

レスピア静注・経口液 60mg

第2部（モジュール2）

2.4 非臨床試験の概括評価

ノーベルファーマ株式会社

## 目次

2.4.1 非臨床試験計画概略	3
2.4.2 薬理試験	3
2.4.2.1 効力を裏付ける試験	3
2.4.2.2 副次的薬理試験	6
2.4.2.3 安全性薬理試験	6
2.4.2.4 薬力学的薬物相互作用試験	10
2.4.3 薬物動態試験	11
2.4.3.1 吸収	11
2.4.3.2 分布	11
2.4.3.3 代謝	12
2.4.3.4 排泄	12
2.4.3.5 薬物相互作用	13
2.4.4 毒性試験	13
2.4.4.1 単回投与毒性試験	13
2.4.4.2 反復投与毒性試験	13
2.4.4.3 遺伝毒性試験	13
2.4.4.4 がん原性試験	14
2.4.4.5 生殖発生毒性試験	14
2.4.4.6 局所刺激性試験	14
2.4.4.7 その他の毒性試験	14
2.4.5 考察及び結論	15

## 略語一覧

ADP	アデノシン二リン酸 (Adenosine diphosphate)
ANOVA	分散分析 (analysis of variance)
$B_{max}$	最大結合密度
CB	頸動脈小体 (carotid body)
CBD	頸動脈小体神経除去 (carotid body denervation)
CHA	シクロヘキシルアデノシン (Cyclohexylaenosine)
CPAP	経鼻的持続気道陽圧呼吸 (continuous positive airway pressure)
8-CPT	8-シクロペンチルテオフィリン (8-cyclopentyltheophylline)
CSN	頸動脈洞神経 (carotid sinus nerve)
CYP	チトクロム P450
DPY	ジピリダモール (Dipyridamole)
$+dT/dt_{max}$	最大発生張力 (tension first derivative)
f	呼吸数 (respiratory rate)
FENa	Na 排泄率 (Na excretion rate)
FF	糸球体濾過比 (GFR/RPF 比)
$FiO_2$	吸入気酸素濃度 (inspired oxygen concentration)
FMO	フラビン含有モノオキシゲナーゼ (flavin -containing monooxygenase)
FSH	卵胞刺激ホルモン (follicle stimulating hormone)
GFR	糸球体濾過量 (glomerular filtration rate)
hERG	ヒト遅延整流カリウムイオンチャネル遺伝子 (human ether-a-go-go related gene)
IAP	ヨードアンチピリン (Iodoantipyrine)
IARC	国際がん研究機関 (International Agency for Research on Cancer)
NECA	5'-N-エチルカルボキサミドアデノシン (5'-N-ethylcarboxamidoadenosine)
$LD_0$	最大耐量 (Lethal Dose 0)
$LD_{50}$	50%致死量 (Lethal Dose 50)
PDE	ホスホジエステラーゼ (phosphodiesterase)
8-PT	8-フェニルテオフィリン (8-phenyltheophylline)
RBF	腎血流量 (renal blood flow)
RVR	腎血管抵抗 (renal vascular resistance)
SCE	姉妹染色分体交換 (sister chromatid exchange)
TI	吸気時間 (inspiratory phase time)
VE	分時換気量 (minute ventilation 又は volume)
VT	1 回換気量 (tidal ventilation 又は volume)
VT/TI	平均吸気流量 (1 回換気量/吸気時間)

### 2.4.1 非臨床試験計画概略

レスピア静注・経口液 60mg (以下、「本剤」) は、3 mL 中にカフェインクエン酸塩 60 mg を含有する、静注及び経口のいずれも投与可能なバイアル入り水性の無菌製剤である。本剤はフランスでは 1997 年、米国では 1999 年、イギリスでは 2008 年に、オーストラリアでは 2010 年に早産児無呼吸発作治療薬として承認されている。

現在、国内では、早産児無呼吸発作の治療として低酸素投与や物理的刺激などが行われているが、これらの治療では十分ではないことからアミノフィリン及びテオフィリン等のキサンチン誘導体を用いた薬物治療と呼吸管理としての経鼻的持続気道陽圧呼吸 (CPAP) 療法や人工換気療法などが行われている。しかし、人工換気療法では長期挿管による感染や予後の咽頭・気管狭窄など懸念があり、その使用頻度を低下させる上で薬物治療は重要である。

本剤は、アミノフィリン及びテオフィリン等の薬剤に比べ、有効かつ安全で、経済性に優れた小児の必要不可欠医薬品として、現在 WHO の「Model List of Essential Medicine for Children 2009」に、早産児無呼吸発作の治療薬として唯一記載されている薬剤である。

本剤の国内開発については、「医療上の必要性の高い未承認薬・適応外薬検討会議」の検討結果に基づいて、平成 22 年 5 月 21 日付けで厚生労働省から開発要請があり、本剤の開発が開始されることとなった。

本剤の非臨床試験に関して、薬理試験、薬物動態試験及び毒性試験に係るデータ構成は、1999 年の米国での本剤の新医薬品承認申請に用いられた資料に、文献検索して得られた公表論文を加えて CTD 様式として纏めた。なお、CTD に纏めるにあたってはカフェインクエン酸塩の作用に加えて、カフェインの作用も含めて記載した。

### 2.4.2 薬理試験

#### 2.4.2.1 効力を裏付ける試験

##### (1) 自発呼吸に対する作用

(添付資料 4.2.1.1-1~4 参)

ペントバルビタール麻酔下の 2~7 日齢のウサギにカフェイン 10 mg/kg 腹腔内投与したとき、1 回換気量 (VT) の低下及び呼吸数 (f) の増加がみられたが、分時換気量 (VE) は変化しなかった。Hering-Breuer 呼気誘発反射に関して、カフェインは、VT を減少、気道圧を不変又は減少させたが、呼気反射は増加させた。Hering-Breuer デフレーション反射では吸気時間と呼気時間の減少と f の増加が認められたが、カフェインは、これらのパラメーターに対して影響を与えなかった。カフェインの呼吸系に対する作用は、迷走神経の切除により影響を受けなかった。

早産未熟児ヒヒ (平均 125±2 日で帝王切開:185 日の妊娠期間の 67%に相当する日数) を用いた実験において、未熟児摘出後、直ちにサーファクタント 200 mg/kg を投与し、さらに生後 6 時間にも 100 mg/kg を投与した。カフェインクエン酸塩は、20 mg/kg を生後 1 及び 12 時間後の計 2 回を 20 分かけて静脈内に持続投与した。カフェイン投与群ではカフェイン非投与群と比べて  $FiO_2$  は 24 時間後に、最大吸気圧は 12~24 時間後に、呼吸器必要率は 18~24 時間後に減

少した。カフェインは、有効換気容積及び動脈・肺胞酸素比を有意に改善した。カフェインは、1回換気量に対しては影響を与えなかったが、投与後12及び24時間における気道抵抗を有意に減少させ、18及び24時間における呼吸系コンプライアンスを有意に増加させた。サーファクタントとの併用において、カフェインによる生後早期治療は、生後24時間にわたって肺機能を改善することが認められた。

生後日齢が平均 $13 \pm 0.6$ 日のヒツジを12匹使用し、そのうち6匹は両側性の頸動脈小体神経を除去(CBD)し、残りの6匹は神経未除去(intact)とした。intactヒツジではカフェインクエン酸塩20 mg/kg(カフェイン10 mg/kgに相当する用量)投与後1分のVEは瞬時に増加(baselineから46%増加)し、その後この増加は減少するものの、15及び120分後においてもカフェイン投与前のレベルより高かった。このカフェインのVE増加作用は、CBDヒツジでは完全に消失した。IntactヒツジにおけるカフェインのVE増加作用は平均吸気流量(VT/TI)の増加に起因していた。カフェインによりVT/TIはVEと同様な変化推移を示した。CBDヒツジにおいて、intactヒツジで見られたVT/TIのカフェインによる増加は消失していた。

サル呼吸機能に対する作用を検討したとき、アデノシン拮抗作用及び/又はホスホジエステラーゼ(PDE)阻害作用を有するキサンチン誘導体であるカフェイン(5~100  $\mu$ M/kg)、テオフィリン(0.5~50  $\mu$ M/kg)、8-フェニルテオフィリン(8-PT)(0.5~50  $\mu$ M/kg)、8-シクロペンチルテオフィリン(8-CPT)(3~30  $\mu$ M/kg)、エンプロフィリン(5~100  $\mu$ M/kg)及び非キサンチン誘導体でかつアデノシン拮抗作用を有していないPDE阻害剤のロリプラム(0.01~0.5  $\mu$ M/kg)は用量依存的に呼吸数を増加させ、ロリプラム、テオフィリン及び8-CPT投与では1回換気量も増加させた。これらの薬剤の効果は二酸化炭素正常空気及び高二酸化炭素空気負荷(+5%CO<sub>2</sub>負荷)のいずれの条件においても認められた。8-PT(0.5~50  $\mu$ M/kg)は呼吸数及び1回換気量に対しては何ら影響を与えなかった。

## (2) 低酸素モデルにおける呼吸機能改善作用

### (添付資料4.2.1.1-5~7参)

生後1~4日齢のブタを15匹使用した。低二酸化炭素/低酸素刺激後2分では分時換気量(VE)は有意に増加したが、10分後にはbaselineに戻った。一方、高二酸化炭素/低酸素刺激では、その2分後のVEは増加し、10分後においてもこの増加は持続していた。カフェインクエン酸塩は、20 mg/kgを静脈内に投与(この時の血中濃度:8~12  $\mu$ g/mL)したとき、低二酸化炭素/低酸素刺激によるVEの増加が2分後に認められたが、カフェインクエン酸塩投与前で見られたような刺激後10分でbaselineに戻ることはなく、2分後の増加作用が持続したままであった。高二酸化炭素/低酸素刺激では、2分及び10分後のVEはカフェインクエン酸塩投与前後ともに増加した。脳血液関門を通過しないアデノシンの神経細胞再取り込み阻害薬のdipyridamole(DPY)及びアデノシン受容体阻害薬の8-PTを脳室内投与した。低二酸化炭素/低酸素刺激後2分に見られたVE増加は10分後に減少するが、8-PT投与ではこの減少は認められず、カフェインと同様に2分後の増加が持続していた。一方、DPYでは、低二酸化炭素/低酸素刺激によるVE

の変動は減弱し、2 分後の有意な増加はみられなかった。以上の結果から、ブタの呼吸器系に対し、カフェインは、低酸素時に見られる遅延性の呼吸器機能低下を改善し、カフェインのこの作用には中枢系アデノシンの関与が推察された。

サルは体重 6.0~10.2 kg の成熟雄 2 匹及び雌 3 匹の合計 5 匹を用いた。正常空気負荷時において、カフェインは、f 及び VE を有意に増加した。正常空気負荷時に見られたカフェインの効果は低酸素及び高酸素負荷時においても認められた。

23 匹の雄性新生児ラットを用いた。新生児ラットは生まれた日を生後 0 日とし、生後 3 日~12 日まで (10 日間連続) oxycycler を用いて間欠的かつ慢性的な低酸素負荷を与えた。12 日に正常酸素負荷での VE と Apnea の発生頻度及び持続時間のベース変動性を 10 分間観察した後、新生児ラットに低酸素負荷を与えた。即ち、1 分間で酸素負荷を正常酸素の 21% から 5% に、続く 2 分間で 5% から 21% に戻し、5 分間正常酸素負荷とし、このサイクルを 8 分毎に 10 回繰り返した。カフェインクエン酸塩は、実験開始前 30 分に腹腔内投与した。VE、Apnea の発生頻度と Apnea の持続時間を正常酸素負荷後、低酸素負荷後及び 2 時間の回復後にカフェイン投与群と対照群 (生理食塩液) につき測定した。間欠的に 10 日間低酸素負荷を与えた新生児ラットでは、低酸素負荷後 2 時間の回復期間において、VE はカフェイン投与により有意に増加したが、f は軽度ではあるが減少した。Apnea の発生頻度及び発生持続時間に対して、カフェインは、baseline 時 (正常酸素負荷後) 及び低酸素負荷後 2 時間の回復期の Apnea の発生頻度を低下させたが、発生持続時間には影響を与えなかった。

### (3) 作用機序

#### (添付資料 4.2.1.1-4、8~10 参)

カフェインの 5 種類のホスホジエステラーゼ (PDE) isoenzymes に対する IC<sub>50</sub> 値は mM 未満の濃度で観察され、PDE isoenzymes 間における阻害強度には顕著な差は認められなかった。カフェインのアデノシン A1 及び A2 受容体結合阻害濃度は約 40~50  $\mu$ M の範囲内で、アデノシン A1 及び A2 受容体に対する選択性は認められなかった。テオフィリンの PDE に対する IC<sub>50</sub> 値は 155~630  $\mu$ M であったのに対し、アデノシン A1 及び A2 受容体結合阻害作用は、10  $\mu$ M のオーダーレベルで認められた。これらの結果から、カフェインは、アデノシン受容体阻害作用及び PDE 阻害作用を有することが示された。

体重 250~350 g の Wistar 系雌雄ラットから頸動脈小体及び洞神経側枝を摘出し、頸動脈小体-洞神経 (CB-CSN) 標本を、また、洞神経側枝を除去した頸動脈小体を調製した。CB-CSN の活性の指標として神経の活動電位を測定した。頸動脈小体では化学受容器からの [<sup>3</sup>H] カテコールアミンの遊離を測定した。低酸素 (5%O<sub>2</sub>) では CB-CSN 活性に対するカフェインの抑制作用には二相性が認められ、カフェインに対する low affinity ([<sup>3</sup>H] カテコールアミンリリースに影響を及ぼす濃度と同じ濃度レンジ) と high affinity の二つのコンポーネントが存在していた。Michaelis-Menten 式から算出した high affinity コンポーネントの Km 値は 17.90  $\times 10^{-9}$ M で、この時のカフェインの CB-CSN 活性に対する最大抑制率は 29.81% であった。Low affinity コンポーネントの Km 値は 160  $\times 10^{-6}$ M で、この時の最大抑制率は 21.35% であった。その結果、

カフェインの低酸素による CB-CSN 活性に対する最大抑制率は 51.16% となった。アデノシン 2A 受容体アンタゴニスト SCH58621 の 200 nM (アデノシン A2A 受容体の解離定数の 10 倍以上の濃度) における CB-CSN 活性抑制率は  $29.53 \pm 2.73\%$  であったことから、カフェインの high affinity コンポーネントは、アデノシン A2A 受容体によって調節されていることを示している。一方、アデノシン A2A/A2B 受容体アンタゴニストの ZM241385 は 300 nM (アデノシン A2A 及び A2B 受容体の解離定数のそれぞれの 75 倍以上及び 10 倍以上の濃度) において低酸素刺激による CB-CSN 活性を  $61.22 \pm 5.83\%$  阻害した。これはカフェインの CB-CSN 活性に対する low affinity コンポーネントはアデノシン A2B 受容体により調節されていることを示している。頸動脈小体化学受容器に対するカフェインの抑制作用にはアデノシン A2A 及び A2B の両方の受容体が関与していると推察される。

在胎 18 日目～生後 3 日目までのラット (Wistar 系) から脳幹脊髓標本を作製し、それを 95%  $O_2$ -5%  $CO_2$  混合ガス通気下に人工脳脊髄液で灌流し、suction electrode を用いて C4 又は C5 腹側根の呼吸系活動を測定した。ラットは、在胎時期 2 日目から生後は 3 日目まで母ラットの飲水 (0.3 g/L) を通じて長期間にわたってカフェインを投与された。脳幹部の呼吸系活動は脳橋により抑制を受けるが、カフェイン非投与ラットと比べて、カフェイン投与ラットでは、脳橋による脳幹部の呼吸系活動に対する抑制作用がより顕著であった ( $p < 0.05$ , MANOVA, repeated measures design)。また、脳橋を除去した脳幹脊髓標本における呼吸系活動に関して、カフェイン投与ラットでは、カフェイン非投与ラットに比べて呼吸系活動は有意に高かった ( $p < 0.05$ , t-test)。このときの延髄及び脳橋におけるアデノシン A1 受容体数及びその mRNA 含量はカフェインの影響を受けなかった。以上の結果から、在胎期間中から生後にかけてカフェインを長期間投与すると、アデノシン A1 受容体数や mRNA 量自体には検出可能な変化は認められないが、延髄の呼吸リズムを発生する神経ネットワークの活動及びその活動に対する脳橋による抑制効果は増加すると考えられる。

サルの f 及び 1 回換気量に対して非選択的アデノシン受容体アゴニストの 5'-N-エチルカルボキサミドアデノシン (NECA) は f を増加させ、1 回換気量を減少させた。この作用に対し、カフェイン及び 8-CPT は拮抗したが、PDE 阻害作用は有するがアデノシン受容体阻害作用を有していないロリプラムは拮抗作用を示さなかった。この結果から、カフェインの呼吸促進作用はアデノシン受容体を介して作用している可能性が示唆された。

#### 2.4.2.2 副次的薬理試験

該当する試験を実施しなかった。

#### 2.4.2.3 安全性薬理試験

##### (1) 中枢系に対する作用

(添付資料 4.2.1.3-1~8 参)

発達性 (正向反射と開眼)、自発運動 (open field activity) 及びオペラント学習 (空間学

習能力) の三項目につき評価した。カフェイン 1 又は 9 mg/kg を生後 1~6 日間、胃内投与し、カフェインの作用を検討した。カフェイン投与により、新生児ラットの自発運動量の低下、成熟期におけるオペラント学習の障害が認められた。生後 1~17 日目では体重増加の抑制が認められたが、成熟期には vehicle 群とカフェイン 1 及び 9 mg/kg 投与群との間には体重増加の差は認められなかった。生後の発達過程においてカフェインは開眼と正向反射には影響を与えなかった。カフェインの作用に性差は認められなかった。

生後 2 日目の新生児ラット (SD 系) を用いた。カフェインを生後 2 日目に 20 mg/kg、3~6 日目には 15 mg/kg を胃内投与した (5 日間連投)。測定項目として鎮痛 (Hot plate)、不安行動 (Dark-light 移動) 及び学習行動 (Step-through 受動回避学習) に対する影響を検討した。カフェインを新生児期 (生後 2~6 日) に 5 日間投与したラットは雌雄を問わず、生後 35 日目においても痛覚に対する回避反応時間は有意に短縮し、痛覚過敏を示した。カフェインの不安行動に対する作用では、カフェインを新生児期 (生後 2~6 日) に 5 日間投与したラットは雌雄を問わず、生後 39 日目においても明室にいる時間は延長し、暗室にいる時間は短縮した。カフェインの記憶学習行動に対する作用では、カフェインを新生児期 (生後 2~6 日) に 5 日間投与したラットは雌雄を問わず、生後 35~37 日目においても電気ショックに対する記憶保持が低下した。

母ラット (SD 系) に、カフェイン 23~30 mg/kg/日又は 94~135 mg/kg/日を、control 群の母ラットには蒸留水のみを出産から離乳 (21 日目) までの 3 週間にわたって飲水投与した。評価項目として新生児の聴覚刺激反射、開眼及び正向反射に対するカフェインの影響を検討した。開眼に対しては、control 群とカフェイン群との間には有意な差は認められなかった。カフェイン摂取した新生児ラットでは、control 群に比べて正向反射及び聴覚刺激反射に対する発達は早かった。

母ラット (SD 系) に妊娠 7 日目から、さらにその新生児ラットが離乳する生後 22 日目までの間、飲料水にカフェイン (飲料水中濃度: 0.0125、0.0250 及び 0.0500%) を含ませて与えたとき (カフェイン平均摂取量: 23、49 及び 92 mg/kg/日) のラットの体重、開眼及び行動に対する影響を検討した。カフェインの作用については、妊娠期間と授乳期間とに分けて control 群と比較した。試験期間中の新生児ラットの体重増加に対してカフェインは影響を与えなかった。開眼時期に対してはほぼすべての新生児ラットは 15 日目までに開眼したが、生後 13 日目の時点での開眼率はカフェイン投与により遅延した。カフェインのこの遅延作用に性差や投与量による違いは認められなかった。離乳した思春期ラットでは、カフェインにより有意な探索行動の増加、rearing 回数の増加が認められた。一方、正向反射、その他の行動 (ストレス応答、回避行動の獲得と消去) に対してカフェインは影響を与えなかった。

カフェインを母ラット (SD 系) の母乳を通じて生後 1~15 日目まで新生児ラットに連続的に経口投与した。Control 群には 20% プロテイン食のみを、カフェイン投与群はこのプロテイン食にカフェインを加え 10 mg/kg 又は 20 mg/kg 投与した。新生児ラット脳内の各種成分含量は生後 15 日目に測定した。カフェイン 10 mg/kg 投与群では、脳内タンパク質量及びコレステロール量は有意に低下し、アルカリホスファターゼ量は有意に増加した。脳重量に対してはカフェインにより有意ではないが増加傾向を示した。一方、カフェイン 20 mg/kg 投与群では脳重量の増加のみが認められた。

新生児ラット (SD 系) へのカフェイン投与は、離乳までは母ラットを介して行った。在胎期間中母ラットに妊娠 9 日目よりカフェイン 20 mg/kg を含む 20%タンパク質食を与え、胎児ラットは母ラットの母乳を通じてカフェインを摂取した。生後から生後 22 日までは母乳を通じてカフェインを摂取、離乳した生後 22 日から生後 93 日まではカフェインを含んだ食餌 (母ラットと同じ食餌) よりカフェインを摂取した。生後 93 日から 388 日まではカフェインフリー食に切り替えた。運動量は生後 31 日から 375 日まで測定した。カフェインを長期にわたって投与したラットの運動量はその後の成長過程を含めて有意に増加した。

カフェインは、新生児ラット (Long Evans 系) の生後 2 日目に 20 mg/kg、3~6 日目に 15 mg/kg を、control 群には水をそれぞれ胃内投与した (投与量と投与期間はヒト臨床の場合と同じ設定)。生後直ちに投与したカフェインがラットの成長過程で、脳内各部位のアデノシン受容体機能に対してどのような影響を与えるのかを検討するため、ラット脳内のアデノシン A1 受容体 (アデノシン A1 受容体リガントとして [<sup>3</sup>H]cyclohexyladenosine (CHA)) に対する作用を生後 14~90 日の期間に検討した。生後直ちにカフェインを投与したラットの特異的アデノシン A1 受容体結合能は大脳皮質、小脳及び海馬で有意に増加したが、脳幹及び視床下部では有意な変化は認められなかった。大脳皮質において  $K_d$  値はカフェインにより影響を受けなかったが、高親和性アデノシン A1 受容体の最大結合密度  $B_{maxH}$  は有意に増加した。

自発運動量とアデノシン受容体の関係に対するカフェインの影響を検討した実験では、自発運動量に対する作用の検討には生後 12、15、18 又は 28 日齢の新生児ラット (Long Evans 系) を、アデノシン特異的結合能 (リガンドとして D-phenylisopropyladenosine を使用) に対する作用では生後 14、18、21 又は 28 日齢の新生児ラットを使用した。カフェインクエン酸塩は 15、30 及び 60 mg/kg を、control 群には水を腹腔内投与した。いずれも投与しない未処置の各日齢ラットの自発運動量を測定し、この値を baseline とし、カフェイン及び vehicle 投与による影響はこの baseline からの変化率として表した。未処置ラットの自発運動量はラットの日齢変化によって有意な変動を示した ( $p < 0.01$ ) が、カフェイン投与では、この変動に対して影響を与えなかった。一方、カフェインによる [<sup>3</sup>H]CHA 結合置換率は、ラットの日齢変化に対して大脳皮質及び小脳においては有意な変化が認められた ( $p < 0.01$ ) が、海馬では [<sup>3</sup>H]CHA 置換率の有意な変化は認められなかった。

## (2) 循環器系に対する作用

(添付資料 4.2.1.3-9~15 参)

3 日齢ラットの摘出心室乳頭筋標本を用いて心筋の収縮力に対するカフェイン (bath 中濃度が 1、2.5 及び 5 mM の 3 濃度) の影響を検討した。カフェイン添加前の収縮力に対し、カフェイン 1mM では、25%、2.5mM では 80%、5mM では 75%増加した。カフェインのこの収縮力増加作用は添加後 5 分間維持し、15 分後には低下を示した。カフェインの収縮増加作用は wash-out 後 20 分でほぼ完全に消失した。また、カフェインの収縮力増加作用は 1  $\mu$ M propranolol により影響を受けなかった。bath 中の Na 濃度を 140 から 20 mM に下げることにより筋の拘縮と後収縮が観察されたが、この状態に 5 mM カフェインを添加すると静止時の張力は即時に増加した。これらの結果は、成熟ラット摘出心筋でこれまでに報告されてきたカフェインの収縮力抑制作

用とは正反対であった。

次に新生児ウサギ（ニュージーランドホワイト系）及び成熟ウサギの摘出心臓に対する高濃度 20 mM カフェインの影響を検討した。カフェインは、成熟ウサギの心臓の最大発生張力（+dT/dtmax）をカフェイン添加前に比べ41%増加した（有意差あり）が、新生児ウサギでは、11%の増加であったが有意ではなかった。また、カフェインは、静止張力（RT）を増加したが、カフェインのこの RT 増加作用は、成熟ウサギの方が新生児ウサギに比べカフェイン添加後の最初の 10 分間及び 30 分以降において有意に大きかった。以上の結果から、カフェインの心機能に対する作用は、ウサギの日齢差により異なることが示された。

また、実験 1 として、妊娠から授乳期間終了（生後 22 日）まで、母ラット（SD 系）にカフェイン 10 mg/kg/日を経口投与し、母ラットから生まれた新生児ラットの心臓を生後 50 日の時点で摘出した。実験 2 では、授乳期間中（生後 1～22 日）は母ラットに、離乳後（生後 22～50 日）は新生児ラットに、いずれもカフェイン 10 mg/kg/日を経口投与し、生後 50 日の時点で新生児ラットより心臓を摘出した。実験 3 では、授乳期間中（生後 1～22 日）は母ラットに、離乳後（生後 22～88 日）は新生児ラットに、いずれもカフェイン 10 mg/kg/日を経口投与し、生後 88 日の時点で新生児ラットより心臓を摘出した。すべての新生児ラットから摘出した心臓は、95%O<sub>2</sub>-5%CO<sub>2</sub>で飽和した Krebs-Henseleit 緩衝液（37℃）で灌流した。後負荷（70 cm H<sub>2</sub>O）を一定に保った状態で前負荷を変化（10、15、20 及び 25 cm H<sub>2</sub>O、その後 15 cm H<sub>2</sub>O に戻す）させたときの心拍出量、最大心収縮期圧、心仕事量、冠血流量及び心重量を測定した。在胎期間から生後の授乳期間（生後 22 日）までカフェインの投与を受けた新生児ラットでは、離乳後にカフェインの投与を受けなくても生後 50 日において最大心収縮期圧、心仕事量及び冠血流量の軽度増加が認められた。授乳期間から生後 50 日までカフェインの投与を受けた新生児ラットでは、心拍出量、最大心収縮期圧、心仕事量及び冠血流量の減少が認められた。さらに長く生後 88 日までカフェインの投与を受けると、50 日までの変化に加え、心重量の増加が観察された。

在胎 21 日の胎児ラットの心電図に対して、カフェイン（母ラットに 100 mg/kg の高用量を投与）は、心拍数を増加、QT interval 及び ST segment length を短縮した。心拍数増加、QT interval 短縮はカフェイン投与後 30～60 分に認められ、それ以降は正常のレベルに回復した。ST segment length は投与後 30 分から有意に短縮し、その作用は 240 分まで持続していた。また、カフェインにより P 波の異常は 50%増加し、期外収縮は 38%増加した。以上の結果から、妊娠ラットに対してカフェイン高用量の投与は、その胎児の心電図に影響を与えることが示された。

hERG (human ether-a-go-go related gene) 導入 HEK293 細胞を用い、hERG チャネルに対する影響を検討したところ、カフェインは、濃度依存性（100 μM～20 mM）に hERG チャネルを阻害した。カフェインの阻害作用は 100 μM から認められたが、その阻害作用は 20 mM という高濃度においてはコントロールの 12.7±1.1%が残存したにすぎなかった。

SD 系雄性ラットを用い、脳血流量は [<sup>14</sup>C]iodoantipyrine (IAP) 法により脳を 61 部位に分けてそれぞれの部位の血流量を測定した。カフェインは、IAP 投与 30 分前に 10 mg/kg を静脈内投与した。カフェインにより、14 部位（聴覚皮質、側坐核、扁桃体中心核、傍室核、視床外側核、視床腹側核、視床背外側尾状核、視床下核、黒質網様体、下丘、正中縫線、背側縫線、青

斑核、上オリーブ) で脳血流量の低下が認められた。

### (3) その他の一般薬理作用

#### (添付資料 4.2.1.3-16~20 参)

麻酔新生児ウサギ (ニュージーランドホワイト系、生後 5~10 日齢) の腎血行動態及び腎機能に対するカフェイン (ヒト新生児に投与されている用量範囲内のカフェイン安息香酸ナトリウム 5 又は 10 mg/kg) 及びアミノフィリン (3 又は 6 mg/kg) の静脈内投与の影響を検討した。パラアミノ馬尿酸排泄率はカフェイン及びアミノフィリンにより影響を受けなかった。カフェイン 5 mg/kg 投与は、腎機能に対して影響を与えなかった。10 mg/kg 投与は腎血流量 (RBF) 及び糸球体濾過比 (FF) に対して影響しなかったが、腎血管抵抗 (RVR) に対し、遅延性に増加させた。アミノフィリンは、RBF の低下と RVR の増加を示し、高用量では FF の増加も認められた。糸球体濾過量 (GFR) はアミノフィリン 3 mg/kg 投与により減少し、アミノフィリン 6 mg/kg 及びカフェイン 10 mg/kg 投与で増加した。カフェイン 10 mg/kg 及びアミノフィリン 3 及び 6 mg/kg 投与により尿管からの水の再吸収抑制作用と利尿作用が認められた。また、カフェイン投与 10 mg/kg では Na 排泄 (FENa) 促進作用も認められた。

8 匹の新生児ラット (SD 系) の骨重量及び骨組成分に対するカフェインの作用を検討した。新生児ラットに 20%タンパク食を与えた。カフェイン 10 mg/kg (投与容量は 0.1 mL/body) 又は生理食塩液を生後 3~13 日の間、一日おきに投与した。骨重量及び骨組成分の測定は生後 15 日目に行った。下顎骨及び長骨重量に対してカフェインは影響を与えなかった。骨内の DNA 量、タンパク質量、Ca 含量、コラーゲン合成及び Ca 取り込みに対してもカフェインは影響を与えなかった。

歯の成長に対しては、カフェイン 20 mg/kg を生後直後から 22 日まで新生児ラット (SD 系) の授乳期間中に投与したとき (22 日の離乳後~50 日まではカフェインフリーの普通食を与えた)、生後 50 日目の新生児ラットの第 1 臼歯のエナメル質に対して高い齶蝕が認められたが、象牙質及び第 2 臼歯に対する影響は認められなかった。

カフェインの胃酸及びペプシン分泌に対する作用を雄性 Wistar 系ラット (280~320 g) を用いて検討した。カフェイン安息香酸ナトリウム 30、60 及び 120 mg/kg を 24 時間かけて静脈内に持続投与した。カフェインは胃酸及びペプシンの濃度には影響を与えることなく、投与後 24 時間の胃液分泌量、胃酸及びペプシン分泌量を有意に増加した。

ウサギ総頸動脈から採取調製した血小板懸濁液を用い、0.4  $\mu$ M adenosine diphosphate (ADP) による血小板形態変化に対するカフェイン及びテオフィリンの阻害作用を検討した。カフェイン及びテオフィリンによる ADP の血小板形態変化阻害作用に必要な最小濃度はそれぞれ 10 及び 8 mM と、ほとんど同じであった。

#### 2.4.2.4 薬力学的薬物相互作用試験

##### (添付資料 4.2.1.4-1 参)

ラットに、けいれんが発現するまでカフェインクエン酸塩 (1.28 mg/分) 又はテオフィリン

(アミノフィリンとして 1.03 mg/分) 単独静脈内投与した 2 群及びカフェイン前投与 (1.28 mg/分を 15 分間) に引き続きテオフィリン (アミノフィリンとして 1.03 mg/分) をけいれんが発現するまで投与した群の計 3 群を用いて、けいれん発現までの時間及び投与量を比較したとき、カフェインにより、テオフィリンのけいれん発現時間の短縮とそれに伴う投与量の低下がみられた。

## 2.4.3 薬物動態試験

### 2.4.3.1 吸収

(添付資料 4.2.2.2-1~3 参)

ラット及びウサギに[1-methyl-<sup>14</sup>C]-カフェインを 25 mg/kg 単回経口投与したとき、カフェインの吸収半減期は 1 時間以内であり、カフェインの経口吸収は速やかであった。また、血漿中カフェインの消失半減期は、ラットで 2.8 時間、ウサギでは 3.7 時間であり、いずれの動物においても血漿からの消失は速やかであった。

成熟動物と幼若動物の薬物動態パラメーターを比較すると、イヌ及びウサギのいずれにおいても血漿中カフェインの消失半減期は成熟動物の方が幼若動物よりも短く、見かけの分布容積は幼若動物の方が、また総クリアランスは成熟動物の方がそれぞれ大きかった。

### 2.4.3.2 分布

(添付資料 4.2.2.3-1~8 参)

マウスに[<sup>3</sup>H, <sup>14</sup>C]-カフェインを 25 mg/kg 単回経口投与したとき、投与後 5 分のすべての組織中に [<sup>14</sup>C] 放射能が認められ、その放射能の大部分がカフェインと考えられた。 [<sup>14</sup>C] 由来の放射能は肝臓及び脾臓では投与後 5 分に最高値を示したが、他の組織では投与後 30~60 分に最高値を示し、その後、 [<sup>14</sup>C] 由来の放射能は、いずれの組織においても速やかに減少し、投与後 24 時間では最高値の約 1/8~1/30 まで低下した。組織中カフェインの消失は脳で最も遅く、投与後 3 時間において [<sup>14</sup>C] 由来の放射能の約 69% がカフェインであった (その他の組織は約 26~44%)。

雄性マウス(有色)に[1-methyl-<sup>14</sup>C]-カフェイン 又は[2-<sup>14</sup>C]-カフェインを 0.7 又は 11 mg/kg 単回静脈内投与し、投与後 0.1、0.33、1、3、9 及び 24 時間の全身オートラジオグラムを作製し生体内分布について検討した。いずれの [<sup>14</sup>C]-カフェインを静脈内投与したときも、嗅覚器上皮、腎臓、肝臓、涙腺、消化管、消化管内容物及びメラニン組織に放射能の分布が認められた。[1-methyl-<sup>14</sup>C]-カフェインを投与したときのみ、骨髄、唾液腺、膵臓、胸腺、及び脾臓に放射能の分布が認められ、1-methyl 基の有無が組織への分布に影響するものと推察された。

新生児及び成熟のイヌにカフェインを 50 mg/kg 単回静脈内投与したとき、投与後 3 時間において、新生児イヌの骨格筋及び脳中に成熟イヌのそれよりも高いカフェイン濃度を示す傾向が認められた。投与後 10 時間においては、新生児イヌのすべての組織中に成熟イヌ組織よりも高いカフェイン濃度が認められた (P<0.01)。投与後 36 時間では、新生児イヌの腎臓、脳及び骨格筋中に、投与後 10 時間の成熟イヌのそれらよりも高濃度のカフェインが残留する傾向が認め

られた。

妊娠 20 日目のラットにカフェインを 5 mg/kg 単回経口投与したとき、検討した母動物及び胎児の体液及び組織のいずれにおいてもカフェインが検出された。母動物血漿、胎盤、羊水及び胎児血液中の最高カフェイン濃度は同程度であった。また、母動物血漿、胎盤、羊水、胎児血液、胎児肝臓及び胎児腎臓中に、主要代謝物であるジメチルキサンチン代謝物（パラキサンチン、テオブロミン、テオフィリン）が認められた。

妊娠 12 日目のラットにカフェインを 80 mg/kg 単回経口投与したとき、投与後 24 時間の母獣血液、羊水及び胎児中にカフェイン及びその主要代謝物であるジメチルキサンチン代謝物（パラキサンチン、テオブロミン、テオフィリン）が認められた。

カフェインのタンパク質結合率は、成熟ウサギ血清で 24.2%、幼若ウサギ血清で 11.6%であった。また、主要代謝物であるパラキサンチン、テオブロミン及びテオフィリンの成熟ウサギ血清との結合率は、それぞれ 65.7%、8.0%及び 61.6%であった。

### 2.4.3.3 代謝

(添付資料 4.2.2.4-1~9 参)

ラット、マウス、ハムスター及びウサギのいずれの動物においても主要代謝経路は N-脱メチル化及び C-8 位での酸化代謝であった（テオフィリン、パラキサンチン、テオブロミン、1,3,7-trimethyluric acid など）。これらの代謝反応には、主に CYP1A2、CYP3A 及びフラビン含有モノオキシゲナーゼ（FMO）が関与した。

ラット肝臓切片を用いてカフェイン代謝活性の生後変化について比較した。カフェイン代謝活性は、1 日齢で最も低く、21 日齢で最高値を示し、その後、成熟動物レベルまで減少した。

### 2.4.3.4 排泄

(添付資料 4.2.2.5-1~3 参)

ラット、マウス及びハムスターに [1-methyl-<sup>14</sup>C]-カフェインを 4 mg/kg 単回経口投与したとき、投与後 48 時間までの尿中に、いずれの動物においても投与放射能の大部分が排泄され（平均 67~70%）、カフェインの主要排泄経路は尿中排泄と考えられた。糞中には投与量の平均 3.8~5.7%が排泄された。また、ラット、マウス及びハムスターの呼気中に、それぞれ投与量の平均 20.6%、13.9%及び 15.3%の [<sup>14</sup>C]-CO<sub>2</sub> が排泄された。

生後 2、7 及び 35 日齢のイヌに [1-methyl-<sup>14</sup>C]-カフェインを 50 mg/kg 単回経口投与したときの尿中累積排泄率を測定した。放射能の尿中排泄率は、61~92%であり、生後日齢の増加に伴い尿中への排泄は増加した。一方、未変化カフェインの尿中排泄率は、2 日齢で約 17%と最も高く、35 日齢では約 5~6%と生後日齢の増加に伴い低下した。

出産後 17~22 日の授乳中ウサギにカフェインを 5 mg/kg 単回静脈内投与したとき、カフェイン及び代謝物の乳汁中への移行が認められた。乳汁中へのカフェインの移行は速やかで、乳汁中カフェイン濃度及びその動態は血清中カフェインのそれと近似した。一方、主要代謝物であるジメチルキサンチン代謝物（パラキサンチン、テオブロミン、テオフィリン）の乳汁中濃度

は血清中濃度より低い傾向を示した。

### 2.4.3.5 薬物相互作用

(添付資料 4.2.2.6-1~5 参)

カフェインは、反復投与によって CYP1A2 及び CYP2B 分子種が介在する肝ミクロソーム薬物代謝酵素活性の誘導（薬物代謝酵素誘導）とカフェイン自身の代謝を亢進する自己代謝誘導がみられた。

カフェインの主要代謝経路である N-脱メチル化及び C-8 位での酸化代謝には主に CYP1A2 及び CYP3A の CYP 分子種が関与し、また、カフェインは反復投与によって CYP1A2 及び CYP2B を誘導する。これらの CYP 分子種によって代謝される薬物等は、カフェインとの併用によって代謝が抑制又は増強され、薬理活性や生理活性が変動することが考えられる。

代謝に CYP1A2 及び CYP3A が関与する薬物及びこれらの CYP 分子種の活性を阻害又は誘導する薬物は、カフェインの代謝を抑制又は促進し、カフェインの血中濃度を上昇又は低下させ、カフェインの薬理活性や生理活性を増強又は減弱させることが考えられる。

### 2.4.4 毒性試験

#### 2.4.4.1 単回投与毒性試験

(添付資料 4.2.3.1-1 参)

カフェインのラット皮下投与のLD<sub>50</sub>値（投与後1日）は、成熟ラットで265 mg/kg、新生児ラットで220 mg/kgと両者に差はなかった。毒性症状は、成熟ラットで強直性間代性けいれん、振戦、無気力状態がみられた。新生児の死因として、授乳不全による発育阻害が主な原因と考えられた。

#### 2.4.4.2 反復投与毒性試験

(添付資料 4.2.3.2-1~2 参)

ラット 8 週間混餌投与試験（300 mg/kg/日相当）では、死亡例はなかったが、体重増加の抑制がみられ、精巣及び胸腺重量の減少、精子細胞の退行性変化が認められた。ラット 14 週間経口投与試験（136~264 mg/kg/日）では、摂水量及び尿量の増加、精神異常様の自傷行為（自身の四肢、尾を咬んで傷つける）、呼吸不全がみられた他、副腎皮質の肥大、心臓、肝臓、肺等のうっ血、腎臓の浮腫及びうっ血、胃腸管の粘膜肥厚又は炎症がみられ、最大耐量（LD<sub>0</sub>）は 110 mg/kg/日であった。なお、いずれの試験でも無毒性量は得られなかった。

#### 2.4.4.3 遺伝毒性試験

(添付資料 4.2.3.3.1-1~2 参、4.2.3.3.2-1~2 参)

哺乳動物細胞を用いた in vitro の遺伝子突然変異試験及び染色体異常試験はいずれも陰性で

あった。in vivo 試験のうち、ハムスターによる姉妹染色分体交換試験（20～400 mg/kg/日、2日経口投与）で姉妹染色分体交換の増加が、マウス及びハムスターの小核試験では小核の出現頻度がLD<sub>50</sub>レベルの用量で増加した。

#### 2.4.4.4 がん原性試験

（添付資料4.2.3.4-1～2参）

マウス18ヵ月間混餌投与及びラット24ヵ月間飲水投与試験ともカフェインによる腫瘍の発生増加は認められなかった。

#### 2.4.4.5 生殖発生毒性試験

（添付資料4.2.3.5.1-1参、4.2.3.5.2-1～2参、4.2.3.5.3-1参）

カフェインの150～180 mg/kg/日を投与した雌性マウスの受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験（飲水投与）では、母動物の生殖能に異常はなかったが、新生児の死亡及び体重の低値がみられた。

マウスの胚・胎児発生に関する試験（飲水投与）の母動物では、140～178 mg/kg/日以上で摂餌量及び摂水量の減少、207～242 mg/kg/日で体重増加率の抑制がみられた。胎児では、140～178 mg/kg/日以上で吸収胚数の増加傾向及び骨化遅延が、207～242 mg/kg/日で胎児体重の低値がみられた。

ラットの胚・胎児発生に関する試験（飲水投与）の母動物では、86.6 mg/kg/日以上で体重増加の抑制が、115.8 mg/kg/日以上で摂餌量及び摂水量の減少がみられた。160.9 mg/kg/日以上で着床数の減少、生存胎児数の減少、吸収胚数の増加等がみられた。胎児では、86.6 mg/kg/日以上で体重の低値など発育不全、並びに水腫及び出血が認められた。母動物及び胚・胎児発生に対する無毒性量はともに50.7 mg/kg/日であった。

ラットの出生前及び出生後の発生並びに母動物の機能に関する試験（混餌投与）では、62.3 mg/kg/日で出生児体重の低値がみられた。母動物の生殖能及び新生児の成長・発達に対する無毒性量はともに35.3 mg/kg/日であった。

#### 2.4.4.6 局所刺激性試験

該当する試験を実施しなかった。

#### 2.4.4.7 その他の毒性試験

（添付資料4.2.3.7-1参）

ラットでの117週混餌投与（約50 mg/kg/日）による心血管系への影響として、平均寿命の短縮がみられ、死亡の多くは心不全によるものであった。剖検では拡張性心肥大及び肺・肝・脾の急性・慢性うっ血が、病理組織学的所見では心筋梗塞が認められた。

### 2.4.5 考察及び結論

早産児無呼吸発作の原因としては、中枢神経系の未熟性<sup>1)</sup>や二酸化炭素に対する末梢化学受容体の感受性の欠如<sup>2)</sup>、及び横隔膜の易労性による換気量の低下<sup>3)</sup>などが挙げられる。早産児における無呼吸発作の発生頻度は未熟性によって異なる。1000 g 未満の低体重の早産児では、その発生頻度は約 80%と高く、2500 g 未満では約 25%とされている<sup>4)</sup>。

無呼吸発作を起こした早産児は低換気となり、徐脈を起こし、その結果発達途上にある脳機能障害がもたらされ、時には生命が脅かされる。したがって、無呼吸発作は早産児に対して重大な影響を及ぼす。

現在、早産児無呼吸発作の治療では、低酸素投与や物理的刺激などが行われているが、これらの治療では十分ではないことからキサンチン誘導体を用いた薬物治療と呼吸管理としての経鼻的持続気道陽圧呼吸（CPAP）療法や人工換気療法などが行われている。しかし、人工換気療法では長期挿管による感染や咽頭・気管狭窄など予後に影響を与える懸念があり、その使用頻度を低下させる上でも薬物治療は重要である<sup>5-7)</sup>。

薬理試験におけるカフェインの薬効を裏付ける作用としては、ラット、ウサギ、ヒツジ、ヒヒ、ブタの新生児及び幼若種動物を用いた試験及び成熟サルを用いた試験において、カフェインは自発呼吸機能改善作用を示すと共に低酸素負荷モデルにおいても呼吸機能改善作用を示した。カフェインの呼吸促進作用は、カフェインによる直接的な延髄の呼吸中枢系に対する興奮作用に加え、間接的な作用として肺の進展に依存して起こる Hering-Breuer 呼吸誘発反射の増強作用や血中の酸素濃度、二酸化炭素濃度及び pH に反応する末梢化学受容体に対する作用などにに基づいていると考えられる。これらのカフェインの作用は、臨床において用いられている用法、用量で認められたことから、カフェインは、早産児の無呼吸発作治療薬として有用な薬剤と考えられる。

アデノシンは抑制性神経伝達物質として知られており、動物やヒトにおいて呼吸系を抑制することが報告されている。カフェインは、アデノシン受容体（A1 及び A2）結合阻害作用と PDE 活性阻害作用を有しているが、カフェインのアデノシン受容体結合阻害作用はカフェインの PDE 阻害作用に比べて強いこと、アデノシンによる呼吸抑制作用はカフェインにより拮抗されることから、カフェインの呼吸促進作用機序としては、主にアデノシン受容体結合阻害作用が重要と考えられる。しかし、アデノシン受容体結合阻害を有していない PDE 阻害剤も呼吸促進を有していることから、カフェインの作用に PDE 阻害作用も一部関与していると推察される。

安全性薬理試験では、カフェインの中枢系、循環器系、腎臓、骨、歯、消化器系及び血液系に対する影響を検討した。カフェインは、中枢系に対して、呼吸促進作用を示す投与用量及び動物の投与時期や投与期間などにより様々な影響を及ぼすことが認められた。生後 1 週間（ラット脳の発達に重要な時期でヒトでは妊娠 26～38 週に相当）以内にカフェインを新生児ラットに投与した時、その後の成長過程において、幼若時期には、自発運動量の低下、オペラント学習の障害などが、また成熟期では、ストレス性不安の抑制及び痛みに対する感受性の増加、学習記憶保持の低下が認められた。生後にカフェインを投与した新生児ラットでは、脳重量の増加、脳内におけるタンパク白質及びコレステロール含量の低下、アルカリホスファターゼ量の増加が観察された。循環器系に対しては、生後ラット及びウサギの摘出心筋標本及び心臓灌流

標本を用いた時、カフェインは心収縮力を増加した。在胎時期から生後離乳時期までカフェインを投与したラットでは、生後 50 日において心重量は影響を受けなかったが、心仕事量、心収縮力、心拍出量及び冠動脈血流量の減少が認められた。なお、心重量は生後 88 日に増加が認められた。心電図に対しては臨床投与時の血中濃度に比べると、その血中濃度が約 5 倍以上となる高用量においてのみ心拍数の増加、QT 及び ST 間隔の減少、期外収縮の発生が認められた。hERG チャネルに対しても 20 mM と高い濃度ではあるが 90% 弱の阻害が認められた。カフェインは、臨床において脳血流量を減少すると言われており、成熟ラットの脳の一部においてカフェインは脳血流量を減少させた。新生児ウサギの腎機能に対しては、10 mg/kg のカフェインにより利尿作用及び水再吸収率の抑制が認められた。新生児ラットの骨や歯の成長に対し、カフェインは影響を与えなかった。成熟ラット消化器系に対して、カフェイン（安息香酸ナトリウムカフェインとして）は 30 mg/kg 以上ではあるが、胃酸とペプシン分泌量を増加した。ウサギ血小板懸濁液を用いた *in vitro* での血小板凝集阻害作用では、カフェインは高濃度でこれを阻害した。

以上の結果をまとめると、臨床投与量と同等量のカフェインを投与した早産児及び新生児の動物試験において、カフェインは、自発呼吸促進作用及び低酸素呼吸抑制モデルにおける呼吸促進作用を示すと共に、中枢系に対しても影響（運動量、学習行動、脳代謝など）を与えることが認められた。しかし、臨床投与量と同等量のカフェインを用いたときには、循環器系、腎臓、骨、歯、消化器系及び血液系に対しては問題となるような影響を与えないと思われる。カフェインの作用機序に関しては、カフェインの呼吸促進作用は、主にアデノシン受容体結合阻害作用に基づくと考えられるが、PDE 阻害作用も一部関与していると推察される。

薬物動態試験においてカフェインの経口吸収及び血中からの消失は、いずれの動物においても速やかであった。また、ヒトにおいてもカフェインの消化管からの吸収は速やかでほぼ完全であり、その薬物動態は投与経路に依存しないと報告されている（添付資料 4.2.2.7-1 参）。

マウスに [ $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$ ]-カフェインを 25 mg/kg 経口投与したとき、投与後 5 分においてすべての組織中に  $^{14}\text{C}$  放射能が認められ、その放射能の大部分がカフェインと考えられた。 $^{14}\text{C}$  放射能は肝臓及び脾臓では投与後 5 分で、その他の組織では投与後 30~60 分でそれぞれ最高値を示した。その後、いずれの組織中放射能も速やかに減少し、投与後 24 時間では最高値の約 1/8~1/30 まで低下し、放射能の高い残留を示す臓器は認められなかった。組織におけるカフェインの放射能比率の低下は、薬効発現の標的組織である脳で最も遅く、投与後 3 時間において  $^{14}\text{C}$  放射能の約 69% がカフェインであり（その他の組織は約 26~44%）、薬効発現との関連が示唆された。

カフェインを投与した妊娠中期及び後期のラットのいずれにおいても胎児体液及び胎児組織中にカフェイン及びその代謝物が検出されたことから、カフェイン及びその代謝物は、胎盤を通過し、胎児に移行するものと考えられた。

カフェインの血清タンパク質との結合率は、成熟ウサギ及び幼若ウサギ血清で 24.2% 及び 11.6% であった。また、カフェインの血漿タンパク質との結合率は、ヒト及び種々の動物において 10~30% と報告されている（添付資料 4.2.2.7-1 参）。これらのことから、カフェインのタンパク質結合能は低いと推察された。

ラット、マウス、ハムスター及びウサギのいずれの動物においても主要代謝経路はN-脱メチル化及びC-8位での酸化代謝であった(テオフィリン、パラキサンチン、テオブロミン、1,3,7-trimethyluric acid等)。これらN-脱メチル化代謝には、主にCYP1A2及びFMOが、また、C-8位での酸化代謝には、主にCYP3Aがそれぞれ関与するものと推察された。

ラットにカフェイン150 mg/kg/日を反復経口投与(3日間)したとき、肝ミクロソームCYP1A2及びCYP2B1/2B2含量が約2倍に増加し、これらのCYP分子種が関与する薬物代謝酵素活性が上昇した。これらの結果から、カフェインは反復投与によってCYP1A2及びCYP2Bが介在する肝ミクロソーム薬物代謝酵素活性を誘導するものと考えられた。また、CYP1A2は、カフェインの主要代謝経路であるN-脱メチル化代謝に関与することから、カフェインは、反復投与によってカフェイン自身の代謝を促進する自己代謝誘導をもたらすものと考えられた。

ラット、マウス及びハムスターに[1-methyl-<sup>14</sup>C]-カフェインを4 mg/kg単回経口投与したとき、投与後48時間までの尿中にいずれの動物においても投与放射能の大部分が排泄され(平均67~70%)、カフェインの主要排泄経路は尿中排泄と考えられた。また、ラット、マウス及びハムスターの呼気中に、それぞれ投与量の約14~21%に相当する[<sup>14</sup>C]-CO<sub>2</sub>が排泄され、1位の脱メチル化によるCO<sub>2</sub>の生成が示唆されるとともに、呼気中排泄もカフェインの主要な排泄経路の1つであることが示された。また、カフェインを投与したウサギにおいて、乳汁中にカフェイン及び代謝物が検出され、カフェイン及びその代謝物は乳汁中へ移行するものと考えられた。

成熟動物と幼若動物におけるカフェインの薬物動態には以下の差異が認められた。成熟動物と幼若動物の薬物動態パラメーターを比較すると、イヌ及びウサギのいずれにおいても血中カフェインの消失半減期は、成熟動物の方が幼若動物よりも短く、分布容積は幼若動物の方が、また、総クリアランスは成熟動物の方がそれぞれ大きかった。また、新生児及び成熟のイヌにカフェインを50 mg/kg単回静脈内投与したとき、新生児イヌにおいて、成熟イヌよりも高いカフェインの組織中分布と残留が認められた。さらに、生後2日齢、7日齢及び35日齢のイヌに[1-methyl-<sup>14</sup>C]-カフェインを50 mg/kg単回経口投与したとき、放射能の尿中累積排泄率は、61~92%であり、生後日齢の増加に伴い尿中排泄は増加したのに対して、未変化カフェインの尿中排泄率は、2日齢で約17%と最も高く、35日齢では約5~6%と生後日齢の増加に伴い低下し、カフェインの尿中排泄は、カフェイン代謝に関わる酵素の生後発達に伴い上昇したものと推察された。一方、ラット肝臓切片を用いて、カフェイン代謝活性の生後変化について比較したところ、カフェイン代謝活性は、1日齢で最も低く、21日齢で最高値を示し、その後、成熟レベルに減少した。これらのことから、カフェインの薬物動態は、肝薬物代謝酵素の生後発達に伴い変動するため、新生児と成熟動物では異なるが、出生後の時間経過とともに成熟動物レベルに近づくものと推察された。なお、イヌにおいて新生児と成熟動物で認められたカフェインの組織内分布の差異は、新生児イヌの組織含水量が成熟イヌのそれよりも多いことも一因と推察されている。

カフェインの主要代謝経路に関与するCYP分子種は、N-脱メチル化では主にCYP1A2であり、C-8位の酸化代謝では主にCYP3Aであった。また、カフェインは反復投与によってCYP1A2及びCYP2Bを誘導した。このため、これらのCYP分子種によって代謝される薬物等は、カフェインとの併用によって代謝が抑制又は増強され、薬理活性が変動することが考えられる。また、代

謝に CYP1A2 及び CYP3A が関与する薬物並びにこれらの CYP 分子種の活性を阻害する薬物(シメチジン等)は、カフェインの代謝を抑制するため、カフェインの血中濃度を上昇させ、カフェインの薬理活性や生理活性を増強させることが考えられる。また、CYP1A2 及び CYP3A 等の CYP 分子種を誘導する薬物はカフェインの代謝を増強するためカフェインの薬理活性を減弱することが考えられる。このため、これらの薬物との併用には注意喚起が必要である。

単回投与毒性試験の結果から、カフェインの皮下投与における LD<sub>50</sub> (投与後 1 日) は、成熟ラットで 265 mg/kg、新生児ラットで 220 mg/kg と両者に差はなかった。その他の動物に関しては、マウスにカフェインを静脈内投与及び経口投与したときの LD<sub>50</sub> はそれぞれ 319 及び 1746 mg/kg、イヌに静脈内投与したときの概略致死量は 75 mg/kg であったと報告されている<sup>8,9)</sup>。毒性症状としては、成熟ラットへの皮下投与では、強直性間代性けいれん、振戦、無気力状態及び唇を舐める動作が、イヌ静脈内投与では失禁、頻脈、振戦及びけいれん等の症状がみられた。いずれもカフェインで一般的に認められている自律神経系あるいは循環器系への過剰反応に基づくものと考えられた。Bonati ら<sup>8)</sup>は、マウスにカフェインの LD<sub>50</sub> 相当量を経口投与及び静脈内投与でそれぞれ投与し、死亡時におけるカフェインの臓器内濃度を比較した。その結果、心臓、肝臓及び腎臓内のカフェイン濃度は、静脈内投与より経口投与で大きかったのに対し、脳内濃度は両者で近似していたことから、脳がカフェインの急性毒性での標的臓器であるとした。

反復投与毒性試験では、ラットの 8 週間混餌投与試験 (300 mg/kg/日相当) で、死亡はなかったが、体重増加の抑制、精巣及び胸腺重量の減少、精原細胞の退行性変化が認められた。カフェインの高用量をテオブロミン、テオフィリンなどのキサンチン誘導體とともに投与すると、精巣の萎縮及び精子の形成障害が認められている<sup>10-13)</sup>。その原因は明らかではないが、有糸分裂細胞数の減少 (ラット)<sup>10,11)</sup>、卵胞刺激ホルモン (FSH) の分泌低下 (ウサギ)<sup>13)</sup>などが考えられている。ラットの 14 週間経口投与試験 (136~264 mg/kg/日) では、摂水量及び尿量の増加、自傷行為 (自身の四肢、尾を咬んで傷つける) がみられた。病理学的所見では気管支肺炎、副腎皮質の肥大、心臓、肝臓、肺及び卵巣等の毛細血管うっ血、腎臓の浮腫及びうっ血、胃腸管の粘膜肥厚又は炎症がみられた。高用量群における死因は、呼吸不全とそれに伴うけいれんと考えられた。ラットに 2 週間経口投与 (185 mg/kg/日) した別の報告でも、摂水量及び尿量の増加、糖尿、自傷行為、虚脱、緩徐呼吸、下痢、運動失調などの諸症状がみられ、死亡例は呼吸不全を伴う強直性間代性けいれんで死亡した<sup>10)</sup>。

カフェインの心血管系への影響を検討したラット 117 週間混餌投与 (約 50 mg/kg/日相当) では、平均寿命の短縮がみられた。これらの動物では拡張性心肥大、肺・肝・脾の急性・慢性うっ血及び心筋梗塞が認められ、死亡の多くは心不全に起因していると考えられた。自傷行為については、ラットにカフェインの毒性用量 (140~185 mg/kg) を反復皮下投与すると、自発運動の亢進とともに認められており<sup>14)</sup>、アンフェタミンとの併用でさらに増強するとの報告もある<sup>15)</sup>。カフェインの毒性として、神経症状の他、ホスホジエステラーゼの阻害による細胞内環状アデノシンリン酸濃度の上昇により、心筋収縮力の増大、気管支平滑筋の弛緩、脳細動脈の収縮のような交感神経興奮様作用及び胃酸分泌の亢進を示すことが知られている。また、腎血管拡張により糸球体ろ過量 (GFR) の増大と尿細管での水分の再吸収の抑制による利尿作用もよく知られている。ラット 8 週間及び 14 週間経口投与毒性試験において認められた所見の多く

は、いずれも既知のカフェインの作用に基づくものと考えられた。いずれの試験でもカフェインの無毒性量は得られなかったが、ラット 14 週間経口投与試験の最大耐量 (LD<sub>0</sub>) は 110 mg/kg/日であった。

生殖発生毒性について、カフェインの 150~180 mg/kg/日を投与した雌マウスの受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験 (飲水投与) では、母動物の生殖能に異常はなかったが、新生児の死亡及び体重の低値がみられた。

マウスの胚・胎児発生に関する試験 (飲水投与) では、カフェインの 140mg/kg/日以上で母動物の摂餌量及び摂水量の減少、207 mg/kg/日で体重増加率の抑制がみられた。胎児では、同じく 140mg/kg/日以上で吸収胚数の増加傾向及び骨化遅延が、207 mg/kg/日で胎児体重の低値がみられた。ラットの胚・胎児発生に関する試験 (飲水投与) では、カフェインの 86.6 mg/kg/日以上で母動物の体重増加の抑制が、115.8 mg/kg/日以上で摂餌量及び摂水量の減少がみられた。さらに、160.9 mg/kg/日以上で着床数の減少、生存胎児数の減少、吸収胚数の増加等がみられた。胎児では、86.6 mg/kg/日以上で胎児体重の低値並びに胎児の水腫及び出血が認められた。母動物及び胚・胎児発生に対するカフェインの無毒性量はともに 50.7 mg/kg/日であった。

ラットの出生前及び出生後の発生並びに母動物の機能に関する試験 (混餌投与) では、62.3 mg/kg/日で出生児体重の低値及び体重増加の抑制傾向がみられた。母動物の生殖能及び新生児の成長・発達に対する無毒性量はともに 35.3 mg/kg/日であった。

カフェインの生殖・発生毒性に関しては他にも多くの報告があり、マウスへの高用量 (250 mg/kg) 腹腔内投与 (母体毒性量) では四肢奇形や口蓋裂の発生がみられている<sup>16,17)</sup>。雄性ラットの受胎能に関する試験として、雄性ラットに交配前4日間カフェインを皮下投与 (50 mg/kg/日) し無処置の雌と交配させると、受胎能の減少、胎児数の減少及び新生児死亡率の増加傾向が認められた<sup>18)</sup>。また、ラットの妊娠期間中にカフェインを経口投与された妊娠末期胎児の精巣では 3β-ヒドロキシ-Δ<sup>5</sup>-ステロイドデヒドロゲナーゼの低下とそれに伴う血漿テストステロンの低値が報告されている<sup>19)</sup>。一方、ヒトの解凍精子にカフェインを曝露すると、精子の運動能や頸管粘液を貫通する精子数が増加するとの報告もある<sup>20)</sup>。しかし、日常的にカフェイン含有飲料が多いヒトでは精子の運動能や精子濃度は減少する傾向にある<sup>21,22)</sup>。

カフェインの摂取とヒトの生殖・発生障害についての文献調査によると、カフェイン摂取が奇形の発現や早産に関与している可能性は低いが、受胎能力の低下や、流産、胎児の成長阻害を引き起こしている可能性が示唆されている<sup>23,24)</sup>。

新生児の安全性について (ラット F<sub>1</sub> 児の行動発達について、カフェインをラットの妊娠 0~10 日に投与された F<sub>1</sub> 児で、成熟期 (6 ヶ月齢) までにオープンフィールドにおける情動性に亢進がみられている<sup>25)</sup>。ラットの妊娠及び授乳期間中の投与でも同様に F<sub>1</sub> 児の成熟期での情動性の亢進がみられた<sup>26)</sup>ほか、空間認知に異常を示唆する所見もみられた<sup>27)</sup>。母ラットの授乳期間中 (生後 1~6 日) にカフェインを投与された F<sub>1</sub> 児では、2 週齢で自発運動の低下が、9 週齢で空間弁別行動の低下がみられた<sup>28)</sup>。また、2~6 日齢の新生児ラットにカフェインを直接投与した場合も痛覚過敏、抗不安の低下、回避学習の障害などアデノシン受容体に関連する行動異常がみられた<sup>29)</sup>。さらに、性成熟期に達したラット (44~55 日齢) へカフェインを投与した場合でも、2.5 及び 4 ヶ月齢でオープンフィールドでの情動性、衝撃性の亢進が観察されている<sup>30)</sup>。

このようにカフェインをラットの胎児期から性成熟期までの間曝露すると、脳の神経伝達物質の変調により新生児ラットの行動異常を誘発し、その影響が成熟時期まで継続する。著者らは、カフェイン投与による脳でのアデノシン受容体密度の増加がこれらの行動変化に関連していると考察している。アデノシン受容体に関連する行動異常のリスクは、成長が加速する新生児の脳（脳の発達が加速する新生児）で高くなることが考えられることから、臨床使用に際しても、新生児への長期、過剰量投与には注意が必要である。

反復投与毒性における最大耐量と臨床用量との関係について、カフェイン投与時の血漿中濃度をラットとヒトで比較すると、ラット及びヒト新生児ともカフェインの血漿中濃度は用量相関的に増加し、10 mg/kg 付近を経口投与した場合の  $C_{max}$  は、ラットで 4.5  $\mu\text{g/mL}$  (8.8 mg/kg 投与)<sup>31)</sup>、ヒト新生児で 6~10  $\mu\text{g/mL}$  (10 mg/kg 投与) (米国添付文書) と両者に大きな差異はみられなかった。ラット 14 週間反復経口投与時の最大耐量 ( $LD_0$ ) は 110 mg/kg/日であったが、この用量での  $C_{max}$  は約 80  $\mu\text{g/mL}$  に達するものと考えられる (ラット 80 mg/kg 投与時の  $C_{max}$  63.1  $\mu\text{g/mL}$ <sup>32)</sup> から推定)。「負荷投与として 20 mg/kg を静脈内投与し、24 時間後から 5 mg/kg/日を反復静脈内投与又は経口投与する」が本剤の国内臨床試験での用法・用量であった。この用法・用量での平均血中濃度は 10.7~20.8  $\mu\text{g/mL}$  の範囲にあり、これはラット 14 週間経口投与時の最大耐量 110 mg/kg/日での  $C_{max}$  の約 1/4 以下であった。

遺伝毒性及びがん原性に関し、哺乳動物細胞を用いた *in vitro* の遺伝子突然変異試験及び染色体異常試験においては、カフェインはいずれも陰性であったが、*in vivo* 試験のうち、マウス及びハムスターの小核試験の高用量 ( $LD_{50}$  付近) で小核の軽微な増加が、ハムスターによる姉妹染色分体交換試験 (100~400 mg/kg/日、2 日経口投与) で SCE の増加が認められた。同様の報告として、マウス姉妹染色分体交換試験 (5~15 日間飲水混入投与) でも SCE の誘発が認められたが<sup>33)</sup>、マウスの小核試験 (4 日間腹腔内投与) は陰性であった<sup>34)</sup>。カフェインは DNA 鎖の伸長を抑制し、他の変異原物質と同時曝露すると SCE の発現を促進するとの報告もある<sup>35)</sup>。しかし、ハムスターを用いた SCE 試験の成績を見る限り、SCE の増加は対照群の 2 倍未満で、かつ用量関係が明瞭でないこと、並びにマウス及びハムスターの小核の増加は致死量付近での発現であり、かつ対照群の 2 倍程度であることから作用としては弱いものと考えられる。がん原性試験においては、マウス 18 ヶ月間混餌投与及びラット 24 ヶ月間飲水投与試験ともカフェインによる腫瘍の発生増加は認められていないことから、SCE 及び小核の増加は、ヒトへのリスクを示唆する変化ではないと考えられた。なお、Agency for research on cancer (IARC) によればカフェインは“発ガン性について分類できない(Group 3)”としている<sup>36)</sup>。

#### 参考文献

- 1) Parmelee AH, Stern E, Harris MA. Maturation of respiration in premature and young infants. *Neuropaediatric* 1972;3:294-304.
- 2) Rigatto H, Brady JP, Chir B, de la Torre Verduzco R. Chemoreceptor reflexes in preterm infants. The effect of gestational and postnatal age on the ventilatory response to inhaled carbon dioxide. *Pediatrics* 1975;55:614-20.

- 3) Muller N, Volgyesi G, Bryan MH, et al. The consequences of diaphragmatic muscle fatigue in the newborn infants. *J Pediatr* 1979; 95: 793-7.
- 4) Alden ER, Mandelkorn T, Woodrum DE et al. Morbidity and mortality of infants weighting less than 1,000 grams in an intensive care nursery. *Pediatrics* 1972;50:40-9.
- 5) Barrington K, Finer N. The natural history of the appearance of apnea of prematurity. *Pediatr Res* 1991;29:372-75.
- 6) Stoll BJ, Kliegman RM. Respiratory tract disorders. In: Behrman RE, Kliegman RM, Jenson HB. Editors, Nelson. Textbook of pediatrics, 17th Ed, 2004, p573-74.
- 7) Aranda JV, Turmen T. Methylxanthines in apnea of prematurity. *Clin Perinatol* 1979; 6:87-108.
- 8) Bonati M, Jiritano L, Bortolotti A, Gaspari F, Filippeschi S, et al. Caffeine distribution in acute toxic response among inbred mice. *Toxicol Lett.* 1985;29:25-31.
- 9) Dimitrov NV. The effects of caffeine on glucose metabolism of polymorphonuclear leukocytes. *J Pharmacol Exp Ther* 1969;168:240-3
- 10) Friedman L, Weinberger MA, Farber TM, Moreland FM, Peters EL, F, et al. Testicular atrophy and impaired spermatogenesis in rats fed high levels of the methylxanthines caffeine, theobromine, or theophylline. *J Environ Pathol Toxicol.* 1979;2:687-706.
- 11) Weinberger MA, Friedman L, Farber TM, Moreland FM, Peters EL, et al. Testicular atrophy and impaired spermatogenesis in rats fed high levels of the methylxanthines caffeine, theobromine, or theophylline. *J Environ Pathol Toxicol.* 1978;1:669-88.
- 12) Ax RL, Collier RJ, Lodge JR. Effects of dietary caffeine on the testis of the domestic fowl, *Gallus domesticus*. *J Reprod Fertil.* 1976;47:235-8.
- 13) Ezzat AR, el-Gohary ZM. Hormonal and histological effects of chronic caffeine administration on the pituitary-gonadal and pituitary-adrenocortical axes in male rabbits. *Funct Dev Morphol.* 1994;4:45-50.
- 14) Kies SD, Devine DP. Self-injurious behaviour: a comparison of caffeine and pemoline models in rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 2004;79:587-98.
- 15) Mueller K, Saboda S, Palmour R, Nyhan WL. Self-injurious behavior produced in rats by daily caffeine and continuous amphetamine. *Pharmacol Biochem Behav.* 1982;17: 613-7.
- 16) Nishimura H. Congenital malformations in offspring of mice treated with caffeine. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1960;104:140-2.
- 17) Reddy RV. Interaction of dimethylsulfoxide and arachidonic acid with the teratogenic effects of caffeine in mice. *Nutral Toxins.* 1994;2:29-35

- 18) Soyka LF, Joffe JM. Male mediated drug effects on offspring. *Prog Clin Biol Res.* 1980;36:49-66.
- 19) Pollard I, Jabbour H. Effects of caffeine administered during pregnancy on fetal development and subsequent function in the adult rat: prolonged effects on a second generation. *J Toxicol Environ Health.* 1987;22:1-15.
- 20) Aitken RJ, Best F, Richardson DW, Schats R, Simm G. Influence of caffeine on movement characteristics, fertilizing capacity and ability to penetrate cervical mucus of human spermatozoa. *J Reprod Fertil.* 1983;67:19-27.
- 21) Marshburn PB. Semen. Quality and association with coffee drinking, cigarette smoking and ethanol consumption. *Fertil Steril* 1989;52:162-5
- 22) Dlugosz L, Bracken MB. Reproductive effects of caffeine: a review and theoretical analysis. *Epidemiol Rev.* 1992;14:83-100.
- 23) Golding J. Reproduction and caffeine consumption--a literature review. *Early Hum Dev.* 1995;43:1-14.
- 24) Caffeine in Gerald GB, Roger KF, Sumner JY. eds. *Drugs in pregnancy and lactation.* 9th ed. Philadelphia:Wolters Kluwer Health, 2011;183-7
- 25) Hughes RN, Beveridge IJ. Behavioral effects of prenatal exposure to caffeine in rats. *Life Sci.* 1986;38:861-8.
- 26) Hughes RN, Beveridge IJ. Behavioral effects of exposure to caffeine during gestation, lactation or both. *Neurotoxicol Teratol.* 1991;13:641-7.
- 27) Hughes RN, Loader VG. Effects on elevated plus-maze behavior of exposure to caffeine during both gestation and lactation. *Psychobiology* 1996;24:314-9
- 28) Zimmerberg B, Carr KL, Scott A, Lee HH, Weider JM. The effects of postnatal caffeine exposure on growth, activity and learning in rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 1991;39:883-8.
- 29) Pan HZ, Chen HH. Hyperalgesia, Low-anxiety, and impairment of avoidance learning in neonatal caffeine-treated rats. *Psychopharmacology (Berl).* 2007;191:119-25.
- 30) Anderson NL, Hughes RN. Increased emotional reactivity in rats following exposure to caffeine during adolescence. *Neurotoxicol Teratol.* 2008;30:195-201.
- 31) Lau CE, Ma F, Falk JL. Oral and IP caffeine pharmacokinetics under a chronic food-limitation condition. *Pharmacol Biochem Behav.* 1995;50:245-52.
- 32) Ikeda GJ, Sapienza PP. Blood levels of caffeine and results of fetal examination after oral administration of caffeine to pregnant rats. *J Appl Toxicol.* 1982;2:307-14.

- 33) Panigrahi GB. Influence of caffeine on arecoline-induced SCE in mouse bone-marrow cells in vivo. *Mutat Res* 1983;122:347-53
- 34) MacGregor JT. Cytogenetic damage induced by folate deficiency in mice is enhanced by caffeine. *Proc Natl Acad Sci* 1990;87:9962-5
- 35) Shiraishi Y. Effects of caffeine-induced defective DNA replication on SCE and chromosome aberrations produced by alkylating agents. *Mutat Res.* 1980;72:251-6.
- 36) International Agency for Research on Cancer (IARC) - Summaries & Evaluations. 1991;51.