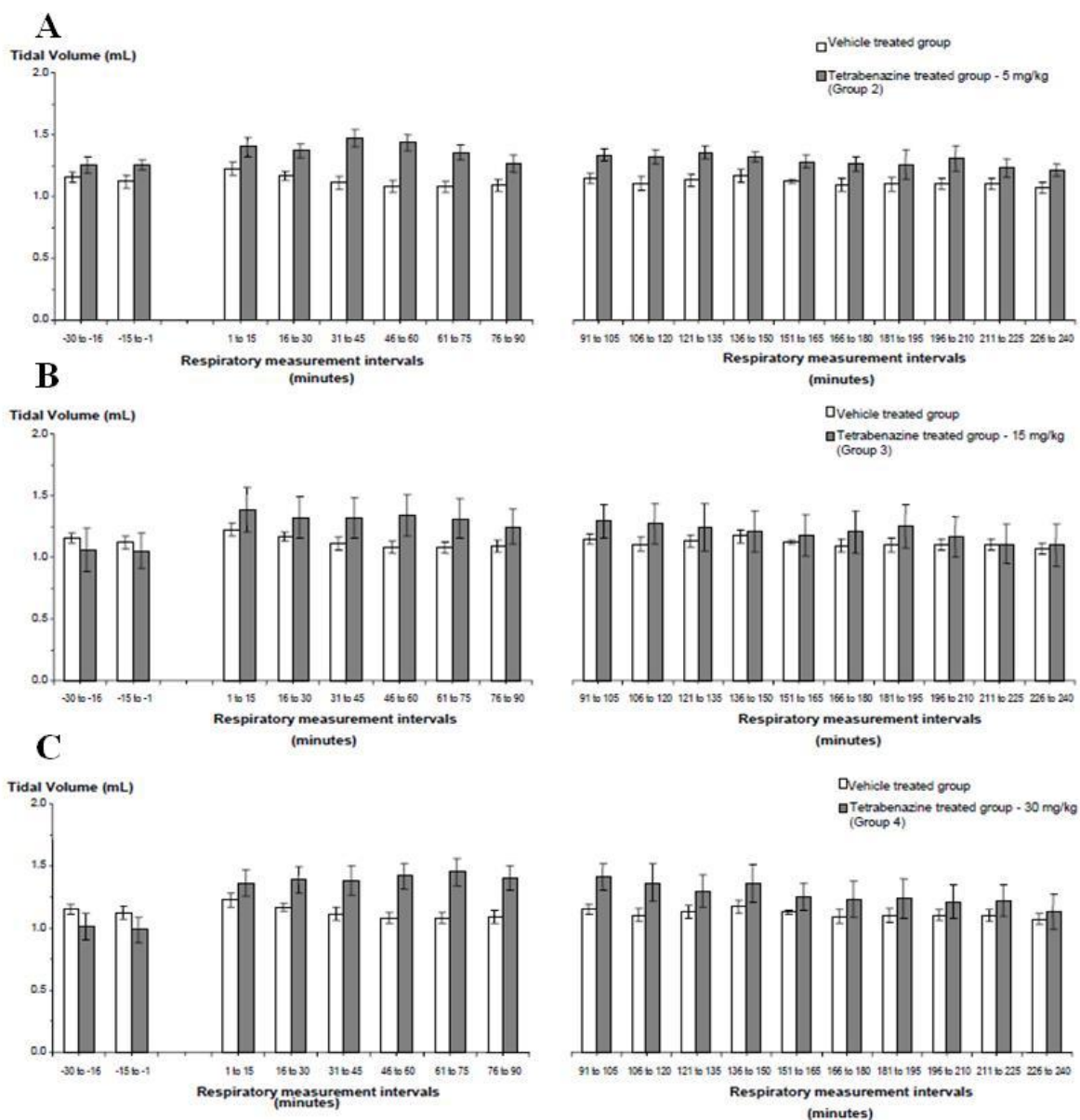


図 2.6.2.4.3-1 全身プレチスモグラフィ法によるテトラベナジンの1回換気量に及ぼす作用
(資料番号：4.2.1.3-9, 図 1, 2, 3 を改変)

図中の数値は平均値±SE (N=5~6) を表す。A：テトラベナジン 5 mg/kg, B：テトラベナジン 15 mg/kg, C：テトラベナジン 30 mg/kg.

2.6.2.5 薬力学的薬物相互作用試験

ハンチントン病患者において、自殺念慮を伴う抑うつや攻撃的行動などの精神症状が認められるため、抗うつ薬や抗不安薬が処方される。薬力学的相互作用試験として、抗うつ薬や抗不安薬のテトラベナジンに及ぼす影響を検討した。

1) リチウムとの相互作用（公表論文，資料番号：4.2.1.4-1 [参考資料]，公表論文）

リチウムは最も古い双極性障害の治療薬であり、気分安定薬としての作用に加え抗うつ薬の増強治療薬として有効であるが、その作用機序は不明である。テトラベナジンとリチウムの相互作用を ddY 系マウス（雄，リチウム投与開始時の体重 18~21 g）を用いて検討した。テトラベナジン（塩酸塩）と塩化リチウムは精製水に溶解して所定濃度に調製し、対照群には生理食塩液を投与した。テトラベナジンの投与容量は 0.1 mL/10 g，塩化リチウムの投与容量は 0.1 mL/マウスとした。

マウスに塩化リチウム 22, 67, 200 mg/kg を 1 日 1 回，計 21 日間反復皮下投与し，1, 7, 14 及び 21 日目の薬物投与終了 2 時間後にテトラベナジン 5 mg/kg を皮下投与して，オープンフィールド装置で自発運動量の変化を調べた。試験結果を図 2.6.2.5-1 に示す。

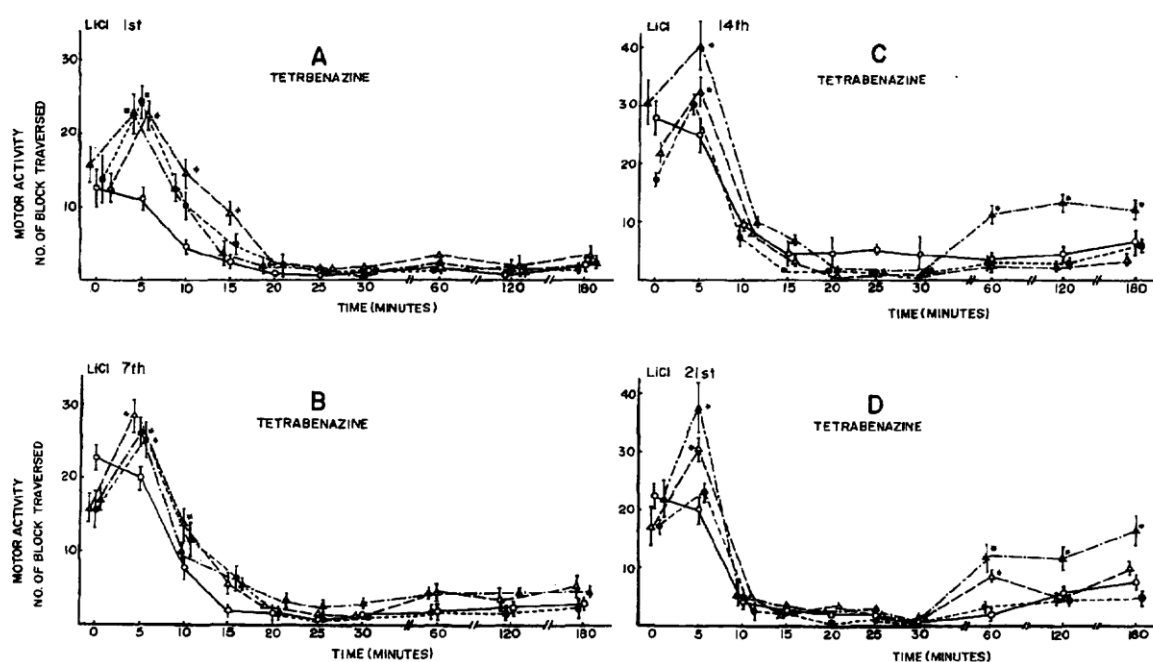


図 2.6.2.5-1 テトラベナジン誘発運動量低下に対するリチウムの作用

(資料番号 4.2.1.4-1 [参考資料] の図 4 を改変)

○：対照，●：塩化リチウム 22 mg/kg 群，△：塩化リチウム 67 mg/kg 群，▲：塩化リチウム 200 mg/kg 群。
A：1 日目，B：7 日目，C：14 日目，D：21 日目にそれぞれ試験を行った。図中の数値は平均値±SE (N=10) を表す。*：p<0.05 (対照群との比較，t 検定)。

テトラベナジン 5 mg/kg 皮下投与後，対照群では連続的な自発運動量の減少が認められ約 3 時間持続した。塩化リチウム投与群ではテトラベナジン投与 5 分後をピークとして一過性の自発運

動量増加が観察された後に対照群と同様の運動量低下が認められた。しかし、リチウムの投与期間及び用量に依存して、投与後 60 分以降に、テトラベナジン誘発自発運動量低下から早く回復する作用が認められた。

リチウムを単回投与した場合、テトラベナジン誘発自発運動量低下作用に対して有意に早い回復作用は認められなかったが、反復投与により、回復が早くなる作用が認められるようになった。テトラベナジン誘発自発運動量低下作用に対するリチウムのこの作用の機序は不明であるが、リチウムはメタンフェタミンやハロペリドールによる自発運動量増加作用にも抑制作用を示すことから、DA ニューロンのシナプス前に作用して、シナプスの異常な活性を正常化する働きがあることが推察された。

2) メタンフェタミンとの相互作用（公表論文，資料番号：4.2.1.4-2 [参考資料]，公表論文，資料番号：4.2.1.4-3 [参考資料]）

精神刺激剤メタンフェタミンは小胞内 DA の局在を変化させ、細胞内又はシナプス間隙内 DA 量を増大させる。その後ミトコンドリアの酸化ストレスを誘発し、細胞傷害を引き起こす。そこでテトラベナジンとメタンフェタミン（以下、METH）との相互作用を検討した。

(1) ラット線条体シナプス標本におけるメタンフェタミンのドパミン取り込み及び $[^3\text{H}]$ -ジヒドロテトラベナジン結合に及ぼす作用（公表論文，資料番号：4.2.1.4-2 [参考資料]）

SD 系ラット（雄，体重 280~330 g）に METH 10 mg/kg（フリー体に換算）を 2 時間間隔で 4 回皮下投与（対照群には生理食塩液 1 mL/kg を皮下投与）し、その後 1 又は 24 時間にラットを屠殺して線条体シナプス小胞標本作製し、 $[^3\text{H}]$ -DA 取り込み作用とジヒドロテトラベナジン結合について検討した。

線条体シナプス小胞は、20,000 g（20 分間）及び 100,000 g（45 分間）、超遠心分離によって分画し、 $[^3\text{H}]$ -DA（最終濃度 30 nM）の存在下に 3 分間インキュベーションした。非特異的な DA 取り込みは、シナプス小胞試料を ATP 非存在下、4°C でインキュベーションして求めた。

ジヒドロテトラベナジン結合試験は、試料（タンパク量 2.5 μg 以下に調製）を 2 nM（最終濃度）の $[^3\text{H}]$ -ジヒドロテトラベナジン存在下に、25°C で 10 分間インキュベーションして行った。非特異的結合はテトラベナジン 20 μM と共にインキュベーションして求めた。試験結果を図 2.6.2.5-2 に示す。

METH 処置により、DA 取り込みは 1 時間後で 65% 低下し、この低下は 24 時間後も持続していた。また $[^3\text{H}]$ -ジヒドロテトラベナジン結合も METH 処置により低下した。

DA 作動性ニューロンに存在する VMAT2 には、5-HT ニューロンも存在するので、5-HT 神経毒であるパラクロロアンフェタミンをラットに投与した後、DA 取り込みへの影響を調べたところ、有意な影響は認められなかった。これらのことから、本試験で認められた DA 取り込み量の低下は DA 神経系を介する作用であることが示唆された。

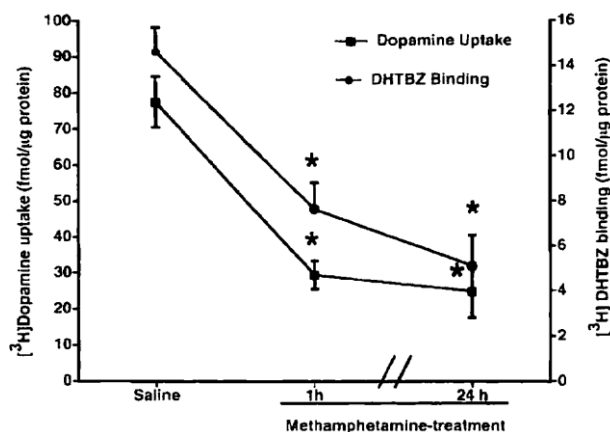


図 2.6.2.5-2 メタンフェタミンの DA 取り込み及びジヒドロテトラベナジン結合に及ぼす作用
(資料番号 4.2.1.4-2 [参考資料] の図 1 を改変)

ラットに METH 10 mg/kg を 2 時間間隔で 4 回投与し、その 1 及び 24 時間後に、線条体シナプス標本における [³H]-DA 取り込みと [³H]-ジヒドロテトラベナジン結合について検討した。図中の数値は平均値±SE を表す (N=7~8)。*: p<0.01 (生理食塩液対照群との比較, Student t 検定)。

(2) マウスの自発運動量に及ぼすテトラベナジンとメタンフェタミンの相互作用 (公表論文, 資料番号: 4.2.1.4-3 [参考資料])

試験には 1 群 10 匹の dd 系マウス (雄, 試験時 6 週齢, 体重 25~28 g) を用いた。自発運動量の測定には直径 20 cm のバケツ状の自発運動量計量装置を用い、水平方向の動きを測定した。

テトラベナジン前投与による METH との相互作用を検討するため、マウスにテトラベナジン (塩酸塩) の 1, 2, 4 mg/kg 皮下投与 (対照群には生理食塩液) 後 30 分に METH (塩酸塩) 2 mg/kg を皮下投与し、30 分間の自発運動量を測定した。試験結果を図 2.6.2.5-3 に示す。

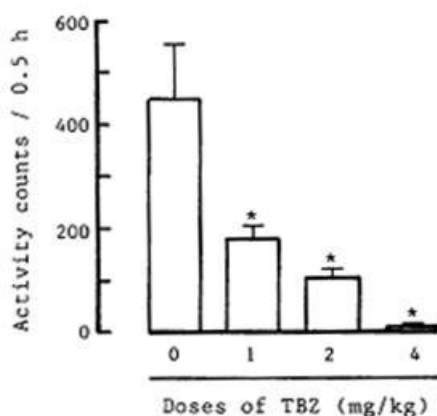


図 2.6.2.5-3 テトラベナジンを前投与したマウスにおけるメタンフェタミンの自発運動に及ぼす影響

(資料番号 4.2.1.4-3 [参考資料] の図 2 を改変)

テトラベナジン (1~4 mg/kg, 皮下投与) を前投与した 30 分後に METH 2 mg/kg を皮下投与し、その直後 30 分間の自発運動量を測定した。図中の数値は平均値±SE (N=10) を表す。統計解析には 1-wayANOVA を用い、有意差が認められる場合には、Dunnett 検定を用いた。*: p<0.05 (対照群 [テトラベナジンの用量=0] に対して)。

テトラベナジンは METH (2 mg/kg) による自発運動量増加を 1 mg/kg から有意に抑制し、この作用は用量依存的であった。

また、METH をテトラベナジンと同時併用投与した時の相互作用を検討するため、各群 10 匹のマウスに METH 2 mg/kg (皮下投与) とテトラベナジン 1, 2, 4 mg/kg (皮下投与) を併用投与して 30 分間の自発運動量を測定した。対照として METH 2 mg/kg を単独皮下投与した場合と比較した。

試験結果を図 2.6.2.5-4 に示す。

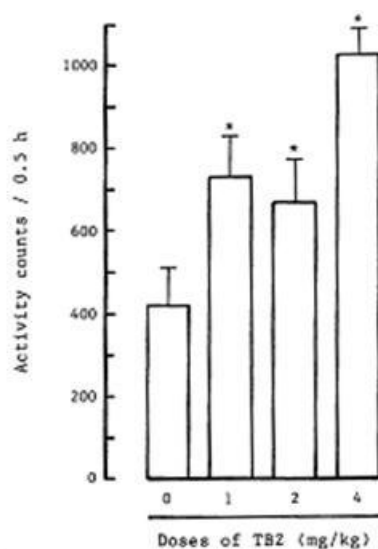


図 2.6.2.5-4 テトラベナジンとメタンフェタミンを併用投与した場合のマウス
自発運動に及ぼす影響

(資料番号 4.2.1.4-3 [参考資料] の図 4 を改変)

METH (2 mg/kg, 皮下投与) 単独投与, 又はテトラベナジン (1~4 mg/kg, 皮下投与) を併用投与した直後 30 分間の自発運動量を測定した。図中の数値は平均値±SE (N=10) を表す。*: $p<0.05$ (1way ANOVA & Dunnett 検定, METH 単独投与群 [テトラベナジンの用量=0] との比較)。

テトラベナジンと METH を併用投与すると、METH 単独投与に比べ、自発運動量が有意に増加した。テトラベナジン 1 mg/kg から有意な自発運動量の増加作用が認められたが、用量依存性は認められなかった。

さらに METH の自発運動量増強作用消失後にテトラベナジンを投与した場合の相互作用を検討するため、マウスに METH 2 mg/kg を皮下投与した 4 時間後にテトラベナジン 1, 2, 4 mg/kg を皮下投与 (対照群には生理食塩液を投与) して、30 分間の自発運動量を測定した。試験結果を図 2.6.2.5-5 に示す。

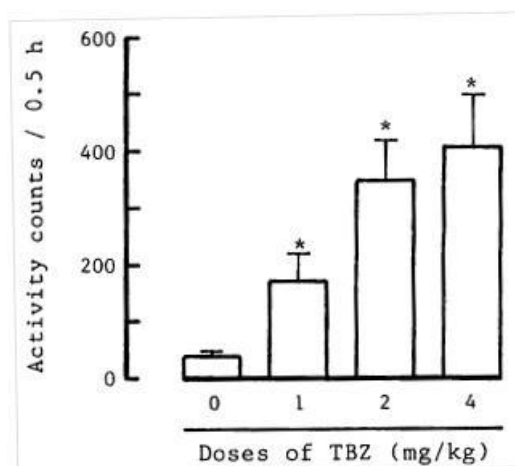


図 2.6.2.5-5 メタンフェタミンを前投与したマウスにおけるテトラベナジンの自発運動に及ぼす影響

(資料番号 4.2.1.4-3 [参考資料] の図 5 を改変)

METH (2 mg/kg, 皮下投与) を前投与した 4 時間後にテトラベナジン (1~4 mg/kg, 皮下投与) を投与し, その直後 30 分間の自発運動量を測定した. 図中の数値は平均値±SE (N=10) を表す. *: $p<0.05$ (1way ANOVA & Dunnett 検定, METH 単独投与群 [テトラベナジンの用量=0] との比較).

METH の自発運動量増加作用の持続時間は約 3 時間であり対照群では自発運動量の増加は観察されないが, テトラベナジンを投与した群では, 対照群と比較して用量依存的な自発運動量増加が認められた.

3) テトラベナジンの脳内モノアミン溜渇作用に及ぼす MAO 阻害薬クロルギリンの影響 (公表論文, 資料番号: 4.2.1.4-4 [参考資料]) (注: 資料番号: 4.2.1.1.1-1 [参考資料] と同資料)

モノアミン酸化酵素 (MAO) 阻害薬は, MAO を阻害することによって, 脳内の DA を増加させる. 現在, 国内ではパーキンソン病の治療にのみ使用されるが, 米国などではうつ病の治療薬として認可されており, うつ症状を持つ患者に使用される. そこでテトラベナジンと MAO 阻害薬クロルギリンとの相互作用を検討した. 試験には SD 系ラット (雄, 体重 150~200 g) を用いた. テトラベナジン (メタンスルホン酸塩) とクロルギリン (塩酸塩) は精製水に溶解して調製し, 前者は皮下投与し, 後者は腹腔内投与した (薬物の用量はフリー体に換算して表示). また対照群には精製水を同容量投与した.

ラットにクロルギリン 1, 3, 6 mg/kg を腹腔内投与した 30 分後に, テトラベナジン 3 mg/kg を皮下投与し, その 15 分後に屠殺して, 脳を摘出し, 皮質 NA 量, 線条体 DA 量, 海馬 5-HT 量を HPLC/ECD 法により測定した. 試験結果を表 2.6.2.5-1 に示す.

表 2.6.2.5-1 テトラベナジン誘発脳内モノアミン涸渇作用に及ぼすクロルギリンの影響
(資料番号 4.2.1.4-4 [参考資料] の表 2 を改変)

投与群	皮質 NA	線条体 DA	海馬 5-HT
対照	0.76 ± 0.08	45.6 ± 2.3	3.87 ± 0.17
テトラベナジン 3 mg/kg	0.26 ± 0.03*	8.4 ± 1.6*	2.11 ± 0.16*
クロルギリン 1 mg/kg	0.73 ± 0.06	51.6 ± 1.4	4.82 ± 0.09*
クロルギリン 3 mg/kg	0.83 ± 0.05	52.7 ± 4.7	5.56 ± 0.50*
クロルギリン 6 mg/kg	0.76 ± 0.03	58.2 ± 2.6*	6.03 ± 0.23*
クロルギリン 1 mg/kg + テトラベナジン 3 mg/kg	0.42 ± 0.05*#	35.9 ± 1.4*#	3.17 ± 0.18#
クロルギリン 3 mg/kg + テトラベナジン 3 mg/kg	0.70 ± 0.06	48.8 ± 2.9	5.00 ± 0.36*
クロルギリン 6 mg/kg + テトラベナジン 3 mg/kg	0.74 ± 0.07	47.4 ± 3.1#	4.94 ± 0.37*

ラットにクロルギリン (1, 3, 6 mg/kg) 又は精製水を腹腔内投与し, その 30 分後にテトラベナジン 3 mg/kg 又は精製水を皮下投与して 15 分後に屠殺し, 脳内各部位のモノアミン量を定量した. 表中の数値は平均値 ± SE (pmol/mg 組織, N=4~5) を表す. *: p<0.05, Duncan's multiple range 検定 (対照群との比較), #: p<0.05, Duncan's multiple range 検定 (対応するクロルギリン単独投与群との比較).

クロルギリン (1, 3, 6 mg/kg) のみを投与した場合, 海馬の 5-HT 量が用量依存的に増加し, 6 mg/kg では線条体 DA 量も有意な増加が認められた.

テトラベナジン (3 mg/kg) とクロルギリン (1, 3, 6 mg/kg) を併用した場合, クロルギリン 1 mg/kg 群では, テトラベナジン単独投与に比べて NA, DA, 5-HT, 全てのモノアミンの涸渇作用に対して抑制を示した. クロルギリン 3 及び 6 mg/kg 群では全てのモノアミンの涸渇に対して, 同様の相互作用が認められ, 海馬 5-HT 量は対照群と比較しても有意に高値であった.

テトラベナジン 20 mg/kg 投与におけるクロルギリンのテトラベナジン誘発モノアミン涸渇作用に対する阻害作用も検討した. ラットにクロルギリン (6 mg/kg) 又は精製水を腹腔内投与し, 30 分後にテトラベナジン 20 mg/kg 又は精製水を皮下投与して 15 分後に屠殺し, 脳内各部位のモノアミン量を測定した. テトラベナジン高用量誘発脳内モノアミン涸渇作用に対するクロルギリンの作用を表 2.6.2.5-2 に示す.

表 2.6.2.5-2 テトラベナジン高用量誘発脳内モノアミン涸渇作用に対するクロルギリンの作用
(資料番号 4.2.1.4-4 [参考資料] の表 3 を改変)

投与群	皮質 NA	線条体 DA	海馬 5-HT
対照	1.11 ± 0.08	53.4 ± 6.7	5.03 ± 0.28
クロルギリン 6 mg/kg	1.22 ± 0.08	58.6 ± 3.6	6.12 ± 0.96
テトラベナジン 20 mg/kg	0.49 ± 0.03*	13.4 ± 1.3*	1.32 ± 0.08*
クロルギリン 6 mg/kg + テトラベナジン 20 mg/kg	1.00 ± 0.14	49.6 ± 8.2	5.78 ± 1.34

表中の数値は平均値 ± SE (pmol/mg 組織, N=4~5) を表す. *: p<0.05, Duncan's multiple range 検定 (対照群との比較).

クロルギリン 6 mg/kg のみを投与した場合、脳内モノアミン量に有意な作用を及ぼさないが、テトラベナジン 20 mg/kg によるモノアミンの潤渇作用を完全に抑制した。

以上の結果より、MAO 阻害薬との併用によりテトラベナジンの作用が減弱される可能性が示唆された。

4) 抗うつ薬との相互作用

各種の抗うつ薬が TBZ 誘発眼瞼下垂作用、体温低下作用などを抑制し、その効果と抗うつ効果がよく相関することから、抗うつ薬の薬効評価系に汎用されている。

(1) テトラベナジンの脳内モノアミン潤渇作用に及ぼすデシプラミンの作用（公表論文，資料番号：4.2.1.4-5 [参考資料]）（注：資料番号：4.2.1.1-1 [参考資料] と同資料）

ラット神経終末に選択的 NA 取り込み阻害作用を有するデシプラミンは受容体刺激の増強により抗うつ作用を示す。そこでテトラベナジンとデシプラミンとの相互作用を検討した。試験には SD 系ラット（雄，体重 150～200 g）を用いた。テトラベナジン（メタンスルホン酸塩）とデシプラミン（塩酸塩）は精製水に溶解して調製し、前者は皮下投与，後者は腹腔内投与した（薬物の用量はフリー体に換算）。ラットにデシプラミン 15 mg/kg を腹腔内投与（対照には精製水を投与）した 30 分後に，テトラベナジン 3 mg/kg を皮下投与（対照には精製水を投与）し，その 15 分又は 30 分後に屠殺して，脳を摘出し，皮質 NA 量，線条体 DA 量，海馬 5-HT 量を HPLC/ECD 法により測定した。試験結果を図 2.6.2.5-6 に示す。

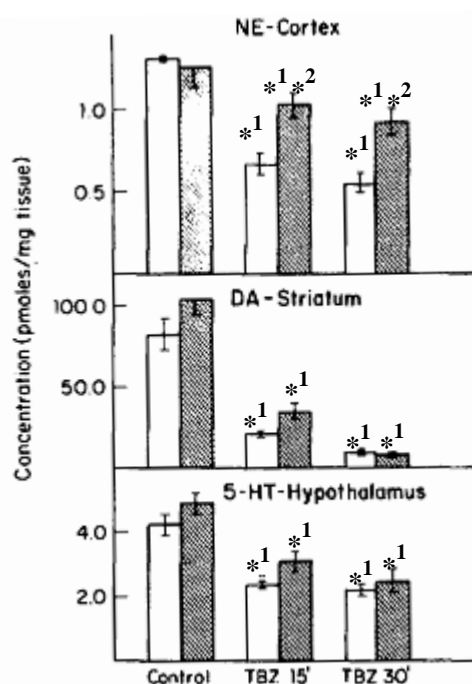


図 2.6.2.5-6 テトラベナジン誘発脳内モノアミン涸渇作用に及ぼすデシプラミンの影響

(資料番号 4.2.1.4-5 [参考資料] の図 3 を改変)

ラットにデシプラミン (15 mg/kg) 又は精製水を腹腔内投与し, その 30 分後にテトラベナジン 3 mg/kg 又は精製水を皮下投与して 15 分又は 30 分後に屠殺し, 脳内各部位のモノアミン量を定量した. 図中の数値は平均値 ± SE (pmol/mg 組織, N=4~5) を表す. *1 : $p < 0.05$, Duncan's multiple range 検定 (対照群との比較), *2 : $p < 0.05$, Duncan's multiple range 検定 (対応するテトラベナジン単独投与群との比較)

テトラベナジン投与 15 及び 30 分後において, デシプラミンの前投与は皮質 NA の涸渇作用に対し有意に抑制した. 一方, 線条体 DA 及び海馬 5-HT の涸渇作用に対して有意な作用を示さなかった.

次に, テトラベナジン誘発皮質 NA 涸渇作用に対する, デシプラミンの阻害作用の用量反応性について検討した. ラットにデシプラミン 1, 3, 10 mg/kg を腹腔内投与した 30 分後に, テトラベナジン 3 mg/kg を皮下投与し, その 15 分後に屠殺して, 脳を摘出し, 皮質 NA 量を HPLC/ECD 法により測定した.

試験結果を表 2.6.2.5-3 に示す. デシプラミン 1~10 mg/kg の腹腔内投与により, テトラベナジンの皮質 NA 涸渇作用に対して用量依存的な阻害作用が認められた.

表 2.6.2.5-3 テトラベナジン誘発脳内モノアミン涸渇作用に及ぼすデシプラミンの影響
(資料番号 4.2.1.4-5 [参考資料] の表 1 を改変)

投与群	皮質 NA 量 (pmol/mg 組織)	変化率
対照	1.11 + 0.03	—
テトラベナジン 3 mg/kg	0.58 + 0.05*	- 48
デシプラミン 10 mg/kg	1.01 + 0.05	- 9
デシプラミン 1 mg/kg + テトラベナジン 3 mg/kg	0.60 + 0.05*	- 46
デシプラミン 3 mg/kg + テトラベナジン 3 mg/kg	0.78 + 0.08*#	- 30
デシプラミン 10 mg/kg + テトラベナジン 3 mg/kg	0.84 + 0.05*#	- 24

表中の数値は平均値±SE (pmol/mg 組織, N=5) を示す. *: p<0.05, Duncan's multiple range 検定 (対照群との比較), #: p<0.05, Duncan's multiple range 検定 (対応するテトラベナジン単独投与群との比較).

(2) テトラベナジン誘発眼瞼下垂に対する抗うつ薬の作用 (公表論文, 資料番号: 4.2.1.4-6 [参考資料])

三環系抗うつ薬及び同等の抗うつ薬作用を有する選択的セロトニン再取り込み阻害薬とテトラベナジンの相互作用を検討した. 試験には Wistar 系ラット (雄, 体重 175~245 g) を用いた.

抗うつ薬としてイミプラミン, アミトリプチリン, パロキセチン (いずれも塩酸塩) を使用し, 1%メチルセルロース溶液に懸濁して経口投与した (N=7~8). 対照群には 1%メチルセルロース溶液を投与した. テトラベナジンは 1 mol メタンスルホン酸 0.3 mL に溶解した後, 精製水で使用濃度に希釈した. 抗うつ薬投与 1 時間後にテトラベナジン 5 mg/kg を皮下投与し, 眼瞼下垂の程度を以下のスコアで評価した (0: 完全に開眼 (眼球突出を含む), 1: 1/4 閉眼, 2: 1/2 閉眼, 3: 3/4 閉眼, 4: 完全閉眼).

対照群ではテトラベナジン 5 mg/kg 投与により 10~15 分後から眼瞼下垂が認められ, 投与 30~60 分後では全例がスコア 3~4 を示した. このスコアは約 2 時間持続し, 8 時間後でも完全には回復しなかった. このためテトラベナジン投与 1 時間後に, スコアが 2 以下になった場合を作用陽性として ED₅₀ を算出した.

イミプラミンは 5.6 mg/kg 以上でテトラベナジン誘発眼瞼下垂を有意に抑制し, 用量依存性が認められた. また, ED₅₀ 値は 2.7 (95%信頼区間 0.5~13.5) mg/kg であった. アミトリプチリンは 10 mg/kg 以上の用量でテトラベナジン眼瞼下垂を有意に抑制し, ED₅₀ 値は 26.0 (9.3~72.8) mg/kg であった. パロキセチンも眼瞼下垂に対して用量依存的な抑制作用を示したが, イミプラミンやアミトリプチリンに比べて作用は弱く, ED₅₀ 値は 34.5 (12.3~96.6) mg/kg であった.

これらは, 抗うつ薬のモノアミンの再取り込み阻害作用によりテトラベナジンによって誘発される作用を抑制するためと推察される.

2.6.2.6 考察及び結論

ハンチントン病は、1872年に George Huntington により報告³⁾された大脳基底核の神経細胞の変性脱落を示す常染色体性優性遺伝病で、不随意運動（舞踏運動）と進行性の認知障害等を主症状とする。

大脳基底核は、線条体、淡蒼球内節・外節、黒質緻密部・網様部、視床下核からなる大脳皮質下の神経核群であり、大脳皮質から興奮性入力を受け、視床を介して抑制性出力を大脳皮質へ返すループを形成している。大脳基底核の入力部は線条体であり、尾状核、被殻、側坐核で構成されており、尾状核と被殻は運動制御や学習に参与している。出力部は淡蒼球内節と黒質網様部で、視床へ GABA 作動性の抑制性出力を投影している。淡蒼球外節と視床下核は入力部と出力部を繋ぐ中継核で、前者は GABA 作動性、後者はグルタミン酸作動性の出力を投影している。黒質緻密部は尾状核・被殻へ DA 作動性の投射により、尾状核・被殻神経の活動を調整している。この線条体（尾状核・被殻）神経は GABA 作動性の投射神経であり、投射先により 2 種に大別される。淡蒼球内節へ直接投影する（直接路）線条体神経は、D₁ 受容体及びサブスタンス P 陽性であり、淡蒼球内節及び黒質網様部を抑制することにより、視床・大脳皮質を興奮（脱抑制）させる。一方、中継核である淡蒼球外節と視床下核を介して出力部に間接的に投影する（間接路）線条体神経は、D₂ 受容体及びエンケファリン陽性であり、淡蒼球内節及び黒質網様部を興奮させることにより、視床・大脳皮質を抑制する。運動制御にはこの大脳基底核内の直接路と間接路のバランスにより調節されており、大脳基底核の変性疾患により、直接路が優位の場合には大脳皮質の随意行動遂行系への抑制が減少し多動（hyperkinetic）となり、間接路が優位の場合には大脳皮質への抑制が強くなり寡動（hypokinetic）となる¹⁾。

ハンチントン病患者では線条体、特に尾状核に神経変性が起こる。病状初期には淡蒼球内節へ直接投影する線条体神経（D₁ 受容体発現細胞）は機能を保ちながら、間接路の投射ニューロンである淡蒼球外節投影線条体神経（D₂ 受容体発現細胞）が脱落することが知られている。そのため中継核への出力が低下し、線条体の出力バランスは直接路優位となり、淡蒼球内節及び黒質網様部が抑制される。その結果、淡蒼球内節・黒質網様部からの視床へ GABA 作動性の抑制性出力が減少し、舞踏運動や多動といった不随運動症状が起こる^{2,4,5)}。このため線条体内 DA 機能が相対的に亢進した状態（D₁ 受容体発現細胞 > D₂ 受容体発現細胞）であり、ハンチントン病の主症状である舞踏運動及び多動に対して DA 遮断薬が有効であることが報告されている^{6~9)}。

果より、線条体（被殻，尾状核）で最も高い分布が認められた。ヒト死後脳を用いた $[^3\text{H}]$ -HTBZの *in vitro* 特異的結合分布の検討（資料番号 4.2.1.1.2-9 [参考資料]）では、黒質緻密部，青斑核，背側海馬で高い分布が認められ，これらはモノアミン作動性神経核の分布と一致していた。

効力を裏付ける *in vitro* 試験

テトラベナジンは，VMAT2 に対して高い親和性と選択性を有する強力な阻害薬（資料番号：4.2.1.1.2-1 [参考資料] ～-4 [参考資料]，-10 [参考資料]，-11 [参考資料]）である。VMAT2 発現組織に対して結合解離定数 (K_d) は，シナプス小胞，クロム親和性顆粒細胞膜，マウス及びヒト脳組織で $\leq 7 \text{ nM}$ を示し，最大結合密度 (B_{max}) は VMAT2 発現細胞・組織で高値を示した。また，テトラベナジン又はジヒドロテトラベナジンの $[^3\text{H}]$ -HTBZ リガンド結合と $[^3\text{H}]$ -モノアミン取り込みに対する阻害作用は近似値を示した。これら VMAT2 選択的及び強力な阻害作用により，細胞質で生合成されたモノアミン (DA, NA, 5-HT) の小胞内へ移行・貯蔵を阻害し，細胞質に留まるモノアミンが MAO による急速な分解を受けることにより，モノアミンの涸渇作用が誘発（資料番号：4.2.1.1.1-1 [参考資料]）されると推察される。VMAT には VMAT1 と VMAT2 の 2 種のアイソフォームがあるが，ヒト脳内ではほとんど VMAT2 しか発現（資料番号 4.2.1.1.2-4 [参考資料]）しておらず，またヒト末梢組織における VMAT2 の発現は特定の臓器（副腎，膵臓など）（資料番号 4.2.1.1.2-4 [参考資料]）に限定されている。テトラベナジンの 2 種の VMAT 分子に対する特異性に関して，ラット VMAT1 におけるモノアミン取り込みに対するテトラベナジンの抑制作用が報告されている（テトラベナジン IC_{50} ： $\sim 4 \mu\text{M}$ ，レセルピン IC_{50} ： $\sim 25 \text{ nM}$ ）¹⁰。しかし，テトラベナジンのヒト VMAT2 に対する親和性は，VMAT1 に対する親和性に比べてはるかに選択性が高く，ヒト VMAT1 におけるモノアミン取り込みに対する抑制作用は $20 \mu\text{M}$ テトラベナジンでも認められず，テトラベナジンのヒト VMAT2 に対する特異性が示された（資料番号 4.2.1.1.2-4 [参考資料]）。また，テトラベナジンをげっ歯類，非げっ歯類及びヒトに投与すると，初回通過効果により急速に 2 つの異性体化合物の α -及び β -ジヒドロテトラベナジンに代謝される。テトラベナジン， α -及び β -ジヒドロテトラベナジンの VMAT2 発現組織における $[^3\text{H}]$ -HTBZ リガンド結合に対する阻害作用 (IC_{50}) は 3.0, 6.0, 20 nM と近似値を示した（資料番号 4.2.1.1.2-2 [参考資料]）。そこでテトラベナジン， α -及び β -ジヒドロテトラベナジンを用いて神経伝達物質受容体／トランスポーター，ステロイド，イオンチャネル，セカンドメッセンジャー系，プロスタグランジン類，成長因子／ホルモン，脳内／消化管内ペプチド等への作用を検討した結果， β -ジヒドロテトラベナジンがシグマ受容体に対して弱い拮抗作用を示した以外は阻害作用を示さなかった（資料番号 4.2.1.1.2-5, -6）。また，テトラベナジンは $[^3\text{H}]$ -スピペロン結合を置換し，弱い DA 受容体拮抗作用（線条体における K_i ： $5.20 \pm 0.80 \mu\text{M}$ ）が示唆された（資料番号：4.2.1.1.2-10 [参考資料]）。

ハンチントン病モデル動物を用いた効力を裏付ける試験

ハンチントン病の原因遺伝子 IT5¹¹⁾は第4染色体短腕(遺伝子座:4p16.3)上にあり、ハンチントン病共同研究班により1993年に同定された。IT5遺伝子が翻訳するタンパク質(ハンチンチン)は、分子量約350 kDaのタンパク質であり、その機能は解明されていない。この遺伝子の第一エクソンのタンパク質翻訳領域でCAG反復(ポリグルタミン)配列が異常に伸長することが、ハンチントン病の発症原因であり、異常長のポリグルタミン配列を持った変異ハンチンチンが、神経変性を誘発すると考えられている^{12, 13)}。そこで1990年代後半から、ハンチントン病患者の遺伝子的特徴を持つハンチントン病モデルマウスが作製された。ハンチントン患者は発症早期に巧緻運動障害と軽微な不随意運動、遂行運動の障害、うつ状態を認める。さらに進行すると舞踏運動が明らかとなり、随意運動も障害される。ヒトハンチンチン遺伝子の全配列を導入したトランスジェニックマウスである「BACHDマウス」及び「YAC128マウス」においても、生後1.5~2ヵ月齢で「多動」、4~6ヵ月齢で「運動障害」、6~8ヵ月齢で「寡動」を発症し、ハンチントン患者と類似した行動学的表現型を示す(資料番号4.2.1.1.2-11 [参考資料])^{14, 15)}。

そこでテトラベナジンのハンチントン病における効力を検討する目的で、ハンチントン病モデル動物「BACHDマウス」及び「YAC128マウス」におけるテトラベナジンの作用を検討した(資料番号:4.2.1.1.1-3 [参考資料], -4 [参考資料])。BACHDマウスは生後1.5~2ヵ月間に、グルーミングやスニッフingのような常同行動の増加を示し、ハンチントン病患者の初期症状である多動と相似の表現型を示す。特にグルーミングの増加はシナプス間隙のDA量の増加が関係しており、DAT阻害薬投与やDATノックアウトマウスでグルーミングの増加が報告^{14, 15)}されている。常同運動増加に対する作用を検討した場合、テトラベナジン2.5 mg/kgは皮下投与によりBACHDマウスの常同症状スコアを有意に抑制したが、WTマウスに対しては有意な作用を示さなかった。また、ハンチントン病患者では病気の進行に伴い、運動機能低下も認められる。そこで加齢に伴う運動機能に対するテトラベナジンの作用をYAC128マウスにおいて検討した。

YAC128マウスの寿命はwild typeと有意な差はないが、4ヵ月齢から運動障害が認められる^{15, 17)}。そこで、テトラベナジンを運動障害発症前の2ヵ月齢から週3回、12ヵ月齢まで経口投与する群(早期投与群)と、発症後の6ヵ月齢から同様に経口投与する群(後期投与群)の2群について、加速RotarodとBeam-walkingにより検討した。その結果、テトラベナジン5 mg/kg経口投与により、対照YAC128マウスに比べ運動障害の改善作用が認められたことから、テトラベナジンはハンチントン病患者と類似の表現型を示す「多動」及び「運動障害」に対して有意な作用を示すことが示唆された。

これらハンチントン病モデル動物における初期症状の発症メカニズムとテトラベナジンの薬理作用を検討するため「BACHDマウス」、「YAC128マウス」及び正常マウスの脳切片を用いて、D₁受容体及びD₂受容体発現線条体細胞のシナプス電流を比較した(資料番号:4.2.1.1.2-11 [参考資料])。1.5~2ヵ月齢後の脳切片では、D₁受容体発現中型有棘神経細胞においてグルタミン酸及びGABAの遊離による自発的興奮性及び抑制性電流が増加したが、D₂受容体発現中型有棘神経

細胞では認められなかった。また、BACHD マウスの D_1 受容体発現細胞では Paired-Pulse Facilitation が有意に抑制されており、シナプス前終末の神経細胞が十分量以上の DA をシナプス間隙に放出していることを示唆している（資料番号：4.2.1.1.2-11 [参考資料]）。これらは、シナプス前終末の神経細胞による DA 投射が D_1 受容体発現中型有棘神経細胞に傾いており、ハンチントン患者と同様（ハンチントン病患者でも線条体の出力バランスは直接路優位となり、舞踏運動や多動といった不随意運動症状が起こる）に直接路が優位な状態である。テトラベナジンは、シナプス前終末の神経細胞の DA 涸渇作用によりシナプス間隙の十分量以上の DA を減少させ、BACHD マウスの D_1 受容体発現細胞の Paired-Pulse Facilitation を正常状態に回復することが認められた。また、同様の結果は YAC マウスでも報告されている（資料番号 4.2.1.1.2-11 [参考資料]）。

これらハンチントン病モデル動物の結果より、テトラベナジンは選択的 VMAT2 阻害作用により、シナプス前終末小胞の DA を涸渇して、DA 神経伝達の活動活性を下げ、相対的に過剰な DA 生成を抑制することにより、ハンチントン病の類似の表現型である「多動」及び「運動障害」を抑制することが示唆された。

副次的薬理試験

テトラベナジンの DA 涸渇作用に基づく神経保護作用をマウスパーキンソン病モデル（資料番号 4.2.1.2-2 [参考資料]、-3 [参考資料]）で検討した場合、保護作用は認められなかったが、過剰な DA により神経毒性が発現するマロン酸二ナトリウム誘発モデル（資料番号 4.2.1.2-1 [参考資料]）において保護作用が確認された。

安全性薬理試験

安全性薬理試験（資料番号：4.2.1.3-1 参～14 参，4.2.3.2-2，4.2.3.2-4，4.2.3.2-5，4.2.3.7-5 及び 4.2.1.4-6）においてテトラベナジンは、中枢神経系に対し、作用機序であるモノアミン涸渇作用に基づくと推察される作用を誘発した。そこで、中枢神経系に対する作用が認められた最大無作用量及び発現用量を表 2.6.2.6-1 に示す。

表 2.6.2.6-1 中枢神経系に対する作用が認められた最大無作用量及び発現用量

中枢神経系に対する作用		動物種	投与経路	最大無作用量 (mg/kg)	発現用量 (mg/kg)
麻酔増強作用	エタノール	マウス	腹腔	-	40
	ヘキソバルビタール			10	20
体温低下作用		マウス	腹腔	-	40
睡眠波誘導作用		ウサギ	静脈	-	40
報酬効果抑制作用	脳内自己刺激	ラット	腹腔	-	2
	自然報酬 (水)			1	2
一般症状の観察					
行動的	運動量減少	イヌ/ネコ マウス/ラット サル	経口	-	10
				10	30
				2.5	10
	鎮静	ラット	腹腔	-	50
条件回避 (無刺激)	ラット	腹腔	-	4	
			-	4	
			-	4	
神経学的	挙尾	マウス	皮下	60	-
	跳躍	マウス	皮下	60	-
	攻撃行動	ラット	経口	15	30
	自発行動の亢進	ラット	経口	-	15
	音刺激けいれん	ラット	腹腔	20	40
	振戦	ネコ	腹腔	15	20
	眼瞼下垂	ラット	皮下	-	5
	縮瞳	イヌ ウサギ	皮下 静脈	-	25
				25	50
	筋緊張	ラット	皮下	-	25
光反射による縮瞳	ウサギ	静脈	-	50	
自律神経系	流涎	イヌ	静脈	-	35

-: 不明

テトラベナジン皮下投与によるラットのモノアミン涸渇作用は 0.5~2.0 mg/kg (資料番号 4.2.1.1.1-1) であり, ハンチントン病モデルマウス (BACHD マウス) における常同行動抑制作用は 2.5 mg/kg (資料番号 4.2.1.1.1-3) 以下であることから, 皮下投与による薬効発現用量は, 0.5~2.5mg/kg であると判断される。よって, ラットにおける薬効発現用量の血中内における HTBZ (α -HTBZ 及び β -HTBZ) 曝露量 (AUC₀₋₂₄ 値) は, 1.0 mg/kg 腹腔内投与の血中曝露量 (58.3 ng hr/mL) 以上 (資料番号 4.2.3.2-6) であり, 7.5 mg/kg 経口投与の血中曝露量 (468.5 ng hr/mL) 以下 (資料番号 4.2.3.2-4) と考えられる。そこで, テトラベナジンの薬効発現用量と中枢神経系に及ぼす作用が認められた発現用量の比 (中枢神経系に及ぼす作用量/薬効発現用量) 及び血中曝露量の比 (中枢神経系に及ぼす血中曝露量/薬効発現血中曝露量) を表 2.6.2.6-2 に示す。

表 2.6.2.6-2 薬効発現用量と中枢神経系に及ぼす作用が認められた発現用量及び血中曝露量の比

中枢神経系に及ぼす作用		動物種	発現用量 (mg/kg)	発現用量 比	血中曝露量 (投与量 ; mg/kg)	血中曝露量比
麻酔増強作用	エタノール麻酔	マウス	40	16~80	2046 (30) ^{a)}	4.4~35.1
	ヘキシバルピタール					
体温低下作用		マウス	40	16~80	2046 (30) ^{a)}	4.4~35.1
睡眠波誘導作用		ウサギ	40	16~80	4297.7 (60) ^{b)}	9.2~73.7
報酬効果抑制作用	脳内自己刺激	ラット	2	0.8~4	58.3 (1) ^{c)}	0.12~1
	自然報酬 (水)					
一般症状の観察						
行動的	運動量減少	イヌ	10	4~20	3701 (10) ^{d)}	7.9~63.5
		マウス	30	12~60	2046 (30) ^{a)}	4.4~35.1
		サル	10	4~20	-	-
	鎮静	ラット	50	20~100	5739.4 (40) ^{e)}	12.3~98.4
	条件回避 (無刺激)	ラット	4	1.6~8	206.7 (2.5) ~468.5 (7.5) ^{f)}	1~3.5
	条件回避 (光刺激)					
	条件回避 (音刺激)					
神経学的	挙尾	マウス	-	-	-	-
	跳躍	マウス	-	-	-	-
	音刺激けいれん	ラット	40	16~80	5739.4 (40) ^{e)}	12.3~98.4
	振戦	ネコ	20	8~40	-	-
	眼瞼下垂	ラット	5	2~10	206.7 (2.5) ~468.5 (7.5) ^{f)}	1~3.5
	縮瞳	イヌ	25	10~50	3701 (10) ^{d)}	7.9~63.5
		ウサギ	50	20~100	4297.7 (60) ^{b)}	9.2~73.7
	筋緊張	ラット	25	10~50	1857.3 (20) ~5739.4 (40) ^{e)}	12.3~31.9
光反射による縮瞳	ウサギ	50	20~100	4297.7 (60) ^{b)}	9.2~73.7	
自律神経系	流涎	イヌ	35	14~70	3701 (10) ^{d)}	7.9~63.5

- : 不明

a) 資料番号 4.2.3.2-2, b) 資料番号 4.2.2.2-1, c) 資料番号 4.2.3.2-6, d) 資料番号 4.2.3.2-8, e) 資料番号 4.2.3.2-6,

f) 資料番号 4.2.3.2-4

薬効発現血中曝露量と中枢神経系に及ぼす作用 (麻酔増強作用, 体温低下作用, 睡眠波誘導作用, 運動量減少, 鎮静, 音刺激けいれんに対する作用, 縮瞳, 筋緊張及び自律神経系に対する作用) が認められた血中曝露量の比は 4.4~98.4 であった。また, マウスの挙尾及び跳躍は 5 mg/kg 以下のテトラベナジン皮下投与では発現しないため発現用量及び発現曝露量は不明であるが, マウスを用いた毒性試験における症状観察では 60 mg/kg の経口投与 (HTBZ の AUC₀₋₂₄ ; 10730 ng・hr/mL) でも認められていないため (資料番号 4.2.3.2-2), マウスの挙尾及び跳躍発現曝露量は薬効発現曝露量の 22.9~184.0 倍以上であると考えられる。サル及びネコの薬物動態試験はなく, 血中曝露量 (AUC₀₋₂₄ 値) を推定することは不可能なため, 投与量から比較を行った場合, サルの運動量減少用量は薬効用量の 4~20 倍, ネコの振戦発現用量は薬効用量の 8~40 倍で発現することが示唆された。一方, ラットにおける条件回避抑制作用, 眼瞼下垂誘導作用及び報酬効果抑制作用

用の発現曝露量及び発現用量の比では条件回避抑制作用は1~3.5及び1.6~8, 眼瞼下垂誘導作用は1~3.5及び2~10, 報酬効果抑制作用は0.12~1及び0.8~4を示した。

さらに, 臨床最大用量投与時(50 mgを単回投与した場合及び100 mg/日を3回分割投与した場合)の曝露量(AUC₀₋₂₄)と中枢神経系に及ぼす作用の推定血中曝露量(AUC₀₋₂₄)からヒトにおける推定作用発現用量(mg/日)を外挿し, さらに最小安全域(ヒトにおける推定作用発現用量/100 mg)を算出した結果を表2.6.2.6-3に示す。

表 2.6.2.6-3 ヒトにおける推定作用発現用量 (mg/日) 及び安全域

中枢神経系に及ぼす作用	外挿動物	単回投与 ^{a)} (ng・hr/mL)	3回分割投与 ^{b)} (ng・hr/mL)	最小発現量 (mg)	最小安全域 (最小発現 用量/100 mg)	
麻酔増強作用	マウス	>124.2	>180.2	>124.2	1.2	
体温低下作用	マウス	>124.2	>180.2	>124.2	1.2	
睡眠波誘導作用	ウサギ	>260.8	>378.6	>260.8	>2.6	
報酬効果抑制作用	ラット	>3.5	>5.1	>3.5	>0.035	
一般症状の観察						
行動的	運動量減少	イヌ	224.6	326.0	224.6	2.2
		マウス	124.2	180.2	124.2	1.2
		サル	-	-	-	-
	鎮静	ラット	>348.3	>505.6	348.3	3.5
条件回避	ラット	12.5~28.4	18.2~41.3	12.5	0.13	
神経学的	挙尾・跳躍	マウス	>651.1 ^{c)}	>945.2 ^{c)}	651.1	6.5
	音刺激けいれん	ラット	348.3	505.6	348.3	3.5
	振戦	ネコ	-	-	-	-
	眼瞼下垂	ラット	12.5~28.4	18.2~41.3	12.5	0.13
	縮瞳	イヌ	>224.6	>326.0	224.6	2.2
		ウサギ	>260.8	>378.6	260.8	2.6
運動協調等	ラット	112.7~348.3	163.6~505.6	112.7	1.1	
自律神経系	光反射による縮瞳	ウサギ	>260.8	>378.6	260.8	2.6
	流涎	イヌ	>224.6	>326.0	224.6	2.2

- : 不明

a : ヒトにテトラベナジンの1回最大用量50 mgを単回投与した場合 : 50 mg×HTBZの血中曝露量÷824 ng・hr/mL (HTBZのAUC₀₋₂₄)

b : ヒトにテトラベナジンを100 mg/日を3回分割投与した場合 : 100 mg×HTBZの血中曝露量÷1135.2 ng・hr/mL (テトラベナジンの朝37.5 mg, 昼25 mg, 夕37.5 mg反復投与後の定常状態におけるHTBZのAUC₀₋₂₄をシミュレーションした結果)

c : マウス60 mg/kgの経口投与におけるHTBZのAUC₀₋₂₄ (10730 ng・hr/mL)より算出。

最小安全域（ヒトにおける推定作用発現用量/100 mg）が1未満を示したものは条件回避抑制作用、眼瞼下垂誘導作用及び報酬効果抑制作用であった。これら発現機序はテトラベナジンのモノアミン涸渇作用が関係しており、条件回避抑制作用及び報酬効果抑制作用は扁桃体及び腹内側前頭前皮質におけるモノアミン機能低下及び機能不全により抑うつ症様状態を発症させ²²⁾、学習性無気力を形成した可能性が示唆される²³⁾。また、ラットを用いた抗うつ薬の評価系として、レセルピン又はテトラベナジンによる眼瞼下垂の拮抗作用を観察する方法が知られているが、ヒトと齧歯類における眼瞼開閉の神経伝達には種差があり、齧歯類の場合、眼瞼を閉じる時に発火する神経は長期及び短期の眼輪筋収縮を誘導することが報告されている²⁴⁾。また、国内外臨床試験及び市販後調査では、眼瞼下垂の報告は少なく（2名）、モノアミン涸渇作用による眼瞼下垂の誘導はヒトと齧歯類とで感受性に差のあることが示唆される²⁵⁾。一方、条件回避抑制作用及び報酬効果抑制作用の場合、テトラベナジンはドパミン涸渇作用により、中脳-辺縁系及び線条体における「ドパミンスパイラル」を遮断して報酬の反復摂取を抑制し、さらに黒質のドパミン神経を介して背側線条体に投射する経路を抑制することにより、報酬獲得反応が自動化し、制御が失われた報酬探索行動を抑制したと考えられる²⁶⁾。よって、テトラベナジンは、条件回避抑制作用及び報酬効果抑制作用を示したため、精神依存は形成されにくいと考えられる。以上より、臨床最大用量投与の場合には抑うつ症の発症には注意が必要であると考えられる。

以上より、テトラベナジンはモノアミン涸渇作用により中枢神経系に対する種々の作用を発現するが、これら以外に特記すべき所見はなく、薬効用量と推察される2.5 mg/kg以下ではうつ病の発症以外安全性の高い薬物であることが示唆された。

VMAT分子に対して阻害作用を持つ薬物として、テトラベナジン以外にレセルピンが知られている。しかしレセルピンはテトラベナジンと異なり、VMATに対して非選択的阻害作用を持つため、中枢及び末梢組織でモノアミン涸渇作用を示す。また、VMAT分子のモノアミン結合ドメインに、直接、不可逆的結合するため、モノアミン涸渇作用はテトラベナジンより強力である（長時間に亘り持続的に作用する）が、テトラベナジンには認められない副作用が報告されている。テトラベナジンとレセルピンの薬理学的作用の差異を表2.6.2.6-1に示す^{18~21)}。

表 2.6.2.6-1 テトラベナジンとレセルピンの薬理的な作用プロファイル

薬理学的特質	テトラベナジン	レセルピン
作用機序	ヒト VMAT2 に選択的かつ可逆的に結合する	ヒト VMAT1 及び VMAT2 に同等の親和性で不可逆的に結合する
VMAT2 結合部位	小胞内部に結合	小胞の表面に結合
ヒトにおける作用持続時間	約 12 時間	数日間
ヒトにおける低血圧	誘発しない	誘発する
ヒトにおける消化管への影響	影響なし	下痢を誘発

参考文献 18~21 及びテトラベナジンの *in vitro* 試験の内容から編集した。

以上、テトラベナジンは中枢組織への移行性が良好であり、VMAT2 に対して特異性が高く、また他分子に対して阻害作用を示さなかったことから、中枢選択性が高く末梢組織への作用が少ない薬物と推察された。

薬力学的薬物相互作用試験

ハンチントン病患者では、自殺念慮を伴う抑うつや攻撃的行動などの精神症状が認められることがあり、抗うつ薬や抗不安薬が処方される。そこで薬力学的相互作用試験（資料番号：4.2.1.4-1 [参考資料] ~-6 [参考資料]）として、抗うつ薬や抗不安薬がテトラベナジンの作用に及ぼす影響を検討した。その結果、テトラベナジンとリチウム、メタンフェタミン、MAO 阻害薬、選択的 NA 取り込み阻害薬、三環系抗うつ薬及び選択的セロトニン再取り込み阻害薬との併用で、テトラベナジンの中枢作用が減弱したことから、実際に臨床でこのような薬物と併用する場合には注意が必要であると考えられた。

結論

ハンチントン病の舞踏運動は、随意運動の制御に關与する大脳皮質 - 大脳基底核 - 視床からなる運動神経回路において、抑制性の間接路が選択的に神経変性を起こすため、間接路からの出力が低下し、また一方では、興奮性の直接路の神経機能は維持されるので、直接路優位となって過剰な運動亢進が生じることが原因と推察されている。上述したように、テトラベナジンは選択的に VMAT2 を阻害することにより、特に線条体黒質において強力な DA 涸渇作用を示して、DA 作動性神経伝達を弱め、直接路を抑制して抗舞踏運動作用を示すものと推察された。テトラベナジンは副次的薬理試験では、過剰な DA により神経毒性が発現するモデルにおいて保護作用を示し、また安全性薬理試験においても、薬効に起因する作用以外に特記すべき所見は認められなかった。このようにテトラベナジンは、ハンチントン病舞踏運動に対し、非常に有用な薬物であることが示唆された。

2.6.2.7 図表

本文中に記載.

2.6.2.8 参考文献

- 1) Parent A, Sato F, Wu Y, Gauthier J, Lévesque M, Parent M. Organization of the basal ganglia: the importance of axonal collateralization. *Trends Neurosci.* 2000;23(10 Suppl):S20-7 〈資料番号 : 4.3-1〉
- 2) Poon LH, Kang GA, Lee AJ. Role of tetrabenazine for Huntington's disease-associated chorea. *Ann Pharmacother.* 2010 Jun;44(6):1080-9. 〈資料番号 : 4.3-2〉
- 3) Huntington G. On chorea. *Arch Neurol.* 1967;17:332-3 〈資料番号 : 4.3-3〉
- 4) Reiner A, Albin RL, Anderson KD, D'Amato CJ, Penney JB, Young AB. Differential loss of striatal projection neurons in Huntington disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1988;85(15):5733-7. 〈資料番号 : 4.3-4〉
- 5) Deng YP, Albin RL, Penney JB, Young AB, Anderson KD, Reiner A. Differential loss of striatal projection systems in Huntington's disease: a quantitative immunohistochemical study. *J Chem Neuroanat.* 2004;27(3):143-64. 〈資料番号 : 4.3-5〉
- 6) Giménez-Roldán S, Mateo D. Huntington disease: tetrabenazine compared to haloperidol in the reduction of involuntary movements. *Neurologia.* 1989;4(8):282-7. 〈資料番号 : 4.3-6〉
- 7) Bonelli RM, Mahnert FA, Niederwieser G. Olanzapine for Huntington's disease: an open label study. *Clin Neuropharmacol.* 2002;25(5):263-5. 〈資料番号 : 4.3-7〉
- 8) Lundin A, Dietrichs E, Haghighi S, Göller ML, Heiberg A, Loutfi G et al. Waters S, Tedroff J. Efficacy and safety of the dopaminergic stabilizer Pridopidine (ACR16) in patients with Huntington's disease. *Clin Neuropharmacol.* 2010 Sep-Oct;33(5):260-4. 〈資料番号 : 4.3-8〉
- 9) Ponten H, Kullingsjö J, Lagerkvist S, Martin P, Pettersson F, Sonesson C et al. In vivo pharmacology of the dopaminergic stabilizer pridopidine. *Eur J Pharmacol.* 2010 10;644(1-3):88-95. 〈資料番号 : 4.3-9〉
- 10) Liu Y, Peter D, Roghani A, Schuldiner S, Privé GG, Eisenberg D et al. A cDNA that suppresses MPP+ toxicity encodes a vesicular amine transporter. *Cell.* 1992;70:539-51. 〈資料番号 : 4.3-10〉
- 11) The Huntington's Disease Collaborative Research Group. A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. *Cell.* 1993;72:971-83 〈資料番号 : 4.3-11〉
- 12) Gatchel JR, Zoghbi HY. Diseases of unstable repeat expansion : mechanisms and common principles. *Nat Rev Genet.* 2005;6:743-55 〈資料番号 : 4.3-12〉
- 13) Di Prospero NA, Fischbeck KH. Therapeutics development for triplet repeat expansion diseases. *Nat Rev Genet.* 2005;6:756-65 〈資料番号 : 4.3-13〉
- 14) Van Raamsdonk JM, Pearson J, Rogers DA, Bissada N, Vogl AW, Hayden MR et al. Loss of wild-type huntingtin influences motor dysfunction and survival in the YAC128 mouse model of Huntington disease *Hum Mol Genet.* 2005 15;14(10):1379-92. 〈資料番号 : 4.3-14〉
- 15) Menalled L, El-Khodor BF, Patry M, Suárez-Fariñas M, Orenstein SJ, Zahasky B et al. Systematic behavioral evaluation of Huntington's disease transgenic and knock-in mouse models. *Neurobiol Dis.* 2009;35(3):319-36. 〈資料番号 : 4.3-15〉
- 16) Antoniou K, Kafetzopoulos E, Papadopoulou-Daifoti Z, Hyphantis T, Marselos M. D-amphetamine, cocaine and caffeine: a comparative study of acute effects on locomotor activity and behavioural patterns in rats. *Neurosci Biobehav Rev.* 1998;23(2):189-96. 〈資料番号 : 4.3-16〉
- 17) Spielwoy C, Roubert C, Hamon M, Nosten-Bertrand M, Betancur C, Giros B. Behavioural disturbances associated with hyperdopaminergia in dopamine-transporter knockout mice. *Behav Pharmacol.* 2000;11(3-4):279-90. 〈資料番号 : 4.3-17〉

- 18) Scherman D, Henry JP. Reserpine binding to bovine chromaffin granule membranes. Characterization and comparison with dihydrotetrabenazine binding. *Mol Pharmacol.* 1984;25:113-22 〈資料番号 : 4.3-18〉
- 19) Darchen F, Scherman D, Henry JP. Reserpine binding to chromaffin granules suggests the existence of two conformations of the monoamine transporter. *Biochemistry.* 1989;28(4):1692-7. 〈資料番号 : 4.3-19〉
- 20) Ferrante RJ, Kowall NW, Beal MF, Richardson EP Jr, Bird ED, Martin JB. Selective sparing of a class of striatal neurons in Huntington's disease. *Science.* 1985;230:561-3 〈資料番号 : 4.3-20〉
- 21) Vonsattel JP, Myers RH, Stevens TJ, Ferrante RJ, Bird ED, Richardson EP Jr. Neuropathological classification of Huntington's disease. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1985;44:559-77 〈資料番号 : 4.3-21〉
- 22) 田熊一徹, 山田清文. 9 記憶／学習の評価方法. In: 社団法人日本薬理学会編. 実践行動薬理学. 初版. 京都: 株式会社金芳堂; 2010. P71-8 〈資料番号 : 4.3-39〉
- 23) 中川豊. 5 抗うつ薬の薬効評価系. In: 社団法人日本薬理学会編. 実践行動薬理学. 初版. 京都: 株式会社金芳堂; 2010. P35-42. 〈資料番号 : 4.3-40〉 Mark LeDoux. *Animal Models of Movement Disorders. C3 Animal Models of Benign Essential Blepharospasm and Hemifacial Spasm ELSEVIER.* 2005 ;P253-263 〈資料番号 : 4.3-41〉
- 24) Evinger C, Kassem IS. *C3 Animal Models of Benign Essential Blepharospasm and Hemifacial Spasm.* In: LeDoux M, editor. *Animal Models of Movement Disorders.* ELSEVIER; 2005.p.253-63. 〈資料番号 : 4.3-41〉
- 25) Katz RJ. *Animal Models and Human Depressive Disorders.* *Neurosci Biobehav Rev.* 1981;5:231-46. 〈資料番号 : 4.3-42〉
- 26) 廣中直行. 1 報酬探索行動の神経機構とその病態解明に向けた課題. In: 社団法人日本薬理学会編. 実践行動薬理学. 初版. 京都: 株式会社金芳堂; 2010. p.253-62. 〈資料番号 : 4.3-43〉

2.6.3 薬理試験概要表

2.6.3.1 薬理試験：一覧表

2.6.3.1.1 効力を裏付ける試験

2.6.3.1.1.1 薬効薬理試験

試験の種類	試験系	投与方法	実施施設	報告書番号	資料番号
1) モノアミン溜渇作用	SD系ラット	皮下投与	Merck Sharp & Dohme Research Laboratories	公表論文	4.2.1.1.1-1 [参考資料]
2) 線条体ドパミン及びホモバニリン酸含量に及ぼすテトラベナジン 12 ヶ月投与の影響	Wistar系ラット	飲水投与	King's College Hospital Medical School	公表論文	4.2.1.1.1-2 [参考資料]
3) ハンチントン病モデルマウス (BACHD マウス) の常同行動に対するテトラベナジンの作用	BACHD マウス (HD モデル動物)	皮下投与	California 大学	公表論文	4.2.1.1.1-3 [参考資料]
4) ハンチントン病モデルマウス (YAC128 マウス) におけるテトラベナジンの運動機能改善作用	YAC128 マウス (HD モデル動物)	経口投与	Texas 大学 中国科学院	公表論文	4.2.1.1.1-4 [参考資料]

2.6.3.1.1.2 *In vitro*作用機序試験

試験の種類	試験系	投与方法	実施施設	報告書番号	資料番号
1) ジヒドロテトラベナジンによるシナプス小胞画分へのモノアミン取り込み阻害作用	マウス脳標本 シナプス小胞画分	<i>in vitro</i>	Institut de Biologie Physico-Chimique	公表論文	4.2.1.1.2-1 [参考資料]
2) 精製クロム親和性顆粒細胞膜におけるジヒドロテトラベナジンの結合特性	ウシ精製クロム親和性顆粒細胞膜	<i>in vitro</i>	Institut de Biologie Physico-Chimique	公表論文 公表論文	4.2.1.1.2-2 [参考資料] 4.2.1.1.2-3 [参考資料]
3) ヒト VMAT2 及び VMAT1 発現細胞における ³ H]-ジヒドロテトラベナジン及びモノアミンの基質特異性	ヒト VMAT2, VMAT1 発現線維芽細胞	<i>in vitro</i>	John Hopkins 大学	公表論文	4.2.1.1.2-4 [参考資料]
4) テトラベナジン, α-ジヒドロテトラベナジン, β-ジヒドロテトラベナジンの各種受容体/トランスポーター等に対する選択性	スクリーニング試験	<i>in vitro</i>	社	-0968 -1448	4.2.1.1.2-5 4.2.1.1.2-6
5) マウス脳におけるジヒドロテトラベナジン特異的結合の分布	マウス脳ホモジネート	<i>in vitro</i>	Institut de Biologie Physico-Chimique INSERM	公表論文	4.2.1.1.2-7 [参考資料]
6) ラット線条体におけるジヒドロテトラベナジン及びスルピリド特異的結合の分布	ラット線条体脳切片	<i>in vitro</i>	INSERM Institut de Biologie Physico-Chimique	公表論文	4.2.1.1.2-8 [参考資料]

2.6.3.1.1.2 *In vitro*作用機序試験

試験の種類	試験系	投与方法	実施施設	報告書番号	資料番号
7) ヒト死後脳におけるジヒドロテトラベナジン特異的結合の分布	ヒト死後脳標本	<i>in vitro</i>	Hôpital de la Salpêtrière Hôpital Charles Nicolle	公表論文	4.2.1.1.2-9 [参考資料]
8) ドパミン D ₂ 受容体への作用	ラット線条体ホモジネート ブタ脳下垂体ホモジネート	<i>in vitro</i>	University of Virginia School of Medicine	公表論文	4.2.1.1.2-10 [参考資料]
9) ハンチントン病モデルマウスのシナプス伝達に対するテトラベナジンの作用	YAC128 マウス脳切片 BACHD マウス脳切片	<i>in vitro</i>	California 大学	公表論文	4.2.1.1.2-11 [参考資料]

2.6.3.1.1.3 *In vivo*作用機序試験

試験の種類	試験系	投与方法	実施施設	報告書番号	資料番号
1) 標識リガンドを用いた脳組織内分布の検討 (1) マウスにおける試験	CD-1 系マウス	静脈内投与	Michigan 大学	公表論文	4.2.1.1.3-1 [参考資料]
(2) サルにおける試験	ブタオザル	静脈内投与	Michigan 大学	公表論文	4.2.1.1.3-2 [参考資料]

2.6.3.1.2 副次的薬理試験

試験の種類	試験系	投与方法	実施施設	報告書番号	資料番号
1) マウスにおける内因性ドパミン誘発性線条体ドパミンニューロン傷害に対するテトラベナジンの保護作用	Swiss-Webster 系マウス	腹腔内投与	New Jersey Robert Wood Johnson Medical School	公表論文	4.2.1.2-1 [参考資料]
2) マウスのパーキンソン病モデルにおける神経保護作用 (1) 6-ヒドロキシドパミン誘発性黒質線条体ドパミンニューロン傷害に対するテトラベナジンの作用	Swiss-Webster 系マウス	皮下投与	CNRS	公表論文	4.2.1.2-2 [参考資料]
(2) 1-メチル-4-フェニル-1,2,3,6-テトラヒドロピリジン誘発性黒質線条体ドパミンニューロン傷害に対するテトラベナジンの作用	C57BL/6 系マウス	腹腔内投与	The Wellcome Research Laboratories	公表論文	4.2.1.2-3 [参考資料]

2.6.3.1.3 安全性薬理試験

試験の種類	試験系	投与方法	実施施設	報告書番号	資料番号
1) 中枢神経系に及ぼす影響					
(1) 麻酔に対する作用					
a) テトラベナジンのエタノール麻酔増強作用	マウス	皮下投与	F.Hoffmann-La Roche & Co.A.G	公表論文	4.2.1.3-1 [参考資料]
b) テトラベナジンのヘキソバルビタール麻酔増強作用	マウス	腹腔内投与	F.Hoffmann-La Roche & Co.A.G	公表論文	4.2.1.3-2 [参考資料]
(2) テトラベナジンの体温に及ぼす影響	dd 系マウス	腹腔内投与	住友製薬	公表論文	4.2.1.3-3 [参考資料]
(3) 自発脳波に対する作用	ウサギ	記載なし	F.Hoffmann-La Roche & Co.A.G	公表論文	4.2.1.3-4 [参考資料]
(4) 報酬効果（条件付け）に対する作用					
a) 脳内自己刺激で誘導された報酬効果に対する作用	Wistar 系ラット	腹腔内投与	Goteborg 大学	公表論文	4.2.1.3-5 [参考資料]
b) 自然報酬効果に対する作用	SD 系ラット	腹腔内投与	Chicago 大学	公表論文	4.2.1.3-6 [参考資料]
(5) 一般症状に及ぼす作用	マウス, ラット, ウサギ, ネコ, イヌ, サル	経口投与, 腹腔内投与, 皮下投与, 静脈内投与	社 社 他	公表論文 -102 19371 20730 14623	4.2.1.3-2, -4, 10 ~-14 [参考資料], 4.2.1.4-6 [参考資料], 4.2.3.2-2, -4, -5, 4.2.3.7-5
2) 心血管系に及ぼす影響					
(1) hERG チャネル阻害作用	In vitro 電気生理学的試験	in vitro	社		4.2.1.3-7
(2) 無麻酔下犬におけるテレメトリー法によるテトラベナジンの心血管循環及び心電図パラメータに及ぼす作用	無麻酔ビーグル犬	経口投与	社	No.2418/001	4.2.1.3-8
3) 呼吸器系に及ぼす影響					
(1) 無拘束ラットにおける全身プレチスモグラフィ法によるテトラベナジンの呼吸機能に及ぼす作用	SD 系ラット	経口投与	社	No.2418/002	4.2.1.3-9

2.6.3.1.4 薬力学的薬物相互作用試験

試験の種類	試験系	投与方法	実施施設	報告書番号	資料番号
1) リチウムとの相互作用	ddY 系マウス	皮下投与	福岡大学	公表論文	4.2.1.4-1 [参考資料]
2) メタンフェタミンとの相互作用 (1) ラット線条体シナプス標本におけるメタンフェタミンのドパミン取り込み及び $[^3\text{H}]$ -ジヒドロテトラベナジン結合に及ぼす作用	SD 系ラット 線条体シナプス標本	<i>ex vivo</i>	Utah 大学	公表論文	4.2.1.4-2 [参考資料]
(2) マウスの自発運動量に及ぼすテトラベナジンとメタンフェタミンの相互作用	dd 系マウス	皮下投与	群馬大学	公表論文	4.2.1.4-3 [参考資料]
3) テトラベナジンの脳内モノアミン溜渇作用に及ぼす MAO 阻害薬クロルギリンの影響	SD 系ラット 脳ホモジネート	皮下投与 <i>ex vivo</i>	Merck Sharp & Dohme Research Laboratories	公表論文	4.2.1.4-4 [参考資料] ^{注1)}
4) 抗うつ薬との相互作用 (1) テトラベナジンの脳内モノアミン溜渇作用に及ぼすデシプレアミンの作用	SD 系ラット	皮下投与	Merck Sharp & Dohme Research Laboratories	公表論文	4.2.1.4-5 [参考資料] ^{注1)}
(2) テトラベナジン誘発眼瞼下垂に対する抗うつ薬の作用	Wistar 系ラット	経口投与	九州大学	公表論文	4.2.1.4-6 [参考資料]

注1) : 資料番号 4.2.1.1.1-1 [参考資料] と同資料

2.6.3.2 薬理試験：総括表

2.6.3.2.1 効力を裏付ける試験

2.6.3.2.1.1 薬効薬理試験

試験の種類	試験系	投与方法	投与量 (mg/kg)	例数	試験成績	資料番号
1) モノアミン涸渇作用	SD 系ラット	皮下投与	2 0.5~10 (用量はフリー体に換算して表示)	記載なし	<p>TBZ 2 mg/kg 皮下投与で脳内（視床下部，前頭皮質，線条体）のモノアミン（DA，NA，5-HT）量は速やかな減少を示したが，投与後 15 分ではほぼ最大効果に達し 2 時間に亘ってその効果は持続した。TBZ のモノアミン涸渇作用は DA に選択的であり，線条体や視床下部の DA 量は，対照に比し 70~75% の低下を示した。一方，視床下部の NA 量に対し TBZ の涸渇作用は弱く，最大 25% の低下しか認められなかった。</p> <p>TBZ の作用に対する各モノアミンの用量反応性を調べた試験でも TBZ の作用は DA に対する選択性が最も高く，対照に比べ 50% の低下を示す TBZ の用量は DA が最も低かった。</p>	4.2.1.1.1-1 [参考資料]
2) 線条体ドパミン及びホモバニリン酸含量に及ぼすテトラベナジン 12 ヶ月投与の影響	Wistar 系ラット	飲水投与	6.0~6.7 (mg/kg/day)	6~8	<p>TBZ を飲水投与したラットの線条体 DA 及び HVA 含量は，12 ヶ月間を通して，対照動物に比べ低値を示し，レセルピンとは異なり，耐薬性が生じ難いことが示唆された。</p>	4.2.1.1.1-2 [参考資料]
3) ハンチントン病モデルマウス（BACHD マウス）の常同行動に対するテトラベナジンの作用	BACHD マウス (HD モデル動物)	皮下投与	2.5	12, 13 4, 7	<p>2 ヶ月齢の BACHD マウスの常同行動スコアは WT マウスに比べて有意に高く，グルーミングやスニッフing に費やす時間は有意に長かった。</p> <p>2 ヶ月齢の BACHD マウスに TBZ 2.5 mg/kg を皮下投与（1~2 回）すると，常同行動スコアは有意な低下を示したが，WT マウスでは有意な影響は認められなかった。</p>	4.2.1.1.1-3 [参考資料]

2.6.3.2.1.1 薬効薬理試験

試験の種類	試験系	投与方法	投与量 (mg/kg)	例数	試験成績	資料番号
4) ハンチントン病モデルマウス (YAC128 マウス) におけるテトラベナジンの運動機能改善作用	YAC128 マウス (HD モデル動物)	経口投与	(5) (試験期間を通じたマウスの平均体重を 25 g と仮定した時に相当する用量)	15	<p>1) 加速 Rotarod 試験 YAC 対照では WT 対照に比べ 6 ヶ月齢以降に運動障害が認められた。TBZ を WT に投与すると運動機能障害が認められた。一方、早期 TBZ 投与 YAC では 6, 9, 11, 13 ヶ月齢で、後期 TBZ 投与 YAC では 9, 11, 13 ヶ月齢で YAC 対照に比べ運動障害の改善が認められたが、WT 対照レベルまでの改善作用は認められなかった。</p> <p>2) Beam-walking 試験 YAC 対照では WT 対照に比べ 6 ヶ月齢以降に運動障害が認められた。WT に TBZ を投与しても影響はなかったが、YAC に TBZ を投与すると有意な latency の短縮と foot slips 回数の減少が認められた。 YAC の早期 TBZ 投与では 6 ヶ月齢以降に、後期 TBZ 投与では 9 ヶ月齢以降に、それぞれ対照と比べて、有意な latency の短縮作用が認められた。</p>	4.2.1.1.1-4 [参考資料]

2.6.3.2.1.2 *In vitro*作用機序試験

試験の種類	試験系	適用量	試験成績	資料番号
1) ジヒドロテトラベナジンによるシナプス小胞画分へのモノアミン取り込み阻害作用	マウス脳標本シナプス小胞画分 バインディングアッセイ	—	[³ H]-HTBZ の B _{max} 値は線条体で最も高く、線条体で VMAT2 の分布が多いことが示唆された。HTBZ の 5-HT 取り込み阻害作用の IC ₅₀ 値は脳内各部位で 2.2~3.0 nM の範囲であり、また K _m 値は 0.60~1.10 μM であった。	4.2.1.1.2-1 [参考資料]

2.6.3.2.1.2 *In vitro*作用機序試験

試験の種類	試験系	適用量	試験成績	資料番号
2) 精製クロム親和性顆粒細胞膜におけるジヒドロテトラベナジンの結合特性 (1) [³ H]-ジヒドロテトラベナジン結合曲線と結合部位の特性 (2) [³ H]-ジヒドロテトラベナジン結合とカテコラミントランスポーターとの相互作用 (3) [³ H]-ジヒドロテトラベナジン結合部位の薬理学的特性	ウシ精製クロム親和性顆粒細胞膜	—	(1) [³ H]-HTBZ は精製クロム親和性顆粒細胞膜の VMAT に結合し、解析の結果、 K_d 値： 3.1 ± 0.4 nM, B_{max} 値： 62 ± 8 pmol/mg protein であった。 (2) [³ H]-HTBZ の結合部位占有率と ATP 依存性 [³ H]-NA 取り込み阻害作用との間に良好な相関関係が認められた。 (3) モノアミン取り込み阻害薬と [³ H]-HTBZ 結合の阻害作用から以下の EC_{50} 値 (nM) が求められた。TBZ：1.8/3.0, HTBZ[ラセミ体]：4.1, α -HTBZ：6.0, β -HTBZ：20, レセルピン：238/300, ハロペリドール：1071, クロルプロマジン：1890, 5-HT：345 $\times 10^3$, NA：1720 $\times 10^3$	4.2.1.1.2-2 [参考資料] 4.2.1.1.2-3 [参考資料]
3) ヒト VMAT2 及び VMAT1 発現細胞における [³ H]-ジヒドロテトラベナジン及びモノアミンの基質特異性	ヒト VMAT2, VMAT1 発現線維芽細胞	—	hVMAT2 発現細胞において [³ H]-HTBZ ([³ H]-TBZOH) との結合能が認められたが、hVMAT1 発現細胞において結合能は認められなかった。 [³ H]-5-HT 取り込み能に対して、hVMAT2 及び hVMAT1 発現細胞は同様の時間-濃度曲線を示し、 K_m 値は 0.8 及び 1.3 μ M で、 V_{max} 値は 43 及び 37 pmol/min/450,000 cells であった。 モノアミンに対する親和性は 5-HT>DA>Ad>NA>HA の順であり、hVMAT2 が hVMAT1 より高親和性を示し、5-HT に対する親和性は 1.6 倍、カテコールアミンに対しては 2.7~4.0 倍、HA に対しては 30 倍以上であった。 TBZ は [³ H]-5-HT 取り込みにおいて、hVMAT2 発現細胞に対しては阻害作用を示すが、hVMAT1 発現細胞に対して 20 μ M でも阻害作用を示さなかった。	4.2.1.1.2-4 [参考資料]

2.6.3.2.1.2 *In vitro*作用機序試験

試験の種類	試験系	適用量	試験成績	資料番号
4) テトラベナジン, α -ジヒドロ テトラベナジン, β -ジヒドロ テトラベナジンの各種受容 体トランスポーター等に対 する選択性	スクリーニング試験 バインディングアッセイ	0.1 μ M	<p>以下に示した試験項目（「酵素活性阻害作用」を除く）の中で、標識リガンドに対する結合阻害率が50%を超えたのはβ-HTBZのシグマ受容体（非特異的）に対する場合のみであった。β-HTBZのシグマ受容体結合に対するIC_{50}値を求めると、143 nMであった。</p> <p>他に被験物質（TBZ, α-及びβ-HTBZ）は、試験した受容体等と強い相互作用を示さず、また試験した酵素に対して強い阻害作用を示さなかった。</p> <p>試験項目</p> <ul style="list-style-type: none"> ・神経伝達物質受容体／トランスポーター：アデノシン（非選択的）、アドレナリン（α_1-及びα_2- [非選択的], β [非選択的]）、ドパミン（非選択的）、DAT, GABA_A（作動部位）、GABA_A・ベンゾジアゼピン・複合体（α_1）、GABA_B, グルタミン酸（AMPA, カイニン酸, NMDA（NMDA, グリシン））、ストリキニーネ感受性グリシン、ヒスタミン（H₁, H₂及びH₃）、メラトニン（非選択的）、ムスカリン性アセチルコリン（M₁及びM₂）、ムスカリン（非選択的中枢性及び末梢性）、ニコチン性アセチルコリン（α-ブングアロトキシン非感受性）、NET, オピオイド（非選択的）、オルファニン, SERT, セロトニン（非選択的）、シグマ（非選択的） ・ステロイド：エストロゲン, テストステロン（細胞質） ・イオンチャンネル：カルシウムチャンネルL型（ジヒドロピリジン結合部位）、N型, カリウムATP感受性, カリウム（ATP感受性）、カリウム（Ca²⁺活性型）、カリウム（hERG）、ナトリウム（サイト2） ・セカンドメッセンジャー系：NOS（ニューロン） ・プロスタグランジン類：ロイコトリエン [LTB₄及びLTD₄]、トロンボキサン [TXA₂] ・成長因子／ホルモン：コルチコトロピン遊離ホルモン（非選択的）、オキシトシン, PAF, サイロトロピン遊離ホルモン [TRH] ・内因性生理活性ペプチド：アンジオテンシン [AT₁及びAT₂]、ブラジキニン [BK₂]、コレシストキニン [CCK 及び CCK₂]、エンドセリン [ET-A 及び ETB]、ガラニン（非選択的）、ニューロキニン [NK₁, NK₂（NK_A）及びNK₃（NK_B）]、血管作動性小腸ペプチド [VIP]（非選択的）、バソプレッシン [V₁] ・酵素活性阻害作用：コリンアセチルトランスフェラーゼ [ChAT], アセチルコリンエステラーゼ [ACHASE], グルタミン酸脱炭酸酵素 [GAD], モノアミン酸化酵素 [MAO-A 及び MAO-B]（末梢性） 	4.2.1.1.2-5 4.2.1.1.2-6

2.6.3.2.1.2 *In vitro*作用機序試験

試験の種類	試験系	適用量	試験成績	資料番号
5) マウス脳におけるジヒドロテトラベナジン特異的結合の分布	マウス脳ホモジネート	—	脳の各部位における ^[3H] -HTBZの最大結合密度 B _{max} 値 (fmol/mg protein) は以下の通りであった。 線条体：1330, 視床：130, 視床下部：355, 中脳：235, 橋-延髄：164, 海馬：120, 前頭皮質：97, 小脳：46	4.2.1.1.2-7 [参考資料]
6) ラット線条体におけるジヒドロテトラベナジン及びスルピリド特異的結合の分布 (1) ジヒドロテトラベナジン結合 (2) スルピリド結合	ラット線条体脳切片	—	(1) 線条体各部位における ^[3H] -HTBZ 結合部位の B _{max} 値 (fmol/mg protein) は、内側部：620±22, 外側部：716±24, 背内側部：774±25 であった。 (2) 線条体各部位における ^[125I] -ヨードスルピリド結合部位の B _{max} 値 (fmol/mg protein) は、内側部：17.34±0.60, 外側部：24.93±0.96 であった。	4.2.1.1.2-8 [参考資料]
7) ヒト死後脳におけるジヒドロテトラベナジン特異的結合の分布	ヒト死後脳標本	—	^[3H] -HTBZ 結合部位の脳部位別分布を検討したところ、黒質緻密部、青斑核、背側縫線核で高く、腹側被蓋野では中等度の分布であり、また黒質網様部や A8 (カテコラミン作動性細胞) では低かった。	4.2.1.1.2-9 [参考資料]
8) ドパミン D ₂ 受容体への作用	ラット線条体ホモジネート ブタ脳下垂体ホモジネート	—	K _i (見かけの阻害定数) は以下の通りであった。 線条体：5.20±0.80 μM 脳下垂体前葉：3.20±0.50 μM	4.2.1.1.2-10 [参考資料]
9) ハンチントン病モデルマウスのシナプス伝達に対するテトラベナジンの作用	YAC128 マウス脳切片 BACHD マウス脳切片	10 μM	ハンチントン病モデルマウスにおいて線条体の出力バランスは直接路優位であり、これはシナプス前終末の神経細胞がシナプス間隙に十分量以上の DA を放出していることによるものと示唆された。また、TBZ はシナプス前終末の DA 潤渇作用により D ₁ 受容体発現細胞の活動活性を低下させた。	4.2.1.1.2-11 [参考資料]

2.6.3.2.1.3 *In vivo*作用機序試験

試験の種類	試験系	投与方法	投与量 (mg/kg)	例数	試験成績	資料番号
1) 標識リガンドを用いた脳組織内分布の検討 (1) マウスにおける試験	CD-1 系マウス 放射性リガンド： [¹¹ C]-TBZ	静脈内投与	0.02~0.57 mCi/ 0.05~ 0.1 mL	4	(1) [¹¹ C]-TBZ の脳内への移行性は速やかで、投与した2分後には投与量の3.2%が認められた。消失も速やかで、60分後の残存量は投与量の0.21%であった。 投与10分後の脳内分布は、線条体、視床下部、視床、海馬、橋-延髄、皮質、小脳の順であった。 [¹¹ C]-TBZ 結合は非標識 TBZ で阻害されたが選択的 DAT 阻害薬 GBR 12935 では阻害されなかった。	4.2.1.1.3-1 [参考資料]
(2) サルにおける試験	ブタオザル 放射性リガンド： [¹¹ C]-TBZ (1匹は MPTP 投与によりパーキンソン病様症状を示すモデル動物)	静脈内投与	4.0~6.0 mCi	2	(2) [¹¹ C]-TBZ は投与後急速な脳内への移行と消失が認められ、5分後に脳内濃度は最高となった。 線条体では投与10分後に最高濃度に達し、[¹¹ C]-TBZ の消失が最も遅かった。 [¹¹ C]-TBZ 結合は非標識 TBZ で阻害され、また MPTP で傷害した脳半球では[¹¹ C]-TBZ 結合は認められなかった。	4.2.1.1.3-2 [参考資料]

2.6.3.2.2 副次的薬理試験

試験の種類	試験系	投与方法	投与量 (mg/kg)	例数	試験成績	資料番号
1) マウスにおける内因性ドパミン誘発性線条体ドパミンニューロン傷害に対するテトラベナジンの保護作用	Swiss-Webster 系 マウス	腹腔内投与	0.1, 1.0, 10	3~16	マロン酸二ナトリウム処置により DA 神経終末の変性が生じ、線条体 DA 含量は対照（生理食塩液処置）に比べ 40%まで低下したが、TBZ 1.0, 10 mg/kg を腹腔内に投与した群では、線条体 DA 含量低下が抑制され神経保護作用が認められた。	4.2.1.2-1 [参考資料]
2) マウスのパーキンソン病モデルにおける神経保護作用 (1) 6-ヒドロキシドパミン誘発性黒質線条体ドパミンニューロン傷害に対するテトラベナジンの作用	Swiss-Webster 系 マウス	皮下投与	30	13	(1) TBZ は 6-OHDA 誘発性の神経毒性 (DA 及び DA 代謝物量低下) を抑制せず、神経保護作用を示さなかった。	4.2.1.2-2 [参考資料]
(2) 1-メチル-4-フェニル-1,2,3,6-テトラヒドロピリジン誘発性黒質線条体ドパミンニューロン傷害に対するテトラベナジンの作用	C57BL/6 系マウス	腹腔内投与	25		(2) MPTP を 1.5 時間間隔で 3 回腹腔内投与すると、線条体 DA 量及び海馬 NA 量は低下した。また、レセルピン (5 mg/kg) のみを投与したマウスでは、線条体 DA 量減少のみ認められ、海馬 NA 量に変化はなかった。一方、レセルピンと MPTP を併用処置した場合には増強作用が認められ、線条体及び海馬内カテコールアミン量が MPTP 単独処置の場合に比べ更に減少した。 TBZ と MPTP を併用処置した場合も同様に、増強作用が認められ、線条体 DA 量は MPTP 単独処置の場合に比べて減少したが、海馬 NA 量に変化はなかった。	4.2.1.2-3 [参考資料]

2.6.3.2.3 安全性薬理試験

試験の種類	試験系	投与方法	投与量 (mg/kg)	例数	試験成績	資料番号
1) 中枢神経系に及ぼす影響						
(1) 麻酔に対する作用						
a) テトラベナジンのエタノール麻酔増強作用	マウス	皮下投与	40	記載なし	a) エタノールの麻酔作用を増強し、その作用は4～5時間持続した。	4.2.1.3-1 [参考資料]
b) テトラベナジンのヘキソバルビタール麻酔増強作用	マウス	腹腔内投与	10, 20, 40	30	b) ヘキソバルビタールの麻酔作用を増強し、その作用は用量依存的であった。40 mg/kg の TBZ 投与群においては顕著な増強作用を示した。	4.2.1.3-2 [参考資料]
(2) テトラベナジンの体温に及ぼす影響						
a) TBZ の単独作用及び LTD との併用作用	dd 系マウス	腹腔内投与	40	10	a) TBZ 投与により対照群では 3.3℃ の体温下降が認められたが、LTD 200～800 mg/kg の併用により、TBZ の体温下降作用は用量依存的に拮抗され、この作用は4時間持続した。	4.2.1.3-3 [参考資料]
b) NA 脳室内投与の影響				8	b) NA 1 µg の icv により、30 分後に体温下降が止まり、また 5 µg では 30 分後に体温下降が止まり、60 分以降は対照群に比べて有意な体温上昇が認められた。	
c) 脳内 NA 量に及ぼす TBZ 単独及び LTD 併用の影響				8	c) TBZ 投与により脳内 NA 含量は著明に低下したが、LTD の併用により TBZ による脳内 NA 含量の低下は有意に抑制された。	

試験の種類	試験系	投与方法	投与量 (mg/kg)	例数	試験成績	資料番号
(3) 自発脳波に対する作用	ウサギ	記載なし	40	記載なし	紡錘波に続く高振幅徐波（睡眠脳波）が誘発され、その作用は 4 時間持続した。	4.2.1.3-4 [参考資料]
(4) 報酬効果（条件付け）に対する作用						
a) 脳内自己刺激で誘導された報酬効果に対する作用	Wistar 系ラット	腹腔内投与	2	4	a) 平均 76.8 回/分のレバー押しをするように条件付けされたラットに TBZ を投与すると、投与 15～20 分からレバー押し回数は、平均 3 回/分に有意に減少し、その作用は少なくとも 2 時間に亘り全個体で観察された。	4.2.1.3-5 [参考資料]
b) 自然報酬効果に対する作用	SD 系ラット	腹腔内投与	0.25, 0.5, 1, 2, 4 (用量はフリー体に換算して表示)		b) TBZ の投与量と反応回数率及び報酬効果達成率の間には相関があり (0.81 及び 0.88), 反応回数率は 2 及び 4 mg/kg 投与により、それぞれ-20% と-90% に減少した。報酬効果達成率に対しても同様の作用が認められた。	4.2.1.3-6 [参考資料]

試験の種類	試験系	投与方法	投与量 (mg/kg)	例数	試験成績	資料番号
(5) 一般症状に及ぼす作用	マウス, ラット, ウサギ, ネコ, イヌ, サル	経口投与, 腹腔内投与, 皮下投与, 静脈内投与	(p.o.) 2.5, 10, 15, (i.p.) 15 (s.c.) 20, 60 (i.v.) 25	3~20 (一部記載なし)	TBZ 投与後のマウス, ラット, ウサギ, イヌ, ネコ, サルにおける一般症状の観察では, 薬理作用により中枢神経系に及ぼす作用が認められたが, その作用発現用量は薬効量と比較すると高用量であり, またモノアミン潤渴作用に起因する作用以外に非特異的な作用は認められなかった.	4.2.1.3-2, -4, 10 ~-14 [参考資料], 4.2.1.4-6 [参考資料], 4.2.3.2-2, -4, -5, 4.2.3.7-5
2) 心血管系に及ぼす影響						
(1) hERG チャンネル阻害作用	<i>In vitro</i> 電気生理学的試験	<i>In vitro</i>		3~4	TBZ, α -HTBZ 及び β -HTBZ の hERG 電流阻害作用の IC ₅₀ 値 (μ M) はそれぞれ 79.1, 12.0 及び 6.4 であった.	4.2.1.3-7
(2) 無麻酔下犬におけるテレメトリー法によるテトラベナジンの心血管循環及び心電図パラメータに及ぼす作用	無麻酔ビーグル犬	経口投与	5, 10, 20	4	高用量 (20 mg/kg) の経口投与により, dP/dt _{max} は有意な増加作用を示した. この作用以外に TBZ による心血管系への有意な作用は認められなかった. 心電図パラメータに対しても, 心拍数増加による RR 間隔の変化以外に著しい変化はなく, QT _c にも影響を及ぼさなかった.	4.2.1.3-8
3) 呼吸器系に及ぼす影響						
(1) 無拘束ラットにおける全身プレチスモグラフィ法によるテトラベナジンの呼吸機能に及ぼす作用	SD 系ラット	経口投与	5, 15, 30	6	15 mg/kg 及び 30 mg/kg 投与群の 1 回換気量に有意な増加作用が認められた. 呼吸数と分時換気量に対しては, 有意な作用は認められなかった.	4.2.1.3-9

2.6.3.2.4 薬力学的薬物相互作用試験

試験の種類	試験系	投与方法	投与量 (mg/kg)	例数	試験成績	資料番号
1) リチウムとの相互作用	ddY 系マウス 自発運動量測定	皮下投与	5 (塩化リチウムとして)	10	TBZ 投与後対照群では, 3 時間に亘り持続的な自発運動量の低下が認められた. 塩化リチウム投与群では TBZ 投与 5 分後をピークとして一過性の自発運動量増加が観察されその後運動量は低下した. しかし塩化リチウムの投与期間が長いほど, また用量が高いほど, 投与 60 分後以降に, TBZ 誘発自発運動量低下からの回復が早くなる傾向が認められた.	4.2.1.4-1 [参考資料]
2) メタンフェタミンとの相互作用 (1) ラット線条体シナプス標本におけるメタンフェタミンのドパミン取り込み及び [³ H]-ジヒドロテトラベナジン結合に及ぼす作用	SD 系ラット 線条体シナプス標本	<i>ex vivo</i>	—	7~8	(1) METH 処置により DA 取り込みは 1 時間後に 65% 低下し, この低下は 24 時間後も持続していた. また [³ H]-ジヒドロテトラベナジン結合も METH 処置により, DA 取り込みと同様の低下を示した.	4.2.1.4-2 [参考資料]

試験の種類	試験系	投与方法	投与量 (mg/kg)	例数	試験成績	資料番号
(2) マウスの自発運動量に及ぼすテトラベナジンとメタンフェタミンの相互作用	dd系マウス	皮下投与	1, 2, 4	10	(2) TBZを前投与した場合には、METHによる自発運動量増加作用は、TBZの用量依存的に低下し、1 mg/kgから有意な作用が認められた。 TBZとMETHを同時に併用投与した場合、METH単独の場合に比べ、有意に自発運動量が増加したが明確な用量依存性はなかった。 TBZをMETHの4時間後に投与した場合、対照群ではMETHの作用が消失しているにもかかわらず、TBZは用量依存的かつ有意な自発運動量増加作用を示した。	4.2.1.4-3 [参考資料]
3) テトラベナジンの脳内モノアミン涸渇作用に及ぼすMAO阻害薬クロルギリンの影響	SD系ラット脳ホモジネート	皮下投与 <i>ex vivo</i>	3, 20 (用量はフリー体に換算して表示)	4~5	クロルギリン(1, 3, 6 mg/kg)単独投与では海馬の5-HT量が用量依存的に増加し、6 mg/kgでは線条体DA量も増加した。 TBZとクロルギリンを併用した場合、クロルギリン1 mg/kgではTBZ単独に比べ、全てのモノアミンの涸渇に対して拮抗作用が認められたが5-HTを除き、対照レベルまでの拮抗作用ではなかった。しかしクロルギリン3及び6 mg/kgでは全てのモノアミンの涸渇に対して、対照のレベル以上の拮抗作用が認められた。 クロルギリンのこの拮抗作用はTBZの用量が20 mg/kgでも認められた。	4.2.1.4-4 [参考資料] ^{注1)}
4) 抗うつ薬との相互作用 (1) テトラベナジンの脳内モノアミン涸渇作用に及ぼすデシプラミンの作用	SD系ラット	皮下投与	3 (用量はフリー体に換算して表示)	4~5	(1) デシプラミンの前投与により、TBZ投与15及び30分後の皮質NAの涸渇作用に対して有意な拮抗作用が認められたが、線条体DA及び海馬5-HTの涸渇に対しては有意な作用は見られなかった。 デシプラミンのこの拮抗作用は1, 3, 10 mg/kgで用量依存性が認められた。	4.2.1.4-5 [参考資料] ^{注1)}
(2) テトラベナジン誘発眼瞼下垂に対する抗うつ薬の作用	Wistar系ラット	皮下投与	5	7~8	(2) イミプラミン、アミトリプチリン、パロキセチンはTBZ誘発眼瞼下垂に拮抗作用を示し、ED ₅₀ 値 (mg/kg) [95%信頼区間] は順に、2.7 [0.5~13.5]、26.0 [9.3~72.8]、34.5 [12.3~96.6]であった。	4.2.1.4-6 [参考資料]

注1) : 資料番号 4.2.1.1.1-1 [参考資料] と同資料