

ミダフレッサ静注 0.1% (ミダゾラム)

第 2 部 : CTD の概要 (サマリー)

2.6.1 緒 言

アルフレッサ ファーマ株式会社

2.6.1 緒言

ミダゾラム (Midazolam) は、化学合成されたイミダゾベンゾジアゼピン誘導体 (図 2.6.1-1) であり、類似のベンゾジアゼピン系薬剤と同様に催眠、鎮静、麻酔、抗不安などの薬理作用に加え、強力な筋弛緩作用及び抗けいれん作用を有している。ミダゾラムは GABA_A 受容体のベンゾジアゼピン結合部位に結合し、アロステリック効果により GABA と GABA_A 受容体との結合親和性を高める。これにより GABA_A 受容体の Cl^- チャンネルの開閉頻度が上昇して神経細胞の過分極及びシャンテイング効果が生じる結果、抑制性の神経伝達が増強され、神経伝達の過剰興奮 (てんかん性放電) が抑制される。

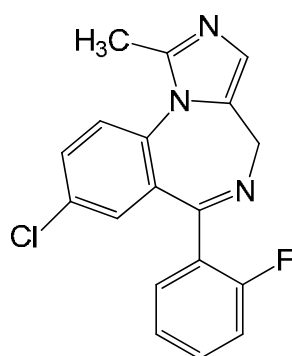


図 2.6.1-1

ミダゾラムの化学構造式

現在、静注用ミダゾラム製剤のてんかん重積状態 (status epilepticus) に対する効能が承認されている国はないが、国内において多くのてんかん重積状態の患者に適応外使用されている。既存の治療薬 (ジアゼパム、フェニトイン又はホスフェニトイン、フェノバルビタールなど) では速効性、持続性又は安全性のいずれかに問題があるが、本剤の効果は強力かつ速効性があり、また希釈性が良好で持続静脈内投与も可能であるため、長期間安定した効果を維持できる。さらに既存の治療薬に比べて呼吸・循環器系に対する影響が少ないため、初期治療に必要な条件を兼ね備えた薬剤として高く評価されている。

以上のように、ミダゾラムの効果は強力かつ速効性があり、持続投与も可能であることから、治療法の少ないてんかん重積状態に対する有効性が期待される。

申請する効能・効果，用法・用量

【効能・効果】

てんかん重積状態

【用法・用量】

静脈内投与

通常、修正在胎 45 週以上（在胎週数＋出生後週数）の小児には、ミダゾラムとして 0.15 mg/kg を静脈内投与する。投与速度は 1 mg/分を目安とすること。なお、必要に応じて 1 回につき 0.1～0.3 mg/kg の範囲で追加投与するが、初回投与と追加投与の総量として 0.6 mg/kg を超えないこと。

持続静脈内投与

通常、修正在胎 45 週以上（在胎週数＋出生後週数）の小児には、ミダゾラムとして 0.1 mg/kg/時より持続静脈内投与を開始し、必要に応じて 0.05～0.1 mg/kg/時ずつ増量する。最大投与量は 0.4 mg/kg/時までとすること。

ミダフレッサ静注 0.1%

(ミダゾラム)

第 2 部：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

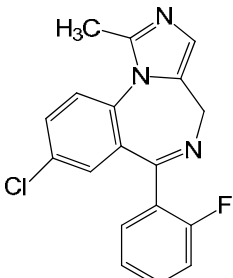
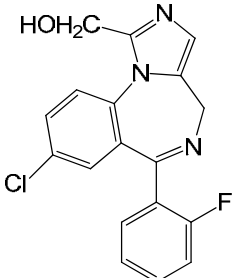
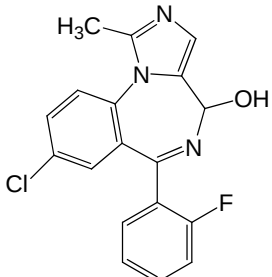
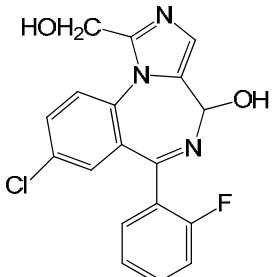
アルフレッサ ファーマ株式会社

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	14
2.6.2.2.1	薬効薬理試験	14
2.6.2.2.2	<i>In vitro</i> 作用機序試験	39
2.6.2.2.3	<i>In vivo</i> 作用機序試験	57
2.6.2.2.4	代謝物の薬理試験	59
2.6.2.3	副次的薬理試験	60
2.6.2.4	安全性薬理試験	73
2.6.2.4.1	ミダゾラムの安全性薬理試験コアバッテリー試験（中枢神経系、心血管系及び呼吸系に及ぼす影響）	73
2.6.2.4.1.1	中枢神経系に及ぼす影響	73
2.6.2.4.1.2	心血管系に及ぼす影響	77
2.6.2.4.1.3	呼吸器系に及ぼす影響	91
2.6.2.4.2	補足的安全性試験（腎・泌尿器系、自律神経系及び胃腸管系に及ぼす影響）	97
2.6.2.4.2.1	腎・泌尿器系に及ぼす影響	97
2.6.2.4.2.2	自律神経系に及ぼす影響	100
2.6.2.4.2.3	胃腸管系に及ぼす影響	101
2.6.2.5	薬力学的薬物相互作用試験	107
2.6.2.6	考察及び結論	122
2.6.2.7	図表	133
2.6.2.8	参考文献	134
2.6.3	薬理試験概要表	136
2.6.3.1	薬理試験：一覧表	136
2.6.3.1.1	効力を裏付ける試験	136
2.6.3.1.1.1	薬効薬理試験	136
2.6.3.1.1.2	<i>In vitro</i> 作用期機序試験	137
2.6.3.1.1.3	<i>In vivo</i> 作用機序試験	138
2.6.3.1.1.4	代謝物の薬理作用	138
2.6.3.1.2	副次的薬理試験	138
2.6.3.1.3	安全性薬理試験	139
2.6.3.1.4	薬力学的薬物相互作用試験	140
2.6.3.2	薬理試験：総括表	141
2.6.3.2.1	効力を裏付ける試験	141

2.6.3.2.1.1	薬効薬理試験	141
2.6.3.2.1.2	<i>In vitro</i> 作用機序試験	141
2.6.3.2.1.3	<i>In vivo</i> 作用機序試験	141
2.6.3.2.1.4	代謝物の薬理作用	141
2.6.3.2.2	副次的薬理試験	141
2.6.3.2.3	安全性薬理試験	141
2.6.3.2.4	薬力学的薬物相互作用試験	141

[ミダゾラム] 及び関連物質の化学名，構造式，略称（略号）及び由来

名称	構造式	略称（略号）	由来
ミダゾラム 【化学名： 8-chloro-6-(2-fluorophenyl)-1-methyl-4H-imidazo[1,5-a][4,4]benzodiazepine】		MDA	原薬
1-ヒドロキシミダゾラム 【化学名： 8-chloro-6-(2-fluorophenyl)-1-hydroxy-methyl-4H-imidazo[1,5-a][4,4]benzodiazepine】		1-OH MDA	代謝物
4-ヒドロキシミダゾラム 【化学名： 8-Chloro-6-(2-fluorophenyl)-1-methyl-4H-imidazo[1,5-a][1,4]benzodiazepin-4-ol、 1-Methyl-8-chloro-6-(2-fluorophenyl)-4H-imidazo[1,5-a][1,4]benzodiazepin-4-ol】		4-OH MDA	代謝物
1,4-ジヒドロキシミダゾラム 【化学名： 1,4-Dihydroxymidazolam;8-Chloro-6-(2-fluorophenyl)-4-hydroxy-4H-imidazo[1,5-a][1,4]benzodiazepine-1-methanol】		1,4-OH MDA	代謝物

略語・略号一覧表

略語・略号	英語	日本語
AMPA	alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole-propionic acid	α -アミノ-3-ヒドロキシ-5-メチル-4-イソオキサゾールプロピオン酸
ANOVA	analysis of variance	分散分析
AP5	D-(-)-2-amino-5-phosphonovaleric acid	D-(-)-2-アミノ-5-ホスホノ吉草酸
B _{max}	maximum binding	最大結合量
C _i	Curie	キュリー
DMCM	methyl-6,7-dimethoxy-4-ethyl-beta-carboline-3-carboxylate	6,7-ジメトキシ-4-エチル-9H-ピリド[3,4-b]インドール-3-カルボン酸メチル
EC	effective concentration	有効濃度
ED	effective dose	有効用量
EGTA	ethyleneglycol bis(2-aminoethylether)tetraacetic acid	エチレングリコールビス 2 アミノエチルエーテル四酢酸
EN	eosinophilic neuron	好酸性に染色された神経細胞
EPSP	excitatory postsynaptic potential	興奮性シナプス後電位
EX	exits	死亡
FR	fixed ratio	定率強化
FUL	flurothyl	フルロチル
GABA	gamma-aminobutyric acid	γ -アミノ酪酸
GABA _A	GABA-A	γ -アミノ酪酸 A
GABA _B	GABA-B receptor	γ -アミノ酪酸 B
GAD	glutamic acid decarboxylase	グルタミン酸脱炭酸酵素
GFAP	glial fibrillary acidic protein	グリア線維性酸性タンパク
h	human	ヒト
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid	4-(2-ヒドロキシエチル)-1 ピペラジンエタンスルホン酸 (ヘペス)
HI-6	1-[[[4-(aminocarbonyl) pyridinio]methoxy]methyl]-2-[(hydroxyomino)methyl] pyridinium • dichloride	1-[[[4-(アミノカルボニル)ピリジニオ]メトキシ]メチル]-2-[(ヒドロキシイミノ)メチル]ピリジニウム・ジクロリド

略語・略号	英語	日本語
HP	Hemalum-Phloxin	ヘマラン-フロキシン
IC	inhibitory concentration	抑制濃度
ICV	intracerebroventricular administration	脳室内投与
I_{GABA}	GABA-induced chloride current	GABA 誘発電流
IPSP	inhibitory postsynaptic potential	抑制性後シナプス電位
K_d	binding dissociation constant	結合解離定数
LD_{50}	50% lethal dose	50%致死量
MES	maximum electroshock seizure	最大電撃けいれん
mIPSC	miniature inhibitory postsynaptic current	微小抑制性後シナプス電流
mIPSP	miniature inhibitory postsynaptic potential	微小抑制性後シナプス電位
mMS	minimal seizure	最小けいれん
MMS	major seizure	全身けいれん
MPA	mercaptopropionic acid	メルカプトプロピオン酸
MS	major seizure	強直間代性けいれん
NMDA	N-methyl-D-aspartate	N-メチル-D-アスパラギン酸
NREMS	non-rapid eye movement sleep	ノンレム睡眠
PHA	hippuric acid	パラアミノ馬尿酸
PK-PD	pharmacokinetics-pharmacodynamics	薬動力学-薬力学
PTZ	pentylentetrazol	ペンチレンテトラゾール
REMS	rapid eye movement sleep	レム睡眠
SD	standard deviation	標準偏差
SE	standard error	標準誤差
SRBD	seizure-related brain damage	けいれん関連脳組織傷害
STR	strychnine	ストリキニーネ
TC	tonic convulsion	強直性けいれん
TTX	tetrodotoxin	テトロドトキシン
VI	variable interval	変動時間間隔強化
W	wakefulness	覚醒

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～-11 参）

a) けいれん重積モデル

I) ラットピロカルピン誘発けいれん重積発作に対する作用

ピロカルピンを全身に投与すると、辺縁けいれん重積発作が 24 時間続き、その後自然発生的なけいれん発作の再発が繰り返し見られ、全般発作のけいれん重積状態様モデルが形成される。ピロカルピン誘発による部分発作後の全般発作（けいれん重積発作）に対し、ミダゾラム 10～50 nmol は黒質網様部、尾状核被殻及び側坐核内への投与により用量依存的かつ有意な抑制作用を示したが、フェニトインは尾状核被殻内に 50 nmol 投与した場合のみ有意な抑制作用を示した。

II) ラット及びマウスソマン誘発けいれん重積発作に対する作用

有機リン酸塩系神経作用物質ソマンは、アセチルコリンエステラーゼの反応を阻害することにより、けいれん重積様発作を誘発する。ソマン誘発によるけいれん重積発作に対し、ベンゾジアゼピン誘導体である、ミダゾラムマレイン酸塩、ジアゼパム及びロラゼパム（それぞれ 3 mg/kg）をけいれん誘発 5 分後に投与した時、いずれも強力な抗けいれん作用を示した。ペントバルビタールナトリウム（30 mg/kg）ではけいれん誘発 5 及び 40 分後に投与した時、いずれの場合でも抗けいれん作用を示した。一方、フェニトインナトリウム（75 mg/kg）、ラモトリギン（18 mg/kg）、バルプロ酸（400 mg/kg）及びカルバマゼピン（30 mg/kg）では投与時期に関係なく抗けいれん作用を示さなかった。

ソマン誘発によるけいれん重積発作では、ソマン投与 24, 72 時間後及び 7 日後に皮質及び扁桃核に多くの好酸球様細胞が認められ、また、活性化アストロサイトが扁桃核ではソマン投与 72 時間後及び 7 日後に、皮質では 7 日後に認められたが、ミダゾラム 25 mg/kg 投与群では好酸球様細胞及び活性化アストロサイトともに認められなかった。一方、けいれん重積発症 2 時間後のケタミン 100 mg/kg 投与群では、傷害細胞が 30～45%、活性化アストロサイトが 40%減少した。また、けいれん重積発症 1 時間後のケタミン 100 mg/kg 投与群（2 及び 3 時間後に 50 mg/kg のケタミンを追加投与）では傷害細胞が 70～80%、活性化アストロサイトが 70～80%減少した。

III) マウスペンチレンテトラゾール誘発けいれん重積発作に対する作用

ペンチレンテトラゾール（PTZ）誘発全般けいれん発作モデルに、ヒダントイン系抗けいれん薬フェニトインを処置すると 90 分間の持続性間代けいれん（けいれん重積発作）が誘発される。ジアゼパムは 0.2 及び 0.4 mg/kg でけいれん重積発作を抑制し、0.4 mg/kg の作用発現は 0.2 mg/kg より速やかであった。一方ミダゾラムは 0.1 及び 0.2 mg/kg でジアゼパムに比し有意かつ速やかなけいれん重積発作抑制作用を示した。

IV) メルカプトプロピオン酸誘発けいれん重積発作及びフルロチル誘発けいれん重積発作に対する作用

てんかん重積時のグルコース代謝は黒質緻密部で最も高いことが知られている。メルカプトプロピオン酸 (MPA) 及びフルロチル (FUL) 誘発けいれん重積モデルにおけるミダゾラムの抗けいれん重積作用及び黒質緻密部傷害に対する保護作用を検討した。MPA 誘発けいれん重積モデル及び FUL 誘発けいれん重積モデルのけいれんは 30～45 分持続する。これらの重積モデルにおいてけいれん重積状態を 30 分間持続させた後にミダゾラムを 25 mg/kg 静脈内投与すると、けいれん重積はミダゾラムの投与直後に消失した。また、ミダゾラム投与により黒質緻密部の好酸性に染色された神経細胞 (eosinophilic neuron: EN) の面積と EN 評価スコア (0: no EN, 1: 1～5% EN, 2: 6～25% EN, 3: 26～50% EN, 4: 51～75% EN, 5: 76～100% EN) は低下した。

b) 急性けいれんモデル

I) 最大電撃けいれん (MES) に対する作用

生体に電気刺激を行うと、脱分極が高頻度に反復して繰り返され、多数の神経細胞が同期化した活動電位を誘発し、その結果、けいれんが誘発される。ミダゾラムは脳室内及び髄腔内投与によりラットの MES に対し抑制作用を示した。マウスのミダゾラム及びジアゼパムの抗 MES 作用を比較すると、ミダゾラム及びジアゼパムを MES 誘発の 10 分前に投与した場合、ミダゾラムの作用がジアゼパムの約 2 倍強力であったが、MES 誘発 30 分前の投与では、逆にジアゼパムの効力が強かった。ミダゾラムは投与後速やかに効果が発現すると推察された。

II) ペンチレンテトラゾール誘発けいれんに対する作用

PTZ は GABA_A 受容体のピクロトキシン結合部位に結合して、Cl⁻チャネルを遮断する。その結果、GABA の抑制機構を遮断して興奮作用をもたらす、けいれん誘発作用を示す。ミダゾラム又はジアゼパムをマウスに投与（経口及び静脈内）した場合、ミダゾラムの抗けいれん作用は投与後急速に減弱した。また、ジアゼパムも一定の効果減弱を示したが、その傾きはミダゾラムより緩やかであった。

III) 幼若ラットにおけるペンチレンテトラゾール誘発けいれんに及ぼす作用

生後 7～90 日齢ラットにおいて、ミダゾラムは 0.5mg/kg 以上の用量で PTZ 誘発けいれんを抑制した。しかし、生後 7 及び 12 日齢ラットにおいて、PTZ は単独で最小けいれんをほとんど発現させないが、PTZ 処置したラットにミダゾラムを投与すると最小けいれんの発現率は増加した。

IV) 3-メルカプトプロピオン酸誘発けいれんに対する作用

3-メルカプトプロピオン酸 (3-MPA) はグルタミン酸脱水素酵素による γ -アミノ酪酸 (GABA) 合成を阻害し、GABA の抑制機構が減弱することによりけいれんを惹起する。ミダゾラムのマウス 3-MPA 誘発けいれんに対する抗けいれん作用は 10 分前にミダゾラムを投与した場合が強力であり、その効力はジアゼパムと同等であった。

V) ストリキニーネ誘発けいれんに対する作用

ストリキニーネは運動ニューロン側のグリシン受容体に結合してそのシナプス後抑制を遮断後、脊髄反射の興奮性を亢進させ、反射性の筋収縮・強直性けいれんを起こす。ミダゾラムは 2 mg/kg 腹腔内投与によりラットにおける強直性けいれん及び強直間代性けいれんの発現率を 50% 抑制し、死亡例は認められず有意な作用を示した。フェニトインは試験に用いた用量では有意な拮抗作用を示さなかった。フェノバルビタールは 80mg/kg で強直性けいれん及び強直間代性けいれんの発現を 100% 抑制し、死亡例もなく有意な作用を示した。

VI) 興奮性アミノ酸誘発けいれんに対する作用

グルタミン酸は興奮性神経伝達物質であり、興奮性シナプス後電位 (EPSP) を誘導することによりけいれんを誘発する。マウスにおいてジアゼパムはすべての興奮性アミノ酸 (NMDA, カイニン酸及びキスカル酸) 誘発けいれんに対して抑制作用を示した。一方、ミダゾラムはカイニン酸誘発けいれんに対し抑制作用を示したが、NMDA 及びキスカル酸誘発けいれんに対しては作用を示さなかった。また、フェノバルビタールはカイニン酸及びキスカル酸誘発けいれんに対して抑制作用を示したが、フェニトインはすべての興奮性アミノ酸誘発けいれんに対して抑制作用を示さなかった。

(2) *In vitro* 作用機序試験 (資料番号 : 4.2.1.1.2-1 参~10 参)

a) マウス培養脳神経組織及び骨髄神経組織におけるミダゾラムの GABA 誘発電流増強作用

GABA 添加によりマウス神経組織において脱分極が認められ、6,7-ジメトキシ-4-エチル-9H-ピリド[3,4-b]インドール-3-カルボン酸メチル (DMCM) により GABA 誘発電流 (I_{GABA}) 抑制作用が認められた。ミダゾラムを添加すると、GABA 誘発電流は増強したが、グリシン誘発電流に対して作用を示さなかった。

b) ラット細胞膜小胞における GABA 開口性クロライドチャネルコンダクタンスに対するミダゾラムの作用

GABA は Cl^- 膜透過性を増加させ、その作用は用量依存的で飽和性を示した。ビククリンは GABA で誘導した Cl^- 膜透過性亢進を阻害したが、ミダゾラムは GABA 誘導 Cl^- 膜透過性亢進作用を増強した。ミダゾラムは GABA 非存在下では Cl^- 膜透過性亢進作用を示さないのに対し、高濃度のペントバルビタールは GABA 非存在下で Cl^- 膜透過性亢進作用を示した。

c) ラット神経終末細胞膜の GABA 受容体における GABA 結合に対するミダゾラムの増強作用

ラット神経終末細胞膜内の GABA 受容体に対する GABA の親和性は低い、ミダゾラム、ジアゼパム、ニトラゼパム、オキサゼパム、クロナゼパム、クロルジアゼポキシド及び非ベンゾジアゼピン系誘導体（ゾピクロン、CL 2018872）により親和性が増加した。

d) ラット培養海馬及び脊髄におけるミダゾラムの GABA 伝達への作用

1 μ M のミダゾラムはラット神経細胞における GABA 性 mIPSC の平均頻度及び振幅に影響を示さなかったが、持続時間を延長した。

e) GABA_A 受容体 $\alpha_1\beta_2\gamma_2$ サブユニット発現細胞におけるミダゾラムの作用

GABA_A 受容体 $\alpha_1\beta_2\gamma_2$ サブユニット発現細胞において [³H]フルマゼニルは高い親和性を有するが、ミダゾラムはこの結合に対して阻害作用を示し、GABA 非存在下での IC₅₀ 値は 2.8 nM であった。一方、GABA の共存によりミダゾラムの阻害作用は増強し、GABA 非存在下 IC₅₀ 値/GABA 共存下 IC₅₀ 値（比）は 3 以上であった。また、最大 I_{GABA} 値の 5～10%を誘導する GABA の濃度において、0.1～10000 nM のミダゾラムは I_{GABA} を最大 342%増強させ、その EC₅₀ 値は 143 nM であった。

f) ミダゾラムの GABA 誘発電流増強作用に及ぼす発達・加齢の影響

生後 7～12 日齢ラット海馬における I_{GABA} に対してミダゾラムは有意な増強作用を示さず、生後 25～35 日齢ラット海馬における I_{GABA} に対しては bell-shaped な増強作用を示した。また、内側中隔・対角帯核ニューロン標本において、この増強作用は加齢（生後 20～21 ヶ月）により増加した。

(3) *In vivo* 作用機序試験（資料番号：4.2.1.1.1-6 参，4.2.1.1.3-2 参）

a) ミダゾラム脳内移行の経時的变化

[³H]フルニトラゼパムを用いて、ミダゾラム及びジアゼパムの脳内ベンゾジアゼピン結合部位占有率及び占有時間を比較した。ミダゾラム及びジアゼパムの 10 mg/kg 経口投与直後における占有率はいずれも約 80～90%であり、その作用はジアゼパムで 4 時間以上維持されたのに対し、投与後 4 時間におけるミダゾラムの占有率は約 20%であった。

(4) ミダゾラム代謝物の薬理作用（資料番号：4.2.1.1.1-6 参）

脳組織を用いた GABA_A 受容体のベンゾジアゼピン結合部位への結合試験において、ミダゾラム代謝物の 1-ヒドロキシミダゾラム（1-OH MDA）はミダゾラムと同等の親和性を示したが、4-ヒドロキシミダゾラム（4-OH MDA）及び 1,4-ジヒドロキシミダゾラム（1,4-OH MDA）はミダゾラムに比べ低い親和性を示した。一方、代謝物の薬理作用をミダゾラムと比較すると、1-OH MDA の活性は約 1/5～1/40、4-OH MDA の活性は約 1/3～1/16 であったが、1,4-OH MDA の活性は 1/40 以下であり、ミダゾラム代謝物の抗けいれん作用は弱かった。PTZ 誘発けいれん（70 mg/kg、静

脈内投与) に対する効力 (ED₅₀ 値) の経時変化を調べると、投与 1 分後ではミダゾラム (マレイン酸塩) の効果は 1-OH MDA の 12 倍、4-OH MDA の 100 倍強力であるが、15 分後には効力差は急速に縮まり、60 分後では有意差が認められなかった。このことは、ピーク時の抗けいれん作用は未変化体に由来することを示唆する。

2) 副次的薬理試験 (4.2.1.1.1-6 参, 4.2.1.2-2 参)

(1) 鎮静作用

ミダゾラムはラットの自発運動及び新奇環境探索行動を抑制し、鎮静作用を示した。

(2) 筋弛緩作用

マウス及びラットを用いた Rotarod 試験, Chimney 試験及び Pole-climbing 試験において、ミダゾラムは静脈内、筋肉内及び経口投与で強力かつ作用発現の速い筋弛緩作用を示したが、筋弛緩作用に性差及び年齢差は認められなかった。

(3) 抗不安作用

ラットを用いた受動的回避学習行動試験, ラット及びリスザルを用いた Geller-Seifter 型コンフリクト試験においてミダゾラムマレイン酸塩は抗不安作用を示したが、高用量では鎮静作用が認められた。

(4) 催眠作用

マウス及びラットにおいてミダゾラムは高用量で正向反射を消失させたが、屈筋反射の消失は認められず、麻酔作用は認められなかった。また、ミダゾラムは静脈内投与でウサギの覚醒時間を短縮させ、ノンレム睡眠時間を延長させた。

3) 安全性薬理試験 (資料番号 : 4.2.1.1.1-6 参, 4.2.1.2-2 参, 4.2.1.3-3 参~5 参)

(1) コアバッテリー試験

a) 中枢神経系に及ぼす影響

マウス, ラット及びサルにおけるミダゾラム静脈内投与後の一般行動及び症状観察において、よろめき歩行, 筋弛緩, 鎮静, 運動量減少及び催眠等の薬理作用が認められた。

b) 心血管系に及ぼす影響

ミダゾラム 0.3~1 mg/kg の静脈内投与により麻酔下のイヌの血圧及び左心室内圧がわずかに低下し、その作用は用量依存的で、発現時間は投与 1~5 分後であった。左心室拡張終期圧にはほとんど影響を示さず、心拍数の低下も 10%以下であった。心拍出量及び心収縮パラメータもわずかに低下させたが、全末梢抵抗には影響しなかった。一方、無麻酔下の雌性腎性高血圧症イヌにおいて、ミダゾラム 0.3~10 mg/kg の静脈内投与により、収縮期血圧に対する影響は認められなかった。

また、ウサギのテレメトリ-ECG 法により記録した心電図波形から、ミダゾラム 3 mg/kg の筋肉内投与による QT 延長作用は認められなかった。

c) 呼吸器系に及ぼす影響

ミダゾラムの静脈内投与（ボラス）により麻酔下のイヌの呼吸数に影響は認められなかったが、漸増静脈内投与（1～2 回目は 0.1 mg/kg, 3～7 回目は 0.2 mg/kg）により、1 回換気量がベースラインに比し 30%減少、血中酸素飽和度が 10%減少及び呼気中二酸化炭素濃度が 15%増加した。呼吸抑制発現時におけるミダゾラムの投与回数は平均 3.4 回であった。

ラットにおけるミダゾラムの呼吸抑制作用について PK-PD 解析を行った結果、血中ミダゾラム濃度は反時計回りの履歴特性（counter-clockwise hysteresis loop）を示し、脳内ミダゾラム濃度は時計回りの履歴特性（clockwise hysteresis loop）を示したことからミダゾラムの呼吸抑制の発現はミダゾラムの中樞神経に対する作用に起因することが示唆された。

(2) 補足的安全性薬理試験

a) 腎・泌尿器系に及ぼす影響

ミダゾラムの静脈内投与（1 mg/kg）により、糸球体濾過量、腎血漿流量、腎血流量、濾過率、尿量及び尿中電解質（Na⁺, K⁺及び Cl⁻）排泄量など各パラメータに変化は認められなかった。

b) 自律神経系に及ぼす影響

ミダゾラム 100 mg/kg までの経口投与により、ピロカルピン誘発唾液分泌に対して影響は認められなかった。また、摘出平滑筋に対しても 3×10^{-5} M 以上の高濃度で非特異的な弛緩作用を示したのみであった。

c) 胃腸管系に及ぼす影響

ミダゾラムは幽門結紮による胃酸分泌に対して抑制作用（ED₅₀ 値：5 mg/kg, i.d.）を示したが、ヒスタミン誘発胃酸分泌に対して抑制作用を示さなかった。また、インドメタシン誘発胃潰瘍に対して抑制作用（ED₅₀ 値：8 mg/kg, p.o.）を示したが、4-メチルヒスタミン・カルバコール誘発十二指腸潰瘍に対して抑制作用を示さず、腸管輸送能にも作用を示さなかった。ヒマシ油誘発下痢に対しても高用量で抑制作用を示した（ED₅₀ 値：100 mg/kg, p.o.）。

4) 薬力学的薬物相互作用試験（資料番号：, 4.2.1.1.1-6 参, 4.2.1.2-2 参, 4.2.1.4-3 参）

(1) 麻酔薬、鎮痛薬及びエタノールとの薬物相互作用

ミダゾラムはマウスにおいてチオペンタール、ケタミン、ドロペリドール・フェンタニール及びエタノールの麻酔作用を増強させた。ブプレノルフィン、フェンタニール及びモルヒネの鎮痛作用に対して影響は認められなかったが、Hot plate 法におけるペンタゾシンの鎮痛効果の延長作用が認められた。

(2) フェンタニールとの薬物相互作用

ラットにおいてミダゾラムとフェンタニールの単独投与に比べ、両薬剤の静脈内併用投与により呼吸抑制が増強され、ミダゾラム 5～25 mg/kg 及びフェンタニール 0.05 mg/kg の静脈内併用投与では重度の呼吸抑制の後に死亡した。

(3) メペリジン塩酸塩、アトロピン、メプロバメート、ペントバルビタール及びクロルプロマジン塩酸塩との薬物相互作用

ミダゾラム 3 mg/kg の静脈内投与により、アトロピン、メプロバメート、ペントバルビタール及びクロルプロマジン塩酸塩投与群の LD₅₀ 値は有意に低下した。一方、ミダゾラムは、メペリジン塩酸塩誘発けいれん発作を抑制し、LD₅₀ 値は高値を示した。しかし、上記の変化はいずれも弱いものであり (0.68～1.54 倍)、ミダゾラムとメペリジン塩酸塩、アトロピン、メプロバメート、ペントバルビタール及びクロルプロマジン塩酸塩の実質的な相互作用は認められなかった。

(4) フルマゼニルとの薬物相互作用

フルマゼニルはミダゾラムの薬理作用である抗けいれん作用、筋弛緩作用、催眠作用及び抗不安作用に対して拮抗作用を示した。

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) けいれん重積モデル

(1) ラットピロカルピン誘発けいれん重積発作に対する作用

(公表論文, 資料番号 : 4.2.1.1.1-1 [参考資料])

ラットにムスカリン受容体作動薬であるピロカルピンを全身投与すると二次性全般化側頭葉てんかんが誘発されるが, その過程は, けいれん症状及び脳波の変化から急性期, 潜伏期及び慢性期に分けられる. ピロカルピン投与後から辺縁けいれん発作重積が 24 時間続き, 4~44 日間の潜伏期間 (けいれん症状及び脳波の変化が消失) が認められ, その後二次性全般化てんかん発作が誘発される. そこでミダゾラムのけいれん発作重積に対する作用を検討するため, ピロカルピン誘発部分発作後の全般発作の発現率をフェニトインと比較した.

Sprague-Dawley 系雄性ラット (300~350g) を用いて, 1 mg/kg のメチルプロスコポラミンを皮下投与 30 分後, 97%の無麻酔ラットが二次性全般発作を発現する用量 (375 mg/kg) のピロカルピンを腹腔内投与し, けいれん重積発作を誘発した. けいれん症状の程度は Racine¹⁾ の方法に従い採点した.

無麻酔下で特定の脳部位に薬物投与するため, 投与 12~14 日前にカニューレガイドをラットに埋め込み, 0.9%生理食塩水に溶かした 10, 25, 50 nmol のミダゾラム又は 10, 25, 50, 100 nmol のフェニトインを黒質網様部, 尾状核被殻又は側坐核に 1 µL の容量 (速度 : 0.5 µL/分) で, ピロカルピン腹腔内投与 15 分前に 2 分間かけてマイクロインジェクションし, 対照には 0.9%生理食塩水をマイクロインジェクションした (n=4~10). ピロカルピン投与後 2 時間の症状観察を行い, 部分発作後の全般発作の発現率を算出した. ミダゾラムとフェニトインのけいれん重積発作に対する作用を表 2.6.2.2.1-1 に示す.

表 2.6.2.2.1-1 ミダゾラムとフェニトインのけいれん重積発作に対する作用

(資料番号 4.2.1.1.1-1 [参考資料] の表 3 を改変)

投与群	全般発作発現率 (%)		
	黒質網様部	尾状核被殻	側坐核
ミダゾラム 対照	83	88	80
10 nmol	-	71	60
25 nmol	75	14*	0*
50 nmol	22*	0*	0*
フェニトイン 対照	86	88	100
10 nmol	-	57	50
25 nmol	100	33	60
50 nmol	100	25*	-
100 nmol	-	-	57

* : p<0.05 (Fisher's exact test, 対照群に対して)

ミダゾラムは黒質網様部、尾状核被殻及び側坐核のいずれの部位に投与しても、有意な抗けいれん重積発作作用を示したが、フェニトインは尾状核被殻内に投与した場合のみ有意な抑制作用を示した。

(2) ラット及びマウスソマン誘発けいれん重積発作に対する作用

(公表論文，資料番号：4.2.1.1.1-2 [参考資料]，-3 [参考資料])

有機リン酸塩系神経作用物質ソマンは、アセチルコリンエステラーゼの働きを阻害し、アセチルコリンの蓄積によりムスカリン受容体を持続的に刺激し、けいれん重積発作を誘発する。そこでミダゾラムのけいれん重積発作に対する作用を検討するため、ソマン誘発けいれん重積発作発現率を他の抗てんかん薬（ジアゼパム、ロラゼパム、ペントバルビタール、フェニトイン、ラモトリギン、バルプロ酸、カルバマゼピン）と比較した。

Sprague-Dawley 系雄性ラット（250～300g）に皮質電極を試験 1 週間前に埋め込み、けいれん発作の発現及び消失を脳波測定により評価した。15 分間の基準脳波を記録した後、生理食塩水に溶解した 125 mg/kg の 1-[[[4-(アミノカルボニル)ピリジニオ]メトキシ]メチル]-2-[(ヒドロキシイミノ)メチル]ピリジニウム・ジクロリド (HI-6) を腹腔内投与し、さらに 30 分後に 180 µg/kg のソマン（溶媒：生理食塩水）を皮下投与することによりけいれん重積発作を誘発した。けいれん誘発の 5 分又は 40 分後にミダゾラムマレイン酸塩 3 mg/kg（溶媒：生理食塩水）、ジアゼパム 3 mg/kg（溶媒：40%プロピレングリコール，10%エタノール，1.5%ベンジルアルコール，48.5%蒸留水）、ロラゼパム 3 mg/kg（溶媒：ジアゼパムと同じ）、ペントバルビタールナトリウム 30 mg/kg（溶媒：ジアゼパムと同じ溶媒）、フェニトインナトリウム 75 mg/kg（溶媒：ジアゼパムと同じ溶媒）、ラモトリギン 18 mg/kg（溶媒：50%プロピレングリコール，50%蒸留水）及びバルプロ酸 400 mg/kg，カルバマゼピン 30 mg/kg（溶媒：ポリエチレングリコール 200）を腹腔内に投与（n=6～13）した。脳波測定により、けいれん発作の発現/消失を 10 秒以上持続する律動性高振幅棘波と鋭波の発生/消失と定義した。ミダゾラムと他の抗てんかん薬のけいれん重積発作に対する作用を表 2.6.2.2.1-2 に示す。

表 2.6.2.2.1-2 ラットにおけるソマン誘発けいれん発現後 5 分及び 40 分における抗けいれん作用
(資料番号 4.2.1.1.1-2 [参考資料] の表 4 を改変)

薬物	用量 (mg/kg) (腹腔内投与)	けいれん消失動物数	
		けいれん誘発 5 分後	けいれん誘発 40 分後
対照 (生理食塩液)	-	0/11	0/6
ミダゾラム	3	9/11	1/7
ジアゼパム	3	8/9	0/6
ロラゼパム	3	5/6	1/5
ペントバルビタール	30	7/11	3/7
フェニトイン	75	0/13	0/6
ラモトリギン	18	0/6	0/7
バルプロ酸	400	2/13	0/6
カルバマゼピン	30	0/7	0/5

ミダゾラム、ジアゼパム及びロラゼパムはソマンけいれん誘発 5 分後に投与した場合には強力な抗けいれん作用（けいれん脳波の消失）を示したが、けいれん誘発 40 分後に投与した場合には有意な抑制作用は認められなかった。ペントバルビタールはけいれん誘発 5 及び 40 分後に投与した場合も抗けいれん作用を示したが、フェニトイン、ラモトリギン及びカルバマゼピンは投与時期に関係なく全く抗けいれん作用を示さなかった。

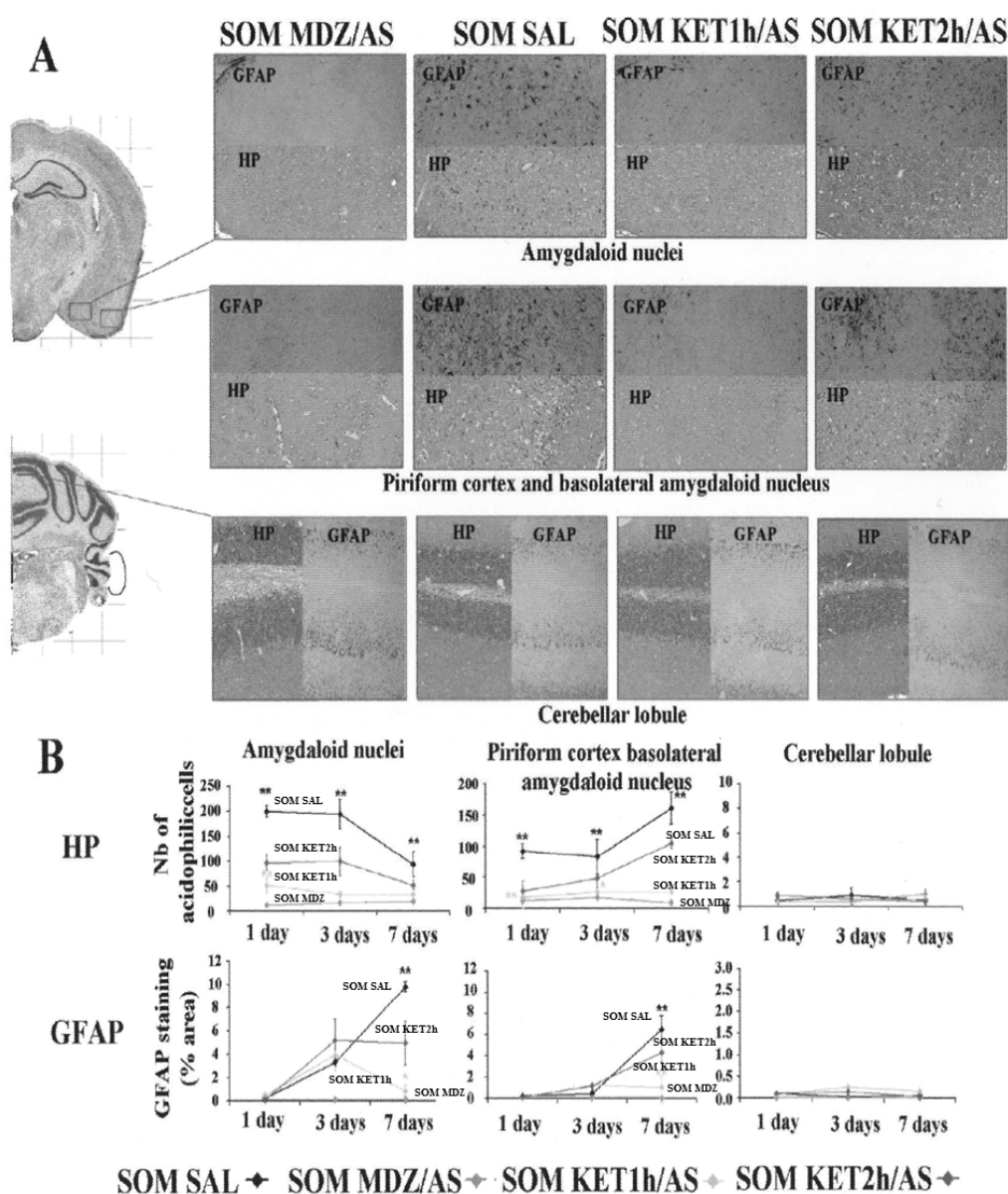
また、ソマン誘発けいれん重積により、数時間以内に細胞傷害性・血管原性脳浮腫を誘導し、神経性炎症が数日間続き、皮質、扁桃核、視床、海馬等に脳組織傷害（seizure-related brain damage : SRBD）がおこることが知られている。そこでミダゾラムのけいれん重積発作 SRBD に対する作用を検討するため、ソマン誘発による SRBD をケタミンと比較した。

Swiss 系雄性マウス（ 32.9 ± 2.0 g）に生理食塩水に溶解した 50 mg/kg の HI-6 と 4 mg/kg のメチルアトロピン硝酸塩を腹腔内投与し、5 分後に 172 μ g/kg のソマン（生理食塩水）を皮下投与することによりけいれん重積発作を誘発した。

処置群として、以下の 4 群（各 $n=21$ ）を置き、ソマン投与後 6 時間の症状観察を行った。

1. 対照群：ソマン投与 1, 2 及び 3 時間後に、生理食塩水 200 μ L を腹腔内投与した。
2. ミダゾラム・アトロピン投与群：ソマンけいれん誘発直後にミダゾラム（25 mg/kg）とアトロピン硫酸塩（10 mg/kg）を腹腔内投与した。
3. ケタミン（1h）・アトロピン投与群：ソマンけいれん誘発 1 時間後にケタミン（100 mg/kg）とアトロピン硫酸塩（10 mg/kg）を投与し、更に 2 及び 3 時間後にケタミン（50 mg/kg）とアトロピン硫酸塩（10 mg/kg）を腹腔内に追加投与した。
4. ケタミン（2h）・アトロピン投与群：ソマンけいれん誘発 2 時間後にケタミン（100 mg/kg）とアトロピン硫酸塩（10 mg/kg）を投与し、更に 3 及び 4 時間後にケタミン（50 mg/kg）とアトロピン硫酸塩（10 mg/kg）を腹腔内に追加投与した。

ソマン誘発による SRBD の経時変化を確認するために、ソマン投与後 24, 72 時間及び 7 日に屠殺し（各時点 $n=7$ ）、脳病理標本作製した。SRBD の指標として Hemalum-Phloxine（HP）染色と glial fibrillary acidic protein（GFAP）免疫染色を行い傷害細胞数（好酸球様細胞）と活性化アストロサイト陽性面積を計測した。ミダゾラム及びケタミン投与後 3 及び 7 日の傷害細胞（好酸球様細胞）と活性化アストロサイトの病理図及び経時的变化量を図 2.6.2.2.1-1 に示す。



A) ソマン/ミダゾラム/アトロピン投与 (SOM MDZ/AS), ソマン/生理食塩水投与 (SOM SAL), ソマン/ケタミン・1時間/アトロピン投与 (SOM KET1h/AS), ソマン/ケタミン・2時間/アトロピン投与 (SOM KET2h/AS) マウスにおける扁桃核 (Amygdaloid nuclei), 皮質 (Piriform cortex and basolateral amygdaloid nucleus) 及び小脳 (Cerebellar lobule) の Hemalum-Phloxine (HP) 染色及び glial fibrillary acidic protein (GFAP) 免疫染色像, B) ソマン/ミダゾラム/アトロピン投与 (SOM MDZ/AS), ソマン/生理食塩水投与 (SOM SAL), ソマン/ケタミン・1時間/アトロピン投与 (SOM KET1h/AS), ソマン/ケタミン・2時間/アトロピン投与 (SOM KET2h/AS) マウスにおける扁桃核 (Amygdaloid nuclei), 皮質 (Piriform cortex and basolateral amygdaloid nucleus) 及び小脳 (Cerebellar lobule) の傷害細胞数 (HP) 及び活性化アストロサイト (GFAP) の経時変化 (平均値±SE (N=7), *: 対照群に対して $p < 0.05$, **: 対照群に対して $p < 0.01$ (posthoc test))

図 2.6.2.2.1-1 ミダゾラムのソマン誘発けいれん重積発作による SRBD に対する作用
(資料番号 4.2.1.1.1-3 [参考資料] の図 2 を改変)

症状観察において、生理食塩水投与群及びケタミン投与群では、80%のマウスに3～8分間の強いけいれん発作が認められ、生理食塩水投与群において発作は4～8時間持続し、10分から6時間で25%のマウスが死亡した。ケタミン投与群においては投与後、けいれん発作は消失し鎮静が認められた。けいれん重積発症2時間後のケタミン投与群では、ケタミン投与後に再び発作を示す個体が認められ14%のマウスが死亡した。また、けいれん重積発症1時間後のケタミン投与群でも7%のマウスが死亡した。一方、ミダゾラム投与群ではけいれん発作は認められず、速やかに鎮静を誘導し、60%のマウスにわずかな線維束性収縮が認められた。

病理解析において生理食塩水投与群では、皮質及び扁桃核に多くの好酸球様細胞が投与後24 (92 ± 12 及び 200 ± 12)、72 (83 ± 17 及び 194 ± 29) 時間及び7 (161 ± 51 及び 94 ± 26) 日に認められた。扁桃核において活性化アストロサイトは72時間後及び7日後に認められ、皮質では7日後に認められた。しかし、小脳では傷害細胞と活性化アストロサイトは認められなかった。けいれん重積発症2時間後のケタミン投与群では、傷害細胞が30～45%、活性化アストロサイトが40%減少した。また、けいれん重積発症1時間後のケタミン投与群では傷害細胞が70～80%、活性化アストロサイトが70～80%減少した。一方、ミダゾラム投与群では傷害細胞と活性化アストロサイトは認められなかった。

(3) マウスペンチレンテトラゾール誘発けいれん重積発作に対する作用

(公表論文, 資料番号: 4.2.1.1.1-4 [参考資料])

高用量のペンチレンテトラゾール (PTZ) をマウスに投与すると, 間代性けいれんと意識消失を伴う強直性伸展けいれんを引き起こし, 死亡することが知られている (PTZ 誘発全般けいれんモデル). PTZ 投与前に, ヒダントイン系抗けいれん薬フェニトインを併用すると強直性伸展けいれんは抑制され死亡しないが, 90 分間の持続性間代けいれん (けいれん重積発作) が誘発される. そこでこの PTZ 及びフェニトインで誘発されるけいれん重積発作に対するミダゾラム及びジアゼパムの抗けいれん作用について検討を行った.

Swiss-Webster 系雄性マウス (20~25g) にアルカリ化生理食塩水に溶解したフェニトインナトリウム 50 mg/kg を腹腔内投与 (投与容量: 0.1 mL/体重 10g) し, その 2 時間後に PTZ 100 mg/kg を背部に皮下投与 (投与容量: 0.01 mL/体重 10g) してけいれん重積発作を誘発した. ミダゾラムとジアゼパムは, 臨床で使用されている注射剤を所定の濃度に希釈して使用した. ミダゾラムの希釈には生理食塩水を, ジアゼパムの希釈には 40% プロピレングリコール, 10% エタノール, 50% 生理食塩水の混液を用いた. 生理食塩水 (対照群), ミダゾラム及びジアゼパムはけいれん重積発作誘発後 18 秒以内に後肢に筋肉内投与 (投与容量: 0.01 mL/10g) した. 鎮静作用を示さず抗けいれん作用を特異的に示す用量として, ミダゾラムは 0.1 及び 0.2 mg/kg (投与量はフリー体に換算) を投与し, 同等の効力を示す用量としてジアゼパムは 0.2 及び 0.4 mg/kg (投与量はフリー体に換算) を用いた. ミダゾラムとジアゼパムのけいれん重積発作に対する作用を比較するため, けいれん重積発作が正常動物と変わらない程度に抑えられるまでの時間を測定し, けいれん発作が再発しないことを 1 時間の症状観察により確認した. ミダゾラム及びジアゼパムの, PTZ 及びフェニトインの併用で誘発されるけいれん重積発作に対する拮抗作用を表 2.6.2.2.1-3 に示す.

表 2.6.2.2.1-3 ミダゾラムのマウス PTZ 誘発けいれん重積モデルにおける拮抗作用

(資料番号 4.2.1.1.1-4 [参考資料] の表 2 を改変)

投与群	例数	間代性けいれん消失までの時間 (分) 注
対照 (saline 投与)	20	90.2±9.42
ミダゾラム 0.1 mg/kg	20	1.93±0.48*, #
0.2 mg/kg	24	1.43±0.19*, \$
ジアゼパム 0.2 mg/kg	18	7.77±2.11*
0.4 mg/kg	22	3.85±0.51*, #

注: 対照ではけいれんが自然消失するまでの時間を示す.

けいれん重積発作 (生理食塩水投与動物で少なくとも 1 時間持続する間代性けいれん) はフェニトイン Na 50 mg/kg (腹腔内投与) と PTZ 100 mg/kg (皮下投与) を併用して誘発した.

平均値±SE

*: 対照群に対して $p < 0.05$, #: ジアゼパム 0.2 mg/kg 群に対して $p < 0.05$, \$: ジアゼパム 0.4 mg/kg 群に対して $p < 0.05$ (いずれも ANOVA)

PTZ 投与後 4.51 ± 0.318 (平均値±SE) 分以内に間代性けいれんが誘発される. 対照群では 20 匹中, 7 匹のマウスが平均 21.4 分で死亡したが, 生き残った 13 匹のけいれん重積発作持続時間 (け

いれんが自然消失するまでの時間)は 34~150 分以上であり, 平均持続時間は 90.2 ± 9.42 (平均値 $\pm$ SE) 分であった. 同等の抗けいれん作用を示すために, ジアゼパムはミダゾラムの用量の 2 倍量が必要であった. ミダゾラム投与群では 0.1 及び 0.2 mg/kg で有意な抗けいれん重積作用が認められたが, 両群で間代性けいれん消失時間に有意な差はなかった. 一方, ジアゼパム投与群では 0.2 及び 0.4 mg/kg の両群で抗けいれん重積発作作用が認められた. 両群の間代性けいれん消失時間 (平均値 $\pm$ SE) はそれぞれ 7.77 ± 2.11 分及び 3.85 ± 0.51 分であり, 高用量群では低用量群に比べてより速く抗けいれん重積作用を示した. けいれん消失までの時間を比較するとミダゾラムはジアゼパムより有意に速かった.

(4) メルカプトプロピオン酸誘発けいれん重積発作及びフルロチル誘発けいれん重積発作に対する作用（公表論文，資料番号：4.2.1.1.1-5〔参考資料〕）

てんかん性異常放電の伝達経路はてんかんの種類により異なっており，部分てんかんの場合は扁桃核に限定されるが，全身てんかんの場合には，黒質緻密部，視床及び皮質を含む辺縁系にも伝達され，てんかん重積時のグルコース代謝は黒質緻密部が最も高いことが知られている．そこでγ-アミノ酪酸（GABA）合成阻害薬であるメルカプトプロピオン酸（MPA）又はナトリウムチャンネルオープナーであるフルロチル（FUL）を用いて，二つのけいれん重積モデルにおけるミダゾラム及び麻酔薬の黒質緻密部傷害に対する保護作用を検討した．

Long-Evans 系雄性ラット（250～400g）を4%ハロタン（O₂ガス中に混入）で麻酔し，0.6 mg d-ツボクラリンで不動化した．気管支カテーテルを人工呼吸機に繋ぎ，1%ハロタン（N₂O：O₂ [70：30] 混合ガス中に混入）で麻酔を維持しながら外頸静脈と尾動脈にカテーテルを挿入し，頭頂骨部に脳波用双極電極を装着した．試験開始1時間前からハロタンをN₂O：O₂ ([70：30] 混合ガス)に換え，0.2～0.4 mg のベクロニウムを適宜静脈内投与して麻酔と不動化を維持した．

MPA 誘発けいれん重積モデルでは，0.475 mmol/kg の MPA を静脈内持続注入した後，0.05 mg のフェノキシベンザミン塩酸塩を静脈内投与した．脳波により最初のけいれん症状確認後 N₂O：O₂ を O₂ に置換し，けいれん重積状態を30分間持続させた．

ラットを5群に分け，ミダゾラム又は麻酔薬を投与した．ミダゾラムと麻酔薬の投与量，投与方法及び投与後の吸入麻酔処置を表2.6.2.2.1-4に示す．ミダゾラム又は麻酔薬の投与4時間後にカテーテルを抜き，3日間の回復期間後脳病理標本を作製し，光学顕微鏡下で評価した．

表 2.6.2.2.1-4 MPA 誘発けいれん重積モデルの群構成
（資料番号 4.2.1.1.1-5〔参考資料〕の図1を引用）

投与群（例数）	静脈内投与（ボラス）	静脈内持続投与（2～3時間）	投与後の吸入麻酔処置
コントロール（4）	チオペンタール（15mg/kg）	生理食塩水	N ₂ O：O ₂ （50：50）
ミダゾラム（5）	ミダゾラム（25 mg/kg）	ミダゾラム（9.7 mg/kg/h）	なし（O ₂ 吸入）
チオペンタール（4）	チオペンタール（27 mg/kg）	チオペンタール（20.9 mg/kg/h）	なし（O ₂ 吸入）
ケタミン（4）	ケタミン（30 mg/kg）	ケタミン（9.12 mg/kg/h）	なし（O ₂ 吸入）
イソフルラン*（4）	イソフルラン（4%）（1分間，吸入麻酔）	イソフルラン（1～2%）（2時間吸入麻酔）	N ₂ O：O ₂ （50：50）

*：平均血圧が60 mmHgより高くなるように維持した．

FUL 誘発けいれん重積モデルでは、けいれん時の急速な動脈圧上昇を防ぐために 0.05～0.2 mg のフェントラミンを静脈内投与した後、5%FUL を 1 分間吸入させ、その後 3%FUL を 44 分間吸入させた。脳波により最初のけいれん症状確認後、N₂O を O₂ に置換し、けいれん重積状態が 45 分間持続するようにした。

ラットを 3 群に分け、コントロール群とミダゾラム処置群を置いた。ミダゾラムの投与量、投与方法及び投与後の吸入麻酔処置を表 2.6.2.2.1-5 に示す。試験終了後に脳病理標本を作製し、光学顕微鏡で評価した。

表 2.6.2.2.1-5 FUL 誘発けいれん重積モデルの群構成

投与群（例数）	静脈内投与（ボラス）	静脈内持続投与	投与後の吸入麻酔処置
コントロール（16）	チオペンタール （15 mg/kg）	生理食塩水	N ₂ O : O ₂ （70 : 30）
ミダゾラム（4）	ミダゾラム （25 mg/kg）	ミダゾラム （9.7 mg/kg/h, 2h）	N ₂ O : O ₂ （50 : 50）
ミダゾラム（10）	ミダゾラム （25 mg/kg）	ミダゾラム （9.7 mg/kg/h, 2h）	N ₂ : O ₂ （70 : 30）

脳病理標本はヘマトキシリン-エオジン染色を行い、光学顕微鏡により病理評価を行った。MPA 誘発けいれん重積モデルの病理評価は、新皮質、海馬、淡蒼球、視床下部、視床及び黒質緻密部の好酸性に染色された神経細胞（EN）をスコア化することにより評価した（0：no EN, 1：1～5% EN, 2：6～25% EN, 3：26～50% EN, 4：51～75% EN, 5：76～100% EN）。FUL 誘発けいれん重積モデルの病理評価は、黒質緻密部についてのみ同様に評価した。

MPA 誘発けいれん重積モデル及び FUL 誘発けいれん重積モデルの試験手順の詳細を図 2.6.2.2.1-2 に、MPA 誘発けいれん重積モデルの EEG におけるミダゾラム及び麻酔薬の作用を図 2.6.2.2.1-3 に、MPA 誘発けいれん重積モデル及び FUL 誘発けいれん重積モデルの病理解析を表 2.6.2.2.1-6 に示す。

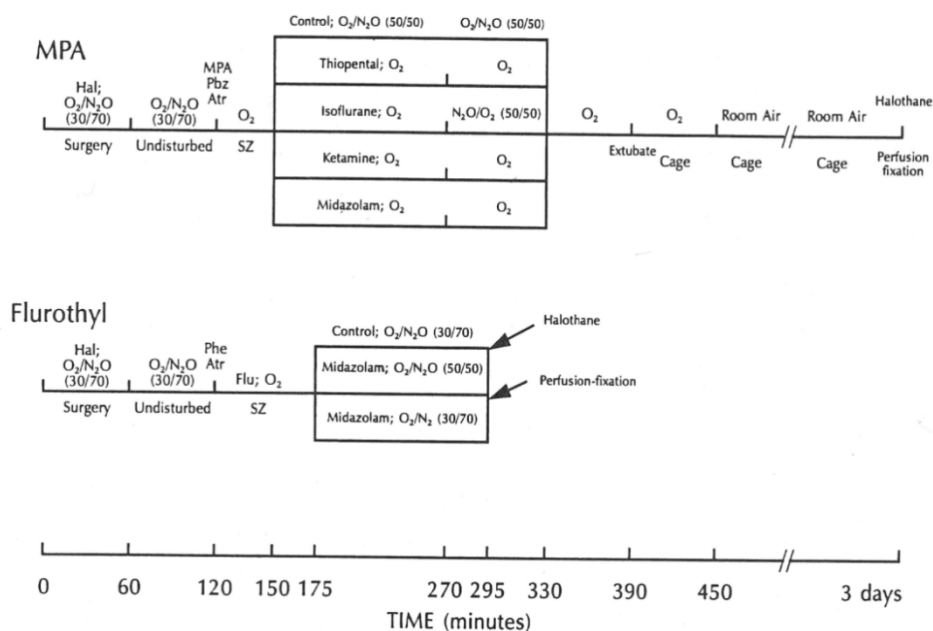
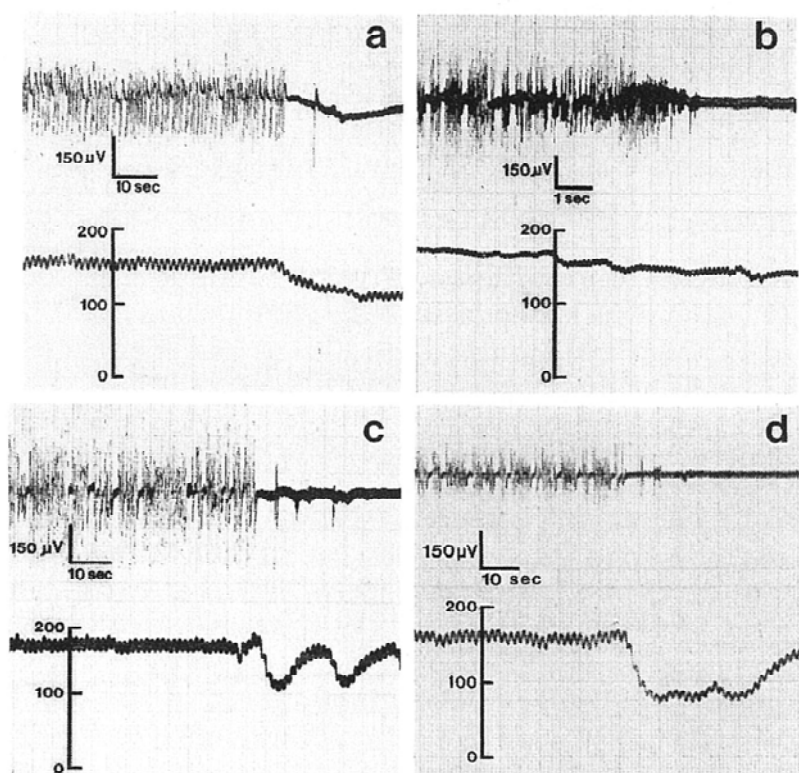


図 2.6.2.2.1-2 MPA 誘発及び FLU 誘発けいれん重積モデルの試験手順
(資料番号 4.2.1.1.1-5 [参考資料] の図 1 を引用)



a: イソフルラン, b: チオペンタール, c: ケタミン, d: ミダゾラム

図 2.6.2.2.1-3 MPA 誘発けいれん重積モデルにおける脳波 (a~d 各図の上部) と
血圧 (同下部) に対するミダゾラム及び麻酔薬の作用
(資料番号 4.2.1.1.1-5 [参考資料] の図 2 を引用)

MPA 誘発けいれん重積モデルの場合は 30 分間, FUL 誘発けいれん重積モデルの場合 45 分間けいれんが持続し, ミダゾラム又は麻酔薬を投与すると投与直後にけいれん脳波は消失した.

表 2.6.2.2.1-6 MPA 誘発及び FUL 誘発けいれん重積モデルにおける病理評価

(資料番号 4.2.1.1.1-5 [参考資料] の表 2 を引用)

けいれん 重積モデル	投与群 (例数)	面積 (mm ²)	黒質緻密部の EN 評価スコア					
			0	1	2	3	4	5
MPA	コントロール (4)	0.86±0.14						4
	ミダゾラム (5)	0.38±0.16	2	1				2
	チオペンタール (4)	0.56±0.20	1					3
	イソフルラン (4)	0.90±0.15						4
	ケタミン (4)	0.62±0.24	1	1				2
FUL	コントロール (16)	0.42±0.06	2			5	9	
	ミダゾラム (14)	0.23±0.07	5	2	1	2	4	

MPA 誘発けいれん重積モデルにおける新皮質、海馬、淡蒼球、視床下部及び視床において、EN のスコアはいずれの投与群でも 0～1 であり差は認められなかったが、黒質緻密部の EN 評価スコアはコントロール群のすべてのラットにおいて 5 を示し、ミダゾラム投与により EN 評価スコア及び EN 面積は低下した。

FUL 誘発けいれん重積モデルの場合、ミダゾラム投与により黒質緻密部の EN 面積と EN 評価スコアは有意に低下した。

2) 急性けいれんモデル

(1) 最大電撃けいれんに対する作用

(公表論文、資料番号：4.2.1.1.1-6 [参考資料] ～-8 [参考資料])

a) マウスにおける試験

生体に角膜や耳介電極を介して電気刺激を行うと、脱分極が高頻度に反復して繰り返され、多数の神経細胞が同期化した活動電位を誘発し、さらにシナプスを介して大脳皮質全般に広がった後、けいれんが誘発される。

ミダゾラム及びジアゼパムのマウス最大電撃けいれん(以下、MES: maximum electroshock seizure)に及ぼす作用を経口投与により検討した。雌性マウス(19～21g)に耳介電極により 50Hz, 10 mA, 0.2 秒間の電気刺激により MES を誘発した。本試験前日に一度 MES を経験させ、マウスの予備選抜を行った。ミダゾラムは蒸留水に溶かし、ジアゼパムは 5%アラビアゴム水溶液に懸濁し、25 mL/kg の投与容量で MES の 10 分前又は 30 分前に経口投与した。試験には各群 10 匹のマウスを用いて、各群の強直性けいれん発現抑制率からプロビット分析により、抗 MES 作用の ED₅₀ 値と 95%信頼区間を算出した。ミダゾラム及びジアゼパムの作用を表 2.6.2.2.1-7 に示す。

表 2.6.2.2.1-7 マウスにおけるミダゾラムの抗 MES 作用

(資料番号 4.2.1.1.1-6 [参考資料] の表 6 を改変)

薬物	前投与時間 (分)	ED ₅₀ 値 (95%信頼区間) [mg/kg, 経口投与]
ミダゾラム	10	14.8 (12.5～17.4)
	30	27.8 (20.6～38.0)
ジアゼパム	10	27.6 (23.4～32.7)
	30	12.3 (9.9～15.3)

抗けいれん作用の指標は、強直性けいれん発現の有無とした。

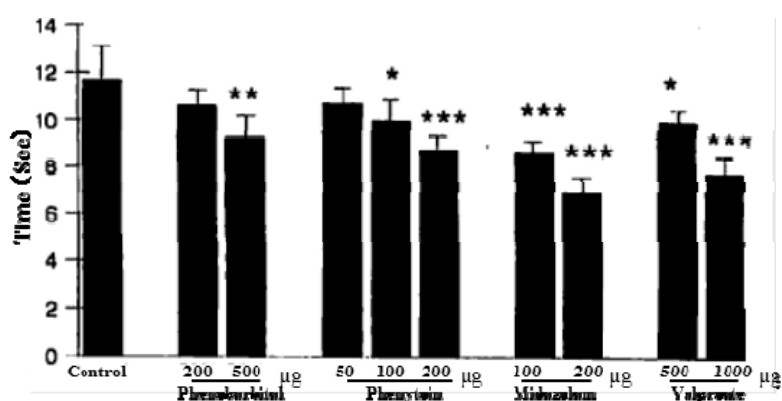
ミダゾラム及びジアゼパムの抗 MES 作用を比較すると、前投与 10 分では、ミダゾラムの作用がジアゼパムの約 2 倍強力であったが、前投与 30 分では逆にジアゼパムの効力が強かった。ミダゾラムは短時間に効果が発現すると推察された。

b) ラットにおける試験

1) 脳室内投与試験

ラットを用いて、ミダゾラムと他の抗てんかん薬（フェノバルビタール、フェニトイン、バルプロ酸）の脳室内投与による抗 MES 作用を比較検討した。

試験には Wistar 系雄性ラット（試験開始時体重 240～270 g）を用い、右側脳室内にカニューレ留置手術実施後 3 日間の回復期間を置き、その間に神経症状が認められない個体を試験に使用した。被験薬としてミダゾラム (100 及び 200 µg)、フェノバルビタールナトリウム (200 及び 500 µg)、フェニトイン (50, 100 及び 200 µg)、バルプロ酸ナトリウム (500 及び 1000 µg) を用い、ミダゾラムの溶媒が 0.1% ベンジルアルコールを含む生理食塩水である以外は生理食塩水を溶媒として使用した。薬物（対照は生理食塩水、各群 8～10 例）投与 30 分後に、ラットに耳介電極により、50 Hz, 70mA, パルス幅 0.2ms, 1 秒間の電気刺激を与え MES を誘発した。ラットの MES では強直性けいれんに続き間代性けいれんが起り、発作後抑制状態を経て回復するが、抗けいれん作用の指標として強直性けいれんの持続時間（秒）を測定した。ミダゾラム及び他の抗てんかん薬の作用を図 2.6.2.2.1-4 に示す。



平均値±SD

* : 対照群に対して $p < 0.05$, ** : 対照群に対して $p < 0.01$,

*** : 対照群に対して $p < 0.001$ (Mann-Whitney test)

図 2.6.2.2.1-4 ラットにおけるミダゾラムの抗 MES 作用（脳室内投与）

（資料番号 4.2.1.1.1-7 [参考資料] の図 1 を改変）

対照群の強直性けいれん持続時間は、 11.7 ± 1.4 秒であり、ミダゾラムを含む薬物投与群では、神経毒性発現用量より低い用量で強直性けいれん持続時間を短縮させた。ミダゾラムは 100 µg 又は 200 µg の脳室内投与で強直性けいれん持続時間をそれぞれ、 8.7 ± 0.4 秒及び 6.9 ± 0.7 秒に短縮させ、有意な抗けいれん作用を示した。

II) 髄腔内投与試験

ラットを用いて、ミダゾラムの髄腔内投与による抗 MES 作用を検討した。

試験には Wistar 系雄性ラット（試験開始時体重 180～200g）を用い、あらかじめ MES の予備試験を行い、正常な個体を選別した。ラットに髄腔内投与のためポリエチレン製カテーテルを胸椎 Th1 部位に 1.5cm 挿入後、傍脊椎筋に固定し、カテーテルの先端は皮下を通して頭頂骨の上部に出した。カテーテル留置手術後 3 日間の回復期間を置き、その間に神経症状が認められない個体を試験に使用した。MES は耳介電極により、100 Hz、50 mA、パルス幅 0.2 ms、1 秒間の電気刺激を与えて誘発した。ミダゾラムの用量は 50、125、及び 250 μg の 3 用量（投与容量 20 μL ）とし、試験直前に 0.1%ベンジルアルコールを含む生理食塩水で調製して、MES 誘発 30 分前に投与した。強直性けいれん及び間代性けいれん発現の有無と発現した場合にはその時間を記録した。抗けいれん作用の指標として強直性けいれん抑制率を算出した。髄腔内投与によるミダゾラムの抗 MES 作用を表 2.6.2.2.1-8 に示す。

表 2.6.2.2.1-8 ラットにおけるミダゾラムの抗 MES 作用（髄腔内投与）

（資料番号 4.2.1.1.1-8 [参考資料] の表 3）

投与群	例数	強直性けいれんが発現しなかった動物	
		例数	抑制率 (%)
対照 (saline 投与)	24	0	0
ミダゾラム 50 μg	8	4	50
ミダゾラム 125 μg	6	2	33
ミダゾラム 250 μg	10	7	70**

**：対照群に対して $p < 0.01$ (χ^2 検定)

対照群の強直性けいれん持続時間は 8.4 ± 1.7 秒、間代性けいれん持続時間は 20.8 ± 2.6 秒であり、すべての個体で発作後の抑制状態が認められた。ミダゾラムは 250 μg の髄腔内投与で有意な拮抗作用を示したが、投与後 15～30 分間の咀嚼行動を伴う突然の筋緊張低下が認められた。

(2) ペンチレンテトラゾール誘発けいれんに対する作用

(公表論文, 資料番号: 4.2.1.1.1-6 [参考資料])

a) マウスにおける試験

1) 静脈内投与試験

GABA が GABA_A 受容体と結合すると, Cl⁻透過性の増加, 脱分極の抑制, 伝達物質放出抑制後, シナプス前抑制をもたらす. PTZ は GABA_A 受容体のピクロトキシン結合部位に結合して, Cl⁻チャネルを遮断する. その結果, GABA の抑制機構を遮断して興奮作用をもたらす, けいれんを誘発する.

雄性マウス (17~25 g) を用い, ミダゾラムマレイン酸塩, ジアゼパム, クロルジアゼポキシド及びクロラゼペートの静脈内投与による抗 PTZ けいれん作用について検討した. 薬物調製は, ジアゼパムの場合に, ジアゼパム: 5 mg, プロピレングリコール: 0.4 mL, エチルアルコール: 0.1 mL, 安息香酸ナトリウム: 48.8 mg, 安息香酸: 1.2 mg 及びベンジルアルコール: 0.015 mL に精製水を加え 1 mL にした 5 mg/mL の原液を精製水で希釈して調製した以外, 他の薬物は精製水で調製した. 被験薬は PTZ けいれん誘発前 1, 15 分又は 60 分前に静脈内投与した. PTZ けいれんは 70 mg/kg を静脈内投与して誘発し, 間代性けいれんの発現の有無を抗けいれん作用の指標とし, 各前投与時間における ED₅₀ 値を求め, 抗けいれん作用の経時変化を調べた.

静脈内投与によるミダゾラム及び他の抗てんかん薬の抗 PTZ けいれん作用の経時変化を図 2.6.2.2.1-5 に示す.

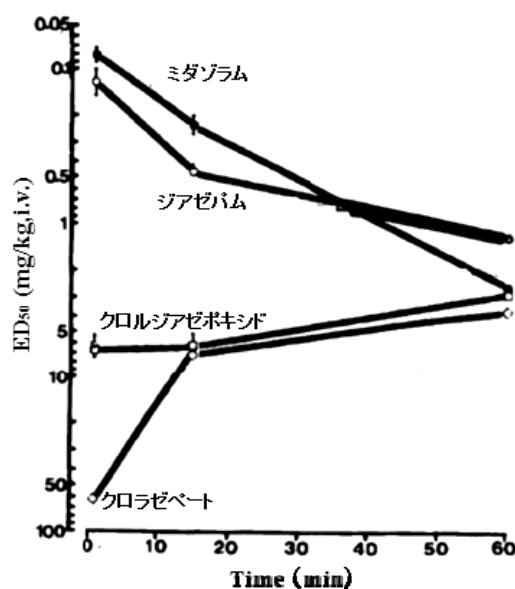


図 2.6.2.2.1-5 静脈内投与によるミダゾラム (マレイン酸塩) の抗 PTZ けいれん作用

(資料番号 4.2.1.1.1-6 [参考資料] の図 8 を改変)

ミダゾラムとジアゼパムは静脈内投与後 1 分で抗 PTZ けいれん作用が最大となり、その後は時間の経過と共に効果が減弱した。一方、クロルジアゼポキシドとクロラゼペートは時間の経過と共に抗けいれん作用が増強した。ミダゾラムとジアゼパムは効果発現が速く、クロルジアゼポキシドとクロラゼペートは効果発現までに時間を要することが推察された。

次に閾値法により、ミダゾラム及びジアゼパム静脈内投与による抗 PTZ けいれん作用の持続時間について検討を行った。

雌性マウス（19～21g）を用い、尾静脈から 0.5% PTZ 生理食塩水溶液を 0.375 mL/min の速度で静脈内持続投与することにより、強直性伸展けいれんを誘発し、その発現時間から PTZ けいれん発現の閾値量を算出した。ミダゾラム（1 mg/kg）又はジアゼパム（3 mg/kg）は、PTZ 投与直前及び PTZ 投与 15, 30, 60, 120 及び 240 分前に尾静脈内持続投与（投与速度 0.5 mL/マウス/30 秒）した（各群 n=6）。抗けいれん作用は基準閾値（20 匹の対照マウスが強直性けいれんを発現するまでの PTZ の用量）に対する比として平均値及び 95%信頼区間を算出した。

マウス PTZ けいれん閾値法におけるミダゾラム及びジアゼパム効力の経時変化を図 2.6.2.2.1-6 に示す。

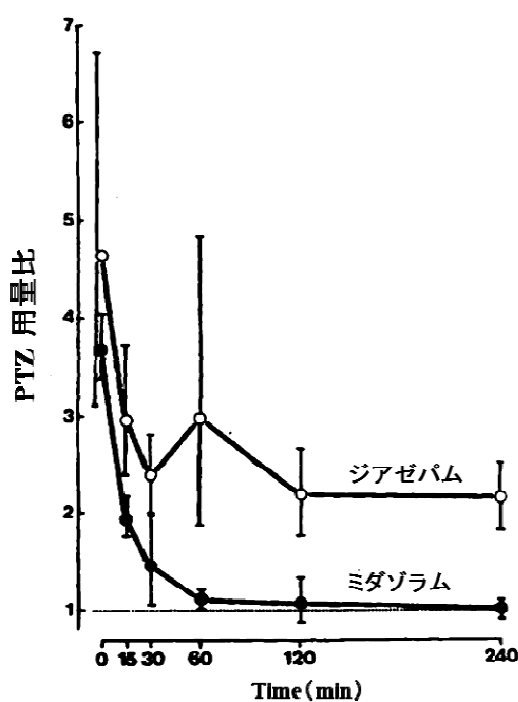


図 2.6.2.2.1-6 マウス PTZ けいれん閾値法におけるミダゾラム及びジアゼパム効力の経時変化
(資料番号 4.2.1.1.1-6 [参考資料] の図 9 を一部改変)

PTZ けいれん誘発直前にミダゾラム (1 mg/kg) を静脈内投与すると、けいれん閾値が基準閾値の約 3.8 倍に引き上げられたが、けいれん閾値の上昇作用は前処置時間 15, 30 分と著明に減弱し、前処置時間 60 分では基準閾値とほぼ同じになった。一方、ジアゼパム (3 mg/kg, 静脈内投与) は PTZ けいれん誘発直前の投与でけいれん閾値を基準閾値の約 4.5 倍に引き上げた。閾値上昇作用は前処置時間 15 分では基準閾値の約 3 倍と急速に減弱したが、前処置時間 30, 60, 120, 240 分では基準閾値の 2~3 倍を維持し、抗 PTZ けいれん作用の持続することが推察された。

II) 経口投与試験

雌性マウス (19~21g) を用い、経口投与によるミダゾラム及びジアゼパムの抗 PTZ けいれん作用について検討した。ミダゾラムは蒸留水に溶かし、ジアゼパムは 5%アラビアゴム水溶液に懸濁し、25 mL/kg の投与容量で PTZ 投与前 10 分又は 30 分前に経口投与した。PTZ けいれんは 120 mg/kg (すべての対照動物で強直性けいれんが誘発され、死亡する用量) を腹腔内投与することにより誘発した。試験には各群 10 匹のマウスを用い、PTZ 投与後 30 分間、強直性けいれん発現の有無について観察し、それぞれの前処置時間における強直性けいれん発現抑制率から、プロビット法により、それぞれ ED₅₀ 値と 95%信頼区間を算出した。マウス PTZ けいれんにおけるミダゾラム及びジアゼパムの作用を表 2.6.2.2.1-9 に示す。

表 2.6.2.2.1-9 マウスにおけるミダゾラムの抗 PTZ けいれん作用
(資料番号 4.2.1.1.1-6 [参考資料] の表 6 を改変)

薬物	前処置時間 (分)	ED ₅₀ 値 (95%信頼区間) [mg/kg, 経口投与]
ミダゾラム	10	1.8 (1.5~2.2)
	30	3.8 (3.2~4.6)
ジアゼパム	10	1.6 (1.2~1.9)
	30	1.6 (1.2~1.9)

抗けいれん作用の指標は、強直性けいれん発現の有無とした。

対照群ではすべてのマウスで強直性けいれんが認められ、死亡率は 100%であった。ミダゾラムは前投与時間 30 分に比べ、前投与時間 10 分の方が、抗けいれん作用は約 2 倍強力であった。

次に、PTZ けいれんに対するミダゾラム又はジアゼパム効力の経時変化について検討した。

雌性マウス (19~21 g) にミダゾラム又はジアゼパムを、2~24 時間の前処置時間で経口投与した後、PTZ 120 mg/kg を腹腔内投与し、30 分間強直性けいれんの発現について観察した。強直性けいれん発現抑制率からプロビット法により ED_{50} 値を算出し、抗けいれん作用の指標とした。

ミダゾラム及びジアゼパムの経口投与による抗 PTZ けいれん作用の経時変化を図 2.6.2.2.1-7 に示す。

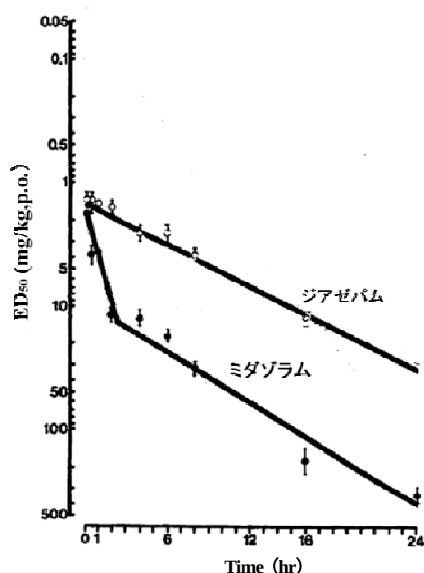


図 2.6.2.2.1-7 ミダゾラム及びジアゼパムの経口投与による抗 PTZ けいれん作用の経時変化
(資料番号 4.2.1.1.1-6 [参考資料] の図 7 を改変)

経口投与によるミダゾラムの抗 PTZ けいれん作用の経時変化は 2 相性を示し、前処置時間 2 時間まで効力は急速に減弱し、その後前処置時間 24 時間まで相対的に緩やかな効力の減弱を示した。一方、ジアゼパムは前処置時間にかかわらず、一定の傾きの効力減弱パターンを示した。

(3) 幼若ラットにおけるペンチレンテトラゾール誘発けいれんに及ぼす作用

(公表論文, 資料番号: 4.2.1.1.1-9 [参考資料])

ラットは他の種とは異なり, KCC2 トランスポーター (K^+-Cl^- co-transporter 2) の発現が遅れるため生後 10~14 日までの神経細胞内 Cl^- イオン濃度は高値を示し, 定常状態では GABA 誘発電流は外向き電流を示す (GABA_A 受容体の脱分極作用) が, 生後 10~14 日においてけいれん発作時の興奮性電流に対する GABA_A 受容体のシャンティング効果 (Cl^- イオン透過性の増加により静止膜電位から離れる電位変化を減弱させる効果) を示すかは不明である. ラット PTZ けいれんは, PTZ の用量の増加に伴い, まず最小けいれん (minimal seizure, 以下 mMS) が誘発され, 次第に全身けいれん (major seizure, 以下 MMS) を発現する動物が増加するが, 成獣に PTZ 90~100 mg/kg を腹腔内投与するとほとんどの動物で直ぐに MMS が誘発され, mMS がマスクされる. そこで幼若ラットにおけるミダゾラムの抗 PTZ けいれん作用について, ①けいれん重症度スコアに対する作用, ②mMS 又は MMS の発現率に対する作用を比較することにより, シャンティング効果と GABA_A 受容体の脱分極作用に対する影響を検討した.

a) けいれん重症度スコアに対する作用

生後 7, 12, 18, 25 及び 90 日齢の Wistar 系ラット (雌雄, 各群 n=8) にミダゾラム 0.025, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5 及び 1 mg/kg を腹腔内投与し, その直後に PTZ 100 mg/kg (18 日齢の場合は 90 mg/kg) を皮下投与して 30 分間の症状観察を行い, 以下の基準に従い各ラットのけいれん重症度についてスコア付けを行った.

- | |
|------------------------------------|
| 0: 変化なし |
| 0.5: 異常行動 (落ち着きのなさ, 振戦など) |
| 1: ミオクローヌス性単収縮 |
| 2: 体の一部分に認められる最小けいれん |
| 3: 主として頭部や前肢の間代性最小けいれんで正向反射は保たれている |
| 4: 非強直性全身けいれん |
| 5: 強直間代性全身けいれん |

幼若ラット PTZ けいれんにおける日齢別の重症度スコアに対するミダゾラムの作用を図 2.6.2.2.1-8 に示す.

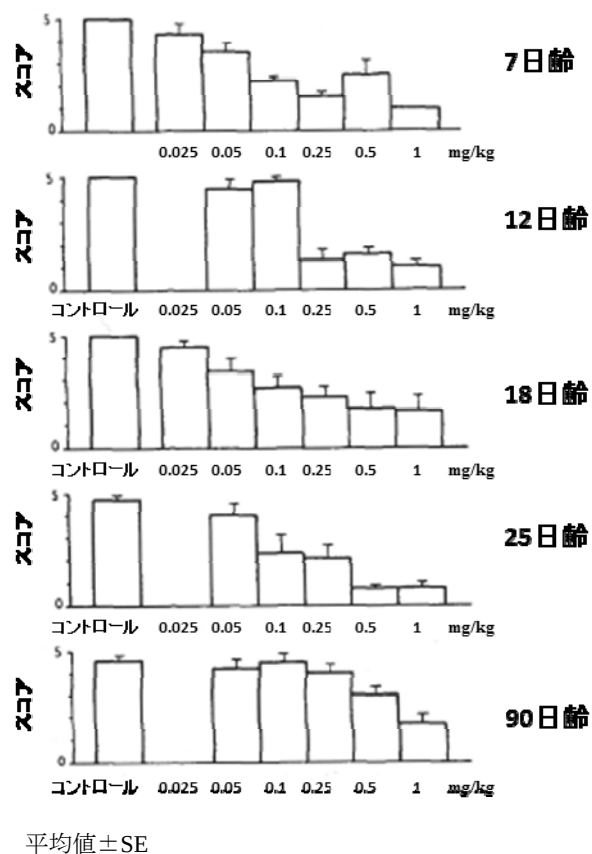


図 2.6.2.2.1-8 幼若ラットにおけるミダゾラムの PTZ けいれん重症度スコアに対する作用
(資料番号 4.2.1.1.1-9 [参考資料] の図 3)

ミダゾラムは生後 7 及び 18 日齢ラットでは、0.05 mg/kg 以上で、12 日齢では 0.25 mg/kg 以上で、25 日齢では 0.1 mg/kg 以上で、90 日齢では 0.5 mg/kg 以上で、けいれん重症度スコア抑制作用を示した。

b) mMS 又は MMS の発現率に対する作用

試験方法は a) と同様であり, 30 分間の症状観察期間に mMS 及び MMS の発現について観察し, 発現率について検討した. 幼若ラット PTZ けいれんにおける日齢別の mMS 及び MMS の発現率に対するミダゾラムの作用を図 2.6.2.2.1-9 に示す.

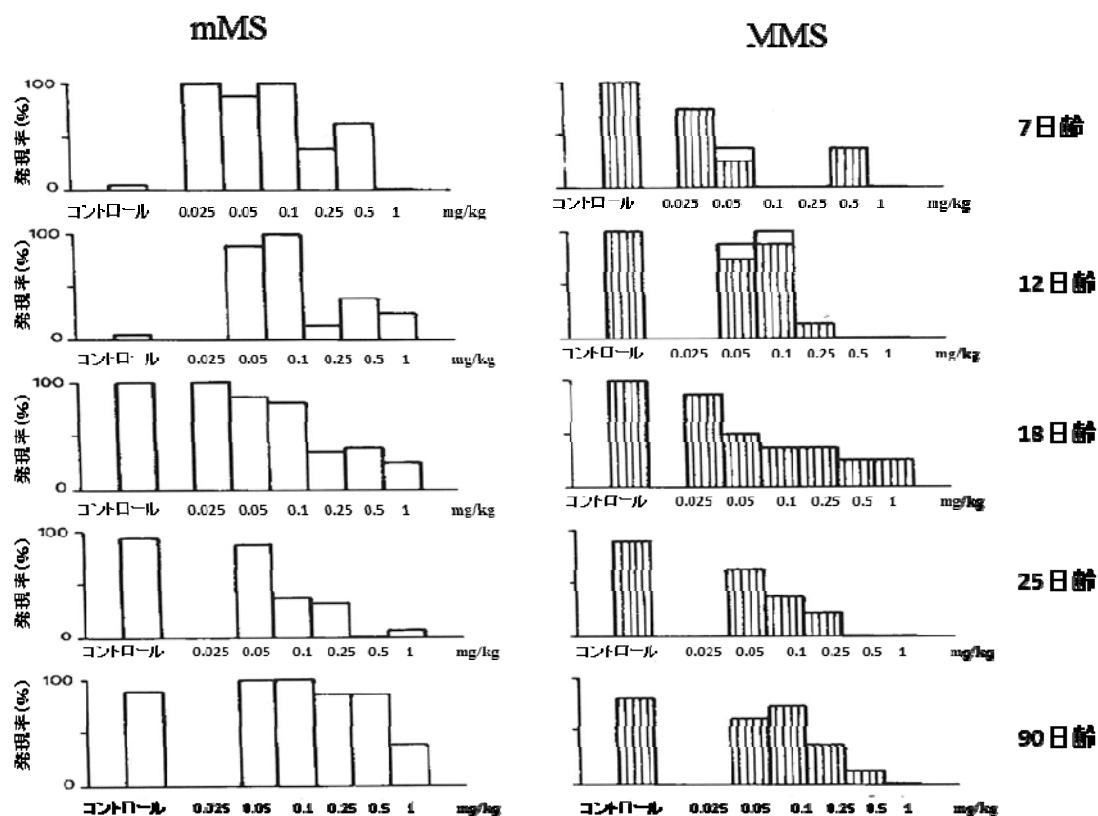


図 2.6.2.2.1-9 幼若ラットの PTZ けいれんにおけるミダゾラムの mMS
及び MMS 発現率に対する作用
(資料番号 4.2.1.1.1-9 [参考資料] の図 1)

18 日齢では 0.25 mg/kg 以上で, 25 日齢では 0.1 mg/kg 以上で, 90 日齢では 1 mg/kg でそれぞれ mMS 発現を抑制した. 一方, 7 及び 12 日齢の対照では mMS の発現が認められないが, ミダゾラムの投与により mMS の発現率は増加した.

7 及び 18 日齢では 0.05 mg/kg 以上で, 12 日齢では 0.25 mg/kg 以上で, 25 日齢では 0.1 mg/kg 以上で, 90 日齢では 0.5 mg/kg 以上の用量でそれぞれ MMS 発現を抑制した.

GABA_A 受容体の脱分極作用を示す 10~14 日齢ラットの PTZ けいれんにおいてミダゾラムは, けいれん重症度スコア抑制作用を示したことから, 幼若ラットの GABA_A 受容体においてもシャンティング効果があることが示された. 一方, 7 及び 12 日齢ラットにおいて mMS の発現が認められたことから GABA_A 受容体の脱分極作用が mMS を誘発することが示唆された.

(4) 3-メルカプトプロピオン酸誘発けいれんに対する作用

(公表論文, 資料番号: 4.2.1.1.1-6 [参考資料])

3-メルカプトプロピオン酸 (3-MPA) は, GABA 合成酵素 GAD を阻害し GABA 量を減少させるため, GABA の抑制機構が減弱し, けいれん誘発作用を示す.

マウス 3-MPA 誘発けいれんに及ぼすミダゾラム及びジアゼパムの作用を経口投与により検討した.

試験には雌性マウス (19~21g) を各群 10 匹ずつ用いた. ミダゾラムは蒸留水に溶かし, ジアゼパムは 5%アラビアゴム水溶液に懸濁して, 25 mL/kg の容量で 3-MPA 投与前 10 分又は 30 分に経口投与した. 3-MPA は蒸留水で 0.16 (v/v)% に調製し, 0.5mL/マウスの容量で腹腔内投与 (48.8 mg/kg に相当) してけいれんを誘発した. 3-MPA 投与後 30 分間の症状観察を行い, 強直性けいれん発現の有無を抗けいれん作用の指標とした. 前処置時間 10 分及び 30 分における強直性けいれん発現抑制率から, プロビット法によりそれぞれの時点における ED₅₀ 値と 95%信頼区間を算出した.

マウス 3-MPA 誘発けいれんに対するミダゾラム及びジアゼパムの作用を表 2.6.2.2.1-10 に示す.

表 2.6.2.2.1-10 マウスにおけるミダゾラムの抗 3-MPA けいれん作用

(資料番号 4.2.1.1.1-6 [参考資料] の表 6 を改変)

薬物	前処置時間 (分)	ED ₅₀ 値 (95%信頼区間) [mg/kg, 経口投与]
ミダゾラム	10	1.3 (1.0~1.6)
	30	2.2 (1.7~2.7)
ジアゼパム	10	1.8 (1.4~2.2)
	30	1.4 (1.1~1.9)

対照群では, 3-MPA 投与によりすべてのマウスに強直性伸展けいれんが認められたが, 死亡率は 70~80%であった. ミダゾラムの抗 3-MPA 誘発けいれん作用は前処置時間 10 分の方が, 前処置時間 30 分より強力であり, ジアゼパムと同等の効力を示した. ミダゾラムは短時間に効果が発現すると推察された.

(5) ストリキニーネ誘発けいれんに対する作用

(公表論文, 資料番号 : 4.2.1.1.1-10 [参考資料])

脊髄、脳幹及び視床ではグリシン作動性介在ニューロンを介した抑制機構があり、グリシンはグリシン受容体に結合後、Cl⁻の透過性を高めて過分極させ、運動ニューロンを抑制する（シナプス後抑制）。ストリキニーネ（以下、STR）は運動ニューロンのグリシン受容体に結合してシナプス後抑制を遮断し、また脊髄反射の興奮性を亢進させるため、わずかな知覚刺激により反射性の筋収縮・強直性けいれんが誘発される。

Wistar 系雄性ラット（200～290 g）を 1 群につき 7～11 匹用いて、ミダゾラム、フェニトイン及びフェノバルビタールの抗 STR けいれん作用について検討した。薬物はいずれも市販の製剤・試薬を希釈して調製した。ミダゾラムは [REDACTED] (0.5%水溶液) を精製水で希釈した。フェニトインは [REDACTED] (5%溶液) をエタノール/プロピレングリコール/水 (2:5:3) で希釈した。フェノバルビタール（ナトリウム塩。以下、用量はナトリウム塩として表示）は試薬を精製水で溶解・希釈して調製した。被験薬の前処置時間は、ミダゾラムを STR 投与直前とした以外、STR 投与 60 分前とし、いずれも 1 mL/kg の容量で腹腔内投与した（用量は表 2.6.2.2.1-11 参照）。なお対照群には、フェニトインの薬物調製に用いた溶媒を投与した対照群と薬物投与を行わない対照群の、2 つの対照群を置いた。STR は [REDACTED] (0.1%溶液) を希釈して調製し、3 mg/kg を皮下投与してけいれんを誘発した。STR 投与後 30 分間の症状観察を行い、強直間代性けいれん (Major Seizure : MS)、強直性けいれん (Tonic Convulsion : TC) 及び死亡 (Exits : EX) の発現例数と発現潜時 (MS は発現例数のみ) を抗けいれん作用の指標とした。

ミダゾラム、フェニトイン及びフェノバルビタールのラット抗 STR けいれん作用の結果を表 2.6.2.2.1-11 に示す。

表 2.6.2.2.1-11 ラットにおけるミダゾラムの抗 STR けいれん作用

(資料番号 4.2.1.1.1-10 [参考資料] の表 2 を改変)

投与群	発現例数			発現潜時及び死亡時間 (平均値±SE, 秒)	
	MS	TC	EX	MS	EX
対照 (薬物投与なし) ※ ¹	10/10	10/10	8/10	540±139	927±60
対照 (溶媒投与)	8/11	8/11	6/11	732±144	1097±185
ミダゾラム					
0.5 mg/kg	7/7	7/7	6/7	744±178	1021±194
1 mg/kg	6/8	6/8	5/8	790±146	996±209
2 mg/kg	4/8	4/8	0/8*	709±131	—
フェニトイン					
30 mg/kg	8/8	8/8	7/8	342± 65	701±265
60 mg/kg	8/8	8/8	7/8	279± 28	1094±201
フェノバルビタール※ ²					
10 mg/kg	5/8	5/8	4/8	820±124	1169±82
20 mg/kg	8/10	8/10	3/10	809± 77	—
40 mg/kg	9/10	9/10	1/10	822±125	—
80 mg/kg	0/8*	0/8*	0/8*	—	—

MS：強直間代性けいれん，TC：強直性けいれん，EX：死亡。

※¹：溶媒はフェニトインの薬物調製に使用したもので，フェニトインの対照とした。それ以外の薬物については「薬物投与なし」を対照とした。※²：フェノバルビタールはナトリウム塩で，用量は塩として表示した。*：対応する対照に対して $p<0.05$ （発現例数の場合は Fischer' exact test，発現潜時及び死亡時間の場合は ANOVA）

2つの対照群では MS，TC の発現率は 100%であったが，死亡率は 100%ではなかった。ミダゾラムは 0.5 及び 1 mg/kg では有意な作用は認められなかったが，2 mg/kg では MS，TC の発現率を 50%に抑制し，死亡例は認められず，有意な作用を示した。フェニトインは試験に用いた用量では有意な拮抗作用を示さなかった。フェノバルビタールは 10～40 mg/kg でも死亡率を抑制したが，80 mg/kg では MS，TC の発現を 100%抑制し，死亡例も無く有意な作用を示した。

(6) 興奮性アミノ酸誘発けいれんに対する作用

(公表論文, 資料番号: 4.2.1.1.1-11 [参考資料])

グルタミン酸は興奮性神経伝達物質の一つであり、けいれん・てんかん発作に重要な役割を果たしている。グルタミン酸受容体はイオンチャネル型と代謝調節型に分けられ、イオンチャネル型受容体はさらに三種類の受容体 (NMDA 受容体, カイニン酸受容体, AMPA 受容体) が存在し、それぞれの特異的作動薬によりけいれんが誘発される。

NMRI 系雄性マウス (18~22g) を、各群につき 4~32 匹用いて、ミダゾラム、ジアゼパム、フェニトイン及びフェノバルビタールの興奮性アミノ酸 (NMDA, カイニン酸, キスカル酸) 誘発けいれんに対する作用について検討した。薬物は生理食塩水又は 10% ポリエトキシ化ヒマシ油含有生理食塩水に溶解して調製し、フェニトインをけいれん誘発 45 分前に腹腔内投与した以外、他の被験薬はけいれん誘発 30 分前に腹腔内投与した。興奮性アミノ酸誘発けいれんは、マウスの頭蓋骨表面から垂直方向に 3.2 mm 注射針を刺入して側脳室内に、NMDA 又はカイニン酸の場合は 1 nmol, キスカル酸の場合は 100 nmol を 5 μ L の生理食塩水に溶解して投与し、けいれんを誘発した。抗てんかん作用の指標として、各被験薬の抗けいれん作用の ED₅₀ 値及び 95% 信頼区間を作用-対数用量回帰曲線から算出した。ミダゾラムと他の抗てんかん薬 (ジアゼパム, フェノバルビタール及びフェニトイン) の薬理作用比較を表 2.6.2.2.1-12 に示す。

表 2.6.2.2.1-12 マウスにおけるミダゾラムの抗興奮性アミノ酸誘発けいれん作用
(資料番号 4.2.1.1.1-11 [参考資料] の表 1 を改変)

投与群	ED ₅₀ 値 (95% 信頼区間) [mg/kg, 腹腔内投与]					
	NMDA (1 nmol)	例 数	カイニン酸 (1 nmol)	例 数	キスカル酸 (100 nmol)	例 数
ミダゾラム	>20	8	4.5 (2.4~8.7)	30	>20	4
ジアゼパム	4.4 (3.5~5.5)	24	2.2 (2.0~2.5)	20	7.8 (4.2~13.5)	24
フェニトイン	>80	8	>80	8	>80	8
フェノバルビタール	>40	8	10.5 (4.7~23.7)	32	22.1 (13.6~35.9)	24

ミダゾラムはカイニン酸誘発けいれんに対し拮抗作用を示したが NMDA 及びキスカル酸誘発けいれんに対しては 20 mg/kg までの用量で拮抗作用を示さなかった。ジアゼパムはすべての興奮性アミノ酸誘発けいれんに対して拮抗作用を示し、フェノバルビタールはカイニン酸及びキスカル酸誘発けいれんに対して拮抗作用を示した。一方、フェニトインはすべての興奮性アミノ酸誘発けいれんに対して拮抗作用は認められなかった。

2.6.2.2.2 *In vitro*作用機序試験

1) マウス培養脳神経組織及び骨髄神経組織におけるミダゾラムの GABA 誘発電流増強作用

(公表論文, 資料番号 : 4.2.1.1.2-1 [参考資料], -2 [参考資料])

ベンゾジアゼピン系薬は GABA 受容体に作用し, GABA 誘発電流を増強させる. そこでベンゾジアゼピン系薬ミダゾラムとけいれん誘発物質 6,7-ジメトキシ-4-エチル-9H-ピリド[3,4-b]インドール-3-カルボン酸メチル (DMCM) を用いて, マウス培養脳神経組織における GABA 誘発電流に対する作用を検討した.

胎生 12~14 日齢のマウス脳神経を組織培養し, 培養 3 週~3 ヶ月後, pH 7.35, 33~35 °C のバス溶液 (組成 (mM) : NaCl (150), KCl (5), CaCl₂ (2), MgCl₂ (2), glucose (6), HEPES (5)) 内で, KCl (1 M) を満たしたガラス管微小電極を用いて細胞内電位を測定した. GABA (0.1~0.5 M, pH 3.5) 及びグリシン (0.1~0.5 M, pH 2.5) は細胞体の近隣 (約 50 µm) に設置した二連結微細ガラス管 (直径 : <1.5 µm) により灌流し GABA 電流及びグリシン電流を誘発した. ミダゾラム (10 mM, pH 4) 及び DMCM (10 mM, pH 3) は細胞体の近隣 (約 50 µm) に設置した別々の微細ガラス管 (直径 : 1~1.5 µm) により灌流した. GABA 及びグリシンを添加した際に生じる脱分極のピーク値とピーク値に及ぼすミダゾラム及び DMCM の作用を図 2.6.2.2.2-1 に示す.

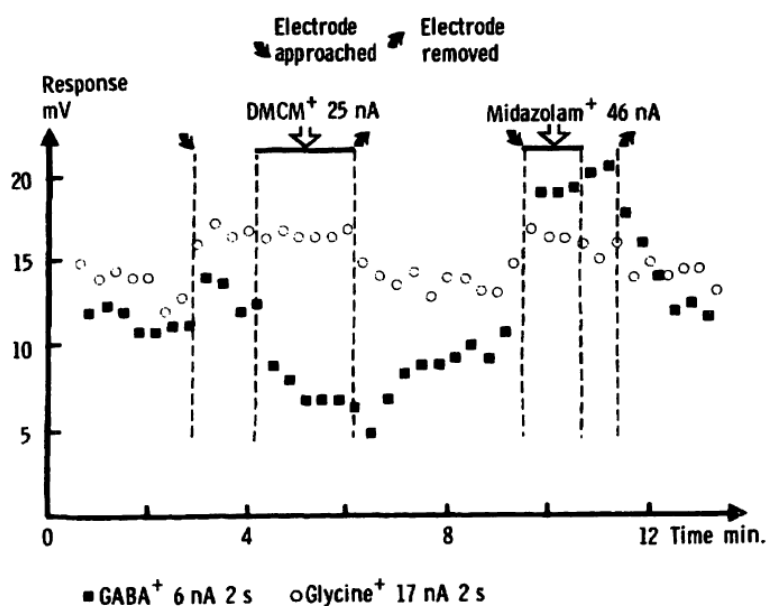


図 2.6.2.2.2-1 マウス培養脳神経組織におけるミダゾラム及び DMCM の GABA 誘発電流増強作用

(資料番号 4.2.1.1.2-1 [参考資料] の図 2 を引用)

GABA 添加によりマウス脳神経組織において脱分極が認められる。GABA 電流誘発後に DMCM を灌流した場合、わずかな増強作用が一時的に誘導されたが、その後 GABA 電流の減少が認められ DMCM 灌流の中に約 50% の GABA 誘発電流抑制作用が示された。DMCM を除去して GABA 誘発電流が元の値に回復した後、ミダゾラムを添加した場合、ミダゾラムの灌流は GABA 誘発電流を約 2 倍増強させた。一方グリシン誘発電流に対して、DMCM 及びミダゾラムは 10 mM で作用を示さなかった。

胎生 12～14 日齢のマウス脊髄神経を組織培養し、培養 1～3 ヶ月後、10 mM Mg^{2+} を加えた 34～35 °C の Hanks 溶液 (pH 7.35) 内で、KCl (3 M) を満たしたガラス管微小電極を用いて細胞内電位を single-electrode-voltage-clamp (SEVC) 法で測定した。保持電位は -55 mV とした。GABA (0.1～0.5 M, pH 3.5) は細胞体の近隣 (50 μ m) に設置した二連結ガラス管 (直径 : <1.0 μ m) により灌流し GABA 電流を誘発した。ミダゾラム (1.0 μ M, pH 4) 及び DMCM (1.0 μ M, pH 3) は細胞体の近隣 (50 μ m) に別々の微細ガラス管 (直径 : 1～1.5 μ m) により灌流した。GABA を添加した際に生じる脱分極と脱分極に及ぼすミダゾラム及び DMCM の作用を図 2.6.2.2.2-2 に示す。

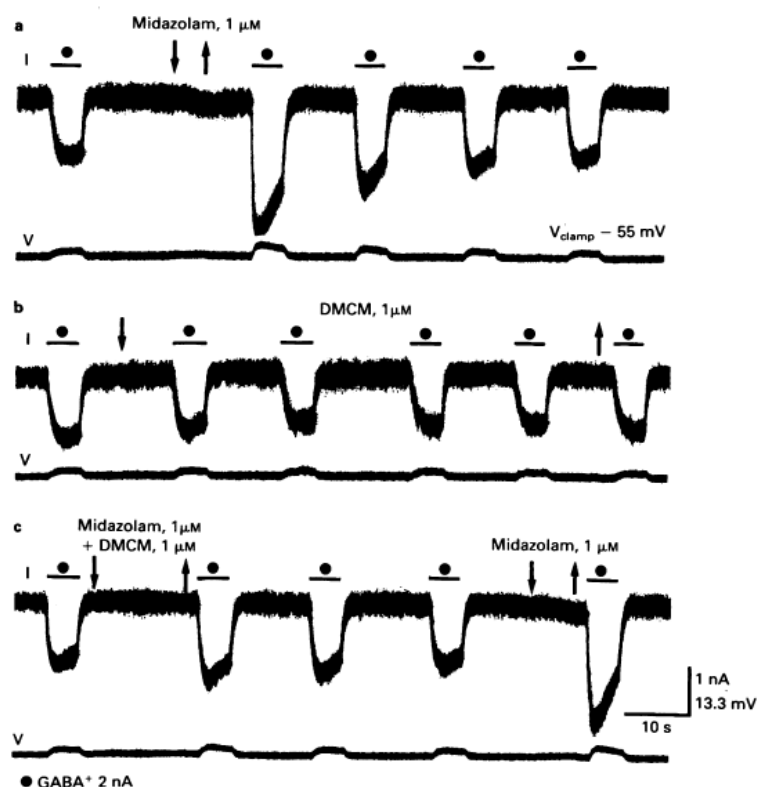


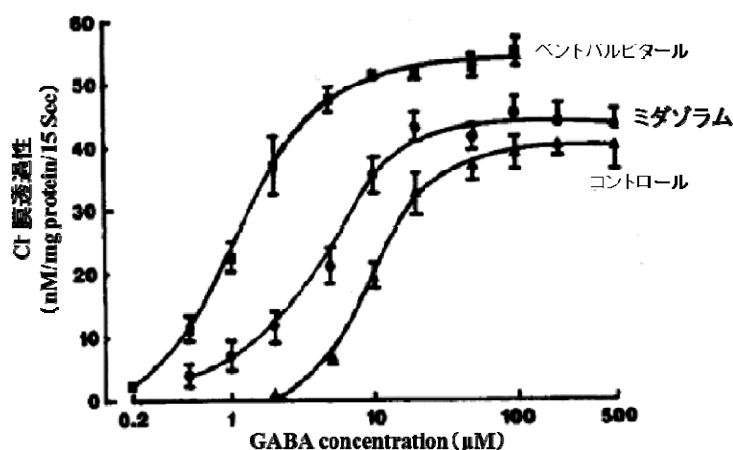
図 2.6.2.2.2-2 マウス培養脊髄神経におけるミダゾラム及び DMCM の GABA 誘発電流増強作用
(資料番号 4.2.1.1.2-2 [参考資料] の図 6 を引用)

1.0 μM のミダゾラムは GABA 電位を 120% 増強し、その作用は 60 秒間持続した。また 1.0 μM の DMCM を 70 秒間添加すると、GABA 電位は 7% 抑制された。一方、ミダゾラムと DMCM を同時に添加するとミダゾラムの GABA 電位増強作用は 25% となり、ミダゾラムの GABA 電位増強作用は DMCM により強く抑制され、ミダゾラムと DMCM は同一の受容体に作用し、DMCM はミダゾラムに対して拮抗作用を示すことが示唆された。

2) ラット細胞膜小胞における GABA 開口性クロライドチャンネルコンダクタンスに対するミダゾラムの作用 (公表論文, 資料番号: 4.2.1.1.2-3 [参考資料])

GABA_A 受容体は GABA 開口性クロライドチャンネルであり、GABA との結合により Cl⁻ の透過性を高めて膜を過分極させることにより活動電位の発生を抑制する。また、ミダゾラム及びペントバルビタールは GABA_A 受容体に作用し、GABA 誘発電流を増強させる。そこで、ラット細胞膜小胞における GABA 開口性クロライドチャンネルコンダクタンスに対するミダゾラム及びペントバルビタールの作用を検討した。

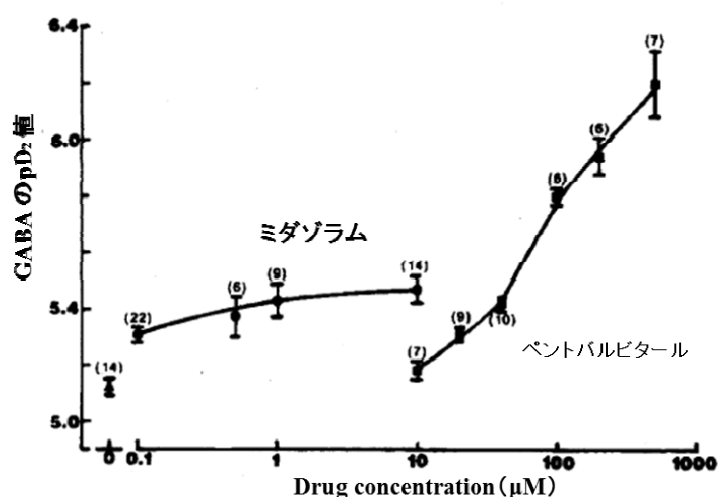
Sprague-Dawley 系雄性ラットの大脳皮質と海馬をホモジネート後、蛋白濃度 7~8 mg/mL に調製しラット細胞膜小胞試料を作製した。この試料に 0.8 μCi の Na ³⁶Cl (571 $\mu\text{Ci}/\text{mmol}$) と GABA を加え、ミダゾラム又はペントバルビタール存在下又は非存在下で 30 °C, 15 秒間インキュベーションした。メンブレンブロット後、放射能活性を測定し、GABA 開口性チャンネルによる Cl⁻ の取り込み量を算出した。GABA_A 受容体における、ミダゾラム (1 μM) 又はペントバルビタール (200 μM) 存在下又は非存在下の GABA 開口性 Cl⁻ 膜透過性の作用を図 2.6.2.2.2-3 に、ミダゾラム (0.1~10 μM) 及びペントバルビタール (10~500 μM) 存在下における GABA 開口性 Cl⁻ 膜透過性亢進作用の pD₂ 値 (-log [EC₅₀]) を図 2.6.2.2.2-4 に示す。



▲ : コントロール (n=6), ● : ミダゾラム (n=9), ■ : ペントバルビタール (n=6), 平均値±SE

図 2.6.2.2.2-3 ラット細胞膜小胞におけるミダゾラム及びペントバルビタールによる GABA 開口性 Cl⁻ 膜透過性に及ぼす作用

(資料番号 4.2.1.1.2-3 [参考資料] の図 1 を改変)



▲ : コントロール (n=14), ● : ミダゾラム (n=6~22), ■ : ペントバルビタール (n=6~10), 平均値±SE

図 2.6.2.2-4 ラット細胞膜小胞におけるミダゾラム及びペントバルビタールの
GABA 開口性 Cl⁻膜透過性亢進作用の pD₂ 値
(資料番号 4.2.1.1.2-3 [参考資料] の図 2 を改変)

GABA は, ラット細胞膜小胞試料において Cl⁻膜透過性を濃度依存的に増加させ, EC₅₀ 値は 7.55 μM であり, 飽和性を示した. また, 100 μM のビククリンは 10 μM GABA で誘導した Cl⁻膜透過性亢進を阻害した. ミダゾラムは, GABA 開口性 Cl⁻膜透過性亢進作用における用量-反応曲線を, 傾きを変えることなく左に約 2.2 倍シフトさせ, GABA の EC₅₀ 値は 3.43 μM を示した. しかし, ミダゾラムは GABA 非存在下では Cl⁻膜透過性亢進作用は示さず, GABA 誘導 Cl⁻膜透過最大量にも影響を与えなかった. 一方, 500 μM のペントバルビタールにおいて GABA の EC₅₀ 値は 0.64 μM を示し, GABA 開口性 Cl⁻膜透過性亢進作用における用量-反応曲線を約 12 倍シフトさせた.

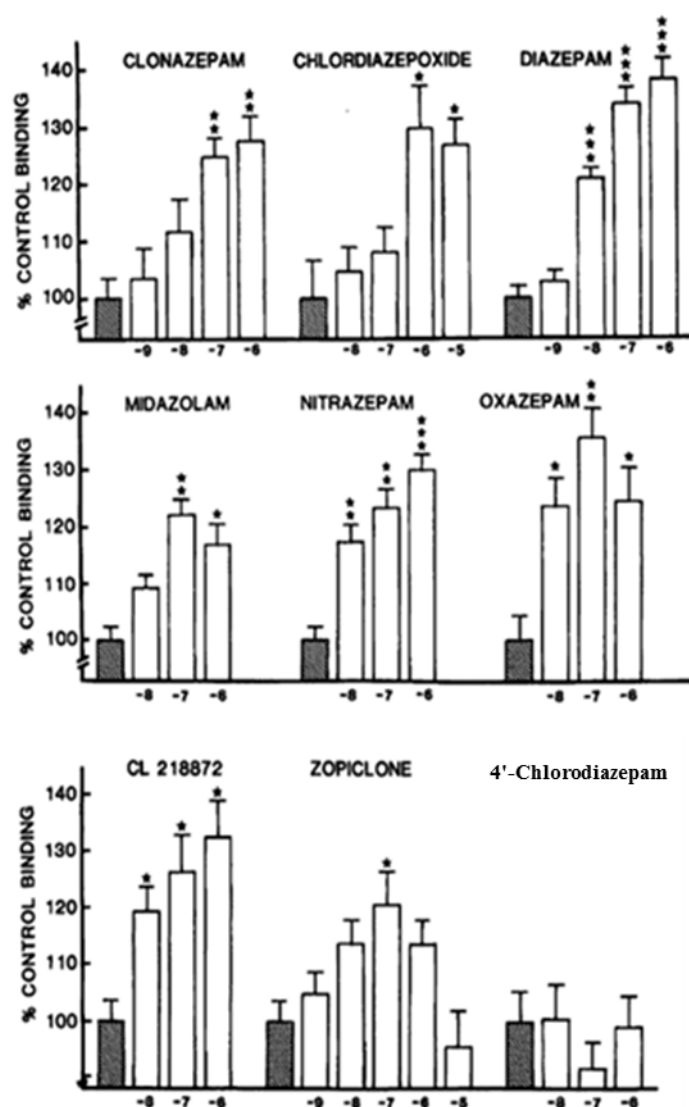
3) ラット神経終末細胞膜内 GABA 受容体における GABA 結合対するミダゾラムの増強作用

(公表論文, 資料番号 : 4.2.1.1.2-4 [参考資料])

GABA_A受容体にはリガンドである GABA 結合部位の他に, バルビツール酸結合部位, ベンゾジアゼピン結合部位, 糖質コルチコイド結合部位, ペニシリン結合部位, フロセミド結合部位などが知られており, GABA との反応性の調節が行われる. ベンゾジアゼピン誘導体であるミダゾラムは, Cl⁻流入に直接関与せず, GABA が GABA_A受容体に結合した後のイオンチャネル開口頻度に関与しており, Cl⁻膜透過性亢進作用を示す.

神経終末細胞膜内 GABA_A受容体に対する GABA 結合能に及ぼすミダゾラム(マレイン酸塩), 他のベンゾジアゼピン系誘導体及び非ベンゾジアゼピン系薬物の作用を検討した.

12 週齢の Sprague-Dawley 系ラットの全脳を 0.32 M のシュウクロース内でホモジナイズ後, 遠心処理を行い, ラット神経終末細胞膜を調製した. この試料 (0.4~0.6 mgprotein) に 250 nM の [³H]GABA (2 Ci/mmol) を加え, ミダゾラム, 他のベンゾジアゼピン誘導体及び非ベンゾジアゼピン薬物存在下又は非存在下で 2 °C, 15 分間インキュベーションした. 非飽和 GABA 結合は 1 mM の非標識 GABA で確認した. ラット神経終末細胞膜内 GABA 受容体における GABA 結合対するミダゾラム, 他のベンゾジアゼピン誘導体(クロナゼパム, クロルジアゼポキシド, ジアゼパム, ニトラゼパム, オキサゼパム, 4'-クロロジアゼパム) 及び非ベンゾジアゼピン誘導体(ゾピクロン, CL 218872) の増強作用を図 2.6.2.2.2-5 に示す.



10^{-9} ~ 10^{-6} M のクロナゼパム (n=3), クロルジアゼポキシド (n=3),
 ジアゼパム (n=12), ニトラゼパム (n=3), オキサゼパム (n=3),
 4'-クロルジアゼパム (n=3), ゾピクロン (n=3),
 CL 218872 (n=3) 平均値±SE,
 * : 対照群に対して $p<0.05$, ** : 対照群に対して $p<0.01$,
 *** : 対照群に対して $p<0.001$ (Student's t-test)

図 2.6.2.2.2-5 ラット神経終末細胞膜内 GABA 受容体における GABA 結合に対する増強作用
 (資料番号 4.2.1.1.2-4 [参考資料] の図 1 及び 2 を改変)

250 nM の [3 H]GABA 濃度で, ラット神経終末細胞膜における特異的結合量は, 総結合量の 25~33%であり, GABA の GABA_A 受容体に対する親和性は低かった. しかし, 10 nM 以上のジアゼパム, ニトラゼパム及びオキサゼパム, 又は 100 nM 以上のミダゾラム及びクロナゼパム, 1000 nM 以上のクロルジアゼポキシドの存在下で GABA の GABA_A 受容体結合量は増加した. さらにゾピクロン及び CL 218872 も同様の作用を示したが, ベンゾジアゼピン結合部位に結合能を有す

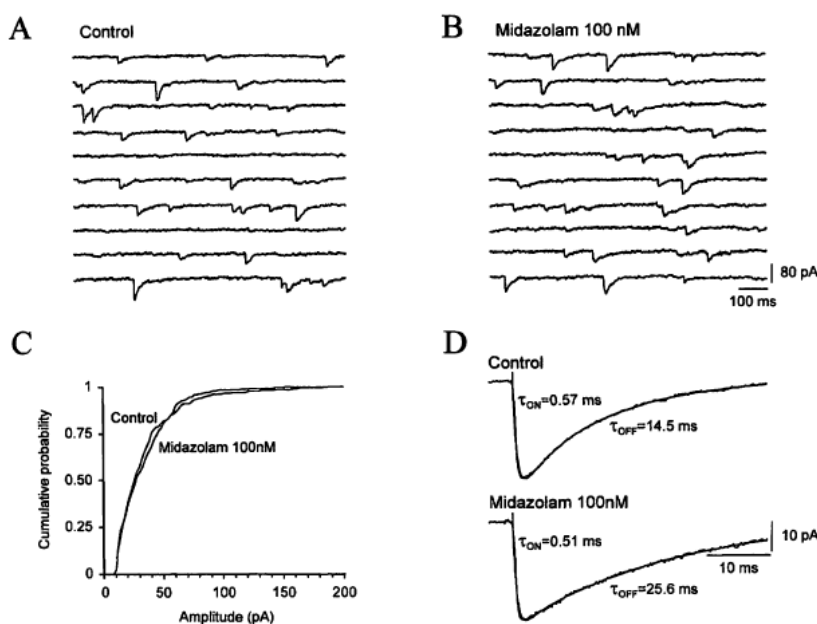
るが、薬理学的作用をもたない 4'-クロロジアゼパムは GABA の親和性に対して影響を及ぼさなかった。

4) ラット培養海馬及び脊髄におけるミダゾラムの GABA 伝達に対する作用

(公表論文, 資料番号 : 4.2.1.1.2-5 [参考資料], -6 [参考資料])

Cl⁻の平衡電位はほとんどの神経細胞で静止膜電位に近いので、Cl⁻透過性が増加することで神経細胞は過分極し、さらにシャunting効果により興奮性入力 of 脱分極効果が減少して興奮性が抑制される。ベンゾジアゼピン系誘導体は、脊髄背角を含む中枢神経系の後シナプスに発現する GABA_A 受容体をアロステリックに調節することで抑制性神経伝達物質である GABA による抑制性シナプス後電位 (IPSP) を変化させる。そこで、海馬及び脊髄培養神経細胞における GABA 性微小抑制性後シナプス電流 (mIPSC) に対するミダゾラムの作用を検討した。

5 日齢のラット海馬スライス標本を組織培養し、培養 2~4 週後、灌流速度 2 mL/min の生理食塩水 (組成 (mM) : NaCl (137), KCl (2.7), NaHCO₃ (8), NaH₂PO₄ (0.4), MgCl₂ (2), CaCl₂ (3), glucose (5.6), フェノールレッド (10 mg/L) を含む) 内で、電極内液 (組成 (mM) : CsCl (130), HEPES (10), EGTA (10), MgCl₂ (2) 及び QX-314 (1)) を満たしたガラス管微小電極を用いて、CA3 錐体の全細胞内電流を測定した。細胞は -70 mV で電位固定し、細胞の膜抵抗 (6.6 ± 0.5 MΩ) と膜容量 (51.2 ± 6.8 pF) をモニターした。GABA 性 mIPSC は、non-NMDA 受容体アンタゴニスト 2,3-ジオキソ-6-ニトロ-1,2,3,4-テトラヒドロベンゾ[f]キノキサリン-7-スルホンアミド (NBQX, 20 μM), NMDA 受容体アンタゴニスト D-(-)-2-アミノ-5-ホスホノ吉草酸 (AP5, 50 μM) 及び電位依存性ナトリウムチャネル阻害薬のテトロドトキシン (TTX, 1 μM) を添加することにより自発性電流を分離して測定した。ラット海馬 CA3 錐体細胞における、GABA 性 mIPSC に対するミダゾラムの作用を図 2.6.2.2.2-6 に示す。



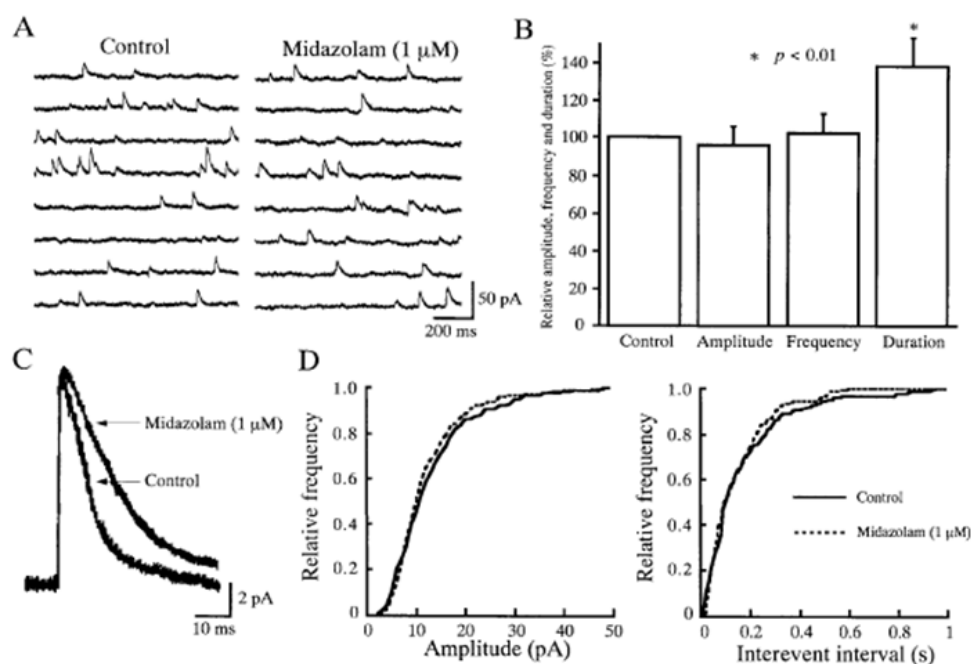
- (A) 対照における GABA 作動性 mIPSC の 10 段の連続記録,
(B) ミダゾラム存在下における GABA 作動性 mIPSC の 10 段の連続記録,
(C) mIPSC 振幅の頻度,
(D) 上段には対照における mIPSC の平均波形と下段にはミダゾラム存在下の mIPSC の平均波形を重ね合わせ

図 2.6.2.2.2-6 ラット培養海馬 CA3 錐体細胞における GABA 性 mIPSC に対するミダゾラムの作用

(資料番号 4.2.1.1.2-5 [参考資料] の図 1 を引用)

100 nM のミダゾラムを添加した時、-70 mV で電位固定した海馬 CA3 錐体細胞における GABA 性 mIPSC の平均電流振幅値は 31.3 ± 2.3 pA ($n=8$) であり、非添加時の平均電流振幅値 30.8 ± 1.7 pA ($n=23$) と有意な差は認められなかった。また、平均電流振幅頻度も同様であった。しかし、10 回の mIPSC における $0.3 \sim 0.8$ msec の τ_{ON} 及び $7.6 \sim 20.4$ msec の τ_{OFF} を比較すると、100 nM ミダゾラム添加は τ_{ON} には作用を示さないが、 τ_{OFF} を $38.1 \pm 8.9\%$ 有意に増加させた。この作用は、ミダゾラム除去後 10 分以上持続し、ベンゾジアゼピンアンタゴニストであるフルマゼニルを $1 \mu\text{M}$ 添加することにより消失した。

6～8 週齢雄性 Sprague-Dawley 系ラットから腰仙の脊髄 (L1～S3) を摘出し、1～3 °C の Krebs 液に保存した。腹背根を除去後、軟膜性クモ膜を剥し 500 μ m の厚さにスライスした。試料を測定チャンバーに装着し、95%O₂、5%CO₂を飽和させた 36 $\pm$ 1°C の Krebs 液内に電流測定開始 1 時間前に灌流 (15 mL/min) させた。位置と形態により膠様質神経を同定し、5～10 M Ω の抵抗値をもつパッチーピペット電極 (電極内液組成 (mM) : CaCl₂ (0.5), HEPES (5), EGTA (5), MgCl₂ (2), 硫酸セシウム (110), テトラエチルアンモニウム (5), アデノシン三リン酸マグネシウム塩 (5), グアノシン-5'-O-2-チオニリン酸塩 (1)) を用いて、ブラインド・パッチクランプ法により全細胞電流を測定した。GABA 性 mIPSC は、non-NMDA 受容体アンタゴニスト 6-シアノ-7-ニトロキノキサリン-2,3-ジオン (CNQX, 20 μ M), 50 μ M の AP5 及び 0.5 μ M の TTX を添加し、自発性電流を分離して測定した。ラット脊髄膠様質神経細胞における GABA 性 mIPSC に対するミダゾラムの作用を図 2.6.2.2.2-7 に示す。



- (A) 対照及びミダゾラム存在下における GABA 作動性 mIPSC の 8 段の連続記録,
(B) ミダゾラム存在下における mIPSC の振幅、発生頻度及び下降相の時間
(C) 対照及びミダゾラム存在下の mIPSC の平均波形を重ね合わせ,
(D) mIPSC 振幅の頻度

図 2.6.2.2.2-7 ラット培養脊髄膠様質神経細胞における

GABA 性 mIPSC に対するミダゾラムの作用

(資料番号 4.2.1.1.2-6 [参考資料] の図 2 を引用)

ラット脊髄膠様質神経細胞における 0 mV 固定電圧の mIPSC には長期持続 (50~100 ms) の GABA 性 mIPSC と短期持続 (20~40 ms) の GABA 性 mIPSC があり, 20 μ M のビククリン (GABA 拮抗薬) 又は 2 μ M のストリキニーネ (グリシン拮抗薬) はそれぞれの mIPSC を抑制した. GABA 性 mIPSC (n=7) の平均頻度は 5.1 ± 1.4 Hz (4.1~7.4 Hz) で振幅は 12.6 ± 4.6 pA (9.3~20.5 pA) であった. 1 μ M のミダゾラムは, GABA 性 mIPSC の平均頻度及び振幅に影響を示さなかったが, GABA 性 mIPSC の持続時間を $138 \pm 14\%$ (n=7) 延長した.

5) GABA_A受容体 $\alpha_1\beta_2\gamma_2$ サブユニット発現細胞におけるミダゾラムの作用

(公表論文, 資料番号: 4.2.1.1.2-7 [参考資料], -8 [参考資料])

リガンド開口イオンチャネルである GABA_A 受容体は, 5 量体のサブユニットで形成されており, クローニングにより 18 種類 (α_1 - α_6 , β_1 - β_3 , γ_1 - γ_3 , δ , ϵ , θ , ρ_1 - ρ_3) のサブユニットが同定されている. 多くの GABA_A 受容体サブタイプにおいて, 大部分は 2 つの α_1 サブユニット, 2 つの β_2 サブユニットと 1 つの γ_2 サブユニットにより形成されており, サブユニットの構成が GABA の感受性及び薬力学的作用を決定している. そこで, $\alpha_1\beta_2\gamma_2$ サブユニット発現細胞におけるミダゾラムの結合能及び GABA 誘発電流における作用を検討した.

pCDM8 発現ベクターにラット $\alpha_1\beta_2\gamma_2$ サブユニット遺伝子を挿入し, HEK293 細胞 (ヒト胎児腎細胞) 内に遺伝子導入した. ラット $\alpha_1\beta_2\gamma_2$ サブユニット発現細胞を 10 mM リン酸緩衝液内 (pH 7.2) でホモジネート後, 遠心処理により GABA_A 受容体発現細胞膜を調製した. GABA との親和性を求めるため, 100 μ g の膜タンパクと [³H]ムシモール (13.4 Ci/mmol) 1~50 nM を 4°C, 60 分間インキュベーションし, 非特異的結合は 100 μ M の GABA の存在下で算出した. またベンゾジアゼピン結合部位の親和性は, 50 μ g の膜タンパクと [³H]フルマゼニル (83.2 Ci/mmol) 0.1~10 nM を 4°C, 60 分間インキュベーションし, 非特異的結合は 10 μ M のジアゼパムの存在下で算出した. さらに 0.5 nM の [³H]フルマゼニルを用いて, 10 μ M の GABA の存在下及び非存在下における, ベンゾジアゼピン系化合物 (ミダゾラム, ジアゼパム, フルニトラゼパム, ブレタゼニル), ゾルピデム及び DMCM の阻害作用を比較した. 各化合物の IC₅₀ 値 (nM) を表 2.6.2.2.2-1 に, また GABA の阻害作用に対する作用を図 2.6.2.2.2-8 に示す.

表 2.6.2.2.2-1 ベンゾジアゼピン系化合物, ゾルピデム及び DMCM の IC₅₀ 値 (nM)

(資料番号 4.2.1.1.2-7 [参考資料] の表 1 を改変)

ミダゾラム	ジアゼパム	フルニトラゼパム	ブレタゼニル	ゾルピデム	DMCM
2.8	27.5	3.1	0.35	46.3	1.9



DIAZ : ジアゼパム, FLUN ; フルニトラゼパム, MIDAZ : ミダゾラム,
ZOLP : ゾルピデム, BRET : プレタゼニル

* : プレタゼニルに対して $p < 0.05$ (Dunnett test)

図 2.6.2.2.2-8 ベンゾジアゼピン系化合物, プレタゼニル, ゾルピデム及び

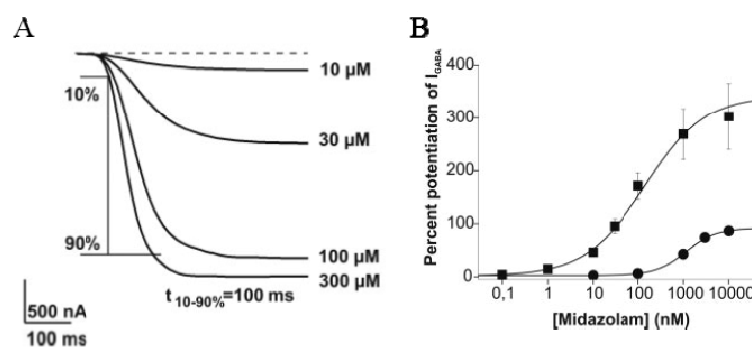
DMCM の IC_{50} 値に対する GABA の作用

(資料番号 4.2.1.1.2-7 [参考資料] の図 1 を改変)

GABA 結合部位に結合能を示す $[^3H]$ ムシモールの K_d 値は 16.1 ± 1.6 nM (平均 $\pm$ SE, $n=3$) を示し, ベンゾジアゼピン結合部位に選択的に結合能を示す $[^3H]$ フルマゼニルの K_d 値及び B_{max} 値は 0.59 ± 0.2 nM 及び 0.74 ± 0.1 pmol/mg protein (平均 $\pm$ SE, $n=3$) を示した. フルマゼニルの結合に対してミダゾラムは阻害作用を示し, GABA 非存在下での IC_{50} 値は 2.8 nM であった. 一方, 10 μ M の GABA の共存によりミダゾラムの阻害作用は増強し, IC_{50} 値 $\cdot$ GABA (-) / IC_{50} 値 $\cdot$ GABA (+) (GABA SHIFT VALUE) は 3 以上を示したが, 同様の増強作用は, 同じベンゾジアゼピン化合物のジアゼパム, フルニトラゼパムでも認められた. プレタゼニル及びゾルピデムでも増強作用が認められたが, GABA は DMCM の阻害作用を 1/2.5 倍に減弱させた.

また, $\alpha_1\beta_2\gamma_2$ サブユニット発現細胞におけるミダゾラムの GABA 誘発 Cl^- 電流 (I_{GABA}) に対する作用を検討するため, アフリカツメガエル卵母細胞に $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$ サブユニット又は $\alpha_1\beta_2\gamma_1$ サブユニット遺伝子を導入後, pH 7.4 のチャンバー溶液 (組成 (mM) : NaCl (90), KCl (1), $CaCl_2$ (1), $MgCl_2$ (1), HEPES (5)) 内で -70 mV の電位固定下で二本刺し電極法により電流を測定した. I_{GABA} は, 120 μ L の GABA 含有溶液を灌流することにより誘発した. ミダゾラムの I_{GABA} に対する作用を検討するために, GABA の濃度は最大 I_{GABA} 値の 5~10% (EC_{5-10}) を誘導する濃度 (通常 3~8 μ M) を用いた.

GABA_A 受容体 $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$ サブユニット発現細胞における 10~300 μM GABA の I_{GABA} と GABA_A 受容体 $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$ サブユニット又は $\alpha_1\beta_2\gamma_1$ サブユニット発現細胞におけるミダゾラムの濃度- I_{GABA} 増強作用反応曲線を図 2.6.2.2.2-9 に, GABA_A 受容体 $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$ サブユニット又は $\alpha_1\beta_2\gamma_1$ サブユニット発現細胞におけるミダゾラムの I_{GABA} 増強作用の EC_{50} 値及び最大増強率を表 2.6.2.2.2-2 に示す.



- A) GABA (10~300 μM) による I_{GABA} の経時変化,
 B) ■ : $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$ サブユニット発現細胞におけるミダゾラムの I_{GABA} 増強作用,
 ● : $\alpha_1\beta_2\gamma_1$ サブユニット発現細胞におけるミダゾラムの I_{GABA} 増強作用

図 2.6.2.2.2-9 GABA_A 受容体 $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$ サブユニット発現細胞における 10~300 μM GABA の I_{GABA} 及び GABA_A 受容体 $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$ サブユニット又は $\alpha_1\beta_2\gamma_1$ サブユニット発現細胞におけるミダゾラムの濃度- I_{GABA} 増強作用反応曲線

(資料番号 4.2.1.1.2-8 [参考資料] の図 1 及び 4 を改変)

表 2.6.2.2.2-2 GABA_A 受容体 $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$ サブユニット又は $\alpha_1\beta_2\gamma_1$ サブユニット発現細胞におけるミダゾラムの I_{GABA} 増強作用の EC_{50} 値及び最大増強率

(資料番号 4.2.1.1.2-8 [参考資料] の表 2 を改変)

ミダゾラム	$\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$		$\alpha_1\beta_2\gamma_1$		EC_{50} 値 ($\alpha_1\beta_2\gamma_1$) / EC_{50} 値 ($\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$)
	EC_{50} 値 (nM)	最大増強率 (%)	EC_{50} (nM)	最大増強率 (%)	
	143±88	342±64	1150±259	92±8	8.04

平均値±SE

GABA_A 受容体 $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$ サブユニット発現細胞において、10, 30, 100 及び 300 μM の GABA は 230, 180, 140 及び 100 ms 以内に Cl^- 電流を 10~90% 増強した。最大 I_{GABA} 値の 5~10% (EC_{5-10}) を誘導する GABA の濃度 (通常 3~8 μM) において、0.1~10000 nM のミダゾラムは I_{GABA} を最大 342% 増強させ、その EC_{50} 値は 143 nM であった。一方 $\alpha_1\beta_2\gamma_1$ サブユニット発現細胞において、0.1~10000 nM ミダゾラムの I_{GABA} 最大率は 92% であり、その EC_{50} 値は 1150 nM であった。 $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$ サブユニット発現細胞の EC_{50} 値と $\alpha_1\beta_2\gamma_1$ サブユニット発現細胞の EC_{50} 値の比は約 8 倍であった。

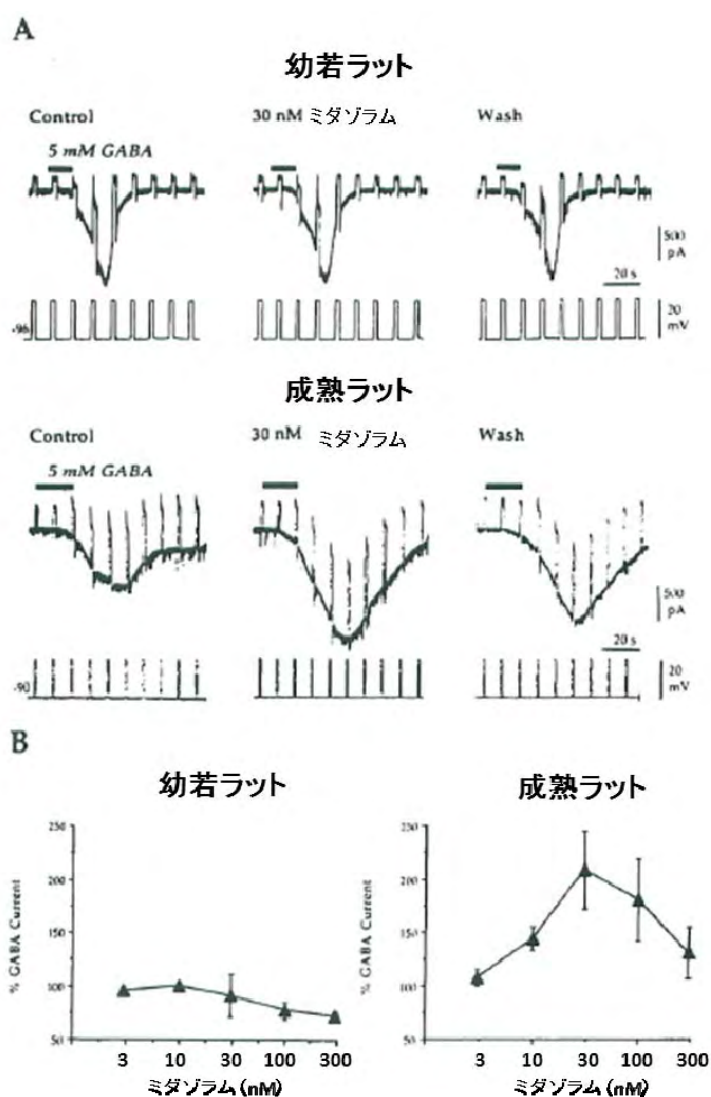
以上よりミダゾラムは GABA_A 受容体の $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$ サブユニット発現細胞に高い親和性を示し、 $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$ サブユニットに結合することにより GABA 誘発 Cl^- 電流を増強することが示唆された。

6) ミダゾラムの GABA 誘発電流増強作用に及ぼす発達・加齢の影響

(公表論文, 資料番号 : 4.2.1.1.2-9 [参考資料], -10 [参考資料])

GABA 神経伝達は発達過程に伴い変化することが知られており, また GABA_A 受容体の発現, GABA 誘発 Cl⁻電流の反応性及び抑制性入力は加齢により変化することが報告されている. そこで, ラット海馬スライス標本を用いてミダゾラムの GABA 誘発電流に及ぼす発達・加齢の影響を検討した.

試験には雄性 Wistar 系ラットを用いた. 生後 7~12 日 (幼若ラット) 又は生後 25~35 日 (成熟ラット) の脳から厚さ 500 µm の海馬脳スライス標本を作製し, 34°C のチャンバーに入れて人工脳脊髄液 (組成 (mM) : NaCl (126), KCl (3.5), CaCl₂ (2), MgCl₂ (1.3), NaHCO₃ (25), NaH₂PO₄ (1.2), glucose (11)) を 3 mL/分の流速で灌流した. KCl (3 M) を満たしたガラス管微小電極を用いて細胞内電位を voltage-clamp 法で測定した. 幼若ラット又は成熟ラットの海馬脳スライス標本において GABA (5 mM, 20~40 秒) 及び電位依存性ナトリウムチャネル阻害薬 TTX (1 µM) を灌流した際に生じる GABA 電流に対するミダゾラム (30 nM) の作用を図 2.6.2.2.2-10 に示す.



A) GABA 誘発電流チャートの典型例,

B) GABA 誘発電流に対するミダゾラムの用量-反応曲線
平均値±SE

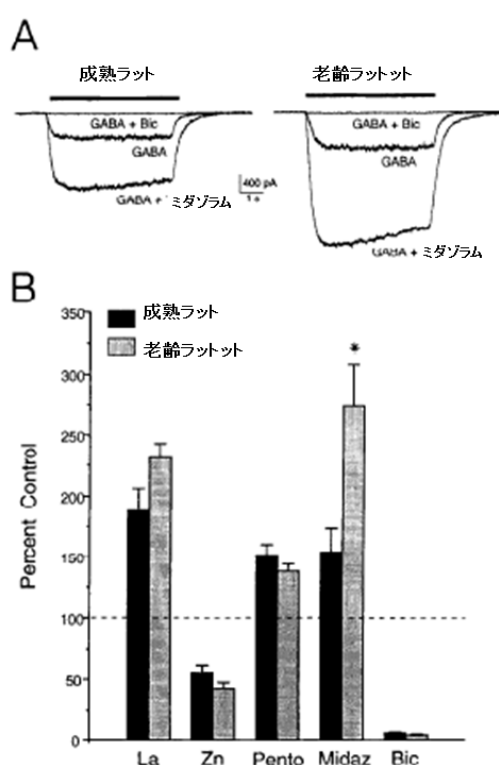
図 2.6.2.2.2-10 幼若及び成熟ラットの海馬スライス標本における

GABA 誘発電流に対するミダゾラムの作用

(資料番号 4.2.1.1.2-9 [参考資料] の図 2 を改変)

幼若ラットの GABA 誘発電流に対して低濃度 (3~30 nM) のミダゾラムは有意な増強作用は示さず (30 nM ミダゾラム: $91.8 \pm 8\%$), 高濃度 (100~300 nM) では抑制作用を示した. 一方, 成熟ラットにおける GABA 誘発電流に対してミダゾラムはベル型の増強作用を示し, 30 nM で最大増強反応が認められた.

次に Fisher 344 系ラットを用いて、ミダゾラムの GABA 誘発電流における加齢の影響を検討した。生後 1～2 ヶ月（成熟ラット）又は生後 20～21 ヶ月（老齢ラット）から内側中隔・対角帯核ニューロン標本を作製後、pH 7.4 の生理食塩水（組成（mM）：NaCl（140）、KCl（3）、CaCl₂（1）、MgCl₂（2）、glucose（33）、HEPES（10））を灌流し、細胞内電位を whole-cell voltage-clamp 法で測定した。Cl 誘発電流を最大化するため、TTX（0.5μM）を含む灌流溶液に GABA（3μM）及び GABA_A 受容体作用物質（作用濃度（μM）：ミダゾラム（1）、ランタン（300）、亜鉛（300）、ペントバルビタール（10）及びビククリン（30））を添加し、GABA 電流を誘発した。成熟ラット又は老齢ラットの内側中隔・対角帯核ニューロン標本における GABA 誘発電流に対するミダゾラムとビククリン及びその他 GABA_A 受容体作用物質の作用を図 2.6.2.2-11 に示す。



A) GABA 誘発電流チャートの典型例,
 B) GABA 誘発電流に対する La（ランタン）、Zn（亜鉛）、
 Pento（ペントバルビタール）、Midaz（ミダゾラム）、
 Bic（ビククリン）添加時の GABA 誘発電流変化率
 平均値±SE

*：成熟ラット群に対して p<0.05（Student's t-test）

図 2.6.2.2-11 成熟ラット及び老齢ラットの内側中隔・対角帯核ニューロン標本における GABA 誘発脱分極電流に対するミダゾラム及びビククリンの作用
 （資料番号 4.2.1.1.2-10〔参考資料〕の図 5 を改変）

ミダゾラム、ランタン及びペントバルビタールはラット内側中隔・対角帯核ニューロン標本における GABA 誘発脱分極に対して増強作用を示した。ランタン及びペントバルビタールの増強作用は加齢の影響を受けないが、ミダゾラムの増強作用は加齢に伴い増強した。また、亜鉛及びビククリンは GABA 誘発脱分極に対して抑制作用を示したが、この作用は加齢の影響を受けなかった。

2.6.2.2.3 *In vivo*作用機序試験

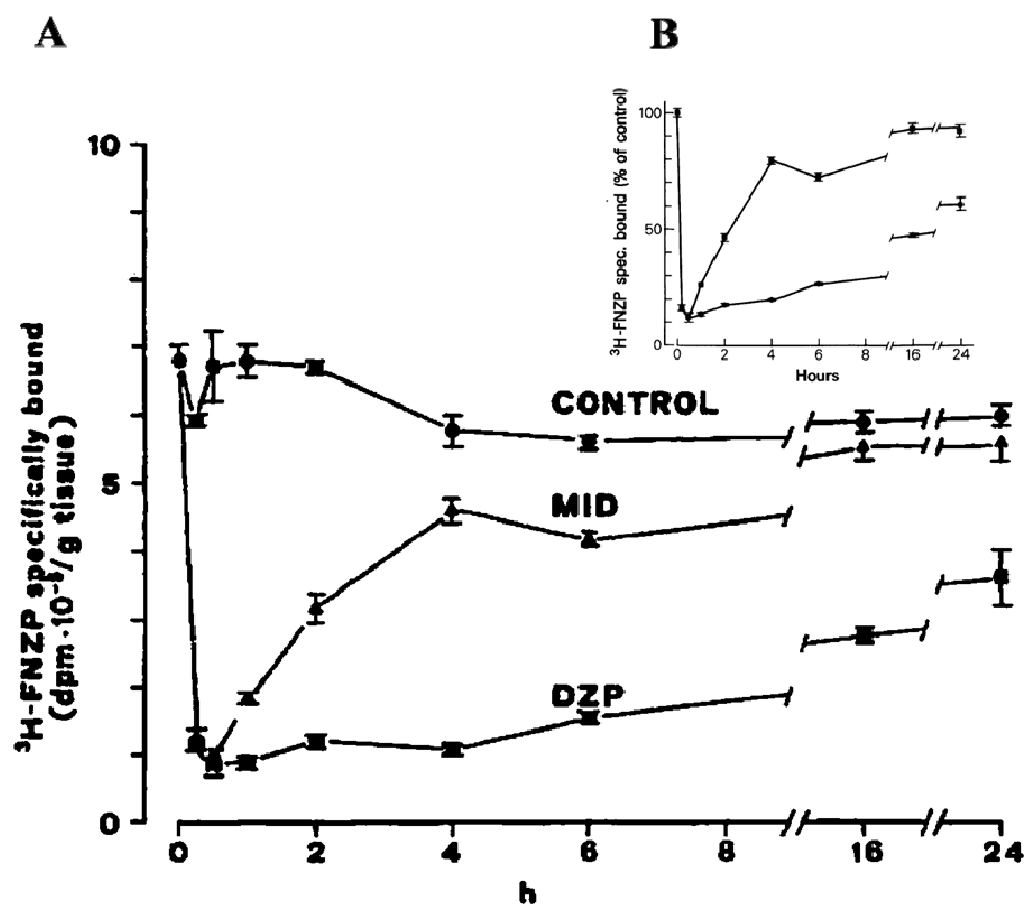
1) ミダゾラム脳内移行の経時的変化

(公表論文, 資料番号: 4.2.1.1.1-6 [参考資料], 4.2.1.1.3-2 [参考資料])

ベンゾジアゼピン結合部位 ($\alpha_1\sim_6\beta_2\gamma_2$) に高い親和性を示す ^3H フルニトラゼパムを用いて, ミダゾラム及びジアゼパムの脳内移行, 脳内ベンゾジアゼピン結合部位の占有率及び占有時間を比較した.

マウスに 10 mg/kg のミダゾラム又はジアゼパムを経口投与後, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 6, 16 及び 24 時間に ^3H フルニトラゼパム (88 Ci/mmol, 300 $\mu\text{Ci/kg}$) を静脈内投与し, 2 分後にマウスから脳を摘出して放射能活性を測定した.

ミダゾラム又はジアゼパム経口投与後の脳内 ^3H フルニトラゼパム結合量及び占有率を図 2.6.2.2.3-1 に示す. また, ミダゾラム又はジアゼパムの経口投与 15 分後における脳内 ^3H フルニトラゼパム結合に対する 50%阻害用量 (ED_{50}) について算出した.



A) ●: コントロール, ▲: ミダゾラム, ■: ジアゼパム, B) ■: ミダゾラム, ●: ジアゼパム
平均値 ± SE (n=3)

図 2.6.2.2.3-1 ミダゾラム経口投与後の脳内 ^3H フルニトラゼパム結合量 (A) 及び占有率 (B)

(資料番号 4.2.1.1.1-6 [参考資料] の図 18 及び 4.2.1.1.3-2 [参考資料] の図 10 を改変)

経口投与 15 分後における脳内³H]フルニトラゼパム結合に対する 50%阻害用量 (ED₅₀) はミダゾラムが 5.5 mg/kg, ジアゼパムは 1.6 mg/kg であった。また, 10 mg/kg のミダゾラム又はジアゼパムを経口投与した直後における脳内ベンゾジアゼピン結合部位の占有率はいずれも約 80~90% であったが, ジアゼパムの占有率は投与後 4 時間経ってもほぼ変化が無く維持されたのに対して, 投与後 4 時間におけるミダゾラムの占有率は約 20%であった。

2.6.2.2.4 代謝物の薬理試験

(公表論文, 資料番号: 4.2.1.1.1-6 [参考資料])

ミダゾラム 10 mg を健康成人に経口投与すると, 代謝物である 1-ヒドロキシミダゾラム (1-OH MDA), 4-ヒドロキシミダゾラム (4-OH MDA) 及び 1,4-ジヒドロキシミダゾラム (1,4-OH MDA) が, 尿中にそれぞれ, 63~66%, 6~8%及び 2~3%の比率で認められる。

そこでマウスを用い, 代謝物の GABA_A 受容体のベンゾジアゼピン結合部位への親和性及び薬理作用 (抗けいれん作用及び筋弛緩作用) について検討した。代謝物は 5%アラビアゴム水溶液に懸濁して腹腔内投与し, その 30 分後に薬理作用を検討した。

ミダゾラム代謝物のベンゾジアゼピン結合部位への親和性及び薬理作用を表 2.6.2.2.4-1 に示す。

表 2.6.2.2.4-1 ミダゾラム代謝物のベンゾジアゼピン結合部位への親和性及び薬理作用
(資料番号: 4.2.1.1.1-6 [参考資料] の表 19 を改変)

		ミダゾラム マレイン酸塩	ミダゾラム	1-OH MDA	4-OH MDA	1,4-OH MDA
親和性	IC ₅₀ 値	4.8	4.8	4.5	12	48
3-MPA けいれん	ED ₅₀ 値	1.0	1.2	19.1	13.9	100
電撃けいれん		17	23.3	>100	75.6	>100
Rotarod test		0.57	1.1	5.2	10.6	46.5
Chimney test		0.68	1.2	5.4	10.1	65.2
PTZ けいれん閾値法		1.4	1.5	58.3	24.4	100

表中の IC₅₀ 値は nmol/L, ED₅₀ 値は mg/kg で表示した。

脳組織を用いた GABA_A 受容体のベンゾジアゼピン結合部位への結合試験において, 1-OH MDA はミダゾラムと同等の親和性を示したが, 4-OH MDA 及び 1,4-OH MDA はミダゾラムに比べ弱い親和性であった。

一方, 代謝物の薬理作用をミダゾラムと比較すると, 1-OH MDA の活性は約 1/5~1/40, 4-OH MDA の活性は約 1/3~1/16 であったが, 1,4-OH MDA の活性は 1/40 以下であり薬理作用は弱かった。

マウスを用いた PTZ 誘発けいれん (70 mg/kg, 静脈内投与) に対する効力 (ED₅₀ 値) の変化から, ミダゾラムマレイン酸塩, 1-OH MDA, 4-OH MDA の抗けいれん作用の経時変化について検討した (詳細な試験方法は p.28 に記載の方法を参照)。試験の結果, 投与 1 分後では, ミダゾラムマレイン酸塩の効果は 1-OH MDA の 12 倍, 4-OH MDA の 100 倍強力であったが, 15 分後では効力差は急速に縮まり, 更に 60 分後では各被験薬の効力に有意な差は認められなかった。この結果は, ピーク時のミダゾラムの抗けいれん作用は, 未変化体に由来することを示唆する。

2.6.2.3 副次的薬理試験

1) 鎮静作用（公表論文，資料番号：4.2.1.1.1-6〔参考資料〕）

雄性ラット（約 200 g）を用いて，ミダゾラムの鎮静作用を異所運動性（自発運動量及び新奇環境探索運動）により評価した．

ラットを 1 群 3 匹として赤外線ビーム自発運動量測定装置（直径：50 cm，高さ：40 cm）に入れ，水平移動量を測定した．新奇環境要因を除くために 3 日間装置内で飼育後試験を行った．30 分間の装置内環境馴化の後，Tween 80 水溶液（2 滴／5 mL）に懸濁した薬物（ミダゾラム，ジアゼパム，オキサゼパム及びフルニトラゼパム）を経口投与して，2 時間の自発運動量を，自発運動量が多い朝に測定した．用量-反応曲線から，対照群の自発運動量を 60 及び 40%減少させる値（ED_{60%}及び ED_{40%}）を求めた．

ミダゾラム及び他のベンゾジアゼピン系化合物の作用を表 2.6.2.3-1 に示す．

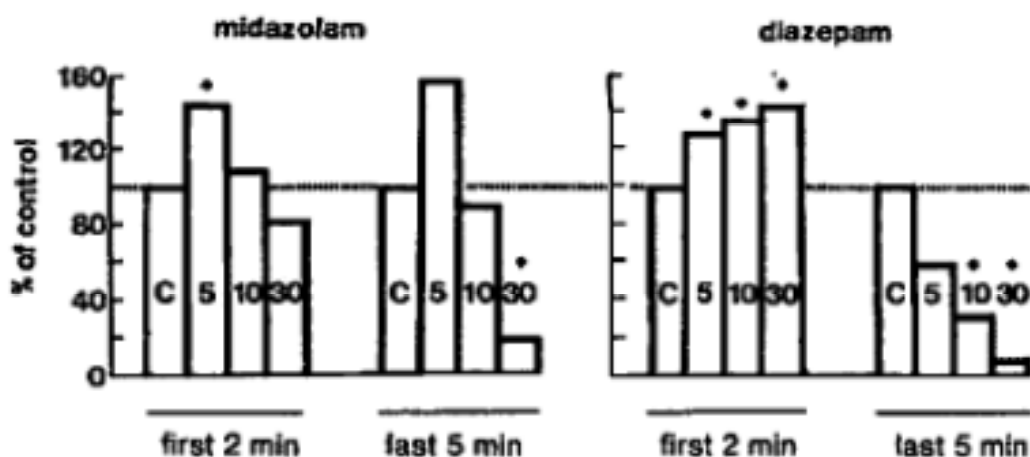
表 2.6.2.3-1 ミダゾラムの自発運動量に及ぼす作用
（資料番号 4.2.1.1.1-6〔参考資料〕の表 3 を改変）

薬物	ED _{60%} (mg/kg)	ED _{40%} (mg/kg)
ミダゾラム	8.2	19.5
ジアゼパム	9.4	29.3
オキサゼパム	11.9	26.6
フルニトラゼパム	0.63	3.9

ミダゾラム，ジアゼパム及びオキサゼパムは同等の鎮静作用を示したが，フルニトラゼパムの作用は 5～19 倍程度強かった．

1 群 10 匹の雄性ラットを用い、5%アラビアゴム水溶液に懸濁した 5, 10, 30 mg/kg のミダゾラム及びジアゼパムを経口投与し、1 時間後にアニメックス運動量自動測定装置に入れ、新奇環境探索行動量を 10 分間測定し、対照群の行動量が 50%減少する用量 (ED_{50} 値) を算出した。

ミダゾラム及びジアゼパムの、測定開始直後 2 分間又は測定終了までの 5 分間の新奇環境探索行動量に対する抑制作用を図 2.6.2.3-1 に示す。



* : コントロールに対して $p < 0.05$

図 2.6.2.3-1 ミダゾラムの測定開始直後 2 分間又は測定終了までの 5 分間における新奇環境探索行動量に対する抑制作用

(資料番号 4.2.1.1.1-6 [参考資料] の図 3 を引用)

ミダゾラムは測定開始直後 2 分の測定では 5 mg/kg で探索運動量の増加が認められた。また、測定終了までの 5 分間の測定では 5 mg/kg で探索運動量の増加が見られたが有意な作用ではなく、さらに 30 mg/kg で著明な探索運動量の低下があり、有意な鎮静作用が認められた。一方、ジアゼパムは測定開始直後 2 分間の測定では 5~30 mg/kg で有意な探索運動量の増加が認められたが、測定終了までの 5 分間の測定では、逆にいずれの用量でも探索運動量の低下があり、10, 30 mg/kg の作用は有意であった。測定終了までの 5 分間の測定における探索運動量低下作用における ED_{50} 値は、ミダゾラムが 17 mg/kg、ジアゼパムが 8 mg/kg であった。

2) 筋弛緩作用

(1) Rotarod 試験 (公表論文, 資料番号: 4.2.1.2-2 [参考資料])

齧歯類 (マウス, ラット) を用いて Rotarod 試験により, ミダゾラムの筋弛緩作用について検討した. ミダゾラムの筋弛緩作用における性差及び週齢差の影響についても併せて検討した.

試験には ICR 系雄性マウス (約 30 g) 又は Sprague-Dawley 系雄性ラット (180~200 g) を用い, 直径 3 cm (マウス) 又は 10 cm (ラット) の回転棒 (毎分 5.4 回転) 上に動物を回転方向と反対向きに乗せ, 1 分間以上とどまることができる動物を 1 群 6~10 匹 (マウス), 又は 6~7 匹 (ラット) 選抜して, 試験を実施した.

ミダゾラムは 1mol 塩酸に溶解後生理食塩水で希釈し, 次いで 1mol NaOH で pH 3.3 付近に調整した. ミダゾラムマレイン酸塩は生理食塩水に溶解して調製し, 用量はフリー塩基に換算して表示した. またジアゼパムは 10% ポリエチレングリコール含有生理食塩水で調製した.

薬物を静脈内投与後 1, 5, 15, 30, 45 及び 60 分後に (ミダゾラムは筋肉内投与試験を併せて実施し, 投与後 1, 5, 10, 20, 30, 45, 60 及び 120 分後に) 動物を回転棒上に乗せ 1 分間とどまれるかどうか試験を行った. 1 分間以内に落下した場合に筋弛緩作用陽性と判断し, 陽性動物数から, 各試験時間の ED₅₀ 値を算出した.

マウス及びラットにおけるミダゾラム, ミダゾラムマレイン酸塩及びジアゼパムの試験結果を, それぞれ表 2.6.2.3-2 及び表 2.6.2.3-3 に示す.

表 2.6.2.3-2 マウスにおけるミダゾラムの筋弛緩作用 (Rotarod 試験)

(資料番号 4.2.1.2-2 の表 1, 2 を改変)

静脈内投与 試験	投与後の時間（分）							
	1	5	15	30	45	60		
	ED ₅₀ 値（95%信頼区間）[mg/kg]							
ミダゾラム	0.19 (0.12-0.30)	0.55 (0.30-0.99)	0.89 (0.52-1.50)	1.50 (0.81-4.00)	>3.0	>3.0		
ミダゾラム マレイン酸塩	0.19 (0.09-0.32)	0.49 (0.31-0.77)	1.0～3.0	1.73 (1.16-2.58)	>3.0	>3.0		
ジアゼパム	0.55 (0.36-0.84)	1.90 (1.06-3.40)	3.0～10	3.0～10	3.0～10	3.0～10		
筋肉内投与 試験	投与後の時間（分）							
	1	5	10	20	30	45	60	120
	ED ₅₀ 値（95%信頼区間）[mg/kg]							
ミダゾラム	0.56 (0.28-1.1)	0.95 (0.47-1.9)	2.1 (0.98-4.6)	2.4 (1.1-5.8)	3.1 (1.7-6.7)	5.6 (2.6-39.)	>10	>10

表 2.6.2.3-3 ラットにおけるミダゾラムの筋弛緩作用 (Rotarod 試験)

(資料番号 4.2.1.2-2 の表 3, 4 を改変)

静脈内投与 試験	投与後の時間（分）							
	1	5	15	30	45	60		
	ED ₅₀ 値（95%信頼区間）[mg/kg]							
ミダゾラム	0.28 (0.11-0.58)	0.55 (0.28-1.10)	1.28 (0.65-2.61)	1.73 (0.94-3.28)	>3.0	>3.0		
ミダゾラム マレイン酸塩	0.23 (0.12-0.47)	0.47 (0.25-0.89)	0.95 (0.49-1.9)	1.78 (0.89-5.82)	>3.0	>3.0		
ジアゼパム	0.38 (0.18-0.82)	0.79 (0.37-1.69)	2.14 (0.94-41.5)	2.14 (0.94-41)	>3.0	>3.0		
筋肉内投与 試験	投与後の時間（分）							
	1	5	10	20	30	45	60	120
	ED ₅₀ 値（95%信頼区間）[mg/kg]							
ミダゾラム	0.74 (0.36-1.5)	0.55 (0.27-1.1)	0.73 (0.29-1.7)	0.87 (0.44-1.7)	1.0～3.0	1.0～3.0	4.8 (2.5-12)	>10

マウスの試験では、静脈内投与した時、ミダゾラムの筋弛緩作用は投与後 1 分でピークとなり、約 30 分間持続し、ジアゼパムの作用より強力であった。ミダゾラムマレイン酸塩の作用もほぼ同等であった。ミダゾラムを筋肉内投与した場合には、投与 1 分後に筋弛緩作用はピークを示し、約 45 分間作用が持続した。

ラットの試験でも、静脈内投与した時のミダゾラム及びミダゾラムマレイン酸塩の作用は、マウスの時と同じで、筋弛緩作用は投与後 1 分でピークとなり、約 30 分の持続が認められたが、ジアゼパムとの効力の差はマウスの場合ほど大きくはなかった。ミダゾラムを筋肉内投与した場合には、投与 5 分後に筋弛緩作用はピークを示し、その作用は約 60 分間持続した。

次に Rotarod 試験により, ミダゾラムの筋弛緩作用における性差及び週齢差について検討した. 性差については 6 週齢の雄 (29~35 g) 及び雌 (22~27 g) の間で, 週齢差については 4 週齢 (18~23 g), 20 週齢 (40~60 g) 及び性差の試験で使用した 6 週齢の ICR 系雄性マウスの中で検討した. 試験方法は前述のマウスの方法と同様である.

ミダゾラムの筋弛緩作用における性差及び週齢差の影響を表 2.6.2.3-4 に示す.

表 2.6.2.3-4 ミダゾラムの筋弛緩作用 (マウス) における性差及び週齢差の影響
(資料番号 4.2.1.2-2 の表 5, 6 を改変)

性	週 齢	投与後の時間 (分)					
		1	5	15	30	45	60
		ED ₅₀ 値 (95%信頼区間) [mg/kg]					
♂	4	0.16 (0.096-0.24)	0.38 (0.21-0.67)	1.00 (0.61-1.80)	2.20 (1.40-4.30)	>3.0	>3.0
	6	0.19 (0.12-0.30)	0.55 (0.30-0.99)	0.89 (0.52-1.50)	1.50 (0.81-4.00)	>3.0	>3.0
	20	0.17 (0.075-0.28)	0.3~1.0	0.3~1.0	1.00 (0.62-1.70)	2.20 (1.40-4.30)	3.0
♀	6	0.19 (0.085-0.32)	0.49 (0.30-0.81)	1.0~3.0	1.20 (0.71-2.30)	2.50 (1.50-8.30)	>3.0

マウスの Rotarod 試験によるミダゾラムの筋弛緩作用の検討において, 性差及び年齢差は認められなかった.

(2) Chimney 試験（公表論文，資料番号：4.2.1.1.1-6〔参考資料〕）

Chimney 試験によりミダゾラムの筋弛緩作用を検討した。試験には 1 群 12 匹の雌性マウス（19～21 g）を用いた。薬物はミダゾラムを蒸留水に溶解させて調製した他，ジアゼパム，オキサゼパム，フルニトラゼパム及びトリアゾラムは 5%アラビアゴム水溶液に懸濁して調製し，25 mL/kg の容量で経口投与した後 30 分に Chimney 試験を行った。試験方法は，直径 28 mm，高さ 20 cm の垂直に立てたガラスチューブを用い，マウスの頭を下向きにさせた姿勢で，後ろ向きに，チューブの下から頂上まで，綿棒を使って登らせその時間を測定した。正常マウスは 30 秒以内に頂上まで登ることができるので，30 秒以内に頂上まで到達しないマウスを作用陽性と判定し，その数により ED₅₀ 値及び 95%信頼区間を算出した。

ミダゾラム，ジアゼパム，オキサゼパム，フルニトラゼパム及びトリアゾラムの Chimney 試験の結果を表 2.6.2.3-5 に示す。

表 2.6.2.3-5 ミダゾラムの筋弛緩作用（Chimney 試験）

(資料番号 4.2.1.1.1-6〔参考資料〕の表 2 を改変)

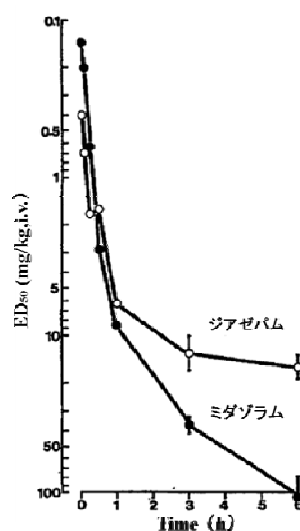
薬物	ED ₅₀ 値 (95%信頼区間) [mg/kg]
ミダゾラム	0.57 (0.41-0.80)
ジアゼパム	2.1 (1.5-2.9)
オキサゼパム	11.2 (7.8-16.2)
フルニトラゼパム	0.23 (0.13-0.40)
トリアゾラム	0.05 (0.04-0.06)

ミダゾラムは，ジアゼパムやオキサゼパムに比べ筋弛緩作用は強力であったが，フルニトラゼパムやトリアゾラムよりは弱かった。

(3) Pole-climbing 試験（公表論文，資料番号：4.2.1.1.1-6〔参考資料〕）

Pole-climbing 試験によりミダゾラムの筋弛緩作用を検討した．試験には 1 群 10 匹の CD-1 系雄性マウス（17～25 g）を用いた．ミダゾラムマレイン酸塩は精製水に溶解して調製し，ジアゼパムは溶媒〔組成（%）：プロピレングリコール（40），エチルアルコール（10），安息香酸ナトリウム＋安息香酸（5）及びベンジルアルコール（1.5）〕に溶解して調製し，静脈内投与した．薬物投与 1 分～6 時間（7 ポイント）後に Pole-climbing 試験を行った．試験方法は，垂直に立てた 52 cm の棒の頂点に取り付けた直径 28 mm，厚さ 28 mm のストッパー上にマウスを置き，棒をゆっくりと引くことによりマウスを頂上まで登らせた．頂上に到達できないマウスを作用陽性と判定し，その数により各測定時点における ED₅₀ 値を算出した．

ミダゾラムマレイン酸塩及びジアゼパムの Pole-climbing 試験の結果を図 2.6.2.3-2 に示す．



●：ミダゾラム，○：ジアゼパム

図 2.6.2.3-2 ミダゾラムマレイン酸塩及びジアゼパムの筋弛緩作用
（資料番号 4.2.1.1.1-6〔参考資料〕の図 2 を改変）

ミダゾラムは作用発現の速い筋弛緩及び運動協調障害作用が認められ，作用のピークは投与 1 分後であり，同時点のジアゼパムの作用より 3 倍強かった．しかし，ミダゾラムの作用は急速に減弱し，投与 1 時間後の作用はジアゼパムの 2/3 となり逆転した．

3) 抗不安作用

(1) 受動回避学習行動試験（公表論文，資料番号：4.2.1.1.1-6〔参考資料〕）

受動回避学習行動試験により，ミダゾラムの抗不安作用を検討した．試験には CD 系雄性ラット（275～300 g）を用いた．被験薬とその調製法は，ミダゾラムマレイン酸塩については精製水に溶解して，またジアゼパムについては 5%アラビアゴム水溶液に懸濁して調製し，いずれも経口投与した．最初に，ラットに少なくとも 40 秒間に 1 回，回避レバーを押すことにより，足の電撃ショック（0.6 mA）が回避できることを学習訓練させた．もしこの頻度でレバー押しを行わなかった場合には，電撃ショックを加え，この時，ラットが回避レバーを押せば，電撃は終了させ，もしラットが回避用レバーを押さなかった場合は 5 秒後に自動的に電撃を終了させた．また，ラットが上記の決められた条件で回避用レバーを押さない場合には，自動的に 20 秒間隔で電撃を与えた．被験薬の試験は隔週で 3 時間かけて行い，薬物評価の間の週に対照試験を実施した．

ミダゾラムマレイン酸塩及びジアゼパムの，受動回避学習行動試験による抗不安作用の結果を表 2.6.2.3-6 に示す．

表 2.6.2.3-6 ミダゾラムマレイン酸塩の受動回避学習行動試験による抗不安作用

（資料番号：4.2.1.1.1-6〔参考資料〕の表 5 を改変）

薬物（例数）		ミダゾラムマレイン酸塩 (4)	ジアゼパム (6)
被電撃頻度増加	最小有効量 (mg/kg, 経口投与)	9.3	5.6
回避頻度減少		13.3	10.1
回避行動無し		77.8	65.0

受動回避学習行動試験におけるミダゾラムマレイン酸塩及びジアゼパムの作用は同等であり，半数のラットが被電撃頻度増加及び回避頻度減少を示したが，回避行動を消失させるためには高用量が必要であった．

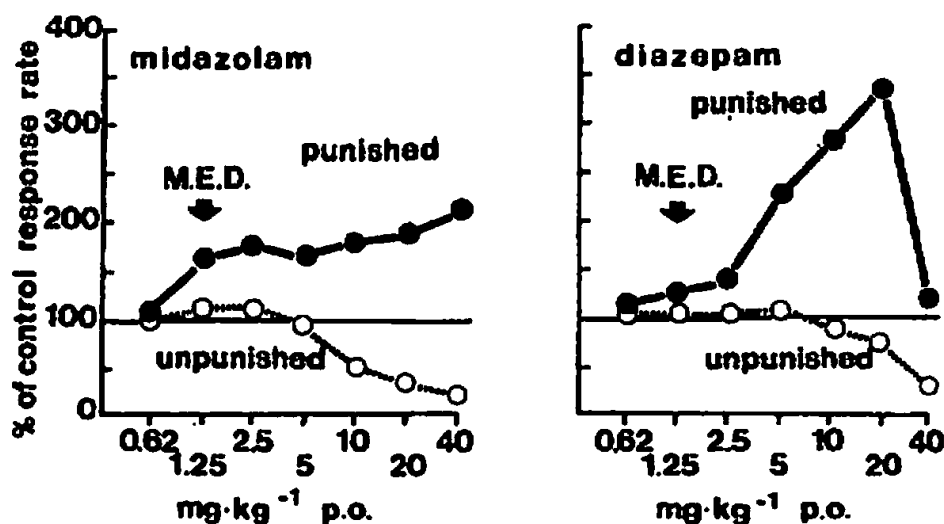
(2) Geller-Seifter 型コンフリクト試験（公表論文，資料番号：4.2.1.1.1-6〔参考資料〕）

Geller-Seifter 型コンフリクト試験によりミダゾラムマレイン酸塩の抗不安作用を検討した．試験は CD 系雄性ラット（試験開始時 250 g）及び雄性リスザル（給餌制限により 0.8～1 kg の体重を維持）で実施した．薬物は，ミダゾラムマレイン酸塩については精製水に溶解して，またジアゼパムについては 5%アラビアゴム水溶液に懸濁して調製し，経口投与した．

a) ラット

試験は給餌制限下、レバーが1つ付いたオペラントチャンバー内で、1日47分間、週に5日のスケジュールで実施した。オペラントスケジュールは、白色光点灯下では、ランダムなレバー押しに対して平均1ペレット/30秒（変動時間間隔強化（VI）30）で給餌し、一方、赤色光点灯下では10回のレバー押しに対して1回（定率強化（FR）10）で給餌すると同時に足に0.1秒間の電撃ショックを与えた。1日の試験は、この白色光点灯（5分間）と赤色光点灯（2分間）交互に47分間繰り返すスケジュールで実施した。月～水曜日に溶媒を投与してその平均値を対照とし、また木曜日に薬物を投与し、反応率を算出した。薬物経口投与35～50分後に試験を実施し、ミダゾラムマレイン酸塩群が4～8匹、ジアゼパム投与群は5匹を用いた。

ミダゾラムマレイン酸塩及びジアゼパムの Geller-Seifter 型コンフリクト試験における抗不安作用を図 2.6.2.3-3 に示す。



●：赤色光点灯下，○：白色光点灯下，M.E.D.：最小有効量

図 2.6.2.3-3 ミダゾラムマレイン酸塩の Geller-Seifter 型コンフリクト試験における抗不安作用
(資料番号 4.2.1.1.1-6 [参考資料] の図 5 を引用)

一定数のレバー押し行動に対して電撃ショックを負荷して、ラットを条件付けさせると、レバー押し行動は著しく減少し、白色光点灯下では40～80回/分であるのに対して、赤色光点灯下では4～13回/分であった。これは餌を得たいという欲求と電撃ショックという罰に対する不安・恐怖から葛藤状態が惹起されるためである。このため赤色光点灯下でレバー押し行動が増加した場合は、抗不安作用が認められ、白色光点灯下でレバー押し行動が減少した場合は、鎮静作用が示唆される。ミダゾラムマレイン酸塩における抗不安作用の最小有効量は1.25 mg/kg、鎮静作用の発現量は10 mg/kg以上であった。一方、ジアゼパムにおける抗不安作用の最小有効量はミダゾラムと同様、1.25 mg/kgであったが、鎮静作用の発現量は20 mg/kg以上とミダゾラムより弱かった。

b) リスザル

試験は給餌制限下、2つのレバーの付いたオペラントチャンバーの中で、1日90分間、週に5日のスケジュールで実施した。オペラントスケジュールは、罰無しレバーを押すとランダムなレバー押しに対して平均6分（VI 6分）で給餌し、一方、罰有りレバーを押すと平均1.5分間隔（VI 1.5分）で給餌を行うと同時に、足に断続的な電撃ショックを与え、再び罰有りレバーを押すと電撃ショックを終了させた。月～水曜日に溶媒を投与してその平均値を対照とし、また木曜日に薬剤を投与し、反応率を算出した。薬物経口投与後30分に試験を実施し、各群9匹のリスザルを用いた。

ミダゾラムマレイン酸塩及びジアゼパムのリスザルの Geller-Seifter 型コンフリクト試験における抗不安作用を図 2.6.2.3-4 に示す。

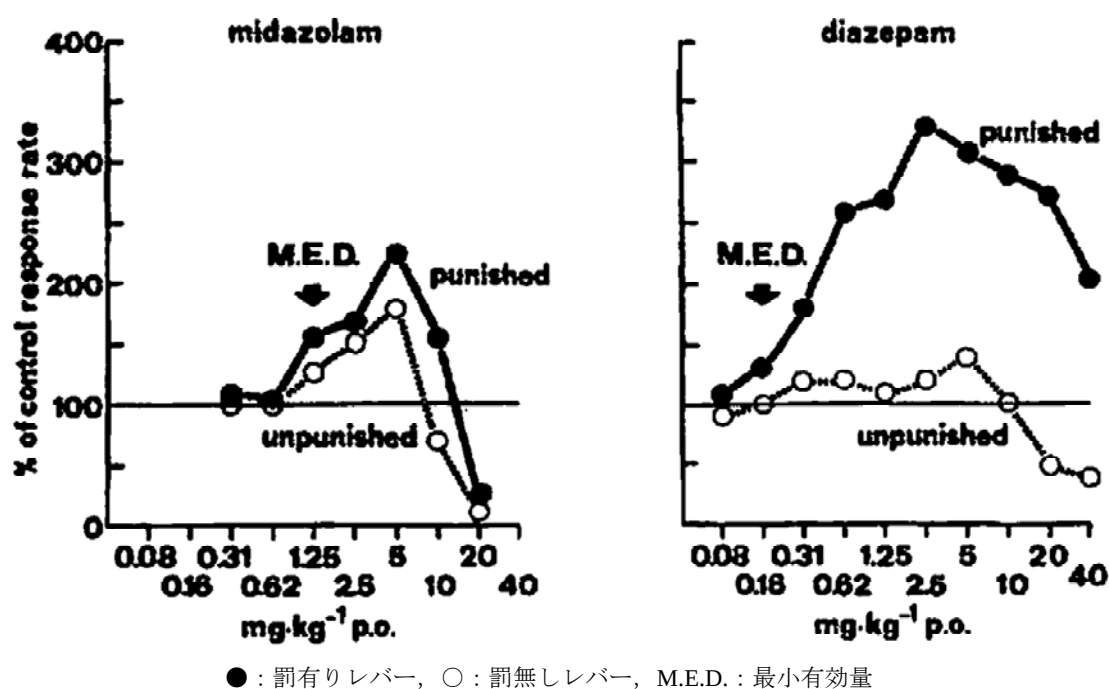


図 2.6.2.3-4 ミダゾラムマレイン酸塩のリスザルの

Geller-Seifter 型コンフリクト試験における抗不安作用

(資料番号 4.2.1.1.1-6 [参考資料] の図 6 を引用)

ミダゾラムマレイン酸塩の抗不安作用の最小有効量は 1.25 mg/kg、持続時間は 60～70 分であったが、選択的な抗不安作用を示す用量範囲（1.25～5 mg/kg）は狭く、20 mg/kg では抗不安作用は消失し、鎮静作用が認められた。一方、ジアゼパムは広い用量範囲（0.16～10 mg/kg）で選択的抗不安作用が認められ、最小有効量は 0.16～0.31 mg/kg であり、試験時間の 90 分を通じて作用が持続した。20 mg/kg 以上では鎮静作用が認められた。

4) 催眠作用

(1) マウス及びラットにおける麻酔作用（公表論文，資料番号：4.2.1.1.1-6〔参考資料〕）

ミダゾラムの麻酔作用をマウス及びラットで検討した。試験方法はミダゾラムを経口投与又は静脈内投与した後，以下の方法で睡眠作用又は麻酔作用の有無について評価した。指標として「正向反射」と「屈筋反射」を用いた。正向反射は動物を仰向けにして置いた時に1分以内に元の姿勢に戻る反射，屈筋反射は脚や尾の先端を歯科用鉗子で掴んだ時に引き返す反射であり，「睡眠」は正向反射が消失しているが，屈筋反射はある状態，「麻酔」は正向反射も屈筋反射も消失した状態と定義した。なお，各投与群の例数は3以上とした。

雄性マウス（18～22 g）にミダゾラム 0.625, 1.25, 2.5, 5, 10, 20 及び 100 mg/kg を経口投与すると運動量の減少と筋弛緩作用が用量依存的に認められたが，正向反射の消失は認められなかった。また，ミダゾラム 50 mg/kg を静脈内投与すると，3 匹中 3 匹の正向反射が消失したが，屈筋反射は消失しなかった。

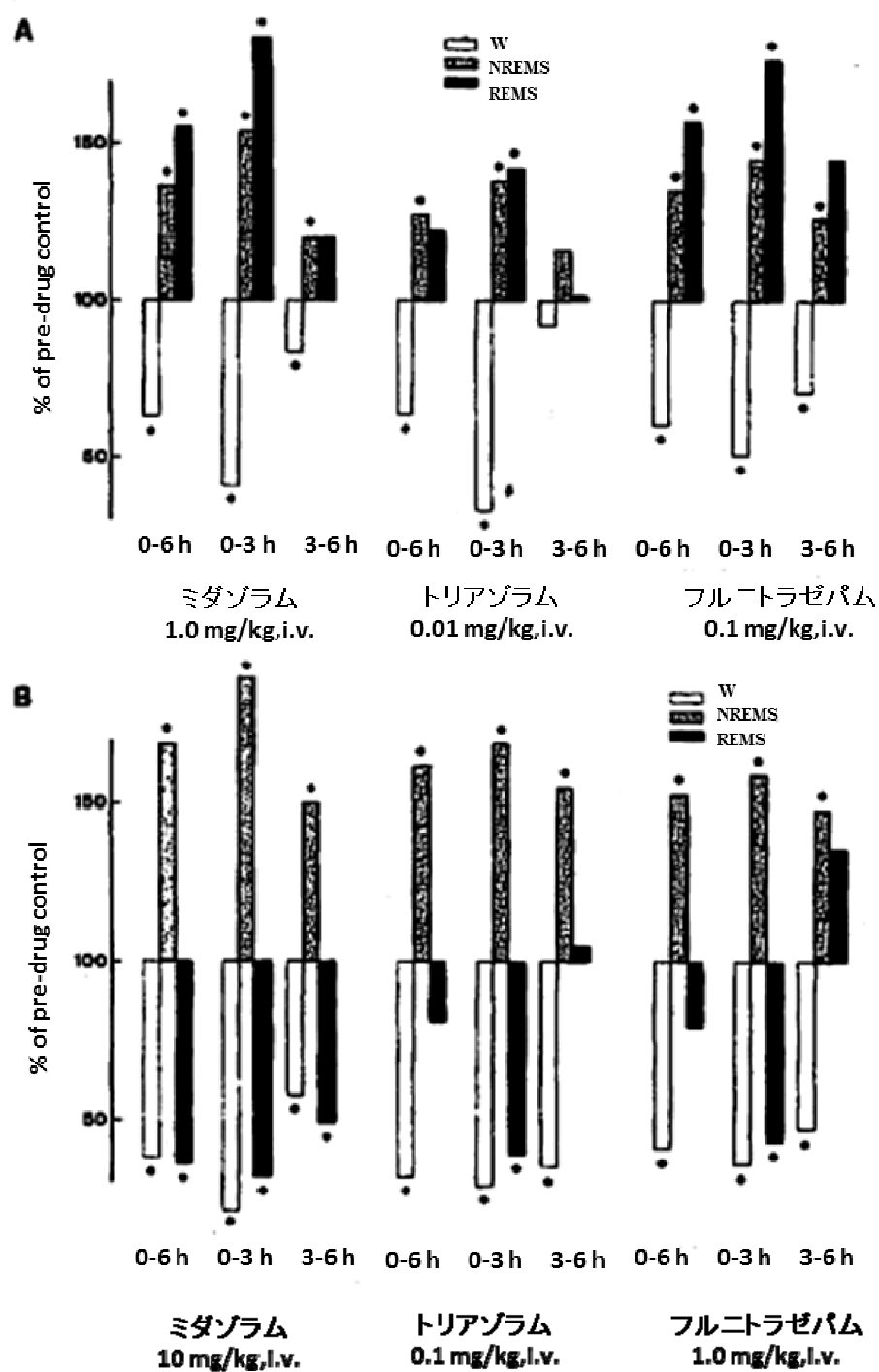
雄性ラット（180 g）にミダゾラム 5 mg/kg を静脈内投与すると運動量の減少と筋弛緩作用が認められたが，完全な正向反射の消失は認められず，屈筋反射も消失しなかった。ミダゾラム 10 mg/kg を静脈内投与すると 2 匹中 1 匹のみ正向反射及び屈筋反射の消失が認められた。また，25 及び 50 mg/kg では 2 匹中 2 匹のラットにおいて正向反射消失及び部分的な屈筋反射の消失が認められたが，明確な麻酔作用は示さなかった。

(2) ウサギの睡眠-覚醒サイクルに及ぼす作用（公表論文，資料番号：4.2.1.1.1-6〔参考資料〕）

ウサギ脳波試験により，ミダゾラムの睡眠-覚醒サイクルに及ぼす作用について検討を行った。試験には wildfarben 系雄性ウサギ（約 3 kg）を用い，測定前に電極埋め込み手術を行って，大脳皮質感覚運動野，背側海馬に脳波用電極を，頸筋，耳翼筋及び眼瞼筋には筋電図用電極を刺入し，脳波，筋電図及び眼球運動を測定した。被験薬とその調製法は，ミダゾラムについては生理食塩水に溶解して，トリアゾラムとフルニトラゼパムについてはベンゾジアゼピン用溶媒に溶解して調製し，測定開始 5 分前に静脈内投与した。脳波・筋電図・眼球運動の測定は連続した 4 日間から成り，順に馴化日，薬物投与前日，薬物投与日及び薬物投与後日とし，それぞれ 6 時間（AM 9:00～PM 3:00）ポリグラフにより測定した。

睡眠-覚醒サイクルは 5 秒単位で，覚醒（wakefulness：W），ノンレム睡眠（non-rapid eye movement sleep：NREMS），及びレム睡眠（rapid eye movement sleep：REMS）の 3 ステージに分類した。試験日ごとの W，NREMS，REMS の量（総試験時間 [0～6 時間]，試験前半 [0～3 時間] 及び試験後半 [3～6 時間] の 3 区分）を算出して，薬物投与前日のコントロール値と比較した。

ミダゾラム，トリアゾラム及びフルニトラゼパムの睡眠-覚醒サイクルに及ぼす作用を図 2.6.2.3-5 に示す。



A) 低用量の各被験薬, B) 高用量の各被験薬
 平均値

*: 投与前値に対して $p < 0.05$ (Paired t-test)

図 2.6.2.3-5 ミダゾラムの睡眠-覚醒サイクルに及ぼす作用 (ウサギ脳波試験)

(資料番号 4.2.1.1.1-6 [参考資料] の図 10 を改変)

いずれもベンゾジアゼピン系薬物である 3 つの被験薬は W (0-6 h) を減少させ、NREMS (0-6 h) を増加させ、これらの作用の強さは用量に比例していた。また、低用量の各被験薬は REMS (0-6 h) を増加させ、トリアゾラムとフルニトラゼパムは高用量でも同様の作用を示したが、ミダゾラムは高用量で REMS (0-6 h) を減少させた。

2.6.2.4 安全性薬理試験

2.6.2.4.1 ミダゾラムの安全性薬理試験コアバッテリー試験（中枢神経系，心血管系及び呼吸系に及ぼす影響）

2.6.2.4.1.1 中枢神経系に及ぼす影響

ミダゾラムの中枢神経系に及ぼす影響を検討するため，マウス，ラット及びサルにおける一般行動及び症状観察を行った。

1) マウスの一般行動及び症状観察試験（公表論文，資料番号：4.2.1.2-2〔参考資料〕）

試験には ICR 系雄性マウス（30～34 g）を使用し，被験薬はミダゾラム（フリー塩基），ミダゾラムマレイン酸塩，ジアゼパムとした．被験薬の薬物調製法は，ミダゾラムについては 1mol HCl に溶解後，生理食塩水で希釈し，次いで 1mol NaOH を用いて pH 3.3 付近に調整した．ミダゾラムマレイン酸塩は生理食塩水で溶解し，用量はフリー塩基に換算して表示した．ジアゼパムは 10%プロピレングリコール含有生理食塩水に溶解して使用した．

一群 8～10 匹のマウスに，被験薬を静脈内投与した時の一般行動及び症状観察を 60～120 分間行った．ミダゾラムについては筋肉内投与した時の試験も実施した．

ミダゾラム及びミダゾラムマレイン酸塩のマウス一般行動及び症状観察結果を表 2.6.2.4.1.1-1 に示す．

表 2.6.2.4.1.1-1 マウスの一般行動及び症状観察試験

薬物	用量 (mg/kg)	投与経路 (例数)	一般行動及び症状観察所見	作用消失時間
ミダゾラム	0.1	静脈内 (10)	落ち着きのなさ (5/10)	5 分
	0.3		よろめき歩行 (10/10), 筋弛緩 (8/10), 鎮静 (1/10), 運動量減少 (5/10)	15 分
	1		よろめき歩行 (10/10), 筋弛緩 (8/10), 鎮静 (6/10), 運動量減少 (2/10)	30 分
	3		よろめき歩行 (10/10), 筋弛緩 (10/10), 鎮静 (10/10), 運動量減少 (2/10)	60 分
	10		よろめき歩行 (10/10), 筋弛緩 (10/10), 鎮静 (10/10)	90～120 分
	30		よろめき歩行 (10/10), 筋弛緩 (10/10), 鎮静 (10/10)	90～120 分
	0.1	筋肉内 (8)	特記所見無し	-
	0.3		よろめき歩行 (1/8)	-
	1		よろめき歩行 (5/8), 筋弛緩 (6/8), 鎮静 (2/8), 運動量減少 (4/8)	45 分
	3		よろめき歩行 (8/8), 筋弛緩 (8/8), 鎮静 (5/8), 運動量減少 (6/8), 立毛 (1/8)	60 分
	10		よろめき歩行 (8/8), 筋弛緩 (8/8), 鎮静 (7/8), 運動量減少 (6/8), 立毛 (2/8)	120 分
ミダゾラム マレイン酸塩	0.1	静脈内 (10)	落ち着きのなさ (4/10)	5 分
	0.3		よろめき歩行 (6/10), 筋弛緩 (6/10), 鎮静 (1/10)	15 分
	1		よろめき歩行 (10/10), 筋弛緩 (10/10), 鎮静 (10/10), 運動量減少 (1/10)	30 分
	3		よろめき歩行 (10/10), 筋弛緩 (10/10), 鎮静 (10/10)	60 分
ジアゼパム	0.1	静脈内 (10)	特記所見無し	-
	0.3		よろめき歩行 (1/10)	5 分
	1		よろめき歩行 (10/10), 筋弛緩 (9/10), 鎮静 (1/10)	5～15 分
	3		よろめき歩行 (10/10), 筋弛緩 (10/10), 鎮静 (4/10)	30 分

2) ラットの一般行動及び症状観察試験（公表論文，資料番号：4.2.1.2-2〔参考資料〕）

一群 6～7 匹の Sprague-Dawley 系雄性ラット（180～200 g）を用いて，ミダゾラム，ミダゾラムマレイン酸塩，1-OH MDA 及びジアゼパムを静脈内投与した時の一般行動及び症状観察を 60～120 分間行った．ミダゾラムについては筋肉内投与した時の一般行動及び症状観察も実施した．薬物調製法等はマウスの場合と同様であり，1-OH MDA についてはミダゾラムと同様に薬物調製した．

ミダゾラム及びミダゾラム関連化合物のラット一般行動及び症状観察結果を表 2.6.2.4.1.1-2 に示す．

表 2.6.2.4.1.1-2 ラットの一般行動及び症状観察試験

薬物	用量 (mg/kg)	投与経路 (例数)	一般行動及び症状観察所見	作用消失時間
ミダゾラム	0.1	静脈内 (7)	よろめき歩行 (5/7)	5～15 分
	0.3		よろめき歩行 (6/7)，筋弛緩 (3/7)	15～30 分
	1		よろめき歩行 (7/7)，筋弛緩 (7/7)，鎮静 (5/7)，運動量減少 (4/7)	45～60 分
	3		よろめき歩行 (7/7)，筋弛緩 (7/7)，鎮静 (7/7)，運動量減少 (5/7)	45～60 分
	0.1	筋肉内 (6～7)	よろめき歩行 (1/6)，筋弛緩 (1/6)	-
	0.3		よろめき歩行 (4/7)	20 分
	1		よろめき歩行 (7/7)，筋弛緩 (4/7)	45 分
	3		よろめき歩行 (7/7)，筋弛緩 (7/7)，鎮静 (6/7)，運動量減少 (6/7)	60 分
	10		よろめき歩行 (5/6)，筋弛緩 (6/6)，鎮静 (6/6)，運動量減少 (6/6)	120 分
ミダゾラム マレイン酸塩	0.1	静脈内 (7)	よろめき歩行 (5/7)，筋弛緩 (1/7)	5～15 分
	0.3		よろめき歩行 (7/7)，筋弛緩 (2/7)，鎮静 (1/7)	15～30 分
	1		よろめき歩行 (7/7)，筋弛緩 (7/7)，鎮静 (7/7)，運動量減少 (3/7)	45～60 分
	3		よろめき歩行 (7/7)，筋弛緩 (7/7)，鎮静 (7/7)，運動量減少 (7/7)	45～60 分
1-OH MDA	0.3	静脈内 (6)	よろめき歩行 (1/6)	-
	1		よろめき歩行 (3/6)，筋弛緩 (3/6)，運動量減少 (1/6)	15～30 分
	3		よろめき歩行 (6/6)，筋弛緩 (6/6)，鎮静 (6/6)，運動量減少 (6/6)	45～60 分
	10		よろめき歩行 (6/6)，筋弛緩 (6/6)，鎮静 (6/6)，運動量減少 (6/6)	45～60 分
ジアゼパム	0.1	静脈内 (6)	よろめき歩行 (4/6)，筋弛緩 (1/6)	15 分
	0.3		よろめき歩行 (6/6)，筋弛緩 (1/6)	15～30 分
	1		よろめき歩行 (6/6)，筋弛緩 (6/6)，鎮静 (3/6)，運動量減少 (3/6)	60 分
	3		よろめき歩行 (6/6)，筋弛緩 (6/6)，鎮静 (6/6)，運動量減少 (6/6)	60 分

3) サルの一般行動及び症状観察試験（公表論文，資料番号：4.2.1.2-2〔参考資料〕）

一群 4～6 頭の雄性カニクイザル（約 3 kg）を用いて、ミダゾラム及びジアゼパムを静脈内投与した時の一般行動及び症状観察を 60 分間行った。薬物調製法はマウスの場合と同様に行った。サルをモンキーチェアに固定し、右又は左側伏在静脈内に薬物投与した後、直ちに飼育ケージに戻し、一般行動及び症状観察を行った。

ミダゾラムのサル一般行動及び症状観察試験結果を表 2.6.2.4.1.1-3 に示す。

表 2.6.2.4.1.1-3 サルの一般行動及び症状観察試験

薬物	用量 (mg/kg)	投与経路 (例数)	一般行動及び症状観察所見	作用消失時間
ミダゾラム	0.03	静脈内 (4～6)	特記所見無し	-
	0.1		筋弛緩又は鎮静 (4/6)	30～45 分
	0.3		筋弛緩 (6/6), 鎮静 (6/6)	30～90 分
	1		筋弛緩 (4/4), 鎮静 (4/4), 傾眠 (2/4), 睡眠 (1/4)	90～120 分
	3		筋弛緩 (4/4), 鎮静 (4/4), 傾眠 (3/4), 睡眠 (2/4)	90～120 分
ジアゼパム	0.1	静脈内 (4)	特記所見無し	-
	0.3		筋弛緩又は鎮静 (4/4)	5～30 分
	1		筋弛緩 (4/4), 鎮静 (4/4)	15～30 分

マウス、ラット及びサルを用いたミダゾラムの一般行動及び症状観察試験において、よろめき歩行、筋弛緩、鎮静、運動量減少及び傾眠・睡眠等の所見が認められた。またマウスやラットにおいてミダゾラムとミダゾラムマレイン酸塩の所見に差は認められなかった。

2.6.2.4.1.2 心血管系に及ぼす影響

1) 麻酔イヌにおける作用（公表論文，資料番号：4.2.1.1.1-6〔参考資料〕，4.2.1.2-2〔参考資料〕）

試験には雌雄雑種成イヌ（8.5～16.7 kg）を用いた。ミダゾラムと 1-OH MDA の薬物調製法はラットの一般行動及び症状観察試験と同様とし，またペントバルビタール，チオペンタール，ケタミン，フェンタニール，ドロペリドールについては市販の注射剤を希釈して使用した。

ペントバルビタール麻酔イヌにおけるミダゾラムの心血管系に及ぼす作用を検討するため，ミダゾラム 0.1～1 mg/kg 又は 1-OH MDA 1 mg/kg を静脈内投与した時の血圧（収縮期，拡張期及び平均），心拍数及び心機能を測定した（n=4～5）。

次に，ミダゾラムと麻酔薬との相互作用による心血管系に及ぼす影響を検討するため，ペントバルビタール麻酔下雌雄雑種成イヌ（8.5～23.5 kg）にミダゾラム 1 mg/kg を静脈内投与した直後に，チオペンタール（5～10 mg/kg），ケタミン（0.1～5 mg/kg）又はフェンタニール（0.5～5 µg/kg）とドロペリドール（25～250 µg/kg）の配合剤を静脈内投与し，血圧（収縮期，拡張期及び平均），心拍数及び心機能を測定した（n=4，5）。

全身血圧は左側大腿動脈よりトランスデューサを介し，心拍数は第Ⅱ誘導心電図を誘導し，その R 波でタコメータを介して測定した。

ミダゾラム及び 1-OH MDA を単独投与した時の心血管系に及ぼす影響を表 2.6.2.4.1.2-1 に，ミダゾラムとチオペンタールの相互作用による心血管系に及ぼす影響を表 2.6.2.4.1.2-2 に，ケタミンとの相互作用の影響を表 2.6.2.4.1.2-3 に，フェンタニールとドロペリドールの配合剤との相互作用の影響を表 2.6.2.4.1.2-4 に示す。

表 2.6.2.4.1.2-1 ミダゾラム及び1-ヒドロキシミダゾラムの麻酔イヌの心血管系に及ぼす影響
(資料番号 4.2.1.2-2 [参考資料] の表 14a 及び 14b を改変)

収縮期血圧 (mmHg)								
薬物	用量 (mg/kg)	例数	薬物投与後の時間 (分)					
			0	5	10	30	60	90
ミダゾラム	0.1	5	159±5	157±5	157±5	157±5	157±5	-
	0.3	5	163±10	147±6	144±5	150±4	153±7	-
	1	4	162±6	134±16	135±14	146±11	152±10	156±7
1-OH MDA	1	5	171±12	152±21	151±21	154±19	155±19	155±18
拡張期血圧 (mmHg)								
薬物	用量 (mg/kg)	例数	薬物投与後の時間 (分)					
			0	5	10	30	60	90
ミダゾラム	0.1	5	109±5	106±4	107±4	107±5	107±5	-
	0.3	5	111±8	97±7	95±6	98±7	97±6	-
	1	4	109±7	96±14	94±12	97±10	101±11	102±10
1-OH MDA	1	5	113±9	98±16	98±15	99±13	100±13	100±13
平均血圧 (mmHg)								
薬物	用量 (mg/kg)	例数	薬物投与後の時間 (分)					
			0	5	10	30	60	90
ミダゾラム	0.1	5	126±4	123±4	123±4	124±4	124±4	-
	0.3	5	129±9	114±7	111±6	115±6	116±6	-
	1	4	126±4	108±15	108±12	114±10	118±11	120±9
1-OH MDA	1	5	130±9	116±17	116±17	118±15	119±15	118±15
脈拍数 (回/分)								
薬物	用量 (mg/kg)	例数	薬物投与後の時間 (分)					
			0	5	10	30	60	90
ミダゾラム	0.1	5	185±9	183±11	184±11	187±12	187±12	-
	0.3	5	192±10	179±13	178±12	182±14	188±14	-
	1	4	186±14	170±12	181±15	172±15	187±19	183±16
1-OH MDA	1	5	184±8	183±8	177±6	186±8	186±8	185±7
左心室内圧の最大上昇速度 (mmHg/sec)								
薬物	用量 (mg/kg)	例数	薬物投与後の時間 (分)					
			0	5	10	30	60	90
ミダゾラム	0.1	5	4275±100	4041±134	4074±67	4342±200	4342±200	-
	0.3	5	4743±334	4008±267	3908±267	4175±233	4375±233	-
	1	4	4385±307	3524±271*	3474±277*	3684±294	4142±261	4426±438
1-OH MDA	1	5	4275±267	3607±434	3641±434	3908±434	3975±401	4108±301
左心室内圧 (mmHg)								
薬物	用量 (mg/kg)	例数	薬物投与後の時間 (分)					
			0	5	10	30	60	90
ミダゾラム	0.1	5	159±4	153±6	155±5	157±6	157±6	-
	0.3	5	165±9	144±8	142±8	147±6	147±6	150±6
	1	4	161±9	136±12	138±10	145±8	151±5	157±8
1-OH MDA	1	5	159±8	144±17	144±18	148±16	149±17	152±15
左心室拡張終期圧 (mmHg)								
薬物	用量 (mg/kg)	例数	薬物投与後の時間 (分)					
			0	5	10	30	60	90
ミダゾラム	0.1	5	9.0±2.5	9.2±2.4	9.2±2.4	7.8±2.6	7.8±2.6	-
	0.3	5	11.8±3.5	11.0±2.6	10.8±2.6	10.8±2.6	11.4±2.0	-
	1	4	10.5±1.0	10.5±1.0	10.8±0.9	12.0±0.7	10.5±0.9	9.5±1.3
1-OH MDA	1	5	6.2±1.5	6.8±1.3	6.6±1.3	6.2±1.7	6.4±1.7	6.0±1.6

平均値±SE, *: 投与前に対して p<0.05

麻酔イヌにおいてミダゾラムは 0.1 mg/kg の静脈内投与で心血管系（血压（収縮期，拡張期及び平均），心拍数及び心機能）に影響を及ぼさず，0.3～1 mg/kg では血压，心拍数，左心室内圧及び左心室内圧の最大上昇速度を軽度到低下させたが，左心室拡張終期圧には影響は認められなかった。

1-OH MDA 1 mg/kg の静脈内投与はミダゾラム同様，血压，心拍数，左心室内圧及び左心室内圧の最大上昇速度を軽度到低下させたが左心室拡張終期圧には影響は認められなかった。

表 2.6.2.4.1.2-2 ミダゾラムとチオペンタールの相互作用による心血管系に及ぼす影響
(資料番号 4.2.1.2-2 [参考資料] の表 15a 及び 15b を改変)

収縮期血圧 (mmHg)								
薬物	用量 (mg/kg)	例数	薬物投与後の時間 (分)					
			0	5	10	30	60	90
ミダゾラム	1	4	162±6	134±16	135±14	146±11	152±10	156±7
チオペンタール	5	4	165±14	168±14	156±15	148±12	151±13	151±13
ミダゾラム チオペンタール	1 5	4	179±10	148±23	150±19	167±20	163±14	163±13
拡張期血圧 (mmHg)								
薬物	用量 (mg/kg)	例数	薬物投与後の時間 (分)					
			0	5	10	30	60	90
ミダゾラム	1	4	109±7	96±14	94±12	97±10	101±11	102±10
チオペンタール	5	4	111±11	112±12	104±12	101±10	102±10	102±10
ミダゾラム チオペンタール	1 5	4	114±6	96±16	97±13	109±11	103±5	103±3
平均血圧 (mmHg)								
薬物	用量 (mg/kg)	例数	薬物投与後の時間 (分)					
			0	5	10	30	60	90
ミダゾラム	1	4	126±4	108±15	108±12	114±10	118±11	120±9
チオペンタール	5	4	127±12	131±13	121±13	117±11	125±15	125±15
ミダゾラム チオペンタール	1 5	4	136±7	113±18	115±14	128±13	123±7	123±6
脈拍数 (回/分)								
薬物	用量 (mg/kg)	例数	薬物投与後の時間 (分)					
			0	5	10	30	60	90
ミダゾラム	1	4	186±14	170±12	181±15	172±15	187±19	183±16
チオペンタール	5	4	197±17	199±18	199±18	205±25	197±18	197±18
ミダゾラム チオペンタール	1 5	4	166±14	161±16	161±15	164±15	166±16	178±22
左心室内圧の最大上昇速度 (mmHg/sec)								
薬物	用量 (mg/kg)	例数	薬物投与後の時間 (分)					
			0	5	10	30	60	90
ミダゾラム	1	4	4385±307	3524±271*	3474±277*	3684±294	4142±261	4426±438
チオペンタール	5	5	4910±588	4970±631	4749±618	4496±501	4716±645	4783±655
ミダゾラム チオペンタール	1 5	4	5043±394	4168±635	4192±511	4586±538	4676±347	4643±287
左心室内圧 (mmHg)								
薬物	用量 (mg/kg)	例数	薬物投与後の時間 (分)					
			0	5	10	30	60	90
ミダゾラム	1	4	161±9	136±12	138±10	145±8	151±5	157±8
チオペンタール	5	5	172±19	174±22	168±20	163±19	171±19	171±19
ミダゾラム チオペンタール	1 5	4	181±13	153±22	155±17	166±17	166±10	166±10
左心室拡張終期圧 (mmHg)								
薬物	用量 (mg/kg)	例数	薬物投与後の時間 (分)					
			0	5	10	30	60	90
ミダゾラム	1	4	10.5±1.0	10.5±1.0	10.8±0.9	12.0±0.7	10.5±0.9	9.5±1.3
チオペンタール	5	5	5.2±2.2	6.4±2.2	6.6±2.3	4.3±2.0	5.8±2.4	5.8±2.4
ミダゾラム チオペンタール	1 5	4	6.8±2.0	7.3±2.3	6.8±2.0	7.5±2.5	6.8±2.0	7.0±1.8

平均値±SE, *: 投与前に対して p<0.05

チオペンタール 5 mg/kg を静脈内投与すると、投与直後に軽度呼吸抑制に伴うわずかな血圧上昇が認められた後に、軽度の血圧下降と左心室内圧の最大上昇速度の低下が認められた。ミダゾラム 1 mg/kg とチオペンタール 5 mg/kg を併用投与すると、血圧、心拍数、左心室内圧及び左心室内圧の最大上昇速度を軽度に低下させた。

表 2.6.2.4.1.2-3 ミダゾラムとケタミンの相互作用による心血管系に及ぼす影響

(資料番号 4.2.1.2-2 [参考資料] の表 16a 及び 16b を改変)

収縮期血圧 (mmHg)								
薬物	用量 (mg/kg)	例数	薬物投与後の時間 (分)					
			0	5	10	30	60	90
ミダゾラム	1	4	162±6	134±16	135±14	146±11	152±10	156±7
ケタミン	1	4	179±11	199±4	182±7	176±10	173±11	173±11
ミダゾラム ケタミン	1 1	4	174±15	146±33	143±29	154±25	151±25	159±26
拡張期血圧 (mmHg)								
薬物	用量 (mg/kg)	例数	薬物投与後の時間 (分)					
			0	5	10	30	60	90
ミダゾラム	1	4	109±7	96±14	94±12	97±10	101±11	102±10
ケタミン	1	4	112±7	122±3	111±4	109±6	108±8	108±8
ミダゾラム ケタミン	1 1	4	109±12	89±17	88±16	97±15	96±15	100±15
平均血圧 (mmHg)								
薬物	用量 (mg/kg)	例数	薬物投与後の時間 (分)					
			0	5	10	30	60	90
ミダゾラム	1	4	126±4	108±15	108±12	114±10	118±11	120±9
ケタミン	1	4	135±9	151±3	136±5	132±7	129±9	129±9
ミダゾラム ケタミン	1 1	4	132±13	109±23	109±22	116±18	117±19	117±18
脈拍数 (回/分)								
薬物	用量 (mg/kg)	例数	薬物投与後の時間 (分)					
			0	5	10	30	60	90
ミダゾラム	1	4	186±14	170±12	181±15	172±15	187±19	183±16
ケタミン	1	4	155±8	158±7	155±7	158±11	159±11	159±11
ミダゾラム ケタミン	1 1	4	183±20	173±20*	169±18*	173±18*	174±21*	183±28
左心室内圧の最大上昇速度 (mmHg/sec)								
薬物	用量 (mg/kg)	例数	薬物投与後の時間 (分)					
			0	5	10	30	60	90
ミダゾラム	1	4	4385±307	3524±271*	3474±277*	3684±294	4142±261	4426±438
ケタミン	1	4	4502±498	5127±424	4676±391	4669±504	4669±504	4669±504
ミダゾラム ケタミン	1 1	4	5561±284	4486±691	4409±561	4593±364	4770±324	4970±371
左心室内圧 (mmHg)								
薬物	用量 (mg/kg)	例数	薬物投与後の時間 (分)					
			0	5	10	30	60	90
ミダゾラム	1	4	161±9	136±12	138±10	145±8	151±5	157±8
ケタミン	1	4	166±13	191±10*	173±11	172±14	176±16	176±16
ミダゾラム ケタミン	1 1	4	194±5	165±22	159±20	168±13	170±11	175±9
左心室拡張終期圧 (mmHg)								
薬物	用量 (mg/kg)	例数	薬物投与後の時間 (分)					
			0	5	10	30	60	90
ミダゾラム	1	4	10.5±1.0	10.5±1.0	10.8±0.9	12.0±0.7	10.5±0.9	9.5±1.3
ケタミン	1	4	7.5±1.2	10.0±2.0	8.3±0.9	7.5±1.3	6.8±2.0	6.8±2.0
ミダゾラム ケタミン	1 1	4	11.3±2.1	10.5±2.4	10.3±2.3	8.8±1.7	8.8±1.7	8.8±1.7

平均値±SE, *: 投与前に対して p<0.05

ケタミン 1 mg/kg を静脈内投与すると、血圧、左心室内圧、左心室拡張終期圧及び左心室内圧の最大上昇速度の上昇と呼吸数の軽度の減少が認められた。ミダゾラム 1 mg/kg とケタミン 1 mg/kg を併用投与すると、ケタミンの血圧上昇及び心機能亢進作用が抑制され、ミダゾラム 1 mg/kg 単独投与時と同様に血圧、心拍数、左心室内圧及び左心室内圧の最大上昇速度を軽度到低下させた。

表 2.6.2.4.1.2-4 ミダゾラムとフェンタニール・ドロペリドール配合剤の相互作用による
心血管系への影響

(資料番号 4.2.1.2-2 [参考資料] の表 17a 及び 17b を改変)

収縮期血圧 (mmHg)								
薬物	用量 (mg/kg)	例数	薬物投与後の時間 (分)					
			0	5	10	30	60	90
ミダゾラム	1	4	162±6	134±16	135±14	146±11	152±10	156±7
フェンタニール ドロペリドール	1.5 µg/kg 75 µg/kg	4	167±8	153±9	151±9	153±9	152±8	152±7
ミダゾラム フェンタニール ドロペリドール	1 1.5 µg/kg 75 µg/kg	4	169±15	142±16	140±15	143±10	148±11	158±15
拡張期血圧 (mmHg)								
薬物	用量 (mg/kg)	例数	薬物投与後の時間 (分)					
			0	5	10	30	60	90
ミダゾラム	1	4	109±7	96±14	94±12	97±10	101±11	102±10
フェンタニール ドロペリドール	1.5 µg/kg 75 µg/kg	4	115±9	104±8	102±8	101±9	101±8	101±8
ミダゾラム フェンタニール ドロペリドール	1 1.5 µg/kg 75 µg/kg	4	116±8	98±12	98±12	102±8	102±9	109±9
平均血圧 (mmHg)								
薬物	用量 (mg/kg)	例数	薬物投与後の時間 (分)					
			0	5	10	30	60	90
ミダゾラム	1	4	126±4	108±15	108±12	114±10	118±11	120±9
フェンタニール ドロペリドール	1.5 µg/kg 75 µg/kg	4	132±9	121±8*	118±8*	118±8*	118±8	117±7
ミダゾラム フェンタニール ドロペリドール	1 1.5 µg/kg 75 µg/kg	4	134±10	113±13	113±12*	116±9	117±9	125±11

表 2.6.2.4.1.2-4 ミダゾラムとフェンタニール・ドロペリドール配合剤の相互作用による

心血管系への影響

(資料番号 4.2.1.2-2 [参考資料] の表 17a 及び 17b を改変)

(続き)

脈拍数 (回/分)								
薬物	用量 (mg/kg)	例数	薬物投与後の時間 (分)					
			0	5	10	30	60	90
ミダゾラム	1	4	186±14	170±12	181±15	172±15	187±19	183±16
フェンタニール ドロペリドール	1.5 µg/kg 75 µg/kg	4	194±15	201±17	200±16	201±18	198±17	207±16
ミダゾラム フェンタニール ドロペリドール	1 1.5 µg/kg 75 µg/kg	4	189±16	177±13	175±11	178±11	187±11	189±13
左心室内圧の最大上昇速度 (mmHg/sec)								
薬物	用量 (mg/kg)	例数	薬物投与後の時間 (分)					
			0	5	10	30	60	90
ミダゾラム	1	4	4385±307	3524±271 *	3474±277 *	3684±294	4142±261	4426±438
フェンタニール ドロペリドール	1.5 µg/kg 75 µg/kg	4	5511±367	5544±334	5478±401	5377±367	5344±334	5511±334
ミダゾラム フェンタニール ドロペリドール	1 1.5 µg/kg 75 µg/kg	4	5043±134	4643±401	4509±367	4542±367	4843±468	5210±267
左心室内圧 (mmHg)								
薬物	用量 (mg/kg)	例数	薬物投与後の時間 (分)					
			0	5	10	30	60	90
ミダゾラム	1	4	161±9	136±12	138±10	145±8	151±5	157±8
フェンタニール ドロペリドール	1.5 µg/kg 75 µg/kg	4	173±6	171±7	170±8	166±6	168±6	171±6
ミダゾラム フェンタニール ドロペリドール	1 1.5 µg/kg 75 µg/kg	4	165±5	146±11	143±12	143±8	148±11	150±13
左心室拡張終期圧 (mmHg)								
薬物	用量 (mg/kg)	例数	薬物投与後の時間 (分)					
			0	5	10	30	60	90
ミダゾラム	1	4	10.5±1.0	10.5±1.0	10.8±0.9	12.0±0.7	10.5±0.9	9.5±1.3
フェンタニール ドロペリドール	1.5 µg/kg 75 µg/kg	4	4.0±0.4	4.0±0.7	3.8±0.8	4.3±0.6	3.8±0.9	4.0±0.9
ミダゾラム フェンタニール ドロペリドール	1 1.5 µg/kg 75 µg/kg	4	4.3±1.2	4.7±0.3	4.3±0.7	4.0±0.6	3.0±1.0	3.3±0.9

平均値±SE, *: 投与前に対して p<0.05

フェンタニール 1.5 $\mu\text{g/kg}$ とドロペリドール 75 $\mu\text{g/kg}$ の配合剤を静脈内投与すると、血圧、左心室内圧及び左心室内圧の最大上昇速度の軽度低下が認められた。ミダゾラム 1 mg/kg とこの配合剤を併用投与すると、血圧、心拍数、左心室内圧及び左心室内圧の最大上昇速度の軽度の低下が認められ、左心室拡張終期圧には変化はなかったが、呼吸数の軽度減少が認められた。

さらにペントバルビタール麻酔下雌雄雑種成イヌ ($18.8 \pm 1.1 \text{ kg}$) 5 匹を用いて、高用量 (0.1～3 mg/kg) のミダゾラムの心血管系に及ぼす作用を検討し、また、ミダゾラムの血圧下降及び脈拍数減少作用を詳細に検討するため、ノルアドリナリン又はイソプロテレノールと併用投与した場合の血圧及び心拍数に及ぼす影響を検討した。この試験ではミダゾラム (塩酸塩) を使用し、溶媒に溶解して調製した。

ペントバルビタールを静脈内投与して麻酔し、人工呼吸下に呼気中 CO_2 濃度をモニタリングした。体温を 37°C に保ちながら、1 時間ごとに採血し、血液ガス解析器により動脈血中 pH, PaCO_2 , PaO_2 及びヘモグロビン量を測定した。全身血圧は腹部大動脈よりトランスデューサを介して、心拍数はタコメータを介して測定した。心機能の指標として左心室内圧、左心室拡張終期圧及び左心室内圧の最大上昇速度を測定し、肺動脈にフロープローブを装着して心拍出量も測定した。また、心電図を記録して R-peak と左心室内圧の最大上昇速度の間隔から ejection time (E-time) を算出した。

ミダゾラム 0.1～3 mg/kg は大腿静脈より漸増投与し、対照には同量の溶媒を投与した。高用量のミダゾラムの血圧、心拍数、心拍出量及び心機能に及ぼす作用を表 2.6.2.4.1.2-5 に、また、ノルアドリナリン又はイソプロテレノールと併用した場合の影響を表 2.6.2.4.1.2-6 に示す。

表 2.6.2.4.1.2-5 高用量のミダゾラムを静脈内投与した時の血圧，心拍数，心拍出量及び
心機能に及ぼす影響

(資料番号 4.2.1.1.1-6 [参考資料] の表 11 を改変)

パラメータ	0.1 mg/kg				0.3 mg/kg			
	投与前	最大 変化量	最大 変化率	最大変 化時間 (分)	溶媒	最大 変化量	最大 変化率	最大変 化時間 (分)
収縮期血圧 (kPa)	18.0 ±1.1	-0.9 ±0.2*	-5	3	18.0 ±0.9	-1.4 ±0.3*	-8	5
拡張期血圧 (kPa)	13.5 ±0.9	-1.0 ±0.1*	-7	3	13.8 ±0.7	-1.3 ±0.3*	-9	5
平均血圧 (kPa)	15.0 ±0.9	-0.9 ±0.1*	-6	3	15.2 ±0.8	-1.3 ±0.3*	-9	5
左心室内圧 (kPa)	18.0 ±1.3	-0.9 ±0.2*	-5	3	17.8 ±1.1	-1.3 ±0.3*	-7	5
左心室拡張終期圧 (Pa)	691 ±92.9	31.2 ±14.9	+5	1	712.3 ±97.4	-18.2 ±36.5	-3	5
左心室内圧の最大上昇 速度 (kPa/s)	376.1 ±34.4	-20.4 ±2.9*	-5	5	360.4 ±25.8*	-46.3 ±5.9*	-13	10
左心室内圧の最大上昇 速度/等容性圧 (/s)	33.7 ±1.9	-0.7 ±0.8	-2	3	34.9 ±0.7	-3.4 ±0.6*	-10	10
最大速度 (/s)	113.3 ±10.7	-2.6 ±1.4	-2	3	112.8 ±10.9	-8.4 ±1.9*	-7	5
心拍数 (beats/min)	156.4 ±8.3	-6.1 ±1.5*	-4	3	158.8 ±7.4	-12.5 ±3.9*	-8	10
E-time (/s ³)	69.4 ±3.6	-0.2 ±0.6	0	3	69.3 ±2.3	1.0 ±1.0	+1	3
心拍出量 (mL/min)	1112 ±74	35.2 ±17	+3	1	1113 ±67	-104 ±31*	-9	5
全末梢抵抗 (MPa/m ³ /s)	250.6 ±34.8	-21.3 ±8.3	-9	5	250.1 ±29.0	-10.3 ±4.5/ +9.6 ±5.0	-4/ +4	1/ 30
左室分時仕事量 (mW)	278.7 ±23.2	-14.2 ±7.1	-5	3	280.6 ±14.6	-49 ±11.4*	-18	5
左心室 1 回仕事量 (mL/beat)	106 ±3.7	2.2 ±2.1	+2	3	106.1 ±3.4	-11.3 ±4.1	-11	5

表 2.6.2.4.1.2-5 高用量のミダゾラムを静脈内投与した時の血圧，心拍数，心拍出量及び
心機能に及ぼす影響

(資料番号 4.2.1.1.1-6 [参考資料] の表 11 を改変)

(続き)

パラメータ	1.0 mg/kg				3.0 mg/kg			
	投与前	最大 変化量	最大 変化率	最大変 化時間 (分)	溶媒	最大 変化量	最大 変化率	最大変 化時間 (分)
収縮期血圧 (kPa)	18.4 ±0.9	-2.1 ±0.5*	-11	10	18.6 ±1.0	-3.0 ±0.7*	-16	1
拡張期血圧 (kPa)	14.5 ±0.7	-1.8 ±0.4*	-12	10	14.6 ±0.6	-2.9 ±0.8*	-20	1
平均血圧 (kPa)	15.8 ±0.8	-1.9 ±0.4*	-12	10	15.9 ±0.7	-2.9 ±0.8*	-18	1
左心室内圧 (kPa)	18.1 ±1.3	-1.9 ±0.4*	-11	15	18.6 ±1.1	-2.9 ±0.7*	-16	1
左心室拡張終期圧 (Pa)	763.6 ±80.4	66.1 ±32.3	+9	10	846.4 ±74.7	82.6 ±42.9	+10	3
左心室内圧の最大上昇 速度 (kPa/s)	310.9 ±21.5	-53.1 ±11.3*	-17	15	298.9 ±41.4	-58.0 ±11.4*	-19	10
左心室内圧の最大上昇 速度/等容性圧 (/s)	32.9 ±0.7	-1.3 ±1.3	-4	15	31.7 ±1.8	-2.7 ±1.5	-9	1
最大速度 (/s)	101.4 ±9.1	-8.8 ±1.8*	-9	10	88.7 ±14.0	-7.1 ±3.4	-8	1
心拍数 (beats/min)	149.5 ±10.6	-12.9 ±3.7*	-9	30	140.2 ±16.0	-14.1 ±2.2*	-10	3
E-time (/s ³)	68.3 ±2.6	4.1 ±2.0	+6	10	68.2 ±2.9	3.5 ±0.8*	+5	30
心拍出量 (mL/min)	1028 ±75	-191 ±31*	-19	15	1055 ±53	-173 ±50*	-16	1
全末梢抵抗 (MPa/m ³ /s)	284.6 ±35.9	-11.5 ±11.4/ +25.8 ±11.6	-4/ +9	1/ 15	289.4 ±41.6	-16.0 ±22.4/ +8.1 ±7.4	-6/ +3	1/ 15
左室分時仕事量 (mW)	268.3 ±13.2	-74.2 ±11.2*	-28	10	280.3 ±17.8	-87.6 ±20.1*	-31	1
左心室 1 回仕事量 (mL/beat)	109.5 ±8.3	-23.3 ±3.7*	-20	10	123.0 ±10.7	-32.8 ±13.0	-27	1

平均値±SE, *: 溶媒に対して p<0.05 (Paired t-test)

ミダゾラムの静脈内投与により血圧及び左心室内圧が軽度に低下し、その作用は用量に比例し、発現時間は投与1～5分後であった。左心室拡張終期圧にはほとんど影響は示さず、心拍数の低下も10%以下であった。心拍出量及び心収縮パラメータも軽度に低下させたが、全末梢抵抗には影響はなかった。

表 2.6.2.4.1.2-6 ノルアドリナリン又はイソプロテレノールを静脈投与した時の血圧及び心拍数変化率(%)に及ぼすミダゾラムの影響
(資料番号 4.2.1.1.1-6 [参考資料] の表 12 を改変)

薬物：用量	平均血圧	心拍数	平均血圧	心拍数
	コントロール		ミダゾラム 0.1 mg/kg 併用時	
ノルアドリナリン 0.1 mg/kg	17.3±5.0	2.0±2.0	15.7±4.9	3.5±1.3
ノルアドリナリン 1 mg/kg	47±7.0	23±5.2	57±7.2	31±1.7
イソプロテレノール 0.1 mg/kg	-28.65±5.0	49±5.3	-27.4±4.6	53±7.3
	コントロール		ミダゾラム 0.3 mg/kg 併用時	
ノルアドリナリン 0.1 mg/kg	15.6±3.8	2.0±1.7	22.4±3.5	4.8±1.3
ノルアドリナリン 1 mg/kg	59±5.7	30±1.5	73±6.5	32±4.4
イソプロテレノール 0.1 mg/kg	-24.8±5.3	51±8.2	-26.4±5.7	52±7.0
	コントロール		ミダゾラム 1 mg/kg 併用時	
ノルアドリナリン 0.1 mg/kg	22.4±3.5	4.8±1.3	28.0±3.7	5.6±0.7
ノルアドリナリン 1 mg/kg	73±6.5	32±4.4	86±10.5	26±4.0
イソプロテレノール 0.1 mg/kg	-26.5±4.7	49±6.3	-26.1±4.8	50±5.0
	コントロール		ミダゾラム 3 mg/kg 併用時	
ノルアドリナリン 0.1 mg/kg	20.8±3.2	3.0±1.7	26.7±2.6	4.0±0.7
ノルアドリナリン 1 mg/kg	69±7.6	21±3.3	74±7.1	14±3.0
イソプロテレノール 0.1 mg/kg	-26.5±3.9	42±7.3	-8.6±9.3	41±4.6

平均値±SE

ノルアドリナリン又はイソプロテレノールを静脈内投与した時の血圧及び心拍数変化に対してミダゾラム 0.1～0.3 mg/kg の併用は影響を与えなかった。

以上のことより、ミダゾラムは静脈内投与によりわずかな血圧下降作用を示すが、この作用は末梢組織に対する直接作用ではないことが示唆された。

2) 無麻酔腎性高血圧症イヌにおける作用（公表論文，資料番号：4.2.1.1.1-6〔参考資料〕）

試験には雌性腎性高血圧症イヌ（ 12.1 ± 0.8 kg）5匹を使用した．本試験ではミダゾラム（塩酸塩）を使用し，溶媒に溶解して調製した．腎性高血圧症イヌを24時間絶食させた後，肘の静脈よりミダゾラム $0.3 \sim 10$ mg/kg を投与し，無麻酔下で収縮期血圧及び脈拍数に及ぼす影響を検討した．血圧及び脈拍数はミダゾラム静脈内投与前及び投与5，10，15，30，45，60，90，120，180，360分後及び24時間後にオシロメトリック法により非観血的測定を行った．投与は1日1回，低用量から実施し，2日間の休薬・症状観察期間の後，順次より高用量のミダゾラムを投与した．

ミダゾラム投与前の収縮期血圧（mmHg）及び脈拍数（回/分）と投与後の変化値を表 2.6.2.4.1.2-7 に示す．

表 2.6.2.4.1.2-7 無麻酔腎性高血圧症イヌの収縮期血圧及び脈拍数に及ぼすミダゾラムの影響
（資料番号 4.2.1.1.1-6〔参考資料〕の表 10 を改変）

用量 (mg/kg)	投与前	投与後（分）										
		5	10	15	30	45	60	90	120	180	360	1440
	血圧	ミダゾラム投与前値からの血圧変化量（mmHg）										
0.3	122.6 ± 6.5	0.4 ± 3.8	0	3.4 ± 4.0	-0.6 ± 4.3	2.4 ± 3.0	2.4 ± 5.1	0.4 ± 2.9	-	-	-	-
1	123.0 ± 7.0	10.0* ± 3.5	15.0 ± 5.9	7.0 ± 4.8	4.0 ± 2.9	6.0 ± 4.0	1.0 ± 1.8	3.0 ± 2.5	2.0 ± 2.5	0	0	2.4 ± 1.8
3	125.4 ± 7.4	9.6 ± 6.2	6.6 ± 4.0	8.6 ± 4.0	7.6* ± 1.6	7.6 ± 3.0	2.5 ± 3.9	2.5 ± 3.6	5.6 ± 2.7	4.6 ± 3.2	0.6 ± 1.8	0 ± 2.7
10	123.5 ± 8.6	7.7 ± 9.0	9.0 ± 5.8	6.5 ± 4.9	7.7 ± 5.7	7.7 ± 4.9	10.2 ± 5.1	5.2 ± 6.4	4.0 ± 4.1	2.7 ± 3.7	-1.0 ± 5.8	3.0 ± 2.0
	脈拍	ミダゾラム投与前値からの脈拍変化量（回/分）										
0.3	78.2 ± 1.6	13.4* ± 3.1	0	15.7* ± 3.7	14.2* ± 3.3	5.4 ± 2.6	5.8* ± 1.2	1.8 ± 0.9	-	-	-	-
1	80.0 ± 1.8	13.2 ± 7.4	18.8* ± 5.2	16.4* ± 4.7	14.8 ± 5.3	12.4 ± 5.1	4.8 ± 2.0	1.2 ± 2.4	-2.8 ± 1.7	0	0	-3.0 ± 2.8
3	77.0 ± 2.9	13.4* ± 1.5	17.0* ± 1.8	19.0* ± 2.4	17.8* ± 3.2	11.0* ± 1.9	9.8* ± 2.9	3.4 ± 2.2	6.2* ± 1.5	3.4* ± 1.2	1.4 ± 1.6	1.7 ± 3.0
10	79.2 ± 2.5	8.7* ± 2.5	15.7 ± 6.0	18.7 ± 9.1	16.7 ± 7.0	18.7 ± 7.0	16.2 ± 9.0	12.2 ± 8.4	5.2 ± 1.9	1.7 ± 1.9	-2.0 ± 1.2	-1.0 ± 0.0

平均値 $\pm$ SE，*：投与前に対して $p < 0.05$ （Paired t-test）

腎性高血圧症イヌにおいて，ミダゾラム $0.3 \sim 10$ mg/kg を静脈内投与した時，収縮期血圧への影響は認められなかったが，脈拍に対しては影響が認められた．

3) ウサギの心筋再分極に及ぼす影響（公表論文，資料番号：4.2.1.3-3〔参考資料〕）

試験には NZW 系ウサギを使用した。本試験では市販のミダゾラム（塩酸塩）注射剤を希釈して使用した。

NZW 系ウサギ（雄 11 匹，雌 5 匹）の体内に心電図用高周波トランスミッターを埋め込み，テレメトリー法により覚醒下の心電図を記録し，free-moving 値からベースライン式を算出した。次に別の NZW 系ウサギ（雌雄各 5 匹）にミダゾラム 3 mg/kg を筋肉内投与し，鎮静を確認した後，耳介動脈から血圧をモニターし，フェイスマスクを通じて酸素吸入を行った。ウサギを仰臥位に固定して 12-誘導心電図電極を装着し 10～15 分間心電図波形（RR，HR，PQ，QRS，QT，QT peak 及び T-wave peak-end intervals）をモニターした。Q 波の降下から T 波の終わりまでを実測 QT 間隔値，Q 波の降下から T 波のピークまでを実測 QT peak 間隔値，RR 間隔値からベースライン式より算出した値を free-moving QT_{exp} 間隔値，（実測 QT 間隔値/free-moving QT_{exp} 間隔値）×100 を QT index と定義し，100%以上の場合を QT 延長とした。

ミダゾラムのウサギ心電図 QT 間隔及び QT index に及ぼす影響を図 2.6.2.4.1.2-1 に示す。

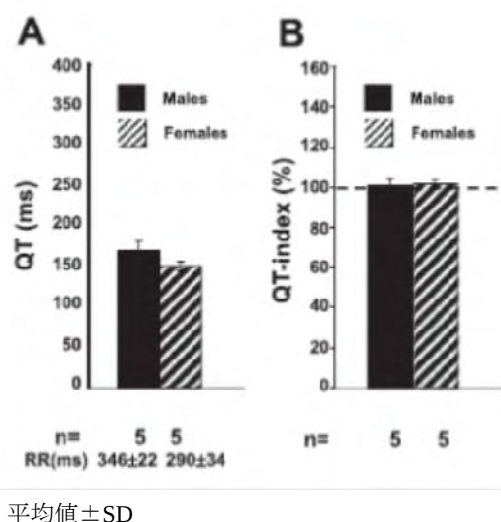


図 2.6.2.4.1.2-1 ミダゾラムのウサギ心電図 QT 間隔及び QT index に及ぼす影響
（資料番号 4.2.1.3-3 の図 3 を改変）

テレメトリー ECG 法により記録した，覚醒下の QT 間隔及び RR 間隔の free-moving 値は，雄が 152±11.2 ms 及び 299.3±26.4 ms，雌が 148±4.8 ms 及び 273.52±24.4 ms であり，ベースライン式は雌雄とも free-moving QT_{exp}=86+0.22*RR であった。ミダゾラム投与により，雌雄とも QT 間隔は free-moving 値と近似の値を示し，また QT index はほぼ 100%を示したことから，ミダゾラムは QT 延長作用を示さないことが示唆された。

2.6.2.4.1.3 呼吸器系に及ぼす影響

1) 麻酔イヌの呼吸数に及ぼす影響（公表論文，資料番号：4.2.1.2-2〔参考資料〕）

試験には雌雄雑種成イヌ（8.5～16.7 kg）を用いた。ミダゾラム等の薬物調製法はマウス及びラットの一般行動及び症状観察試験と同様であり，またペントバルビタールは市販の注射剤を希釈して使用した。

ペントバルビタール麻酔イヌにおけるミダゾラムの呼吸器系に及ぼす作用を検討するため，ミダゾラム 0.1～1 mg/kg 又は 1-ヒドロキシミダゾラム（1-OH MDA）1 mg/kg を静脈内投与した時の呼吸数を測定した。

次に，ミダゾラムと麻酔薬との相互作用による呼吸器系に及ぼす影響を検討するため，ペントバルビタール麻酔雌雄雑種成イヌ（8.5～23.5 kg）にミダゾラム 1 mg/kg を静脈内投与した直後に，チオペンタール（5～10 mg/kg），ケタミン（0.1～5 mg/kg）又はフェンタニール（0.5～5 µg/kg）とドロペリドール（25～250 µg/kg）の配合剤を静脈内投与し，呼吸数を測定した。

呼吸数は気管内に挿入した気管カニューレに装着した呼吸流量計により測定した。

ミダゾラム及び 1-OH MDA 単独投与の呼吸数に及ぼす影響を表 2.6.2.4.1.3-1 に，ミダゾラムとチオペンタールの相互作用による呼吸数に及ぼす影響を表 2.6.2.4.1.3-2 に，ケタミンとの相互作用の影響を表 2.6.2.4.1.3-3 に，フェンタニール・ドロペリドール配合剤との相互作用の影響を表 2.6.2.4.1.3-4 に示す。

表 2.6.2.4.1.3-1 ミダゾラム及び 1-ヒドロキシミダゾラムの麻酔イヌの呼吸数に及ぼす影響
（資料番号 4.2.1.2-2〔参考資料〕の表 14a を改変）

薬物	用量 (mg/kg)	例数	薬物投与後の時間（分）					
			0	5	10	30	60	90
ミダゾラム	0.1	5	14±6	13±6	12±5	13±3	13±3	-
	0.3	5	20±6	18±6	17±4	20±1	20±1	-
	1	4	26±14	26±15	27±14	30±14	42±19	42±25
1-OH MDA	1	5	21±7	19±5	20±8	21±8	21±8	-

平均値±SE

表 2.6.2.4.1.3-2 ミダゾラムとチオペンタールの相互作用による呼吸数に及ぼす影響
（資料番号 4.2.1.2-2〔参考資料〕の表 15a を改変）

薬物	用量 (mg/kg)	例数	薬物投与後の時間（分）					
			0	5	10	30	60	90
ミダゾラム	1	4	25.7±14.1	25.7±14.8	26.7±14.4	29.7±14.0	42.3±18.9	42.3±24.6
チオペンタール	5	5	16.3±7.9	13.3±6.3	15.3±6.4	24.0±7.6	22.7±6.3	35.0±18.6
ミダゾラム チオペンタール	1 5	4	15.0±6.3	14.2±5.8	15.0±6.3	16.0±8.1	17.2±7.9	23.8±10.3

平均値±SE

表 2.6.2.4.1.3-3 ミダゾラムとケタミンの相互作用による呼吸数に及ぼす影響

(資料番号 4.2.1.2-2 [参考資料] の表 16a を改変)

薬物	用量 (mg/kg)	例数	薬物投与後の時間 (分)					
			0	5	10	30	60	90
ミダゾラム	1	4	25.7±14.1	25.7±14.8	26.7±14.4	29.7±14.0	42.3±18.9	42.3±24.6
ケタミン	1	4	8.0±2.0	6.0±0	6.3±0.3	7.0±0.4	7.3±0.5	7.3±0.5
ミダゾラム ケタミン	1 1	4	11.0±2.5	6.0±0.6	5.7±0.3	5.7±0.9	6.0±1.2	6.0±1.2

平均値±SE

表 2.6.2.4.1.3-4 ミダゾラムとフェンタニール・ドロペリドール配合剤の相互作用による

呼吸数に及ぼす影響

(資料番号 4.2.1.2-2 [参考資料] の表 17a を改変)

薬物	用量 (mg/kg)	例数	薬物投与後の時間 (分)					
			0	5	10	30	60	90
ミダゾラム	1	4	25.7±14.1	25.7±14.8	26.7±14.4	29.7±14.0	42.3±18.9	42.3±24.6
フェンタニール ドロペリドール	1.5 µg/kg 75 µg/kg	4	13.0±3.0	13.0±4.0	13.5±2.5	13.5±1.5	14.0±2.0	18.0±6.0
ミダゾラム フェンタニール ドロペリドール	1 1.5 µg/kg 75 µg/kg	4	24.0±1.0	18.5±2.5	17.5±3.5	21.0±6.0	36.5±1.5	42.0±7.0

平均値±SE

麻酔イヌにおいて、ミダゾラム 0.1～1 mg/kg 又は 1-OH MDA 1 mg/kg を静脈内投与しても呼吸数に対する影響は認められなかった。また、ミダゾラムとチオペンタールを併用した場合も影響は認められなかったが、ケタミン又はフェンタニール・ドロペリドール配合剤を併用した場合には、呼吸数は軽度に減少した。

2) イヌにおけるミダゾラム誘発呼吸抑制作用とフルマゼニルの拮抗作用

(公表論文, 資料番号: 4.2.1.3-4 [参考資料])

試験には雑種成イヌ (20~25 kg) を用い, ミダゾラム誘発呼吸抑制作用とその作用に対するフルマゼニルの拮抗作用について検討を行った. (ミダゾラム, フルマゼニル, チオペンタールは市販の注射剤を希釈して使用した.)

チオペンタール (19 mg/kg) で鎮静化し, 気管挿管した雑種成イヌに人工呼吸機を繋ぎ, 安定した自発呼吸が認められるまで空気を送った. 血中酸素飽和度はイヌの耳にオキシメーターを装着して測定した. 呼気中二酸化炭素濃度は CO₂ アナライザーで測定し, 一回換気量は人工呼吸機により測定した. 呼吸抑制作用はミダゾラムをイヌの後肢より漸増静脈内投与 (1~2 回目は 0.1 mg/kg, 3~7 回目は 0.2 mg/kg) することにより誘発した. ベースラインより一回換気量が 30% 減少した場合, 又は血中酸素飽和度が 10% 減少した場合あるいは呼気中二酸化炭素濃度が 15% 増加した場合に呼吸抑制作用発現と定義した.

また, フルマゼニルのミダゾラム誘発呼吸抑制作用に対する拮抗作用を検討するため, 各群 10 匹の雑種成イヌを用いて, ミダゾラム誘発呼吸抑制が認められた後にフルマゼニルの臨床用量 (初めに 0.2 mg, 30 秒後に 0.3 mg) を静脈内, 筋肉内, 舌下又は直腸内投与した. ただし直腸内投与の場合, 臨床用量の 5 倍のフルマゼニルを投与した. フルマゼニルの拮抗作用は, ミダゾラム誘発呼吸抑制作用が認められた時間からベースラインに回復するまでの時間により評価した.

試験の結果, ミダゾラムが投与されたすべてのイヌにおいて呼吸抑制が認められ, 呼吸抑制が発現するまでのミダゾラムの投与回数 (1~2 回目は 0.1 mg/kg, 3~7 回目は 0.2 mg/kg) は平均 3.4 回であり, 呼吸抑制持続時間は平均 1620 秒であった. フルマゼニルによる呼吸抑制回復時間は, 静脈内投与が統計学的に有意に速くて 120 ± 24.5 秒であり (Tukey's multiple range test 及び pairwise t-tests), 次いで舌下投与の 262 ± 94.5 秒, 筋肉内投与の 310 ± 133.7 秒, 直腸内投与の 342 ± 84.4 秒の順であった.

3) ラットにおけるミダゾラム誘発呼吸抑制作用（公表論文，資料番号：4.2.1.3-5〔参考資料〕）

ミダゾラムの血中及び脳内濃度と呼吸抑制発現の関連を検討するために，ミダゾラム持続静脈内投与における呼吸抑制作用持続時間と血中及び脳内ミダゾラム濃度の関係を調べ PK-PD 解析を行った。

試験には 10 匹の Sprague-Dawley 系雄性ラット（250～300 g）を用いた。ミダゾラムは 0.1 M 塩酸を加えて pH 3.3 に調整した生理食塩水に溶かして調製した。

ラットは試験前日に，ケタミン 70 mg/kg 及びキシラジン 10 mg/kg を腹腔内投与して麻酔し，動脈及び静脈内にカテーテルを留置した。

160 mg/kg のミダゾラム溶液を 20 分以上かけて持続静脈内投与（< 8 mg/kg/min）し，ミダゾラム投与開始前及び開始後 5, 30, 60, 120, 180, 240 分に動脈内カテーテルより採血し（200 μ L），血液ガス解析器により動脈血中 pH，PaCO₂，PaO₂ 及び HCO₃⁻を測定した。

一方，ミダゾラム持続静脈内投与時の血中濃度を測定するため，ミダゾラム投与前日に 7 匹の Sprague-Dawley 系雄性ラットを麻酔して，動脈及び静脈内にカテーテルを留置した。160 mg/kg のミダゾラム溶液を 20 分以上かけて持続静脈内投与（< 8 mg/kg/min）し，ミダゾラム投与開始後 5, 10, 20 分及び投与終了後 1, 2, 5, 10, 20, 30, 60, 120, 180, 240 分に動脈内カテーテルより採血し（300 μ L），ミダゾラム濃度を測定した。

さらにミダゾラム持続静脈内投与時の脳内濃度を測定するため，ミダゾラム投与 7 日前に 4 匹の Sprague-Dawley 系雄性ラットを麻酔して，脳内にマイクロダイアリスプローブを留置し，またミダゾラム投与前日に静脈内にカテーテルを留置した。160 mg/kg のミダゾラム溶液を 20 分以上かけて持続静脈内投与（< 8 mg/kg/min）した。マイクロダイアリスプローブより脳内に生理食塩水（1.5 μ L/分）を灌流し，ミダゾラム投与開始後 4 分から 20 分おきに 4 時間採取してミダゾラム脳内濃度を測定した。

ミダゾラム投与に伴う動脈血中 pH，PaCO₂，PaO₂ 及び HCO₃⁻の経時変化を図 2.6.2.4.1.3-1 に，血中及び脳内ミダゾラム濃度の経時変化を図 2.6.2.4.1.3-2 に，血中及び脳内ミダゾラム濃度の経時変化に伴う呼吸抑制の発現を図 2.6.2.4.1.3-3 に示す。

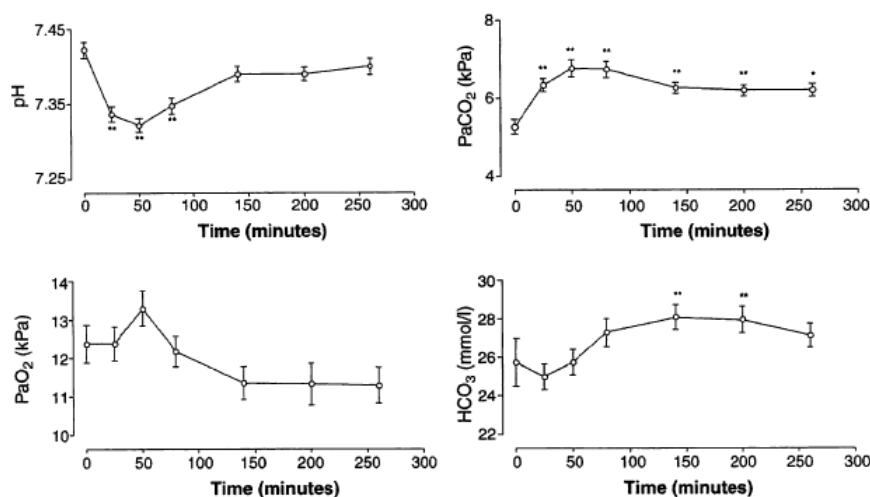
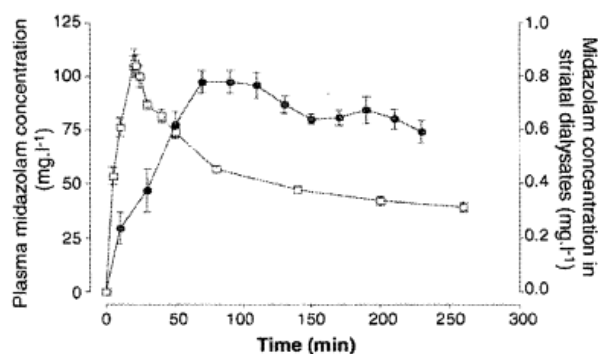
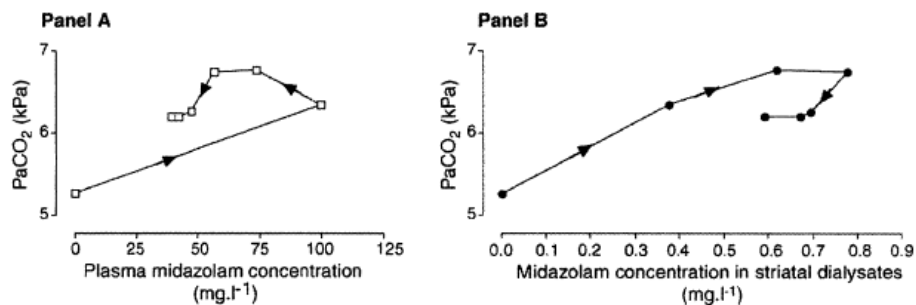


図 2.6.2.4.1.3-1 ミダゾラム投与に伴う動脈血中 pH, PaCO₂, PaO₂ 及び HCO₃⁻ の経時変化
(資料番号 4.2.1.3-5 の図 1 を一部改変)



□ : 血中ミダゾラム濃度, ● : 脳内ミダゾラム濃度

図 2.6.2.4.1.3-2 血中及び脳内ミダゾラム濃度の経時変化
(資料番号 4.2.1.3-5 の図 2 を一部改変)



A : 血中ミダゾラム濃度と動脈血中 PaCO₂, B : 脳内ミダゾラム濃度と動脈血中 PaCO₂

図 2.6.2.4.1.3-3 血中及び脳内ミダゾラム濃度の経時変化に伴う呼吸抑制の発現
(資料番号 4.2.1.3-5 の図 3 を一部改変)

ミダゾラム持続静脈内投与後 30 分に呼吸抑制が認められ、ベースラインと比較して有意な動脈血中 pH の低下 ($7.42 \pm 0.01 \rightarrow 7.34 \pm 0.01$) 及び PaCO_2 の上昇 ($5.27 \pm 0.18 \rightarrow 6.34 \pm 0.17$) が認められ、呼吸抑制作用は投与 60 分後に最大 (pH : 6.77 ± 0.21 , PaCO_2 : 7.32 ± 0.01) となった。投与 90 分後からは HCO_3 の上昇も認められたが、 PaO_2 に対するミダゾラムの有意な作用は認められなかった。

血中のミダゾラム濃度は 2-コンパートメントモデルを示し、急速な体内分布 ($T_{1/2\alpha}$: 6.4 ± 1.8 分) と、遅い消失 ($T_{1/2\beta}$: 288.6 ± 44.3 分) を示した。脳内のミダゾラム濃度は投与開始 90.0 ± 11.5 分後に最大 ($0.80 \pm 0.03 \mu\text{g/mL}$) を示し、血中ミダゾラムの $T_{\max}$ から 70.0 ± 8.9 分遅れたが、40 分間平衡状態であった。脳内ミダゾラム濃度の AUC 値は $147.7 \pm 4.5 \mu\text{g} \cdot \text{min/mL}$ であり、血中ミダゾラムの 1.1% が脳内に移行した。

血中及び脳内ミダゾラム濃度の経時変化に伴う呼吸抑制の発現パラメータを PaCO_2 とした場合、血中では反時計回りの履歴特性 (counter-clockwise hysteresis loop) を示し、脳内では時計回りの履歴特性 (clockwise hysteresis loop) を示したことから、ミダゾラムの呼吸抑制の発現はミダゾラムの中樞神経に対する作用によることが示唆された。

2.6.2.4.2 補足的安全性試験（腎・泌尿器系、自律神経系及び胃腸管系に及ぼす影響）

2.6.2.4.2.1 腎・泌尿器系に及ぼす影響

1) 生理食塩水負荷ラットの尿量及び尿中電解質に対する作用

（公表論文，資料番号：4.2.1.2-2〔参考資料〕）

試験には Wistar 系雄性ラット（約 180 g）を使用した。ミダゾラムの薬物調製はマウスの一般行動及び症状観察試験と同様に行った。

約 18 時間絶食したラットに生理食塩水 30 mL/kg を経口投与し，その 30 分後に再び生理食塩水 30 mL/kg を経口投与して，直後にミダゾラム 0.3，1 及び 3 mg/kg（投与容量 2 mL/kg）又は溶媒（pH 3.3 の生理食塩水）を静脈内投与した。

投与後直ちに 1 群 2 匹としてガラス製採尿ケージに入れ，さらに 30 分後に生理食塩水 30 mL/kg を経口投与した。薬物投与後 0～1，1～2 及び 2～3 時間の尿を採取し，尿量及び尿中電解質量（Na⁺，K⁺及び Cl⁻）を測定した。

ミダゾラムの尿量及び尿中電解質に及ぼす作用を表 2.6.2.4.2.1-1 に示す。

表 2.6.2.4.2.1-1 ミダゾラムの尿量及び尿中電解質に及ぼす作用

（資料番号 4.2.1.2-2〔参考資料〕の表 18 を一部改変）

薬物	用量 (mg/kg,)	採尿 時間 (hr)	例 数	尿量 (ml/100g)	Na ⁺ 量*	K ⁺ 量*	Na ⁺ /K ⁺ 比率	Cl ⁻ 量*
溶媒	-	0-1	4	2.30±0.197	281±37.3	44.1±7.46	6.51±0.477	335±51.7
		1-2	4	2.62±0.317	377±44.4	69.6±10.8	5.50±0.216	473±61.4
		2-3	4	1.36±0.322	209±48.2	44.7±11.2	4.81±0.339	243±52.0
		0-3	4	6.28±0.550	867±70.0	159±15.4	5.50±0.155	1050±72.4
ミダゾ ラム	0.3	0-1	4	2.04±0.270	266±49.5	44.8±9.85	6.15±0.513	328±62.6
		1-2	4	2.16±0.160	315±24.2	63.8±6.49	5.24±0.389	402±21.1
		2-3	4	1.32±0.288	207±40.4	43.5±12.5	5.28±0.626	242±45.3
		0-3	4	5.52±0.245	788±41.6	152±9.75	5.21±0.324	971±49.8
	1	0-1	4	2.32±0.426	284±61.5	42.8±9.11	6.63±0.219	345±70.2
		1-2	4	2.75±0.338	402±18.0	78.0±7.12	5.24±0.389	489±38.6
		2-3	4	0.948±0.112	152±17.2	37.0±8.30	4.84±0.850	189±25.3
		0-3	4	5.70±0.587	844±70.9	158±14.0	5.28±0.452	914±75.6
	3	0-1	4	2.32±0.357	272±31.0	40.3±2.76	6.74±0.504	338±32.6
		1-2	4	2.69±0.287	396±31.8	82.8±10.4	4.86±0.280	502±40.1
		2-3	4	1.09±0.243	161±33.0	41.0±12.0	4.16±0.310	191±34.6
		0-3	4	6.11±0.255	829±43.7	164±22.2	5.19±0.364	1030±52.8

平均値±SE

* : μEq/100 g

生理食塩水経口負荷後のラットの尿量，尿中電解質（Na⁺，K⁺及び Cl⁻）排泄量及び Na⁺/K⁺ 比率に対して，ミダゾラム投与群と溶媒投与群において有意な差は認められなかった。

2) 麻酔イヌの腎クリアランスに対する作用（公表論文，資料番号：4.2.1.2-2〔参考資料〕）

試験には雑種成イヌ（14.0～27.5 kg）を用いた．ミダゾラムや 1-OH MDA の薬物調製等はラットの一般行動及び症状観察試験と同様に行った．パラアミノ馬尿酸（PHA）やペントバルビタールは市販の注射剤を希釈して調製し，クレアチニンは市販の試薬を生理食塩水に溶解して使用した．

イヌを 30 mg/kg のペントバルビタールで麻酔後，下腹部を正中切開して両側の輸尿管を膀胱の開口部の 4～5 cm 上部で結紮し，その上部にカテーテルを挿入して採尿した．両大腿動脈にカテーテルを挿入し，一方の動脈より採血を，反対の動脈より血圧測定を行った．PHA 20 mg/kg 及びクレアチニン 60 mg/kg を静脈内投与後，橈側皮静脈より PHA 及びクレアチニンを含む生理食塩水（1.5 L 生理食塩水に PHA 1g 及びクレアチニン 1.6 g を含む）をペリスターポンプにより 0.2 mL/min/kg の速度で注入して血中内濃度を一定に維持した．ミダゾラム 1 mg/kg を静脈内投与し，1 時間後にミダゾラムの主代謝物である 1-OH MDA 1 mg/kg を静脈投与し，さらに利尿薬のフロセミド 0.1 mg/kg を静脈投与した．15 分間隔で採尿・採血を行い，尿及び血液中の PHA 及びクレアチニンを測定し，糸球体濾過量，腎血漿流量を求めた．腎血漿流量及びヘマトクリット値より腎血流量（腎血流量＝腎血漿流量×100÷（100－ヘマトクリット値））を算出し，濾過率は糸球体濾過量と腎血流量の比より算出した．また，尿中電解質（Na⁺，K⁺及び Cl⁻）量も測定した．

ミダゾラム，1-OH MDA の麻酔イヌ腎クリアランスに及ぼす作用を表 2.6.2.4.2.1-2 に示す．

表 2.6.2.4.2.1-2 ミダゾラム及び 1-OH MDA の麻酔イヌ腎クリアランスに及ぼす影響

(資料番号 4.2.1.2-2 [参考資料] 表 19a 及び 19b を一部改変)

	No.	投与前		ミダゾラム 1 mg/kg, i.v.				1-OH MDA 1 mg/kg, i.v.				フロセミド 0.1 mg/kg, i.v.	
	分	-30	-15	15	30	45	60	15	30	45	60	15	30
腎血漿流量 (mL/min/kg)	1	11.5	12.7	10.7	12.9	9.9	11.9	-	-	-	-	9.3	8.0
	2	19.1	19.1	9.2	11.4	13.5	13.3	9.1	16.3	12.9	13.0	11.6	8.5
	3	14.3	14.1	15.1	14.1	10.3	16.4	15.0	16.7	15.6	16.1	13.4	6.2
腎血流量 (mL/min/kg)	1	20.5	23.3	22.5	21.9	16.8	20.3	-	-	-	-	15.6	13.7
	2	25.1	25.1	12.6	15.4	18.2	17.5	12.0	21.4	16.8	17.1	14.9	11.0
	3	20.1	20.4	21.6	19.9	14.5	22.8	21.4	23.9	22.0	22.4	18.9	8.9
糸球体濾過量 (mL/min/kg)	1	3.5	2.9	2.5	3.4	2.8	3.0	-	-	-	-	0.6	1.6
	2	12.5	7.2	6.7	7.4	7.0	10.1	8.2	10.6	9.8	9.1	8.9	7.0
	3	6.3	5.8	6.4	6.1	6.3	7.7	6.7	7.0	7.3	7.4	14.5	5.7
濾過率	1	0.30	0.23	0.23	0.26	0.28	0.25	-	-	-	-	0.06	0.20
	2	0.65	0.65	0.73	0.65	0.51	0.76	0.90	0.65	0.76	0.70	0.77	0.82
	3	0.44	0.41	0.42	0.43	0.61	0.47	0.45	0.42	0.47	0.46	1.08	0.92
尿量 (mL/kg/15min)	1	0.12	0.13	0.12	0.15	0.15	0.16	-	-	-	-	1.56	0.51
	2	0.35	0.35	0.21	0.21	0.19	0.23	0.19	0.24	0.27	0.28	3.00	1.33
	3	0.21	0.20	0.19	0.19	0.21	0.23	0.23	0.26	0.28	0.34	4.32	1.29
Na ⁺ 量 (μEq/kg/15min)	1	720	670	640	670	760	840	-	-	-	-	1455	420
	2	415	545	330	276	203	211	181	218	190	218	2268	1042
	3	338	284	250	188	285	269	309	339	468	570	5143	1561
K ⁺ 量 (μEq/kg/15min)	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	550	355	198	203	257	250	198	442	509	523	1302	614
	3	262	240	250	267	322	300	341	339	386	369	864	245
Na ⁺ /K ⁺	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	0.75	1.54	1.67	1.36	0.79	0.84	0.91	0.50	0.37	0.42	0.74	1.70
	3	1.29	1.18	1.00	0.70	0.89	0.90	0.91	1.00	1.21	1.54	5.95	6.37
Cl ⁻ 量 (μEq/kg/15min)	1	11.9	15.3	5.6	14.7	14.7	15.4	-	-	-	-	2988.2	830.8
	2	34.3	30.7	20.6	32.7	396.6	416.9	296.2	231.9	299.7	334.3	6192.0	2200.0
	3	32.2	33.6	29.3	32.5	29.5	32.2	44.8	40.0	42.9	47.9	6535.7	1907.6

ミダゾラム、1-OH MDA の静脈内投与では糸球体濾過量、腎血漿流量、腎血流量、濾過率、尿量及び尿中電解質 (Na⁺, K⁺及び Cl⁻) 排泄量などの各パラメータに変化は認められなかった。一方、利尿薬のフロセミドの 0.1 mg/kg 静脈内投与では尿量及び Na⁺, K⁺及び Cl⁻排泄量の増加が認められた。

2.6.2.4.2.2 自律神経系に及ぼす影響

1) ピロカルピン誘発唾液分泌に及ぼす影響（公表論文，資料番号：4.2.1.1.1-6〔参考資料〕）

試験には雄性マウス（20～30 g）を用いた．被験薬はミダゾラム，ジアゼパム及びクロルジアゼポキシドを使用した．

24 時間絶食したマウスに被験薬の種々の用量を経口投与し（n=10），その 30 分後にピロカルピン 2 mg/kg を皮下投与し，15 分間にわたって唾液分泌の有無を確認した．確認の方法はマウスを濾紙上に置き頭部を少し下向きにし，濾紙に唾液分泌亢進によるシミがないものの数をカウントした．

ミダゾラム，ジアゼパム及びクロルジアゼポキシドのいずれも 100 mg/kg までの用量でピロカルピン誘発唾液分泌亢進に対して拮抗作用は認められず，ムスカリン性抗コリン作用がないことが示唆された．

2) 摘出平滑筋に及ぼす影響（公表論文，資料番号：4.2.1.1.1-6〔参考資料〕，4.2.1.2-2〔参考資料〕）

種々の摘出臓器を用いてミダゾラムの平滑筋収縮に対する影響を検討した．

ミダゾラムの摘出平滑筋収縮に及ぼす作用を表 2.6.2.4.2.2-1 に示す．

表 2.6.2.4.2.2-1 ミダゾラムの平滑筋収縮に及ぼす影響

（資料番号 4.2.1.1.1-6〔参考資料〕，4.2.1.2-2〔参考資料〕の内容から編成）

臓器	動物	刺激方法及び適用濃度（M）	ミダゾラム適要濃度（M）及び作用	
気管	モルモット	アセチルコリン （収縮）	>10 ⁻⁵ 10 ⁻⁶ 10 ⁻⁷	>3×10 ⁻⁵ 3×10 ⁻⁵ 3×10 ⁻⁵ ・作用無し ・抑制作用 ・抑制作用
		イソプロテレノール （弛緩）	<10 ⁻⁸	3×10 ⁻⁵ ・増強作用
胃	ラット	セロトニン （収縮）		1×10 ⁻⁵ ・作用無し
空腸	モルモット	電気 （収縮）	-	>1×10 ⁻⁵ ・抑制作用
回腸	モルモット	アセチルコリン （収縮）		<3×10 ⁻⁵ ・作用無し
		ヒスタミン （収縮）		3×10 ⁻⁵ ・抑制作用
輸精管	ラット	ノルアドリナリン （収縮）		<1×10 ⁻⁵ ・作用無し
子宮	ラット	自動運動	-	3×10 ⁻⁵ ・振幅及び律動数の減少
	妊娠ラット			3×10 ⁻⁵ ・律動数の増加

ミダゾラムは摘出器官平滑筋に対して 3×10⁻⁵ M 以上の高濃度で非特異的な弛緩作用を示した．

2.6.2.4.2.3 胃腸管系に及ぼす影響

1) 幽門結紮ラットにおける胃酸分泌に及ぼす影響

(公表論文, 資料番号 : 4.2.1.1.1-6 [参考資料])

試験には雌性ラット (130~160 g) を使用し, 被験薬はミダゾラム, ジアゼパム, クロルジアゼポキシド及び H_2 受容体拮抗薬シメチジンとした. 薬物は 0.5% トラガントゴム水溶液に懸濁して調製した.

ラットを 24 時間絶食させた後, エーテル麻酔下に幽門を結紮し, 薬物を十二指腸内投与した (溶媒対照群が 15 匹の他, 各群 7 匹). 幽門結紮から 4 時間後にラットを屠殺し, 胃内容物の重量を測定して, それぞれの体重に対する相対重量 (胃内容物の重量 : mL/ラットの体重 : kg) を算出した. 胃液の酸度は自動滴定装置を用い, 0.1 mol 水酸化ナトリウムで pH 7.0 まで滴定して測定し, $mEqH^+/kg$ で表した. 溶媒対照群及び薬物投与群の値から抑制率を算出し, ED_{50} 値を求めた.

ミダゾラムのラット胃酸分泌に及ぼす影響を表 2.6.2.4.2.3-1 に示す.

表 2.6.2.4.2.3-1 ミダゾラムの幽門結紮ラットの胃酸分泌に及ぼす影響

(資料番号 4.2.1.1.1-6 [参考資料] の表 13 を一部改変)

薬物	胃酸分泌抑制 ED_{50} 値 (mg/kg, 十二指腸内投与) のパラメータ	
	胃内容物	胃液の酸度
ミダゾラム	5	3
ジアゼパム	4	3
クロルジアゼポキシド	4	3
シメチジン	100	26

ミダゾラム, ジアゼパム及びクロルジアゼポキシドは幽門結紮による胃酸分泌に対して阻害作用を示したが, 特異的 H_2 受容体拮抗薬のシメチジンは作用を示さなかった.

2) ヒスタミン誘発胃酸分泌に対する影響（公表論文，資料番号：4.2.1.1.1-6〔参考資料〕）

試験には雄性ラットを使用し，被験薬はミダゾラム，ジアゼパム，クロルジアゼポキシド及びH₂受容体拮抗薬シメチジンとした．薬物は0.5%トラガントゴム水溶液に懸濁して調製した．

ラットをウレタン（腹腔内0.65 g/kg＋皮下投与0.65 g/kg）で麻酔して，胃内腔灌流ラットを製作し，体温を34℃に保ちながら胃内腔に生理食塩水（0.5 mL/分，34℃）を灌流させた．頸静脈にカテーテルを留置して，最初に生理食塩水を0.075 mL/分の速さで持続投与しながら，灌流液を10分間隔で採取し，自動滴定装置により胃酸分泌量を測定した．次にヒスタミン二塩酸塩（20 µg/kg/分）を40分間灌流して胃酸分泌を誘発し，同様に胃酸分泌量を測定した．

ラットに薬物又は溶媒を腹腔内投与（10 mL/kg）し，その10分又は90分後に，ヒスタミン刺激により胃酸分泌を誘発した．同じラットで薬物・溶媒投与のクロスオーバー形式で実施し，各40分間のヒスタミン灌流による胃酸分泌総量から抑制率を算出し，ED₅₀値を求めた．

ミダゾラムのヒスタミン誘発胃酸分泌に対する影響を表2.6.2.4.2.3-2に示す．

表 2.6.2.4.2.3-2 ミダゾラムのヒスタミン誘発胃酸分泌に対する影響

（資料番号 4.2.1.1.1-6〔参考資料〕の表 14 を一部改変）

薬物	ヒスタミン誘発胃酸分泌抑制作用 ED ₅₀ 値 (mg/kg, 腹腔内投与)
ミダゾラム	60 以上
ジアゼパム	60 以上
クロルジアゼポキシド	30 以上
シメチジン	0.3

ヒスタミン誘発胃酸分泌に対して特異的ヒスタミン H₂ 受容体拮抗薬であるシメチジンは阻害作用を示したが，ミダゾラム，ジアゼパム及びクロルジアゼポキシドは作用を示さなかった．

3) インドメタシン誘発胃潰瘍モデルに対する影響

(公表論文, 資料番号 : 4.2.1.1.1-6 [参考資料])

試験には雄性ラット (130~150 g) を用い, 被験薬はミダゾラム, ジアゼパム, クロルジアゼポキシド, シメチジン及び臭化クリジニウムとした。

ラット (1 群 10 匹) を 24 時間絶食させた後, 薬物を経口投与し, その 1 時間後にインドメタシン 20 mg/kg を経口投与し, さらにその 2 時間後に再度薬物を経口投与した。インドメタシン投与 5 時間後に屠殺して, 胃内の潰瘍数を顕微鏡下で計測した。

ミダゾラムのインドメタシン誘発胃潰瘍モデルに対する影響を表 2.6.2.4.2.3-3 に示す。

表 2.6.2.4.2.3-3 ミダゾラムのインドメタシン誘発胃潰瘍モデルに対する影響

(資料番号 4.2.1.1.1-6 [参考資料] の表 15 を一部改変)

薬物	用量 (mg/kg)	例数	胃潰瘍発生が認められない動物		ED ₅₀ 値 (mg/kg, 経口投与)
			例数	%	
ミダゾラム	3	20	1	5	8
	10	19	11	58	
	30	20	18	90	
ジアゼパム	10	19	6	32	18
	30	20	13	65	
クロルジアゼポキシド	3	30	2	7	16
	10	10	4	40	
	30	20	13	65	
シメチジン	15	40	7	18	22
	50	30	29	97	
	100	10	100	100	
臭化クリジニウム	0.3	20	1	5	5
	1	10	2	20	
	3	19	6	32	
	10	20	14	70	
	30	10	9	90	

インドメタシン誘発胃潰瘍モデルにおけるミダゾラムの潰瘍形成阻害作用はジアゼパム及びクロルジアゼポキシドより 2 倍, シメチジンより 3 倍強いが, 臭化クリジニウムより弱かった。

4) 4-メチルヒスタミン・カルバコール誘発十二指腸潰瘍モデルに対する影響

(公表論文, 資料番号: 4.2.1.1.1-6 [参考資料])

試験には Himalayan spotted 系モルモット (280~320 g) を使用し, 被験薬はミダゾラム, ジアゼパム, シメチジン及び臭化クリジニウムとした.

モルモットを 24 時間絶食させた後, 薬物を経口投与 (n=10) し, その直後及び 1, 2, 3 時間後に 4-メチルヒスタミン (0.2 mg/kg, 腹腔内) とカルバコール (0.01 mg/kg, 皮下) を投与し, 最終投与の 30 分後に屠殺した. 十二指腸内の潰瘍数を顕微鏡下で計測し, 潰瘍形成が認められない動物数から各被験薬の ED₅₀ 値を算出した.

ミダゾラムの 4-メチルヒスタミン・カルバコール誘発十二指腸潰瘍モデルに対する影響を表 2.6.2.4.2.3-4 に示す.

表 2.6.2.4.2.3-4 ミダゾラムの 4-メチルヒスタミン・カルバコール誘発十二指腸潰瘍モデルに対する影響

(資料番号 4.2.1.1.1-6 [参考資料] の表 16 を一部改変)

薬物	潰瘍形成抑制作用 ED ₅₀ 値 (mg/kg, 経口投与)
ミダゾラム	30 以上
ジアゼパム	30 以上
シメチジン	98
臭化クリジニウム	4

ミダゾラム, ジアゼパムは 4-メチルヒスタミン・カルバコール誘発十二指腸潰瘍に対して抑制作用は示さなかった. 臭化クリジニウムは抑制作用を示したが, シメチジンは極めて弱い抑制作用を示しただけであった.

5) 腸管輸送能に及ぼす影響（公表論文，資料番号：4.2.1.1.1-6〔参考資料〕）

試験には雄性マウス（18～28 g）を使用し，被験薬はミダゾラム，ジアゼパム，クロルジアゼポキシド及び臭化クリジニウムとした．

マウスを 24 時間絶食させた後，薬物を経口投与し（n=10），その 30 分後に 0.5%のトラガントゴム水溶液に懸濁した色つきポリ塩化ビニル（直径< 130 μm ）0.5 mL を経口投与し，3.5 時間後に屠殺して盲腸内の色つきポリ塩化ビニルの有無を確認した．盲腸内に色つきポリ塩化ビニルが認められないマウスを腸管輸送遅延と判定し，半数のマウスで腸管輸送遅延を誘発する被験薬の ED₅₀ 値を算出した．

ミダゾラムのマウス腸管輸送能に及ぼす影響を表 2.6.2.4.2.3-5 に示す．

表 2.6.2.4.2.3-5 ミダゾラムのマウス腸管輸送能に及ぼす影響
（資料番号 4.2.1.1.1-6〔参考資料〕の表 17 を一部改変）

薬物	腸管輸送遅延誘発作用 ED ₅₀ 値 (mg/kg, 経口投与)
ミダゾラム	60 以上
ジアゼパム	100 以上
クロルジアゼポキシド	60 以上
臭化クリジニウム	39

ミダゾラム，ジアゼパム及びクロルジアゼポキシドは腸管輸送能に影響を及ぼさなかったが，臭化クリジニウムは腸管輸送能を遅延させた．

6) ヒマシ油誘発下痢モデルに対する影響（公表論文，資料番号：4.2.1.1.1-6〔参考資料〕）

試験には雄性マウス（18～30 g）を使用し，被験薬はミダゾラム，ジアゼパム，臭化クリジニウム及びインドメタシンとした．薬物は0.5%トラガントゴム水溶液に懸濁して調製した．

マウスを18時間絶食させた後，薬物を経口投与（10 mL/kg，1群10匹）し，その1時間後にヒマシ油0.5 mLを経口投与して90分間下痢の有無を観察した．下痢が誘発されない動物数から，被験薬のヒマシ油誘発下痢抑制作用のED₅₀値を算出した．

ミダゾラムのヒマシ油誘発下痢モデルに対する影響を表2.6.2.4.2.3-6に示す．

表 2.6.2.4.2.3-6 ミダゾラムのヒマシ油誘発下痢モデルに対する影響
（資料番号 4.2.1.1.1-6〔参考資料〕の表 18 を一部改変）

薬物	下痢抑制作用 ED ₅₀ 値 (mg/kg, 経口投与)
ミダゾラム	100
ジアゼパム	100
臭化クリジニウム	2.5
インドメタシン	0.15

溶媒対照群のマウスではすべて下痢が認められたが，ミダゾラム及びジアゼパムは100 mg/kgの高用量で下痢抑制作用が認められた．

2.6.2.5 薬力学的薬物相互作用試験

1) 麻酔薬、鎮痛薬及びエタノールとの薬物相互作用

(公表論文, 資料番号: 4.2.1.1.1-6 [参考資料], 4.2.1.2-2 [参考資料])

ミダゾラムは抗けいれん作用以外に、催眠、鎮静、抗不安作用等の薬理作用を有すが、作用持続時間が短いことから短時間型催眠鎮静剤と位置付けされており、本邦においては成人及び小児に対して「麻酔前投薬」、「全身麻酔の導入及び維持」、「集中治療における人工呼吸中の鎮静」の効能・効果を取得している。薬力学的薬物相互作用試験として、ミダゾラム（関連化合物）が麻酔薬、鎮痛薬及びエタノールの作用に及ぼす影響を検討した。

(1) チオペンタール麻酔に及ぼす作用

ICR 系雄性マウス（約 35 g）を用い、チオペンタール麻酔に及ぼすミダゾラム（関連化合物）の作用を検討した。試験では、正向反射の消失した状態が 15 秒以上持続した場合を睡眠と判定し、入眠時間及び睡眠持続時間を測定した。被験薬はミダゾラム、ミダゾラムマレイン酸塩、1-ヒドロキシミダゾラム（1-OH MDA）及びジアゼパムを用いた。ミダゾラム及び 1-OH MDA は 1 mol 塩酸に溶解後、生理食塩水で希釈し、1 mol NaOH で pH 3.3 付近に調整した。ミダゾラムマレイン酸塩は生理食塩水で溶解・希釈した（ただし投与量は塩基に換算して表示した）。ジアゼパムは 10% ポリエチレングリコール含有生理食塩水に溶解した。チオペンタールは市販の注射剤を生理食塩水で希釈して使用した。被験薬を静脈内投与した直後にチオペンタール 25 mg/kg を静脈内投与し、入眠時間及び睡眠持続時間を測定した（n=10~13）。

ミダゾラムと関連化合物のチオペンタール麻酔に及ぼす作用を表 2.6.2.5-1 に示す。

表 2.6.2.5-1 ミダゾラム（静脈内投与）のチオペンタール麻酔に及ぼす作用
(資料番号 4.2.1.2-2 [参考資料] の表 7 を一部改変)

用量 (mg/kg)	ミダゾラム	ミダゾラム マレイン酸塩	1-OH MDA	ジアゼパム
	睡眠持続時間 (秒)			
チオペンタール +0.1 +1.0 +3.0 +10	83±9 (10) 150±18 (10) 444±122 (10) - 1075±181 (10)	83±9 (10) 148±9 (10) 476±96 (10) - 1063±313 (10)	82±7 (10) 91±11 (10) 150±19 (10) - 509±56 (11)	146±20 (10) 270±66 (10) 503±42 (10) 2013±353 (12) 死亡 (6/13)
ED ₅₀₀ (95%信頼区間)	0.49 (0.18~10.4)	0.48 (0.052~1.57)	5.6 (3.0~14.1)	0.42 (0.15~0.82)
ED ₁₀₀₀ (95%信頼区間)	3.9 (1.8~14.2)	3.8 (0.24~4.58)	>10	2.0 (1.0~7.2)
効力比 (95%信頼区間)	1.00	1.03 (0.24~4.58)	0.12 (0.03~0.36)	1.42 (0.48~4.16)

平均値±SE

チオペンタール 25 mg/kg を静脈内投与すると、その直後より全例のマウスの正向反射は消失し、0.1～10 mg/kg のミダゾラムを併用すると用量依存的に睡眠持続時間を延長した。睡眠時間を対照の5及び10倍に延長する用量であるED₅₀₀及びED₁₀₀₀値はそれぞれ0.49及び3.9 mg/kgであった。また、ミダゾラムマレイン酸塩やジアゼパムの作用はミダゾラムとほぼ同等であり、1-OH MDAはミダゾラムの約1/8の効力であった。しかし、ジアゼパム 10 mg/kg 群では約半数の動物が死亡した（表 2.6.2.5-1）。

次に、ミダゾラム及びヒドロキシジンを筋肉内投与した時のチオペンタール麻酔に及ぼす影響を検討した。ヒドロキシジンは生理食塩水に溶解して調製した。ミダゾラム又はヒドロキシジンを筋肉内投与した、それぞれ1分又は10分後に、チオペンタール 25 mg/kg を静脈内投与し、入眠時間及び睡眠持続時間を測定した（n=7）。

ミダゾラムを筋肉内投与した時のチオペンタール麻酔に及ぼす影響を表 2.6.2.5-2 に示す。

表 2.6.2.5-2 ミダゾラム（筋肉内投与）のチオペンタール麻酔に及ぼす作用
（資料番号 4.2.1.2-2〔参考資料〕の表 8 を一部改変）

用量 (mg/kg)	睡眠持続時間（秒）	
	ミダゾラム	ヒドロキシジン
チオペンタール	93±9（7）	125±9（7）
+0.1	126±9（7）	-
+0.3	198±26（7）	-
+1.0	440±83（7）	-
+3.0	798±118（7）	-
+10	1145±270（7）	159±29（7）
+30	-	215±36（7）
+100	-	412±50（7）
ED ₂₀₀ （95%信頼区間）	0.22（0.075～0.41）	28（15～48）
ED ₅₀₀ （95%信頼区間）	0.78（0.41～1.4）	>100
ED ₁₀₀₀ （95%信頼区間）	6.7（3.3～20）	>100

平均値±SE

ミダゾラム 0.1～10 mg/kg を併用すると用量依存的にチオペンタール睡眠持続時間を延長した。対照の睡眠時間を2、5又は10倍にするED₂₀₀、ED₅₀₀及びED₁₀₀₀値はそれぞれ0.22、0.78及び6.7 mg/kgであり、ミダゾラムの作用はヒドロキシジンより強かった（表 2.6.2.5-2）。

(2) ケタミン麻酔及びフェンタニール・ドロペリドール併用麻酔に及ぼす作用

ICR 系雄性マウス（約 35 g）を用い、ケタミン麻酔及びフェンタニール・ドロペリドール併用麻酔に及ぼすミダゾラムの作用を検討した。正向反射の消失した状態が 15 秒以上持続した場合を睡眠と判定し、入眠時間及び睡眠持続時間を測定した。ミダゾラムの薬物調製法はチオペンタール麻酔試験の場合と同様であり、またケタミン、フェンタニール、ドロペリドールについては市販の注射剤を生理食塩水で希釈して使用した。マウスにミダゾラム（0.1 又は 1 mg/kg）を静脈内投与した直後に、ケタミン 20 mg/kg、又はフェンタニール 0.05 mg/kg 及びドロペリドール 2.5 mg/kg を静脈内投与し、入眠時間及び睡眠持続時間を測定した（n=10）。

ミダゾラムのケタミン麻酔及びフェンタニール・ドロペリドール併用麻酔に及ぼす作用を表 2.6.2.5-3 に示す。

表 2.6.2.5-3 ミダゾラムのケタミン麻酔及びフェンタニール・ドロペリドール併用麻酔に及ぼす作用

（資料番号 4.2.1.2-2 [参考資料] の表 9 を一部改変）

薬物	用量 (mg/kg)	正向反射消失数 /全動物数	正向反射消失	
			入眠時間 (秒)	睡眠持続時間 (秒)
ケタミン	20	10/10	7±1.1	53±7
+ミダゾラム	+0.1	10/10	6±0.5	165±19***
+ミダゾラム	+1.0	10/10	3±0.6**	376±25***
フェンタニール+ドロペリドール	0.05+2.5	0/10	-	-
+ミダゾラム	+0.1	10/10	83±15	454±82
+ミダゾラム	+1.0	10/10	67±11	499±70

平均値±SE

：ケタミン麻酔の対照群に対して p<0.01, *：ケタミン麻酔の対照群に対して p<0.001

ケタミン麻酔の対照群では、入眠時間が 7±1.1 秒で、睡眠持続時間は 53±7 秒であったが、ミダゾラム（0.1, 1 mg/kg）の併用により、用量の増加に伴って入眠時間は短縮し、睡眠持続時間は延長した。

フェンタニールとドロペリドールの併用では正向反射の消失は認められなかったが、ミダゾラム（0.1, 1 mg/kg）の併用により正向反射が消失し、450～500 秒程度の睡眠が認められた。

(3) エタノール麻酔に及ぼす作用

試験には雄性マウス（18～21 g）を用いた。被験薬はミダゾラム塩酸塩、ジアゼパム、フルニトラゼパムで溶解又は懸濁して調製した。マウス（n=10）にミダゾラム塩酸塩を経口投与 15, 30 又は 60 分後に非麻酔量のエタノール（4 g/kg）を腹腔内投与し、その 1.5 時間後に、各マウスについて正向反射の有無を調べた。1 分以上持続して正向反射が消失した動物を作用陽性と判定し、その匹数から ED₅₀ 値を算出した。また、ジアゼパム又はフルニトラゼパムを経口投与した 30 分後にエタノールを投与し、ミダゾラム塩酸塩の場合と同様に ED₅₀ 値を算出した。

ミダゾラム塩酸塩は用量依存的に正向反射消失数を増加させ、エタノール投与に対する前処置時間 15, 30 又は 60 分に対する ED₅₀ 値は順に 1.2, 0.88 及び 1.98 mg/kg（経口投与）であった。また、ジアゼパム及びフルニトラゼパムの ED₅₀ 値（30 分後）はそれぞれ 1.4 及び 0.017 mg/kg（経口投与）であった。

(4) 鎮痛薬との薬物相互作用

ICR 系雄性マウス（約 35 g）を用いて、ブプレノルフィン、フェンタニール、ペンタゾシン及びモルヒネの鎮痛作用に及ぼすミダゾラムの併用作用を、Hot plate 法及び Tail flick 法により検討した。Hot plate 法では、マウスを 55±1℃の熱板上に乗せた時に 60 秒間に licking response を示したものを疼痛反応陽性とし、Tail flick 法では、マウスの尾端部に 35 V、40 W の集光ランプにより熱刺激を与え、2～4 秒間に逃避反応を示したものを疼痛反応陽性とした。両試験法において、疼痛反応が陰性の場合に、鎮痛作用ありと判定した。ミダゾラムの薬物調製法はチオペンタール麻酔試験の場合と同様であり、また鎮痛薬は市販の製剤を利用して調製した。マウスにミダゾラム（0.1, 1 又は 10 mg/kg）を静脈内投与した直後に、ブプレノルフィン（0.05 mg/kg, 静脈内）、フェンタニール（0.007 mg/kg, 静脈内）、ペンタゾシン（2.5 mg/kg, 静脈内）又はモルヒネ（3 mg/kg, 皮下）をそれぞれ投与して 60 分後まで鎮痛作用発現個体を計測した。

ミダゾラムの鎮痛薬の効果に及ぼす薬物相互作用を表 2.6.2.5-4 に示す。

表 2.6.2.5-4 ミダゾラムの鎮痛薬の效果に及ぼす薬物相互作用

（資料番号 4.2.1.2-2 [参考資料] の表 10, 11 を改変）

薬物	ミダゾラム 用量 (mg/kg) [投与方法]	Hot plate 法			Tail flick 法		
		鎮痛効果発現数/全動物数					
		投与後の時間 (分)					
		3	30	60	3	30	60
ブプレノルフィン	0.05 [静脈内]	3/9	8/9	7/9	2/9	3/9	3/9
+ミダゾラム	+0.1	1/9	8/9	6/9	0/9	1/9	3/9
+ミダゾラム	+1.0	3/9	8/9	6/9	0/9	1/9	4/9
フェンタニール	0.007 [静脈内]	4/9	2/9	2/9	5/9	0/9	0/9
+ミダゾラム	+0.1	3/7	0/7	3/7	4/7	1/7	0/7
+ミダゾラム	+1.0	0/7	0/7	0/7	2/7	1/7	0/7
+ミダゾラム	+10	2/6	0/6	1/6	1/6	0/6	0/6
ペンタゾシン	2.5 [静脈内]	5/10	0/10	0/10	7/10	2/10	0/10
+ミダゾラム	+0.1	3/10	0/10	0/10	8/10	3/10	0/10
+ミダゾラム	+1.0	2/10	3/10	1/10	4/10	2/10	0/10
+ミダゾラム	+10	6/10	5/10	3/10	6/10	2/10	0/10
薬物	用量	投与後の時間 (分)					
		15	30	60	15	30	60
モルヒネ	3 [皮下]	8/12	6/12	7/12	3/12	5/12	3/12
+ミダゾラム	+1	6/7	6/7	6/7	2/7	3/7	2/7

ミダゾラムにペンタゾシンの Hot plate 法における鎮痛効果の持続時間を延長する作用が認められたが、それ以外にほとんど影響はなかった。

2) フェンタニールとの薬物相互作用（公表論文，資料番号：4.2.1.1.1-6〔参考資料〕）

ミダゾラムは長期間の鎮静管理が必要となる場合に用いられる代表的な薬物であるが、ミダゾラム単独投与で十分な鎮静が得られない場合、又は鎮痛が必要な場合にはミダゾラムとフェンタニールの併用投与が行われている。そこで、フェンタニールとの薬物相互作用を検討した。

雄性ラット（180 g）を用い、ミダゾラム塩酸塩（5～50 mg/kg）又はフェンタニール（0.005～0.125 mg/kg）をそれぞれ静脈内単独投与した時、及びミダゾラム塩酸塩（1.25～25 mg/kg）とフェンタニール（0.025～0.05mg/kg）を静脈内併用投与した時の症状観察及び行動レベルの観察を行った。

ミダゾラム塩酸塩とフェンタニールの薬物相互作用を表 2.6.2.5-4 に示す。

表 2.6.2.5-4 ミダゾラム（塩酸塩）とフェンタニールの薬物相互作用
（資料番号 4.2.1.1.1-6〔参考資料〕の表 7 を改変）

薬物	用量 (mg/kg)	症状観察	行動レベル
ミダゾラム塩酸塩	5, 10	運動失調, 筋弛緩, 正向反射消失, 疼痛反応の消失	無麻酔状態
	25, 50	正向反射消失, 疼痛反応の消失	無麻酔状態
フェンタニール	0.005	短期の運動量増加	興奮状態
	0.025～0.125	筋硬直, カタトニー, 疼痛反応の消失, 呼吸抑制	抑制状態
ミダゾラム塩酸塩 ＋フェンタニール	5 or 25＋0.05	呼吸抑制, チアノーゼ, 死亡	-
	2.5＋0.05	筋硬直, 呼吸抑制, カタトニー, チアノーゼ	抑制状態, 麻酔状態 (1/3)
	1.25＋0.05	筋硬直, カタトニー, 疼痛反応の消失, 呼吸抑制, (フェンタニール単独投与の場合と同様)	抑制状態
	5＋0.025	死亡 (1/2)	
	1.25＋0.025	筋硬直, カタトニー, 疼痛反応の消失, 呼吸抑制, (フェンタニール単独投与の場合と同様)	抑制状態

5 mg/kg のミダゾラム静脈内単独投与では運動失調及び筋弛緩を示し、10～50 mg/kg のミダゾラムでは正向反射及び疼痛反応の消失が認められたが、麻酔作用は認められなかった。

0.005 mg/kg のフェンタニール静脈内単独投与では短期の運動量増加を示し、0.025～0.125 mg/kg のフェンタニールでは筋硬直、カタトニー、疼痛反応の消失及び呼吸抑制が認められた。

5～25 mg/kg のミダゾラム及び 0.05 mg/kg のフェンタニール静脈内併用投与では重度の呼吸抑制が認められ数分後に死亡した。ミダゾラムを 2.5 mg/kg で併用した場合でも、重度の呼吸抑制が認められた。さらにミダゾラムを 1.25 mg/kg で併用した場合には、0.05 mg/kg のフェンタニール単独投与と同様の観察所見が認められた。ミダゾラムと 0.025 mg/kg のフェンタニールを静脈内併用投与すると呼吸抑制を増強し、ミダゾラムを 5 mg/kg に増量した場合には死亡した。

3) メペリジン、アトロピン、メプロバメート、ペントバルビタール及びクロルプロマジンとの薬物相互作用（公表論文，資料番号：4.2.1.1.1-6〔参考資料〕）

麻酔前投与薬として、メペリジン、アトロピン、メプロバメート、ペントバルビタール及びクロルプロマジンが繁用されるので、この5剤とミダゾラムの薬物相互作用について検討した。

試験にはCD-1系雌雄マウス（17～25 g）を用いた。被験薬はメペリジン（塩酸塩）、アトロピン（硫酸塩）、メプロバメート、ペントバルビタールナトリウム、クロルプロマジン（塩酸塩）で用量はフリー塩基・酸に換算して表示した。被験薬はアラビアゴム水溶液に懸濁して調製し、被験薬の種々の用量を、雌雄マウスにそれぞれ少なくとも10匹以上経口投与した。ミダゾラム（マレイン酸塩）[用量は塩基に換算して表示]は溶媒（酒石酸，エデト酸2ナトリウム，塩化ナトリウム，ベンジルアルコール，水酸化ナトリウム，精製水）に溶かし、メペリジン、ペントバルビタールナトリウム、アトロピンと併用する場合には投与5分後に、クロルプロマジンと併用の場合には30分後に、メプロバメートと併用の場合には60分後に、3 mg/kg（LD₅₀値の1/10以下の用量）を静脈内投与し、対照には溶媒を投与した。薬物投与後72時間にわたり死亡の有無及び症状観察を行い、LD₅₀値を算出した。試験結果を表2.6.2.5-5に示す。

表 2.6.2.5-5 ミダゾラムのメペリジン、アトロピン、メプロバメート、ペントバルビタール及びクロルプロマジンのLD₅₀値に及ぼす作用
（資料番号4.2.1.1.1-6〔参考資料〕の表9を改変）

薬物	LD ₅₀ 値：mg/kg, (95%信頼区間)				MDA 併用 /薬物単独	MDA 併用 /溶媒併用
	性	薬物単独	溶媒併用	ミダゾラム併用		
メペリジン (塩酸塩)	♂	323 (281-395)	300 (257-347)	444 (397-491)	0.73	0.68
	♀	364 (324-454)	381 (347-418)	454 (401-523)	0.35	0.84
アトロピン (硫酸塩)	♂	770 (655-962)	639 (538-729)	572 (354-679)	1.35	n.s.
	♀	617 (520-728)	594 (394-706)	668 (606-747)	n.s.	n.s.
メプロバメート	♂	1421 (1355-1521)	1415 (1199-1574)	1512 (1401-1658)	n.s.	n.s.
	♀	1206 (1061-1316)	1377 (1180-1508)	1196 (1084-1294)	n.s.	1.15
ペントバルビタールナトリウム	♂	282 (252-368)	232 (216-251)	230 (213-250)	n.s.	n.s.
	♀	239 (218-269)	278 (246-389)	217 (191-258)	n.s.	1.28
クロルプロマジン (塩酸塩)	♂	887 (783-1002)	945 (848-1034)	869 (691-1061)	n.s.	n.s.
	♀	875 (792-963)	1011 (913-1108)	658 (506-734)	1.33	1.54

用量はフリー塩基・酸に換算して表示した。

n.s.：相互作用なし

ミダゾラムは、アトロピン投与群の雄とメプロバメート投与群の雌、ペントバルビタール及びクロルプロマジン投与群のLD₅₀値を低下させた。一方、ミダゾラムは抗けいれん作用により、メペリジンのけいれん誘発を抑制し、LD₅₀値は高くなった。しかし、トータルとして上記の変化は弱いものであり、ミダゾラムとメペリジン、アトロピン、メプロバメート、ペントバルビタール及びクロルプロマジンの実質的な相互作用は認められなかった。

4) フルマゼニルとの薬物相互作用（公表論文，資料番号：4.2.1.4-3〔参考資料〕）

フルマゼニルは中枢ベンゾジアゼピン受容体と結合したベンゾジアゼピン系薬物と置換することによって薬効を消失させる特異的ベンゾジアゼピン受容体拮抗薬であり，本邦においては「ベンゾジアゼピン系薬による鎮静の解除及び呼吸抑制の改善」の効能・効果を取得している．ミダゾラムとフルマゼニルの薬力学的相互作用として抗けいれん作用，筋弛緩作用及び催眠作用に及ぼす影響について検討した．

(1) 抗けいれん作用に及ぼす影響

a) ペンチレンテトラゾール誘発けいれん

試験には ddY 系雄性マウス（6～7 週齢，20～22 g）を用いた．ミダゾラムは市販の注射剤を希釈して調製し，またフルマゼニルは原末 12 mg をプロピレングリコール及びポリエチレングリコール各 1 mL を加えて溶解し，生理食塩水で希釈して調製した．PTZ は生理食塩水に溶解して調製した．生理食塩水又はミダゾラム 3 mg/kg を静脈内投与した 15 分後に 1～10 mg/kg のフルマゼニル又は溶媒を静脈内投与した（n=10）．さらにその 15 分後に PTZ 120 mg/kg を腹腔内投与し，強直性けいれん発現の有無を観察した．

ミダゾラムの PTZ 誘発けいれん抑制作用に及ぼすフルマゼニルの作用を表 2.6.2.5-6 に示す．

表 2.6.2.5-6 ミダゾラムの PTZ 誘発けいれん抑制作用に及ぼすフルマゼニルの作用
（資料番号 4.2.1.4-3 の表 1 を一部改変）

ミダゾラム (mg/kg, 静脈内投与)	フルマゼニル (mg/kg, 静脈内投与)	強直性けいれん発現例
-	-	10/10***
-	10	9/10***
3	-	0/10
3	1	1/10
3	3	3/10
3	5	5/10*
3	10	7/10**

*：ミダゾラム単独投与群に対して $p<0.05$ ，**：ミダゾラム単独投与群に対して $p<0.01$ ，***：ミダゾラム単独投与群に対して $p<0.001$ （Fisher's exact test）

PTZ 誘発けいれんに対するミダゾラムの強直性けいれん抑制作用の ED_{90} 値は 1.5 mg/kg（静脈内投与）であり，ミダゾラムは 3 mg/kg で強直性けいれんを 100%抑制した．

しかし，フルマゼニル 1～10 mg/kg を併用するとミダゾラムの抗けいれん作用を用量依存的に抑制し，その 50%拮抗用量（ ID_{50} 値）は 5.2 mg/kg（静脈内投与）であった．

次に、フルマゼニルのベンゾジアゼピン受容体拮抗作用の持続時間を検討するため、マウスに 10 及び 20 mg/kg のフルマゼニルを静脈内投与した 0～50 分後に 3 mg/kg のミダゾラムを静脈内投与し、その 15 分後に PTZ120 mg/kg を腹腔内投与し、強直性及び間代性けいれん発現の有無について検討した。

ミダゾラムの PTZ 誘発けいれん抑制作用に対するフルマゼニルの拮抗作用の持続時間を表 2.6.2.5-7 に示す。

表 2.6.2.5-7 ミダゾラムの PTZ 誘発けいれん抑制作用に対する
フルマゼニルの拮抗作用
(資料番号 4.2.1.4-3 の表 2 を一部改変)

フルマゼニル (mg/kg)	フルマゼニルとミダゾラムの投与間隔 (分)									
	0	5	10	15	20	25	30	35	45	50
10	10/10***	8/10***	7/10**	6/10**	1/10	0/10	0/10			
20	8/10***			6/10**			6/10**	3/10	1/10	0/10

表中の数値は、けいれん発現動物数／試験動物数を表す。空欄は試験未実施

** : 0/10 に対して $p<0.01$, *** : 0/10 に対して $p<0.001$ (Fisher's exact test)

ミダゾラムの PTZ けいれん抑制作用に対するフルマゼニルの拮抗作用の持続時間は、10 mg/kg で 15 分、20 mg/kg で 30 分であった。

b) 最大電撃けいれん

試験には ddY 系雄性マウス（6～7 週齢，20～22 g）を用いた．薬物調製法はペンチレンテトラゾール誘発けいれんの場合と同様に行った．生理食塩水又はミダゾラム 50 mg/kg を静脈内投与した 15 分後に 5～20 mg/kg のフルマゼニル又は溶媒を静脈内投与した（n=5～11）．さらにその 15 分後に角膜電極を通して電気刺激（30 mA，50 Hz，0.2 秒）を与え，強直性けいれん発現の有無を観察した．

ミダゾラムの MES 抑制作用に及ぼすフルマゼニルの作用を表 2.6.2.5-8 に示す．

表 2.6.2.5-8 ミダゾラムの MES 抑制作用に及ぼすフルマゼニルの作用
（資料番号 4.2.1.4-3 の表 3 を一部改変）

ミダゾラム (mg/kg, 静脈内投与)	フルマゼニル (mg/kg, 静脈内投与)	強直性けいれん発現例
-	-	10/10***
-	10	10/10***
50	-	2/11
50	5	8/10**
50	10	10/10***
50	20	5/5**

** : ミダゾラム単独投与群に対して $p<0.01$, *** : ミダゾラム単独投与群に対して $p<0.001$ (Fisher's exact test)

MES 誘発 30 分前に 50 mg/kg のミダゾラムを静脈内投与すると 11 例中 9 例の強直性けいれん発現が抑制されたが，フルマゼニル 5 mg/kg 以上の併用でミダゾラムの作用は有意に減弱し，10 mg/kg 以上ではミダゾラムの抗最大電撃けいれん作用が消失した．

(2) 筋弛緩作用

試験には ddY 系雄性マウス（6～7 週齢，20～22 g）を用いた．薬物調製法はペンチレンテトラゾール誘発けいれんの場合と同様に行った．生理食塩水又はミダゾラム 5 mg/kg を静脈内投与した 15 分後に 0.05～2.5 mg/kg のフルマゼニル又は溶媒を静脈内投与した（n=10）．さらにその 5～60 分後の間，5 分ごとに金網に懸垂させ筋弛緩作用を検討した．筋弛緩作用は 3 秒以内にマウスが落下した場合に筋弛緩作用陽性と判定した．

ミダゾラムの筋弛緩作用に及ぼすフルマゼニルの作用を表 2.6.2.5-9 に示す．

表 2.6.2.5-9 ミダゾラムの筋弛緩作用に及ぼすフルマゼニルの作用
(資料番号 4.2.1.4-3 の表 5 を一部改変)

フルマゼニル (mg/kg, 静脈内投与)	ミダゾラム (5 mg/kg, 静脈内投与) の筋弛緩作用発現例数
0	10/10
0.05	8/10
0.075	4/10**
0.15	1/10***
0.3	0/10***
0.6	0/10***
1.2	1/10***
2.5	0/10***

** : ミダゾラム単独投与群に対して $p<0.01$, *** : ミダゾラム単独投与群に対して $p<0.001$ (Fisher's exact test)

ミダゾラムは 5 mg/kg の静脈内投与で 10/10 (100%) のマウスに筋弛緩作用を誘発したが，フルマゼニル 0.05～0.3 mg/kg の併用で，ミダゾラムの作用を用量依存的に 20～100%抑制した．フルマゼニルのミダゾラムの筋弛緩作用に対する 50%拮抗用量 (ID_{50} 値) は 0.072 mg/kg (静脈内投与) であった．

次に、フルマゼニルのミダゾラムの筋弛緩作用に対する拮抗作用の持続時間を検討するため、マウスに 1 mg/kg のフルマゼニルを静脈内投与した 15 分前、同時又は 15 分後に 5 mg/kg のミダゾラムを静脈内投与し、上記の方法と同様に、ミダゾラムの筋弛緩作用を検討した。

ミダゾラムの筋弛緩作用に対するフルマゼニルの拮抗作用の持続時間を表 2.6.2.5-10 に示す。

表 2.6.2.5-10 ミダゾラムの筋弛緩作用に対するフルマゼニルの拮抗作用
(資料番号 4.2.1.4-3 の表 6 を一部改変)

処置	フルマゼニル静脈内投与後の時間（分）と筋弛緩作用発現例数								
	20	25	30	35	40	45	50	55	60
ミダゾラム（5 mg/kg）単独	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	9/10
+フルマゼニル 15 分前処置	3/10**	6/10*	8/10	10/10					
+フルマゼニル同時処置	0/10***	0/10***	1/10***	4/10**	6/10*	7/10	7/10	9/10	
+フルマゼニル 15 分後処置	0/10***	0/10***	0/10***	4/10**	5/10*	6/10*	7/10	8/10	8/10

フルマゼニルは 1 mg/kg を静脈内投与した。

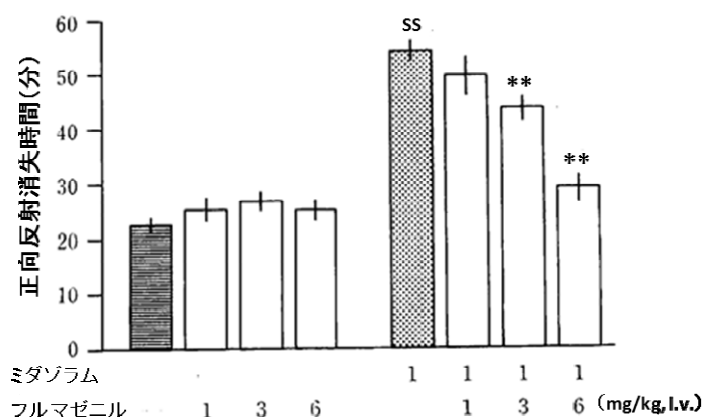
*：ミダゾラム単独投与群に対して $p < 0.05$ ，**：ミダゾラム単独投与群に対して $p < 0.01$ ，***：ミダゾラム単独投与群に対して $p < 0.001$ （Fisher's exact test）

ミダゾラムの筋弛緩作用に対して、フルマゼニルを 15 分前、同時又は 15 分後に併用投与した時の拮抗作用の持続時間は、それぞれ 25 分、40 分及び 45 分間であった。

(3) ヘキソバルビタール睡眠延長作用

試験には ddY 系雄性マウス (6~7 週齢, 20~22 g) を用いた。ミダゾラムとフルマゼニルの薬物調製法は PTZ 誘発けいれんの場合 (114 ページ) と同様に行った。ヘキソバルビタールは 70 mg を秤量し, 注射用蒸留水 7 mL と 1 mol NaOH 0.6 mL を加えて溶解し, 次に 1 mol HCl を加えて pH 10 とした後に精製水を加えて全量を 10 mL とした。生理食塩水又はミダゾラム 1 mg/kg を静脈内投与した 15 分後に 1~6 mg/kg のフルマゼニル又は溶媒を静脈内投与した (n=10)。さらにその 15 分後にヘキソバルビタール 60 mg/kg を腹腔内投与し, 正向反射の有無を指標として睡眠時間を測定した。

ミダゾラムのヘキソバルビタール睡眠延長作用に対するフルマゼニルの作用を図 2.6.2.5-1 に示す。



SS: 無処置群に対して $p < 0.01$ (Duncan の多重比較),

** : ミダゾラム単独投与群に対して $p < 0.01$ (Duncan の多重比較)

図 2.6.2.5-1 ミダゾラムのヘキソバルビタール睡眠延長作用に対するフルマゼニルの作用

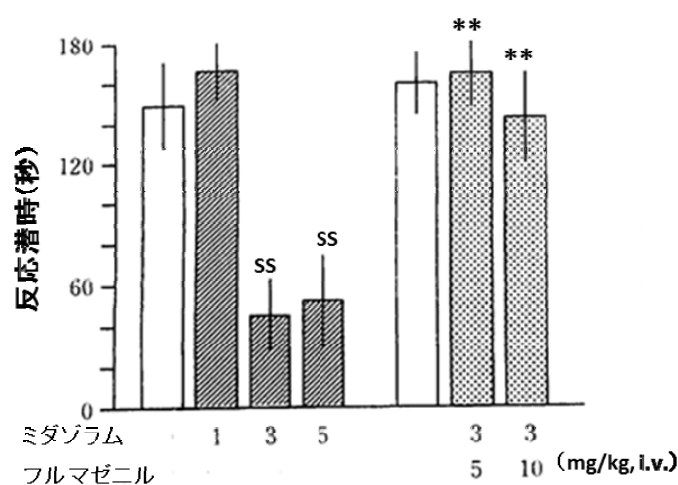
(資料番号 4.2.1.4-3 の図 2 を一部改変)

ミダゾラムは 1 mg/kg の静脈内投与でヘキソバルビタール睡眠時間を約 2 倍に延長させたが, 1~6 mg/kg のフルマゼニルを併用投与すると 3 mg/kg 以上でミダゾラムのヘキソバルビタール睡眠延長作用は有意に減弱した。またフルマゼニルは 1~6 mg/kg の単独投与ではヘキソバルビタール睡眠時間に影響を及ぼさなかった。

(4) 受動回避学習行動

試験には ddY 系雄性マウス (6~7 週齢, 20~22 g) を用いた. 薬物調製法は PTZ 誘発けいれんの場合 (114 ページ) と同様に行った. 生理食塩水又はミダゾラム 1~5 mg/kg を静脈内投与した直後に 5~10 mg/kg のフルマゼニル又は溶媒を静脈内投与した (n=10). その 30 分後にマウスを Step-through 式受動回避学習装置の明室に入れ, 暗室に移動した時に入り口の戸を閉めて, 暗室の床のグットから四肢に電気ショック (1 mA, 2 秒) を与えた (訓練試行). その 24 時間後にマウスを再び明室に入れ, 暗室にはいるまでの時間 (反応潜時) を測定した (試験試行).

受動回避学習行動試験におけるミダゾラムの学習障害作用に対するフルマゼニルの作用を図 2.6.2.5-2 に示す.



ss : 無処置群に対して $p < 0.01$ (Duncan の多重比較),

** : ミダゾラム 3 mg/kg 単独投与群に対して $p < 0.01$ (Duncan の多重比較)

図 2.6.2.5-2 受動回避学習行動試験におけるミダゾラムの学習障害作用に及ぼすフルマゼニルの作用

(資料番号 4.2.1.4-3 の図 3 を一部改変)

ミダゾラムは 1 mg/kg では, 影響を及ぼさないが, 3 及び 5 mg/kg では受動回避学習行動を有意に抑制した. ミダゾラム 3 mg/kg を静脈内投与した直後にフルマゼニル (5 又は 10 mg/kg) を静脈内投与すると, ミダゾラムの受動回避学習行動抑制作用に対して拮抗作用を示した.

(5) 抗不安作用

試験には Fischer 系雄性ラット（8 週齢，170～190 g）を用いた（n=3）．薬物調製法は PTZ 誘発けいれんの場合（114 ページ）と同様に行った．ラットを 1 日 1 回スキナーボックスに入れ，レバーを断続的に押すことにより 45 mg の餌を摂取できることを学習させ，150～250 回/40 分の安定したレバー押し行動を示すようになるまで訓練した．次に，30 分間を 1 セッションとして 5 分間の罰期と非罰期を交互に設け，非罰期には 10 回のレバー押しに対し 1 回の割合で餌を与え，罰期には赤ランプを点灯してブザーを鳴らし，平均 10 回のレバー押しに対して 1 回の割合で，餌を与えると同時に足蹠に電気ショック（0.2～0.3 mA，0.5 秒）を与えた．薬物投与前の 3 日間，1 日 1 セッションの訓練試行をし，基準値とした．試験試行の 30 分前に生理食塩水又はミダゾラム 3 mg/kg を腹腔内投与し，その 15 分後にフルマゼニル（3，6，12 mg/kg）又は溶媒を腹腔内投与して 1 セッションの試験試行を実施した．

抗コンフリクト試験におけるミダゾラムの抗不安作用を表 2.6.2.5-11 に，ミダゾラムの抗不安作用に及ぼすフルマゼニルの作用を表 2.6.2.5-12 に示す．

表 2.6.2.5-11 抗コンフリクト試験におけるミダゾラムの抗不安作用

(資料番号 4.2.1.4-3 の表 7 を一部改変)

非罰期レバー押し回数（レバー押し回数/分）		罰期被ショック回数	
生理食塩水	ミダゾラム	生理食塩水	ミダゾラム
56.2±25	48.1±7.9	3.5±0.7	36.3±9.2**

平均値±SE

**：対照群に対して p<0.01（paired t-test）

表 2.6.2.5-12 ミダゾラムの抗不安作用に及ぼすフルマゼニルの作用

(資料番号 4.2.1.4-3 の表 8 を一部改変)

フルマゼニル (mg/kg)	基準値	フルマゼニル単独	ミダゾラム単独	ミダゾラム及び フルマゼニル併用
3	4.6±1.5	1.3±0.3	50.3±11.9**	18.0±5.5ss
6	4.2±0.7	1.7±0.3	46.0±20.8*	5.3±0.7s
12	1.8±0.1	1.0±0.6	12.7±2.9**	3.3±1.3ss

表中の数値は罰期の被ショック回数（平均値±SE）を示す．

9 匹のラットが 3 日間連続した基準値測定時の被ショック回数は 0-10 の範囲であった．

s：ミダゾラム単独群に対して p<0.05（Duncan の多重比較），ss：ミダゾラム単独群に対して p<0.01（Duncan の多重比較），*：基準値に対して p<0.05（Duncan の多重比較），**：基準値に対して p<0.01（Duncan の多重比較）

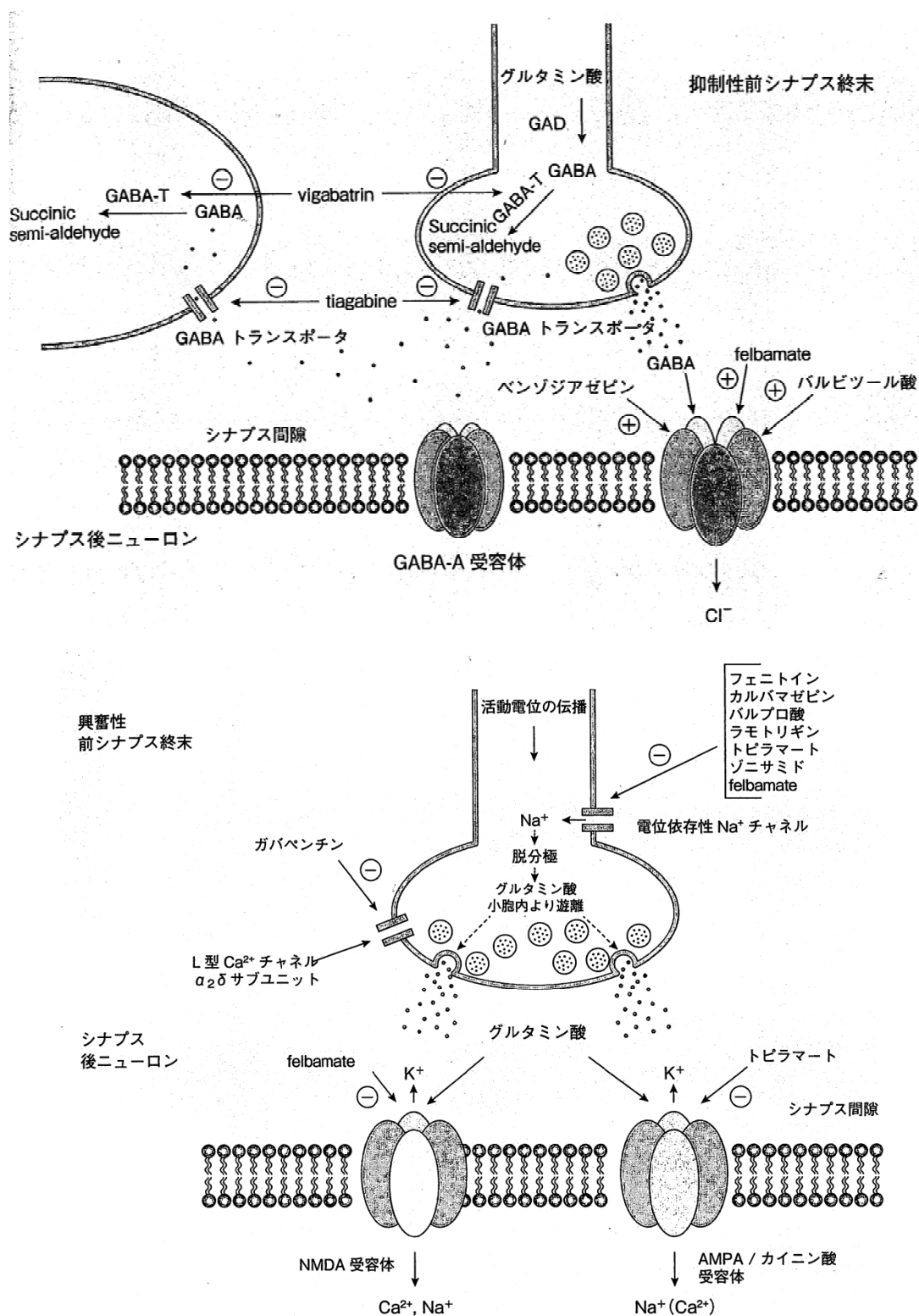
非罰期のレバー押し回数は，ミダゾラム 3 mg/kg を投与しても対照群との間で有意な差は認められなかったが，罰期の被ショック回数は有意に増加した．また，罰期の被ショック回数はフルマゼニル単独投与（3～12 mg/kg）では対照と変わらないが，ミダゾラムの罰期被ショック回数増加作用（抗不安作用）を 3 mg/kg から有意に抑制した．

2.6.2.6 考察及び結論

てんかんについて

「てんかん」は、神経細胞の同期性過剰放電を繰り返す中枢神経系の機能障害であり、この神経細胞の同期性過剰放電により行動学的に「けいれん」が生じる。よって「てんかん」とは自然発生的に生じる、再発性の「けいれん」として定義²⁾されており、WHOでは「大脳神経の過剰な発射により反復性の発作を生じる慢性の脳疾患で、種々の原因が存在し、様々な臨床症状及び検査所見を伴う」と定義している³⁾。てんかんの診断は、①てんかんか否かの診断、②てんかん発作型の診断、③てんかん症候群の診断の3ステップで行われる。てんかんと鑑別すべき疾患としては、失神発作、非てんかん性心因性発作、一過性脳虚血発作、一過性全健忘、過呼吸発作及び急性症候性発作が挙げられる。てんかん発作型の診断は、最初から全般発作をもつ「全般てんかん」と発作が局所性に始まる部分又は焦点性発作をもつてんかん「局在関連（部分，焦点）てんかん」に分けられ、過剰異常放電が中心脳系、特に視床で起これば全般てんかんが起り、過剰異常放電が大脳皮質の局所で起これば局在関連（部分，焦点）てんかんを生じる。全般てんかんの（全般）発作には、欠神発作、ミオクローニ発作、間代発作、強直発作、強直間代発作及び脱力発作があり、局在関連（部分，焦点）てんかんの（部分）発作には、単純部分発作、複雑部分発作及び部分発作から全般発作に移行するものが挙げられる。てんかん症候群の診断では、病因が明白なてんかんを症候性（続発性）、遺伝素因が想定され年齢依存性がみられる以外に病因が見当たらないてんかんを特発性（原発性）と区別しており、代表的なてんかん症候群には、ウェスト症候群、レンノックス・ガストー症候群、小児良性部分てんかん、若年性ミオクローニてんかん及び内側側頭葉てんかん等がある³⁾。これら「全般性か局在関連性か」と「症候性か特発性か」の2つの軸から4つの群に分け、この分類から第一選択の薬剤を決定する。

てんかん病態仮説の中で最も重要なものは「バランス破綻仮説」であり、てんかん性放電は神経伝達の過剰興奮とその伝播で生じていることから、興奮性伝達が抑制性伝達よりも相対的に優勢になることが病態として考えられている。また、特発性てんかん家系から、多くのてんかん責任遺伝子が同定されており、てんかんのイオンチャネル病仮説「チャネロパチー」が提唱されている。興奮性神経系の変異型イオンチャネル蛋白の機能亢進、又は抑制性神経系の変異型イオンチャネル蛋白の機能低下が神経細胞の異常興奮を示し、てんかん発作の引き金となると考えられ、「バランス破綻仮説」の一つとして考えられる⁴⁾。興奮性神経系のイオンチャネル蛋白には、電位依存性ナトリウムチャネル、電位依存性カルシウムチャネル及びグルタミン酸受容体があり、抑制性神経系のイオンチャネル蛋白には、電位依存性カリウムチャネル、グリシン及びGABA_A受容体があり、興奮性神経系のイオンチャネル蛋白の抑制作用又は抑制性神経系のイオンチャネル蛋白の亢進作用が抗てんかん薬の標的となる。抗てんかん薬の標的分子と作用機序を図2.6.2.6-1に示す。

図 2.6.2.6-1 抗てんかん薬の標的分子と作用機序²⁸⁾

正常神経細胞の静止膜電位は細胞内で陰性で(分極), 抑制過程ではさらに陰極になる(過分極). 興奮過程で細胞内は陽性となり, 活動電位が発生する(脱分極). イオンレベルでは, 抑制過程では細胞内への Cl^- の流入と, K^+ の細胞外への流出がみられ, 興奮過程で細胞内への Ca^{2+} と Na^+ の流入がみられ, 細胞内は陽性になる. さらに神経細胞は興奮伝達物質であるグルタミン酸により細胞を興奮させ, 抑制伝達物質である GABA により興奮を抑制する. 抗てんかん薬は, Ca^{2+} や Na^+ などのイオンチャネルに直接又は間接的に作用して細胞の興奮を抑制し, 又は GABA やグルタミン酸などの神経伝達の生合成や代謝, 受容体の開閉のコントロールによりてんかん発作を抑制する.

効力を裏付ける *in vitro* 試験

ミダゾラムは, ベンゼン環・ジアゼピン環から構成されるベンゾジアゼピン (benzodiazepine) 系 GABA_A 受容体リガンドである. GABA 受容体にはイオンチャネル型である GABA_A 受容体 (Cl^- チャネル) と G 蛋白共役型受容体である GABA_B 受容体があり, GABA_A 受容体は 5 つのサブユニットが集まって完全な膜貫通型イオンチャネルを形成しており, 2 分子の GABA が結合することによって開口し, 主に Cl^- を通過させる. Cl^- の平衡電位はほとんどの神経細胞で静止膜電位に近いので, Cl^- 透過性が増加することで神経細胞は過分極し, 興奮性入力 of 脱分極効果が減少し, 興奮性が抑制される. GABA の急速で一過性の後シナプス抑制性電流発生には, 飽和濃度に近い濃度の GABA が後シナプス終板の GABA_A 受容体に結合し, その受容体を活性化して Cl^- コンダクタンスを発生させる必要がある^{5~6)}.

マウスの脳及び骨髄組織を用いて GABA を添加すると内向き電流が記録され, この GABA 誘発電流は GABA_A 受容体のアロステリック阻害物質(DMCM) により部分的に抑制された. ミダゾラムは, GABA 誘発電流を増強させ, その作用は DMCM により抑制された. また, ミダゾラムの内向き電流増強作用はグリシン誘発電流に対して作用を示さないことから, GABA_A 受容体に対してアロステリックアゴニスト作用を示すことが示された (資料番号: 4.2.1.1.2-1 [参考資料], 資料番号: 4.2.1.1.2-2 [参考資料]). GABA 灌流による GABA_A 受容体チャネルの応答は, シナプス下膜に加えてシナプス外膜の GABA_A 受容体チャネルの活性化による. そこでテトロドトキシン (Na^+ channel blocker) を灌流液に加え, 活動電位によらずシナプス前より自然放出された GABA により発生した GABA 作動性微小抑制性シナプス後電流 (miniature inhibitory postsynaptic current: mIPSC) に対するミダゾラムの作用を検討するため, ラット培養海馬及び骨髄神経を用いてパッチクランプ法で mIPSC を測定した. その結果ミダゾラムは自発性の GABA 作動性 mIPSC の下降相の時間は延長する一方, その発生頻度や振幅は変化させなかった. また, グリシン作動性の抑制性シナプス伝達には作用せず, GABA 作動性の抑制性シナプス伝達に特異的に作用することが示された (資料番号: 4.2.1.1.2-5 [参考資料], 資料番号: 4.2.1.1.2-6 [参考資料]).

GABA_A受容体にはリガンドである GABA の結合部位の他にバルビツール酸結合部位、ベンゾジアゼピン結合部位、糖質コルチコイド結合部位、ペニシリン結合部位、フロセミド結合部位、フルマゼニル結合部位が知られており、GABA との反応性をアロステリックに調整している。GABA_A受容体構造の模式図を図 2.6.2.6-2 に示す。

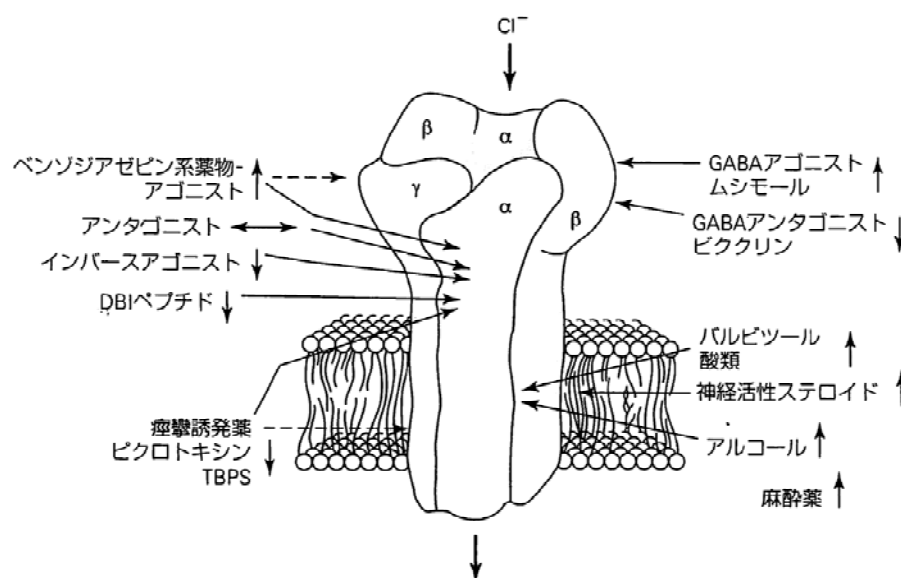


図 2.6.2.6-2 GABA_A受容体構造の模式図²⁹⁾

GABA_A受容体の主な作動薬はベンゾジアゼピン系薬以外にバルビツール酸系薬が挙げられる。ミダゾラムは、GABA_A受容体のベンゾジアゼピン結合部位と結合すると、GABA が誘発するチャネルの開口頻度を増加させる。その作用はバルビツール酸系薬（バルビツール酸結合部位に結合）と異なり、開口時間を延長せず、高用量負荷してもアゴニスト活性はなく、GABA の濃度-作用曲線を左にシフトさせる（資料番号：4.2.1.1.2-3 [参考資料]）。また、ミダゾラムが Cl⁻チャネルの開口頻度をあげるメカニズムとして、GABA と GABA_A受容体との結合親和性を高めることが考えられる（資料番号：4.2.1.1.2-4 [参考資料]）。よって、バルビツール酸薬が GABA の最大効力をあげるのに対してミダゾラムは GABA の用量効力をあげるため、バルビツレートよりも安全性が高いことが示唆される。

GABA_A受容体は、複数のポリペプチドサブユニットの組合せによって形成される 275 kDa のヘテロ 5 量体の糖タンパク質である。7 種類の分子種（α, β, γ, σ, ε, θ, ρ）がクローニングされており、それぞれに複数のアイソザイムが存在することから 18 種類（α₁₋₆, β₁₋₃, γ₁₋₃, σ, ε, θ, ρ₁₋₃）のサブユニットが報告されている。中枢神経系に最も多く発現しているのは α, β, γ（特に α₁, β₂, γ₂）であり、その割合（α:β:γ）は 2:2:1 又は 2:1:2 と報告されている³⁰⁾が、天然 GABA_A受容体の正確なサブユニット構成は不明であり、GABA_A受容体サブユニットアイソフォームの多様性が GABA_A受容体における薬理作用の多様性をもたらすことが示唆されている。

GABA_A受容体結合部位の形成に関与している領域は α サブユニット及び γ サブユニット N 末端

細胞外ドメインであり、その領域は細胞外ドメイン上の数カ所に分かれており、 α_1 サブユニット上では His101, Tyr159-Thr162 領域及び Gly200-Val211 領域及び γ_2 サブユニット上では Lys41-Trp82 及び Arg114-Asp161 領域が、ベンゾジアゼピン系薬の GABA_A 受容体結合に必須である。なかでも α_1 サブユニットの His101 はベンゾジアゼピン系薬が直接作用する「結合部位」であり、 α_1 , α_2 , α_3 及び α_5 サブユニットを含む GABA_A 受容体はベンゾジアゼピン系薬感受性であり、 α_1 サブユニットの His101 に相当する位置にヒスチジン残基をもつ。一方、 α_4 及び α_6 サブユニットを含む GABA_A 受容体はベンゾジアゼピン系薬非感受性であり、この位置にヒスチジン残基でなくアルギニン残基をもつ^{5~6)}。ミダゾラムは α_1 , β_2 , γ_2 サブユニット発現 GABA_A 受容体に対して強い親和性を示し、GABA 誘導電流を増強させた（資料番号：4.2.1.1.2-7 [参考資料]，資料番号：4.2.1.1.2-8 [参考資料]）。

GABA_A 受容体のサブユニット構成は、脳の発達段階及び加齢によって変化することが知られており、ミダゾラムの薬剤感受性に対して脳の発達及び加齢の影響が示唆される。そこで幼若（生後 7~12 日）、成熟（生後 1~2 ヶ月）及び老齢（生後 20~21 ヶ月）ラットの海馬脳スライス標本又は内側中隔・対角帯核ニューロン標本を用いて、ミダゾラムの GABA 誘導電流に対する作用を検討した。その結果、成熟ラットの海馬脳スライス標本又は内側中隔・対角帯核ニューロン標本においてミダゾラムは GABA 誘導電流増強作用を示すが、幼若ラットの海馬脳スライス標本において GABA 誘導電流増強作用は認められず、一方、老齢（生後 20~21 ヶ月）ラットの内側中隔・対角帯核ニューロン標本ではミダゾラムの増強作用は増大した（資料番号：4.2.1.1.2-9 [参考資料]，資料番号：4.2.1.1.2-10 [参考資料]）。これは脳内の GABA_A 受容体の α_1 サブユニット発現パターンと関連しており、胎児期では α_1 サブユニットの発現は認められず、生後 0~12 日までの α_1 サブユニット発現は弱く、生後 20 日から強い発現が認められた^{7~9)}。さらに生後 2 ヶ月齢と生後 30 ヶ月のラット脳内の α_1 , β_2 , γ_2 サブユニットの発現を比較すると、 β_2 , γ_2 サブユニットの発現に有意な差はなく、 α_1 サブユニットの発現は 22.8%上昇した⁸⁾。これらのことから脳の発達段階及び加齢によって変化する GABA_A 受容体の α_1 サブユニット発現パターンが、ミダゾラムの薬剤感受性に影響することが示唆される。

急性けいれんモデルを用いた効力を裏付ける試験

てんかん病態には「てんかん原性」(epileptogenesis)と「発作原性」(ictogenesis)があり、てんかん原性はてんかん細胞、てんかん焦点及びてんかん性回路がバランス破綻を獲得する機構であり、遺伝性要因と獲得性要因がある。一方、発作原性は発作を惹起する能力であり、てんかん原性を獲得した上での、てんかん発作発現に必要な条件が集積した発作トリガー機構である。てんかん原性と発作原性の成熟によりてんかん発作が発現し、てんかん発作の曝露が増加するとてんかん原性成熟が進み、てんかんが重症化すると考えられている。よってバランス破綻状態形成（てんかん原性獲得）の特定段階を強制的に誘導したものがけいれんモデルであり、てんかん原性と発作原性を獲得したモデルが広義のてんかんモデルとなる¹⁰⁾。

MES モデルは、部分てんかんに対する有効性の指標として用いられており、電気刺激により脱分極が高頻度に反復して繰り返され、多数の神経細胞が同期化した活動電位を誘発し、さらにシナプスを介して大脳皮質全般に広がった後、けいれんが誘発される。ミダゾラムは経口、脳室内及び髄腔内投与で MES を抑制し、抗けいれん作用の発現時間はジアゼパムより速かった（資料番号：4.2.1.1.1-6 [参考資料]，資料番号：4.2.1.1.1-7 [参考資料]，資料番号：4.2.1.1.1-8 [参考資料]）。

PTZ, 3-MPA 及びストリキニーネ誘発モデルは、GABA やグリシンなどの抑制性神経伝達の相対的抑制により、てんかん原性を獲得した全般てんかんに対する有効性を評価するけいれんモデルである。ミダゾラムは経口及び静脈内投与で PTZ, 3-MPA によるけいれんを抑制し、作用発現時間はジアゼパムより速かった（資料番号：4.2.1.1.1-6 [参考資料]，資料番号：4.2.1.1.1-6 [参考資料]）。また、グリシンの抑制性神経伝達の相対的抑制により誘発したけいれん（ストリキニーネ誘発けいれん）に対してフェニトインは抑制作用を示さなかったが、ミダゾラム及び高用量のフェノバルビタールは有意に抑制した（資料番号：4.2.1.1.1-10 [参考資料]）。

NMDA, カイニン酸及びキスカル酸の側脳室内投与による興奮性アミノ酸誘発モデルは、興奮性神経伝達の相対的機能亢進によりてんかん原性を獲得した部分てんかんに対する有効性を評価するけいれんモデルである。フェニトインはすべての興奮性アミノ酸誘発けいれんに対して抑制作用を示さなかった。ミダゾラムはカイニン酸誘発けいれんに対して抑制作用を示したが、NMDA 及びキスカル酸誘発けいれんに対しては作用を示さなかった（資料番号：4.2.1.1.1-11 [参考資料]）。

これらミダゾラムを含むベンゾジアゼピン系薬の抗けいれん作用には GABA_A 受容体の α_1 サブユニット発現が重要であることが報告されている。マウスの GABA_A 受容体の各 α_1 サブユニットに対して His101Arg 変異（ベンゾジアゼピン系薬の結合部位である α_1 サブユニットの His101 残基を Arg に置換した）を導入したノックインマウスを用いてジアゼパムの作用を検討すると、抗けいれん作用と鎮静作用のみが著明に減弱し、 α_1 サブユニットのコンディショナルノックアウトマウスにおいてもベンゾジアゼピン系薬の抗けいれん作用と鎮静作用は減弱した^{11~12)}。ミダゾラムは α_1 サブユニット発現 GABA_A 受容体に対して強い親和性を示し、GABA 誘導電流を増強することから（資料番号：4.2.1.1.2-7 [参考資料]，資料番号：4.2.1.1.2-8 [参考資料]），ミダゾラムの抗けいれん作用は α_1 サブユニット発現 GABA_A 受容体の抑制性シナプス伝達増強作用によることが示唆される。

一方、抑制性神経伝達物質である GABA は、GABA_A 受容体 Cl⁻チャネルを開口させて電気化学勾配に従った Cl⁻の流入による膜電位の過分極によって抑制機能を発揮するため、細胞内 Cl⁻濃度が変化すると GABA 作用は変化し、細胞内 Cl⁻濃度が高い胎児期（ヒト）や発達期（生後 10～14 日目のラット）では本来過分極性に働くはずの GABA の作用が Cl⁻の細胞内流出により脱分極を示すことが報告されている。細胞内能動的 Cl⁻ホメオスタシスの役割を担っている分子は、Cl⁻トランスポーターであり、細胞内に Cl⁻を運ぶ NKCC1 (Na⁺, K⁺-2Cl⁻ cotransporter) と細胞外へ Cl⁻を運ぶ KCC2 (K⁺-Cl⁻ cotransporter) の機能比率により細胞内 Cl⁻濃度が調整される。胎児期のラッ

ト脳では NKCC1 の機能が優位であり、生後 0～4 日では NKCC1 と KCC2 の機能が拮抗し、生後 11～20 日目に NKCC1 の発現が消失（KCC2 は生後 0～20 日まで発現）する。よってラット脳細胞内 Cl^- 濃度は胎児期で高く、生後 4～20 日では平衡状態であり、生後 20 日以降では細胞内 Cl^- 濃度は低値を示し、胎児期～生後 4 日目までの GABA_A 受容体は GABA の結合により定常状態では脱分極を示す^{13～15)}。しかし、 GABA_A 受容体の興奮性伝達の抑制作用には、 Cl^- チャンネル開口による電気化学勾配に従った膜電位の過分極作用以外に、シャンティング（ Cl^- イオン透過性の増加により静止膜電位から離れる電位変化を減弱させる）効果が報告されており、発達期のラット（生後 8～12 日目）における K^+ 誘導けいれんモデルにおいて、 GABA_A 受容体は興奮性伝達抑制作用を示し、ベンゾジアゼピン系薬は抗けいれん作用を示した¹⁶⁾。よってミダゾラムは、幼若ラットの PTZ 誘発モデルにおいて、シャンティング効果により抗けいれん作用は示すものの、生後 7 及び 12 日齢ラットの脳細胞内 Cl^- 濃度が高いため、minimal seizure の発現率が増加したものと考えられる（資料番号：4.2.1.1.1-9 [参考資料]）。

けいれん重積モデル動物を用いた効力を裏付ける試験

「てんかん重積 (status epilepticus)」とは、けいれん発作が一定時間以上続く状態、又は持続時間の短い発作が反復して発症し、発作の間歇期に意識が完全に回復しない状態である。てんかん重積には、けいれん性発作が持続する全身けいれん性てんかん重積 (generalized convulsive status epilepticus: GCSE) とけいれん性発作が見られない非けいれん性てんかん重積 (non convulsive status epilepticus: NCSE) の 2 種類があり、NCSE には欠神発作重積、単純又は複雑部分発作重積及び潜在性てんかん重積がある。けいれんが連続する (GCSE)、又は脳波で発作波が連続する

(NCSE) てんかん重積時にはグルタミン酸などの興奮性神経伝達物質がシナプス末端より過剰に放出され、後シナプス側の神経細胞内にカルシウムが多量に流入した結果として細胞が傷害され、神経細胞死に至る³¹⁾。てんかん重積は一刻も早く止めなければ脳の損傷が進行する緊急事態であり、治療初期にはベンゾジアゼピン系、バルビツール酸系薬又はフェニトインのような電位依存性ナトリウムチャンネル阻害薬が用いられる¹⁷⁾。

代表的なけいれん重積モデル動物として、ピロカルピン誘発けいれんモデルがあり、ムスカリン受容体アゴニストであるピロカルピンを全身性に投与すると、症状及び脳波変化を誘発し、その変化は三つの期間に分けられる (① 24 時間持続の辺縁てんかん重積発作、② 4～44 日間の潜伏期間、③ 自然発生的なけいれん発作の再発)。急性期の場合、ピロカルピン投与直後に海馬において発火が起こり、その後皮質に広がり、この脳波形 (律動性高振幅棘波と鋭波) が数時間持続する。発作は 3～5 分おきに再発し、この状態は 50～60 分持続する。慢性期の場合、発作の発生は不定期であり、発作パターンも多様である。ピロカルピン誘発によるてんかん重積は、脳の広範囲な部分にネクロシス及びアポトーシスによる細胞死を誘導する。神経細胞死はピロカルピン投与数分後に発現し、その後遅延性の神経変性を生じる¹⁸⁾。ピロカルピン誘発のてんかん重積発症機序を図 2.6.2.6-3 に示す。

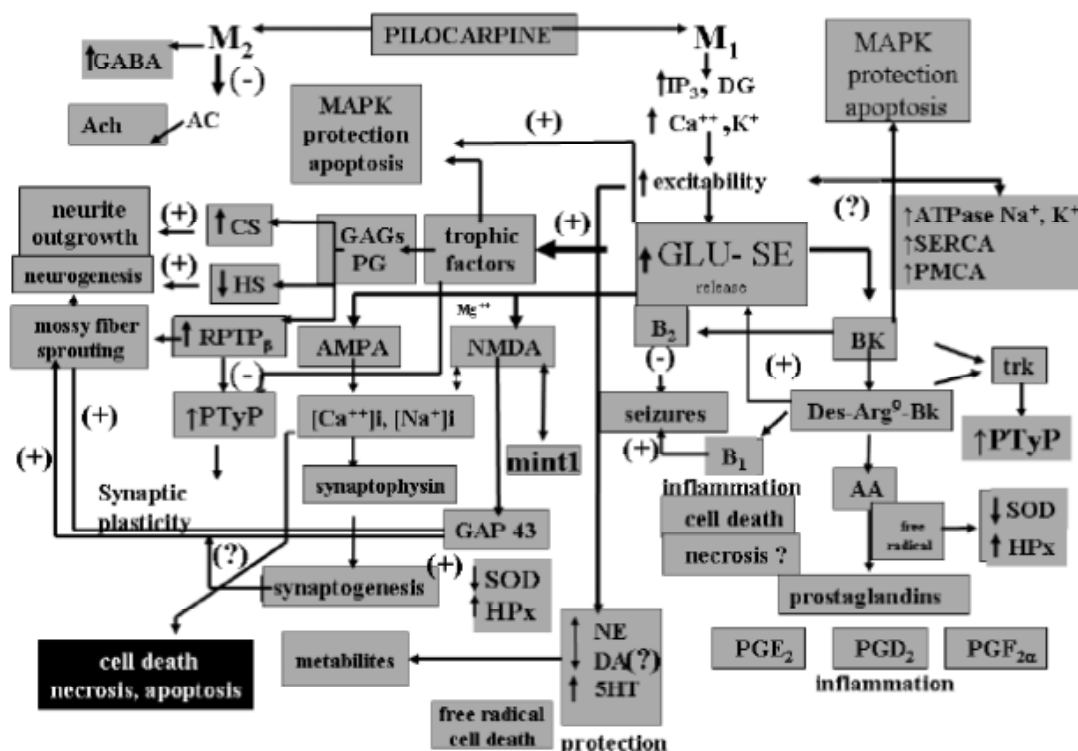


図 2.6.2.6-3 ピロカルピン誘発のけいれん重積発症機序¹⁸⁾

ムスカリン受容体M₁に結合するピロカルピンはphospholipase Cを活性化し, diacylglycerol (DG) と inositol triphosphate (IP₃) が産生され, 細胞内 Ca²⁺が上昇し, グルタミン酸が放出される. 興奮性神経伝達物質であるグルタミン酸は AMPA/KA/NMDA 受容体に結合後, Na⁺及び Ca²⁺が細胞内に流入しネクロシス及びアポトーシスによる細胞死を誘導する. ミダゾラムはピロカルピン誘発による部分発作後の二次性全般発作(複雑部分発作重積)の発現率を抑制した(資料番号: 4.2.1.1.1-1 [参考資料]). また, 有機リン酸塩系神経作用物質ソマンは, アセチルコリンエステラーゼの反応を阻害し, アセチルコリンの集積によりムスカリン受容体を継続的に刺激し, ピロカルピン誘発けいれん発作と同様の発作を誘発する. 治療初期におけるミダゾラムの腹腔内投与は, けいれん脳波を抑制し, 神経細胞死とその後の遅延性の神経変性を抑制した(資料番号: 4.2.1.1.1-2 [参考資料], 資料番号: 4.2.1.1.1-3 [参考資料]).

PTZ 誘発全般けいれん(抑制性神経伝達の相対的抑制)発作モデルに, 電位依存性ナトリウムチャネル阻害薬であるフェニトインを併用(興奮性神経伝達の抑制)すると 90 分間の持続性間代けいれん(GCSE)が誘発される. ミダゾラムはジアゼパムと比較して GCSE に対して短時間に抑制作用を示した(資料番号: 4.2.1.1.1-4 [参考資料]).

初期治療を行っても, けいれんが持続する場合が難治性のてんかん重積であり, てんかん重積が 30 分以上持続すると脳損傷が回復しないことが報告されている¹⁷⁾. そこで全身麻酔下のラットに GABA 合成阻害薬 MPA (抑制性神経伝達の相対的抑制)の持続静脈内投与又はナトリウムチャネルオープナーである FUL (興奮性神経伝達の相対的機能亢進)の持続吸入により難治性の

てんかん重積状態を誘発し、このモデルにおけるミダゾラムのてんかん重積脳波及び脳損傷に対する作用を検討した。ミダゾラムはチオペンタール及びイソフルランとは異なり、てんかん重積持続による脳損傷を抑制するとともに、難治性のてんかん重積状態に対する有効性が示唆された（資料番号：4.2.1.1.1-5 [参考資料]）。

安全性薬理試験

ミダゾラムの安全性薬理コアバッテリー試験として、中枢神経系、心血管系及び呼吸器系に及ぼす影響を検討した。

中枢神経系に対しては、よろめき歩行、筋弛緩、鎮静、運動量減少及び睡眠等の薬理作用に起因した作用が認められた（資料番号：4.2.1.2-2 [参考資料]）。同様の作用は幼若動物でも報告されており、20日齢のC57BL/6系雌雄マウスに高用量（50 mg/kg）のミダゾラムを腹腔内投与すると、3時間後に行動量減少が認められ、その作用は48時間持続した¹⁹⁾。

心血管系に対しては、ミダゾラムの静脈内投与1～5分後に血圧、心拍数、心拍出量、心収縮パラメータ及び左心室内圧がわずかに低下した（資料番号：4.2.1.1.1-6 [参考資料]、4.2.1.2-2 [参考資料]）。また、ミダゾラムは摘出器官平滑筋に対して 3×10^{-5} M以上の高濃度で弛緩作用を示し（資料番号：4.2.1.1.1-6 [参考資料]、4.2.1.2-2 [参考資料]）、L-type Ca^{2+} channelに対して高濃度で阻害作用を示すことが報告されており^{20~22)}、ミダゾラムには血圧下降作用があることが示唆された。しかし、ミダゾラムのQT延長作用は認められず（資料番号：4.2.1.3-3 [参考資料]）、ヒトにおいても同様な結果が報告されていることから、心室性頻脈性不整脈が発現する可能性は低いと考えられた。

呼吸器系に対しては、呼吸数に影響を及ぼさないものの（資料番号：4.2.1.2-2 [参考資料]）、ミダゾラムの静脈内投与では呼吸抑制作用を示し（資料番号：4.2.1.3-4 [参考資料]）、PK-PD解析からミダゾラムの呼吸抑制作用の発現はミダゾラムの中枢神経系に対する作用であることが示唆された（資料番号：4.2.1.3-5 [参考資料]）。また、ミダゾラムは横隔膜神経の発火を抑制し、その抑制作用はベンゾジアゼピン系拮抗薬であるフルマゼニルにより抑制することが報告されていることから^{23~24)}、ミダゾラムの呼吸抑制作用は呼吸中枢の抑制によるものと考えられた。

その他、ミダゾラムの腎・尿系、自律神経系及び胃腸管系に及ぼす影響を検討した結果、ミダゾラムはこれら末梢組織において作用を示さないことが示された（資料番号：4.2.1.2-2 [参考資料]、資料番号：4.2.1.1.1-6 [参考資料]）。

副次的薬理試験及び薬力学的薬物相互作用試験

ミダゾラムは鎮静作用、筋弛緩作用、抗不安作用及び催眠作用（資料番号：4.2.1.1.1-6 [参考資料]、資料番号：4.2.1.2-2 [参考資料]）を示すが、 GABA_A 受容体への占有持続時間が短いことから（資料番号：4.2.1.1.1-6 [参考資料]、資料番号：4.2.1.1.3-2 [参考資料]）、短時間型催眠鎮静剤と位置付けされており、本邦では「麻酔前投薬」、「全身麻酔の導入及び維持」及び「集中治療における人工呼吸中の鎮静」を効能として使用されている。そのためミダゾラムは麻酔薬及び鎮痛

薬と併用して使用される場合が多いことから、ミダゾラムと麻酔薬及び鎮痛薬の薬力学的薬物相互作用を検討した。ミダゾラム単独投与では麻酔作用は認められないが、麻酔薬と併用した場合、ミダゾラムの麻酔増強作用が認められた。一方、鎮痛薬の作用に対して増強作用は認められなかった（資料番号：4.2.1.1.1-6〔参考資料〕、4.2.1.2-2〔参考資料〕）。

また、ミダゾラムはメペリジン塩酸塩、アトロピン、メプロバメート、ペントバルビタール及びクロロプロマジン塩酸塩に対する相互作用を示さなかった（資料番号：4.2.1.1.1-6〔参考資料〕）。

一方、ベンゾジアゼピン系拮抗薬であるフルマゼニルはミダゾラムの抗けいれん作用、鎮静作用、筋弛緩作用、抗不安作用及び催眠作用に対して拮抗作用を示した（資料番号：4.2.1.1.1-6〔参考資料〕）。

ミダゾラム代謝物の薬理作用

ミダゾラムを健康成人に経口投与すると、P450 代謝酵素（CYP 3A4）により 1-OH MDA、4-OH MDA 及び 1,4-OH MDA に代謝され、尿中にそれぞれ 63～66%、6～8%及び 2～3%排泄される。これら代謝物は GABA_A 受容体に対して親和性を示すものの、薬理作用は異なり、筋弛緩作用はミダゾラムと比べて 1-OH MDA が約 1/5、4-OH MDA が約 1/10、1,4-OH MDA が約 1/50 であった。

一方、これら代謝物の抗けいれん作用は 4-OH MDA がミダゾラムの約 1/3～1/16 であり、1-OH MDA 及び 1,4-OH MDA の抗けいれん作用は弱かった（資料番号：4.2.1.1.1-6〔参考資料〕）。

PTZ 誘発けいれんにおける効力の経時変化を調べると、投与 1 分後ではミダゾラム（マレイン酸塩）の効果は 1-OH MDA の 12 倍、4-OH MDA の 100 倍強力であったが、15 分後には効力差は急速に縮まり、60 分後では有意差が認められなかった。このことは、ピーク時の抗けいれん作用は未変化体に由来し、代謝物の関与が低いことを示唆する。

結論

ミダゾラムは神経細胞上の α_1 、 β_2 、 γ_2 サブユニット発現 GABA_A 受容体に結合した後、アロステリック効果により GABA と GABA_A 受容体との結合親和性を高め、Cl⁻チャネルの開口頻度をあげる。その結果、神経細胞は過分極し、さらにシャンティング効果（脱分極を打ち消す作用）により興奮性入力 of 脱分極効果が減少して興奮性が抑制される。この作用機序により、ミダゾラムはバランス破綻（てんかん原性獲得）の特定段階を強制的に誘導したけいれんモデルに対して抗けいれん作用を示し、けいれんが連続する全身性けいれんてんかん重積状態（GCSE）、又は脳波で発作波が持続して発現する非けいれん性てんかん重積状態（NCSE）、けいれん脳波及び細胞傷害を抑制すると考えられる。ラットと異なりヒトでは、胎生 24～26 週で α_1 サブユニットの発現が認められ、生後 0～2 ヶ月齢でその発現量は高値を示す²⁵⁾。また、細胞内能動的 Cl⁻ホメオスタシスの役割を担っている NKCC1 と KCC2 の発現比率は生後 0～2 ヶ月齢と成人では同等であることが報告されている²⁶⁾。よって発達期のヒトにおいては、GABA_A 受容体は膜電位の過分極及びシャンティング効果によって抑制機能を示し、ミダゾラムは GABA の用量効力をあげるにより抗けいれん作用を示すことが示唆される。しかし、ミダゾラムはジアゼパム同様、血圧下降作用

及び呼吸抑制作用がある²⁷⁾ことから、静脈内投与の場合、特に呼吸抑制に注意しながら投与を行う必要がある。

2.6.2.7 図表

本文中に記載.

2.6.2.8 参考文献

- 1) Racine RJ. Modification of seizure activity by electrical stimulation. II. Motor seizure. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol.* 1972;32:281-94. 〈資料番号 : 4.3-7〉
- 2) Helen E. Scharfman, PhD: The Neurobiology of Epilepsy. *Curr Neurol Neurosci Rep.* 2007;7: 348-354. 〈資料番号 : 4.3-8〉
- 3) 日本神経学会, てんかん治療ガイドライン 2010.第1章 てんかんの診断・分類,鑑別 (REM睡眠行動異常症を含む) . 2010年10月:1-16. 〈資料番号 : 4.3-9〉
- 4) Kaneko S, Okada M, Iwasa H, Yamakawa K, Hirose S. Genetics of epilepsy: current status and perspectives. *Neurosci Res.* 2002;44:11-30. 〈資料番号 : 4.3-10〉
- 5) Uusi-Oukari M, Korpi ER. Regulation of GABA_A receptor subunit expression by pharmacological agents. *Pharmacol Rev.* 2010;62:97-135. 〈資料番号 : 4.3-11〉
- 6) Olsen RW, Sieghart W. International Union of Pharmacology. LXX. Subtypes of γ -aminobutyric acid_A receptors: classification on the basis of subunit composition, pharmacology, and function. Update. *Pharmacol Rev.* 2008;60:243-60 〈資料番号 : 4.3-12〉
- 7) Fritschy JM, Paysan J, Enna A, Mohler H. Switch in the expression of rat GABA_A-receptor subtypes during postnatal development: an immunohistochemical study. *J Neurosci.* 1994;14:5302-24. 〈資料番号 : 4.3-13〉
- 8) Laurie DJ, Wisden W, Seeburg PH. The distribution of thirteen GABA_A receptor subunit mRNAs in the rat brain. III. Embryonic and postnatal development. *J Neurosci.* 1992;12:4151-72. 〈資料番号 : 4.3-14〉
- 9) Gutiérrez A, Khan ZU, Ruano D, Miralles CP, Vitorica J, De Blas AL. Aging-related subunit expression changes of the GABA_A receptor in the rat hippocampus. *Neuroscience.* 1996;74:341-8. 〈資料番号 : 4.3-15〉
- 10) Galanopoulou AS, Buckmaster PS, Staley KJ, Moshé SL, Perucca E, Engel J Jr. et al. Identification of new epilepsy treatments: issues in preclinical methodology. *Epilepsia.* 2012;53:571-82. 〈資料番号 : 4.3-16〉
- 11) Rudolph U, Crestani F, Benke D, Brünig I, Benson JA, Fritschy JM, Martin JR, Bluethmann H, Möhler H. Benzodiazepine actions mediated by specific gamma-aminobutyric acid_A receptor subtypes. *Nature.* 1999 ;401:796-800. 〈資料番号 : 4.3-17〉
- 12) Heldt SA, Ressler KJ. Amygdala-specific reduction of α -GABA_A receptors disrupts the anticonvulsant, locomotor, and sedative, but not anxiolytic, effects of benzodiazepine in mice. *J Neurosci.* 2010;30:7139-51 〈資料番号 : 4.3-18〉
- 13) Blaesse P, Airaksinen MS, Rivera C, Kaila K. Cation-chloride cotransporters and neuronal function. *Neuron.* 2009;61:820-38 〈資料番号 : 4.3-19〉
- 14) Delpire E. Cation-Chloride Cotransporters in Neuronal Communication. *Physiol.* 2000;15:309-312. 〈資料番号 : 4.3-20〉
- 15) Yamada J, Okabe A, Toyoda H, Kilb W, Luhmann HJ, Fukuda A. Cl⁻ uptake promoting depolarizing GABA actions in immature rat neocortical neurones is mediated by NKCC1. *J Physiol.* 2004;557:829-41. 〈資料番号 : 4.3-21〉
- 16) Isaev D, Isaeva E, Khazipov R, Holmes GL. Shunting and hyperpolarizing GABAergic inhibition in the high-potassium model of ictogenesis in the developing rat hippocampus. *Hippocampus.* 2007;17:210-9. 〈資料番号 : 4.3-22〉 .
- 17) 日本神経学会, てんかん治療ガイドライン 2010.第8章 てんかん重積状態. 2010年10月:72-85. 〈資料番号 : 4.3-6〉
- 18) Scorza FA, Arida RM, Naffah-Mazzacoratti Mda G, Scerni DA, Calderazzo L, Cavalheiro EA. The pilocarpine model of epilepsy: what have we learned? *An Acad Bras Cienc.* 2009;81:345-65. 〈資料番号 : 4.3-23〉

- 19) Xu H, Liu ZQ, Liu Y, Zhang WS, Xu B, Xiong YC, et al. Administration of midazolam in infancy does not affect learning and memory of adult mice. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2009 36:1144-8. 〈資料番号 : 4.3-24〉 .
- 20) Nakae Y, Kanaya N, Namiki A. The direct effects of diazepam and midazolam on myocardial depression in cultured rat ventricular myocytes. *Anesth Analg*. 1997;85:729-33. 〈資料番号 : 4.3-25〉
- 21) Shiraishi Y, Ohashi M, Kanmura Y, Yamaguchi S, Yoshimura N, Itoh T. Possible mechanisms underlying the midazolam-induced relaxation of the noradrenaline-contraction in rabbit mesenteric resistance artery. *Br J Pharmacol*. 1997;Jul;121(6):1155-63. 〈資料番号 : 4.3-26〉
- 22) Buljubasic N, Marijic J, Berczi V, Supan DF, Kampine JP, Bosnjak ZJ. Differential effects of etomidate, propofol, and midazolam on calcium and potassium channel currents in canine myocardial cells. *Anesthesiol*. 1996;85:1092-9. 〈資料番号 : 4.3-27〉
- 23) Al-Khudhairi D, Askitopoulou H, Whitwam JG. Acute "tolerance" to the central respiratory effects of midazolam in the dog. *Br J Anaesth*. 1982;54:953-8. 〈資料番号 : 4.3-28〉
- 24) Gordon G, Grundy EM, Al-Khudhairi D, Anderson DJ, Whitwam JG. Antagonism of the effects of midazolam on phrenic nerve activity in the dog by Ro 15-1788 and Ro 15-3505. *Br J Anaesth*. 1984;56:1161-5. 〈資料番号 : 4.3-29〉
- 25) Kanaumi T, Takashima S, Iwasaki H, Mitsudome A, Hirose S. Developmental changes in the expression of GABA_A receptor alpha 1 and gamma 2 subunits in human temporal lobe, hippocampus and basal ganglia: an implication for consideration on age-related epilepsy. *Epilepsy Res*. 2006;71:47-53 〈資料番号 : 4.3-30〉
- 26) Hyde TM, Lipska BK, Ali T, Mathew SV, Law AJ, Metitiri OE, Straub RE, Ye T, Colantuoni C, Herman MM, Bigelow LB, Weinberger DR, Kleinman JE. Expression of GABA signaling molecules KCC2, NKCC1, and GAD1 in cortical development and schizophrenia. *J Neurosci*. 2011;27:11088-95 〈資料番号 : 4.3-31〉
- 27) Sunzel M, Paalzow L, Berggren L, Eriksson I. Respiratory and cardiovascular effects in relation to plasma levels of midazolam and diazepam. *Br J Clin Pharmacol*. 1988;25:561-9. 〈資料番号 : 4.3-32〉
- 28) 野沢胤美. IV. 治療, 薬物治療, 抗てんかん薬の特色と相互作用. In: 辻省次, 宇川義一編. *アクトアル脳・神経疾患の臨床, てんかんテキスト New Version*. 東京: 中山書店; 2012. p.188-92 〈資料番号 : 4.3-33〉
- 29) ジャック R. クーパー, フロイド E. ブルーム, ロバート H. ロス著, 樋口宗史訳. *クーパー・ブルーム・ロス神経薬理学生化学からのアプローチ*. 東京: メディカル・サイエンス・インターナショナル; 2005. p.104-7 〈資料番号 : 4.3-34〉
- 30) Barnard EA, Skolnick P, Olsen RW, Mohler H, Sieghart W, et al. International Union of Pharmacology. XV. Subtypes of gamma-aminobutyric acidA receptors: classification on the basis of subunit structure and receptor function. *Pharmacol Rev*. 1998 Jun;50(2):291-313. 〈資料番号 : 4.3-35〉
- 31) 辻省次, 宇川義一, アクトアル 脳・神経疾患の臨床, てんかんテキスト New Version, 株式会社中山書店, 2012 年 5 月 31 日 初版第 1 刷発行, p257-262. 〈資料番号 : 4.3-36〉

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
けいれん重積モデル					
1) ラットピロカルピン誘発けいれん重積発作に対する作用	Sprague-Dawley 系ラット	脳内投与	UCB S.A. Pharma Sector, Preclinical CNS Research	公表論文	4.2.1.1.1-1 参
2) ラット及びマウスソマン誘発けいれん重積発作に対する作用	Sprague-Dawley 系ラット	腹腔内投与	US Army Medical Research Institute of Chemical Defense	公表論文	4.2.1.1.1-2 参
	Swiss 系マウス	腹腔内投与	Institute de Recherche Biomédicale des Armées	公表論文	4.2.1.1.1-3 参
3) マウスペンチレンテトラゾール誘発けいれん重積発作に対する作用	Swiss-Webster 系マウス	筋肉内投与	Gerogetown 大学	公表論文	4.2.1.1.1-4 参
4) メルカプトプロピオン酸誘発けいれん重積発作及びフルロチル誘発けいれん重積発作に対する作用	Long-Evans 系ラット	静脈内投与	Milton S. Hershey Medical Center	公表論文	4.2.1.1.1-5 参
急性けいれんモデル					
1) 最大電撃けいれんに対する作用	マウス	経口投与	F.Hoffmann-La Roche & Co.A.G	公表論文	4.2.1.1.1-6 参
	Wistar 系ラット	脳室内投与	Cadiz 大学	公表論文	4.2.1.1.1-7 参
	Wistar 系ラット	髄腔内投与	Cadiz 大学	公表論文	4.2.1.1.1-8 参
2) ペンチレンテトラゾール誘発けいれんに対する作用	マウス	静脈内投与	F.Hoffmann-La Roche & Co.A.G	公表論文	4.2.1.1.1-6 参
3) 幼若ラットにおけるペンチレンテトラゾール誘発けいれんに及ぼす作用	Wistar 系ラット	腹腔内投与	Czechoslovak Academy of Sciences	公表論文	4.2.1.1.1-9 参

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
4) 3-メルカプトプロピオン酸誘発けいれんに対する作用	マウス	経口投与	F.Hoffmann-La Roche & Co.A.G	公表論文	4.2.1.1.1-6 参
5) ストリキニーネ誘発けいれんに対する作用	Wistar 系ラット	腹腔内投与	Academy of Sciences of the Czech Republic	公表論文	4.2.1.1.1-10 参
6) 興奮性アミノ酸誘発けいれんに対する作用	NMRI 系マウス	腹腔内投与	Schering.A.G	公表論文	4.2.1.1.1-11 参

参：参考資料

2.6.3.1.1.2 *In vitro*作用期機序試験

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) マウス培養神経組織及び脊髄組織におけるミダゾラムの γ -アミノ酪酸誘発電流増強作用	マウス脳組織	<i>in vitro</i>	Aarhus 大学	公表論文	4.2.1.1.2-1 参
	マウス脊髄組織	<i>in vitro</i>	Aarhus 大学	公表論文	4.2.1.1.2-2 参
2) ラット細胞膜小胞における GABA 開口性クロライドチャンネルコンダクタンスに対するミダゾラムの作用	ラット神経細胞膜小胞	<i>in vitro</i>	Ohio 大学	公表論文	4.2.1.1.2-3 参
3) ラット神経終末細胞膜内 GABA 受容体における GABA 結合対するミダゾラムの増強作用	ラット神経細胞膜小胞	<i>in vitro</i>	Sydney 大学	公表論文	4.2.1.1.2-4 参
4) ラット培養海馬及び脊髄におけるミダゾラムの GABA 伝達への作用	ラット海馬組織	<i>in vitro</i>	Zurich 大学	公表論文	4.2.1.1.2-5 参
	ラット脊髄組織	<i>in vitro</i>	新潟大学	公表論文	4.2.1.1.2-6 参
5) GABA _A 受容体 $\alpha_1\beta_2\gamma_2$ サブユニット発現細胞におけるミダゾラムの作用	$\alpha_1\beta_2\gamma_2$ サブユニット発現細胞	<i>in vitro</i>	Synthelabo Recherche	公表論文	4.2.1.1.2-7 参
	$\alpha_1\beta_2\gamma_2$ サブユニット発現細胞	<i>in vitro</i>	Vienna 大学	公表論文	4.2.1.1.2-8 参
6) ミダゾラムの GABA 誘発電流増強作用における発達・加齢の影響	ラット海馬組織	<i>in vitro</i>	Institute National de la Santé et de la Recherche Médicale	公表論文	4.2.1.1.2-9 参
	ラット内側中隔・対角帯核ニューロン	<i>in vitro</i>	Texas A&M 大学	公表論文	4.2.1.1.2-10 参

参：参考資料

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) ミダゾラム脳内移行の経時的変化	マウス	静脈内投与	F.Hoffmann-La Roche & Co.A.G	公表論文 公表論文	4.2.1.1.1-6 参 4.2.1.1.3-2 参

参：参考資料

2.6.3.1.1.4 代謝物の薬理作用

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) ミダゾラム代謝物の薬理作用	マウス	腹腔内投与	F.Hoffmann-La Roche & Co.A.G	公表論文	4.2.1.1.1-6 参

参：参考資料

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) 鎮静作用	ラット	経口投与	F.Hoffmann-La Roche & Co.A.G	公表論文	4.2.1.1.1-6 参
2) 筋弛緩作用	ICR 系マウス Sprague-Dawley 系ラット	静脈内又は 筋肉内投与	ロシュ研究所	公表論文	4.2.1.2-2 参
	マウス	経口投与	F.Hoffmann-La Roche & Co.A.G	公表論文	4.2.1.1.1-6 参
	CD-1 系マウス	静脈内投与	F.Hoffmann-La Roche & Co.A.G	公表論文	4.2.1.1.1-6 参
3) 抗不安作用	CD 系ラット	経口投与	F.Hoffmann-La Roche & Co.A.G	公表論文	4.2.1.1.1-6 参
	CD 系ラット リスザル	経口投与	F.Hoffmann-La Roche & Co.A.G	公表論文	4.2.1.1.1-6 参
4) 催眠作用	マウス ラット	経口投与 静脈内投与	F.Hoffmann-La Roche & Co.A.G	公表論文	4.2.1.1.1-6 参
	Wildfarben 系ウサギ	静脈内投与	F.Hoffmann-La Roche & Co.A.G	公表論文	4.2.1.1.1-6 参

参：参考資料

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
コアバッテリー安全性試験					
1) 中枢神経系に及ぼす影響					
(1) 一般行動及び症状観察	ICR 系マウス Sprague-Dawley 系ラット カニクイサル	静脈内投与	ロシュ研究所	公表論文	4.2.1.2-2 参
2) 心血管系に及ぼす影響					
(1) 麻酔イヌにおける作用	雑種イヌ	静脈内投与	ロシュ研究所	公表論文	4.2.1.2-2 参
	雑種イヌ	静脈内投与	F.Hoffmann-La Roche & Co.A.G	公表論文	4.2.1.1.1-6 参
(2) 無麻酔腎性高血圧症イヌにおける作用	腎性高血圧症イヌ	静脈内投与	F.Hoffmann-La Roche & Co.A.G	公表論文	4.2.1.1.1-6 参
(3) ウサギの心筋再分極に及ぼす作用	NZW 系ラビット	筋肉内投与	Brown 大学	公表論文	4.2.1.3-3 参
3) 呼吸器系に及ぼす影響					
(1) 麻酔イヌの呼吸数に及ぼす作用	雑種イヌ	静脈内投与	ロシュ研究所	公表論文	4.2.1.2-2 参
(2) 麻酔イヌの呼吸抑制作用	雑種イヌ	静脈内投与	The Methodist Hospital	公表論文	4.2.1.3-4 参
(3) 麻酔ラットの呼吸抑制作用	Sprague-Dawley 系ラット	静脈内投与	Paris 大学	公表論文	4.2.1.3-5 参
補足的安全性試験					
1) 腎・泌尿器系に及ぼす影響					
(1) 尿量及び尿中電解質に対する作用	Wistar 系ラット	経口投与	ロシュ研究所	公表論文	4.2.1.2-2 参
(2) 腎クリアランスに対する作用	雑種イヌ	静脈内投与	ロシュ研究所	公表論文	4.2.1.2-2 参
2) 自律神経系に及ぼす影響					
(1) 唾液分泌に及ぼす影響	マウス	経口投与	F.Hoffmann-La Roche & Co.A.G	公表論文	4.2.1.1.1-6 参
(2) 摘出平滑筋に及ぼす影響	モルモット ラット	<i>in vitro</i>	ロシュ研究所	公表論文	4.2.1.2-2 参
3) 胃腸管系に及ぼす影響					
(1) 胃酸分泌に対する影響	ラット	十二指腸内 投与	F.Hoffmann-La Roche & Co.A.G	公表論文	4.2.1.1.1-6 参
	ラット	腹腔内投与	F.Hoffmann-La Roche & Co.A.G	公表論文	4.2.1.1.1-6 参

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
(2) 胃潰瘍モデルに対する影響	ラット	経口投与	F.Hoffmann-La Roche & Co.A.G	公表論文	4.2.1.1.1-6 参
(3) 十二指腸潰瘍モデルに対する影響	モルモット	経口投与	F.Hoffmann-La Roche & Co.A.G	公表論文	4.2.1.1.1-6 参
(4) 腸管輸送能に及ぼす影響	マウス	経口投与	F.Hoffmann-La Roche & Co.A.G	公表論文	4.2.1.1.1-6 参
(5) 下痢モデルに対する影響	マウス	経口投与	F.Hoffmann-La Roche & Co.A.G	公表論文	4.2.1.1.1-6 参

参：参考資料

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) 麻酔薬、鎮痛薬及びエタノールとの薬物相互作用	ICR 系マウス	静脈内又は筋肉内投与	ロシュ研究所	公表論文	4.2.1.2-2 参
	マウス	静脈内又は経口投与	F.Hoffmann-La Roche & Co.A.G	公表論文	4.2.1.1.1-6 参
	ICR 系マウス	静脈内又は筋肉内投与	ロシュ研究所	公表論文	4.2.1.2-2 参
2) メペリジン塩酸塩、アトロピン、メプロバメート、ペントバルビタール及びクロルプロマジン塩酸塩との薬物相互作用	マウス	静脈内投与	F.Hoffmann-La Roche & Co.A.G	公表論文	4.2.1.1.1-6 参
3) フルマゼニルとの薬物相互作用	ddY 系マウス Fischer 系ラット	静脈内投与 腹腔内投与	富山医科薬科大学	公表論文	4.2.1.4-3 参

参：参考資料

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

概要文中に記載.

2.6.3.2.1.2 *In vitro*作用機序試験

概要文中に記載.

2.6.3.2.1.3 *In vivo*作用機序試験

概要文中に記載.

2.6.3.2.1.4 代謝物の薬理作用

概要文中に記載.

2.6.3.2.2 副次的薬理試験

概要文中に記載.

2.6.3.2.3 安全性薬理試験

概要文中に記載.

2.6.3.2.4 薬力学的薬物相互作用試験

概要文中に記載.