レミマゾラムベシル酸塩
アネレム静注用 50mg

第 2 部 CTD の概要

2.4 非臨床試験の概括評価

ムンディファーマ株式会社

略号一覧表

略語・用語	内容
α_1-AGP	α_1-酸性糖タンパク（α_1-acid glycoprotein）
ACR	アルブミン／クレアチニン比（albumin-creatinine ratio）
APD_{30}	30%再分極時の活動電位持続時間（30% action potential duration）
APD_{50}	50%再分極時の活動電位持続時間（50% action potential duration）
APD_{90}	90%再分極の活動電位持続時間（90% action potential duration）
AUC	濃度-時間曲線下面積（area under the concentration time curve）
$AUC_{0\text{-}12}$	12 時間までの濃度-時間曲線下面積（area under the concentration time curve from time 0 to 12 hours）
$AUC_{0\text{-}\infty}$	無限時間までの濃度-時間曲線下面積（area under the concentration time curve from time 0 to infinity）
BSEP	bile salt export pump
BCRP	乳がん耐性タンパク質（breast cancer resistance protein）
BNPP	ビス（4–ニトロフェニル）リン酸ナトリウム塩、エステラーゼ阻害剤（bis-*β*-nitrophenyl phosphate, an esterase inhibitor）
C_{max}	最高血漿中濃度（maximum plasma concentration）
CES	カルボキシルエステラーゼ（carboxylesterase）
CL_{vitro}	代謝クリアランス値（metabolic clearance）
CNS 7054	レミマゾラムの代謝物（metabolite of Remimazolam）
CYP	チトクローム P450（cytochrome P450）
DFP	ジイソプロピルフルオロリン酸、エステラーゼ阻害剤（diisopropyl fluorophosphate, an esterase inhibitor）
ED_{50}	50%有効用量（50% effective dose）
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
ECG	心電図（electrocardiogram）
FDA	アメリカ食品医薬品局（Food and Drug Administration）
GABA	γ-アミノ酪酸（gamma-aminobutyric acid）
GLP	医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準（good laboratory practice）
HEK293	ヒト胎児腎細胞 293（human embryonic kidney cells 293）
HSA	ヒト血清アルブミン（human serum albumin）
hERG	ヒト ether-a-go-go 関連遺伝子（human ether-a-go-go-related gene）
IC_{25}	25%阻害濃度（25% inhibitory concentration）
IC_{50}	50%阻害濃度（50% inhibitory concentration）
Ki	阻害定数（inhibition constant）
LDH	乳酸脱水素酵素（lactase dehydrogenase）
LC/MS/MS	液体クロマトグラフィー・タンデムマススペクトロメトリー（high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry）
LRR	正向反射消失（loss of righting reflex）
MATE	multidrug and toxin transporter
MFD	投与可能最高用量（maximum feasible dose）
MRP	多剤耐性関連蛋白質（multidrug resistance related protein）
NaF	フッ化ナトリウム、エステラーゼ阻害剤（sodium fluoride, an esterase inhibitor）
NMR	核磁気共鳴（nuclear magnetic resonance）
NOAEL	無毒性量（no observed adverse effect level）
NOEL	無影響量（no observed effect level）
OAT	有機アニオントランスポーター（organic anion transporter）
OATP	organic anion transporting polypeptide
OCT	organic cation transporter
pCO_2	二酸化炭素分圧（carbon dioxide partial pressure）

pO_2	酸素分圧（oxygen partial pressure）
P-gp	P 糖蛋白質（P-glycoprotein）
PHMB	*p*-ヒドロキシメルクリ安息香酸ナトリウム（*p*-Hydroxymercuribenzoic acid sodium salt）
pKi	阻害定数 Ki（inhibition constant）の値の常用対数の絶対値（-log 10 of inhibition constant Ki）
QTc	補正 QT（QT interval corrected）
RMP	静止膜電位（resting membrane potential）
S.D.	標準偏差（standard deviation）
SD	Sprague Dawley
SO_2	酸素飽和度（oxygen saturation）
$t_{1/2}$	消失半減期（elimination half-life）
% tail DNA	Tail に含まれる DNA の割合（% tail DNA）
T-MF	総突然変異頻度（total mutation frequency）
UVA	紫外線 A（ultraviolet A）
V_{ss}	分布容積（volume of distribution）

目次

頁
略号一覧表 2
2.4 非臨床試験の概括評価 7
2.4.1 緒言 7
2.4.2 非臨床試験計画概略 7
2.4.3 薬理試験 8
2.4.3.1 効力を裏付ける試験 8
2.4.3.1.1 *In vitro* 試験 8
2.4.3.1.2 *In vivo* 試験 8
2.4.3.2 副次的薬理試験 9
2.4.3.3 安全性薬理試験 9
2.4.3.3.1 中枢神経系に対する影響 9
2.4.3.3.2 心興奮性に対する影響 10
2.4.3.3.2.1 *In vitro* 試験 10
2.4.3.3.2.2 *In vivo* 試験 11
2.4.3.3.2.3 まとめ 12
2.4.3.3.3 心血管系に対する影響 12
2.4.3.3.3.1 ラット 12
2.4.3.3.3.2 ミニブタ 12
2.4.3.3.3.3 ヒツジ 12
2.4.3.3.3.4 サル 13
2.4.3.3.3.5 まとめ 13
2.4.3.3.4 呼吸系に対する影響 13
2.4.3.3.4.1 まとめ 14
2.4.3.4 薬力学的薬物相互作用 14
2.4.3.4.1 鎮静作用 14
2.4.3.4.2 心血管系に対する作用 15
2.4.4 薬物動態試験 15
2.4.4.1 薬物動態概要 15
2.4.4.2 吸収 15
2.4.4.2.1 単回投与：経口投与したときのバイオアベイラビリティ 15
2.4.4.2.2 単回投与 15
2.4.4.2.2.1 ラット 15
2.4.4.2.2.2 ウサギ 16
2.4.4.2.2.3 イヌ 16
2.4.4.2.2.4 ブタ 16
2.4.4.2.2.5 サル 16
2.4.4.2.3 反復投与 16
2.4.4.2.3.1 反復投与：急速静注又は短時間静脈内持続投与 16
2.4.4.2.3.1.1 ラット 17

2.4.4.2.3.1.2 サル 17
2.4.4.2.3.2 反復投与：静脈内持続投与 17
2.4.4.3 分布 17
2.4.4.3.1 ラットに ^{14}C-レミマゾラムを単回急速静注したときの組織内分布 17
2.4.4.3.2 ヒツジにレミマゾラムを単回静脈内投与したときの組織内分布 18
2.4.4.3.3 サルに ^{14}C-レミマゾラムを単回急速静注したときの組織内分布 18
2.4.4.3.4 乳汁移行 18
2.4.4.3.5 妊娠ラットにおける組織内分布、胎盤通過性 18
2.4.4.3.6 血清タンパク結合 18
2.4.4.3.7 血球移行性 19
2.4.4.4 代謝 19
2.4.4.4.1 *in vitro* 代謝 19
2.4.4.4.2 ラットに ^{14}C-レミマゾラムを単回静脈内投与したときの *in vivo* 代謝プロファイル 19
2.4.4.4.3 サルに ^{14}C-レミマゾラムを単回静脈内投与したときの *in vivo* 代謝プロファイル 20
2.4.4.4.4 推定代謝経路 20
2.4.4.5 排泄 21
2.4.4.5.1 ラットに ^{14}C-レミマゾラムを単回静脈内投与したときの尿及び糞中排泄 21
2.4.4.5.2 サルに ^{14}C-レミマゾラムを単回静脈内投与したときの尿及び糞中排泄 21
2.4.4.5.3 ラットに ^{14}C-レミマゾラムを単回静脈内投与したときの胆汁中排泄 21
2.4.4.6 薬物動態学的薬物相互作用 21
2.4.4.6.1 チトクローム P450 21
2.4.4.6.2 カルボキシルエステラーゼ 22
2.4.4.6.3 ヒト薬物トランスポーター 22
2.4.4.7 その他の薬物動態試験 23
2.4.4.8 考察 23
2.4.5 毒性試験 25
2.4.5.1 単回投与毒性試験 25
2.4.5.2 反復投与毒性試験 25
2.4.5.2.1 ラット 25
2.4.5.2.2 サル 26
2.4.5.2.3 ミニブタ 27
2.4.5.2.4 反復経鼻投与毒性試験 27
2.4.5.2.5 反復投与毒性試験の動物における曝露量 27
2.4.5.3 遺伝毒性試験 28
2.4.5.4 がん原性試験 28
2.4.5.5 生殖発生毒性試験 28
2.4.5.5.1 受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験 29
2.4.5.5.2 胚・胎児発生に関する試験 29
2.4.5.5.3 出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験 29

2.4.5.5.4 ウサギの拡張受胎能／交配試験 30
2.4.5.5.5 生殖発生毒性試験の動物における曝露量 30
2.4.5.5.6 幼若動物を用いた試験 31
2.4.5.6 局所刺激性試験 31
2.4.5.6.1 局所刺激性試験の考察 31
2.4.5.7 その他の毒性試験 32
2.4.5.7.1 抗原性試験／光毒性試験 32
2.4.5.7.2 血液適合性試験 33
2.4.5.7.3 乱用傾向及び依存性試験 33
2.4.5.7.4 代謝物の毒性試験 33
2.4.5.7.5 不純物 35
2.4.5.7.6 添加物（デキストラン 40）の毒性試験 35
2.4.5.7.6.1 デキストラン 40 のラットにおける毒性試験 36
2.4.5.7.6.2 デキストラン 40 のウサギにおける毒性試験 36
2.4.5.7.6.3 デキストラン 40 の生殖発生毒性 37
2.4.5.7.6.4 デキストラン 40 の臨床安全性 37
2.4.6 総括及び結論 38
2.4.7 参考文献 40

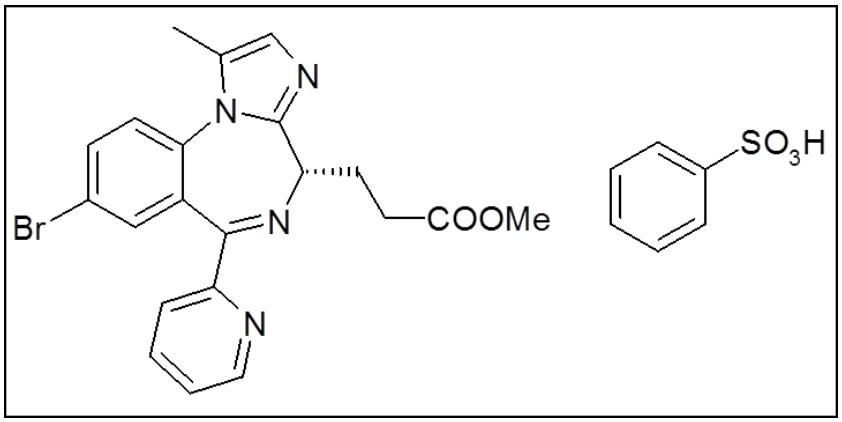
2.4 非臨床試験の概括評価

2.4.1 緒言

レミマゾラムベシル酸塩（以下、レミマゾラムと記載）は全身麻酔の導入及び維持に用いる短時間作用型で、静脈内投与剤として開発されている新規ベンゾジアゼピン系薬剤である。本剤は、methyl 3-[(4*S*)-8-bromo-1-methyl-6-pyridin-2-yl-4*H*-imidazo[1,2-*a*][1,4]benzodiazepin-4-yl]propanoate のベンゼンスルホン酸塩（1：1）である。[redacted]、単一のエナンチオマー（S-エナンチオマー）として合成されたキラル的に純粋な分子である。レミマゾラムの化学構造式を以下に示す（図 2.4-1）。

以下、本項の各試験における本剤の投与量は、特に記載のない限り、レミマゾラム遊離塩基量として記載した。

図 2.4-1 レミマゾラムの化学構造



Remimazolam　　Besylate

2.4.2 非臨床試験計画概略

レミマゾラムは、カルボキシルエステラーゼ（CES）により活性が非常に低い代謝物（CNS 7054）に分解されて短い作用持続時間を示すようにデザインされた鎮静／麻酔薬である。本薬はγ-アミノ酪酸（GABA）$_A$受容体ベンゾジアゼピン結合部位にアゴニストとして作用するが、ミダゾラムよりも全身クリアランス（CL）が高いため、作用発現がより予測しやすく、回復もより早いと考えられる。

薬理試験では、レミマゾラムの受容体結合能及びその特異性を *in vitro* で評価した。また、レミマゾラムの薬理学的特性、中枢神経系、呼吸系及び心血管系に及ぼす影響、並びに臨床の現場でレミマゾラムと併用されると予想される薬剤との薬力学的相互作用を検討した。

また、レミマゾラムの薬物動態（吸収・分布・代謝・排泄・薬物相互作用など）を明らかにするため、ラット、ウサギ、イヌ、ミニブタ及びサルを用いた *in vivo* 試験及び *in vitro* 試験を実施した。なお、レミマゾラムと臨床併用の可能性のある薬物との相互作用についても検討した。

一般毒性試験（単回及び反復静脈内投与試験）は、げっ歯類としてラット及びマウス、非げっ歯類としてサル及びミニブタを用いて実施した。生殖発生毒性試験はラット及びウサギ、並びに局所刺激性試験はラット、ウサギ、サル及びブタを用いて実施した。その他の試験（抗原性試験、薬物依存性試験等）ではモルモット、ラット及びサルも使用した。

臨床投与経路が静脈内投与であることから、被験物質は急速静注又は静脈内持続投与とした。

2.4.3 薬理試験

2.4.3.1 効力を裏付ける試験

2.4.3.1.1 *In vitro* 試験

ヒト、ブタ及びラットの脳組織を用いた競合的結合阻害試験（2.6.2.2.1.1 項）において、レミマゾラムは $GABA_A$ 受容体ベンゾジアゼピン結合部位に高い結合親和性を示し、その阻害定数（Ki）又は Ki の常用対数の絶対値（pKi）は代謝物である CNS 7054 の約 170 倍又は 300 倍超であった（表 2.4-1 及び表 2.4-2）。

表 2.4-1 ラット脳 $GABA_A$ 受容体ベンゾジアゼピン結合部位に対する結合親和性

Remimazolam Ki (nmol/L)	CNS 7054 Ki (nmol/L)	Separation ratio
26.3	4420	~170-fold

n = 2
Separation ratio was calculated from Ki of CNS 7054/ Ki of remimazolam.
Data from [redacted]

表 2.4-2 [^{3}H]フルニトラゼパムに対する競合的結合阻害活性

Species	Remimazolam pKi	CNS 7054 pKi	Separation ratio
Human	7.53 ± 0.10	4.91 ± 0.22	410-fold
rat	7.50 ± 0.09	4.99 ± 0.06	320-fold
Yucatan Micropig	7.56 ± 0.10	5.05 ± 0.04	326-fold

Results are expressed as mean ± standard error of the mean of 4-8 separate experiments.
Separation ratio was calculated from Ki of CNS 7054/ Ki of remimazolam.
Data from [redacted]

ミダゾラム及び他の「古典的」[1]ベンゾジアゼピン系薬剤と同様、レミマゾラムは $GABA_A$ 受容体サブタイプ間で明確な選択性を示さなかった（[redacted]、2.6.2.2.1.2 項）。ベンゾジアゼピン系薬剤の様々な作用及び特性（鎮静作用、健忘作用、抗痙攣作用、筋弛緩作用、鎮静薬に対する依存性及び耐性）は 1 種以上の各 α サブユニットと関連しており [2]、レミマゾラムの薬理学的プロファイルは同クラスの他の薬剤と根本的に異なることはないと考えられる。

特異的なリガンドに結合する標的タンパクを遺伝子組換え技術によって発現させた、各種細胞株を用いた放射性リガンド結合試験において、レミマゾラム又はその主代謝物である CNS 7054 は $GABA_A$ 受容体を除き、いずれの標的に対しても明らかな影響を示さなかった。いずれの試験でもレミマゾラムは $GABA_A$ 受容体ベンゾジアゼピン結合部位のみに結合親和性を示し、CNS 7054 では認められなかった（[redacted]、[redacted]、[redacted]、[redacted]）。これらの試験結果からレミマゾラムの $GABA_A$ 受容体ベンゾジアゼピン結合部位に対する高い親和性及び選択性が確認され、CNS 7054 では認められなかった。

2.4.3.1.2 *In vivo* 試験

げっ歯類では正向反射消失（LRR）発現が鎮静作用評価法として広く用いられている。マウス及びラットでは LRR を用いて、ブタ及びヒツジでは各動物種の鎮静スコア及び脳電図（EEG）パターンを用いてレミマゾラムの鎮静作用を評価した。

マウスにレミマゾラム 15～30 mg/kg を急速静注すると、用量依存的に LRR 発現までの時間は短縮し、LRR 発現数は増加した。LRR 持続時間は最高用量でも短かった（10 分間未満）（2.6.2.2.2.1

項）。レミマゾラム（30 mg/kg）急速静注 15 分前にベンゾジアゼピン拮抗薬であるフルマゼニル（20 mg/kg）を腹腔内投与しておくと、LRR 発現数は減少し、LRR 持続時間は短縮した。CNS 7054 [redacted]は、検討したそれぞれ 100 及び 30 mg/kg までいずれも LRR を発現しなかった（[redacted]、[redacted]）。

ラットでも同様の作用が認められた（2.6.2.2.2.2 項）。レミマゾラム（0.5～100 mg/kg）は 2 mg/kg 以上の用量で LRR の発現が認められた［50%有効用量（ED_{50}）：4.32 mg/kg］（[redacted]）。別試験において、プロポフォールは 5～50 mg/kg、ミダゾラムは 20～100 mg/kg 及びデクスメデトミジンは 10～1000 μg/kg の用量で溶媒対照群と比較して有意に LRR 発現数を増加させた。LRR 発現までの時間はデクスメデトミジンが最も長かった。LRR 持続時間はレミマゾラム及びプロポフォールがミダゾラム及びデクスメデトミジンよりも短かった（[redacted]）。レミマゾラムによる LRR 発現はフルマゼニルにより回復し、LRR の再発現は認められなかった（[redacted]、[redacted]）。

レミマゾラムは 1 mg/kg 以上でラットの自発運動量を用量依存的に低下させたが、持続時間は短かった。これに対し、プロポフォールは自発運動量に対して 5 mg/kg 以上で抑制作用を示し、作用持続時間も短かった。ミダゾラム（≥ 0.05 mg/kg）及びデクスメデトミジン（≥ 2 μg/kg）は自発運動量に対して長時間の抑制作用を示した（E07CS024）。運動失調を発現する最小用量で比較すると、レミマゾラムは[redacted]及び CNS 7054 よりもはるかに高い鎮静作用を示した（それぞれ 40 倍及び 200 倍）。

その他の動物種、ミニブタ（2.6.2.2.2.3 項）、ヒツジ（[redacted]）、及びカニクイザル（2.6.2.2.2.4 項）でも、げっ歯類と同様にレミマゾラムの鎮静作用発現は速かったが、げっ歯類と比べて鎮静からの回復は遅かった。この差異は、げっ歯類血漿中でのレミマゾラムの代謝がより速いことに起因する。ヒトを含む非げっ歯類の血漿中には CES1 が存在せず、血漿中でレミマゾラムがより安定して存在する結果、げっ歯類よりも鎮静作用が持続すると考えられる。ミニブタ及びヒツジの EEG プロファイルは観察された鎮静作用と相関した。両動物種でレミマゾラム投与時の回復時間はミダゾラム投与時よりも短かった（[redacted]、2.6.2.2.2.3 項）。

レミマゾラムの鎮静作用発現までの時間及び鎮静からの回復時間は、各動物種において、特にミダゾラムと比べて短かった。レミマゾラムの鎮静作用はベンゾジアゼピン系薬剤の拮抗薬であるフルマゼニルにより阻害又は解除された。

2.4.3.2 副次的薬理試験

検討した試験範囲で、レミマゾラムは $GABA_A$ 受容体以外の各種受容体、トランスポーター及びイオンチャネルに対して明らかな結合親和性を示さなかった。CNS 7054 は検討した各標的に対して明らかな結合親和性を示さなかった（[redacted]、[redacted]、[redacted]、2.6.2.3.1 項）。

健忘作用はベンゾジアゼピン系薬剤の望ましい薬理学的プロファイルの 1 つである。ラットモデルを用いた比較試験（[redacted]、2.6.2.3.2 項）において、レミマゾラムはミダゾラム及びプロポフォールと同様、健忘作用を示した。

2.4.3.3 安全性薬理試験

2.4.3.3.1 中枢神経系に対する影響

ラットの行動及び生理学的状態に対する作用を検出できる Irwin 試験を用いて、レミマゾラムの中枢神経系に対する作用を評価した（[redacted]、2.6.2.4.1.1 項）。レミマゾラム（10、20 及び

30 mg/kg）静脈内投与 5 分後に、群居性消失、自発運動量及び驚愕反応の減少並びに握力及び体緊張の低下として検出される鎮静作用が発現し、その後、作用は急速に減弱して投与 45 分後までには正常に回復していた。投与量 10 及び 30 mg/kg では、体温低下は投与後 45 分に認められた。全ての症状の変化は、中枢神経系抑制薬、特にベンゾジアゼピン系薬剤で予期されるものであった。本剤の特徴である非常に速い鎮静作用からの回復と一致して、全ての影響は一時的で、発現後速やかに消失した。予期されるリバウンド効果としての興奮や活動量の増加は認められなかった。投与 10 及び 20 分後に接触応答の増加が見られる動物もいたが、同じ影響が溶媒投与群にも認められたことから、薬剤ではなく、試験条件に起因するものと考えられた。

中枢神経系への影響について、単回及び反復投与毒性試験（主要及び補助的試験）の報告書について、再評価を行った（2.6.2.4.1.2 項）。毒性試験の再評価結果から、予想されたとおり、過度の中枢神経系抑制作用が用量制限事項として確認された。高用量での長期投与後においても、明確なリバウンド作用は認められなかった。他のベンゾジアゼピン系薬剤で知られている嘔吐や興奮性症状は、ほとんどの試験において認められなかった。また、依存性試験（2.6.6.8.3 項）において、ベンゾジアゼピン系薬剤の薬理作用として知られている薬物耐性や薬物依存性が認められた。

2.4.3.3.2 心興奮性に対する影響

2.4.3.3.2.1 *In vitro* 試験

パッチクランプ法を用いてヒト胎児腎細胞 293（HEK293）のヒト ether-a-go-go 関連遺伝子（hERG）カリウムチャネル電流に及ぼす影響を検討したところ、CNS 7054 は 100 µmol/L の濃度まで、溶媒と比較して hERG テール電流を有意に阻害しなかったが、レミマゾラムは濃度依存的に hERG 電流を阻害し、25%阻害濃度（IC_{25}）及び 50%阻害濃度（IC_{50}）はそれぞれ 62 及び 207 µmol/L であった（[redacted]、2.6.2.4.2.1 項）。これらの濃度は *in vitro* での $GABA_A$ 受容体活性化に必要な濃度（2.6.2.2.1.1 項）又は臨床試験で認められた血漿中遊離型薬物濃度よりもはるかに高い濃度であった（表 2.4-3）。

表 2.4-3 臨床での血漿中遊離型薬物濃度と比較したレミマゾラムの *in vitro* hERG チャネル電流及び乳頭筋活動電位に対する作用

Parameter	Remimazolam	CNS 7054
Mean C_{max} (free), human reference study*	0.40 µg/mL (0.91 µmol/L)	1.54 µg/mL (3.6 µmol/L)
hERG IC_{25}	62 µmol/L (68-fold) **	> 100 µmol/L (> 28-fold) **
hERG IC_{50}	207 µmol/L (227-fold) **	NA
Guinea-pig papillary muscle NOEL	30 µmol/L (33-fold) **	100 µmol/L (28-fold) **

Data for hERG from [redacted] and for guinea-pig papillary muscle action potential from [redacted] and [redacted]
* calculatedfrom C_{max} using freeform rate (ca. 8.1%) at a dose 12 mg/kg, study CNS7056-010
** compared to human reference study (CNS7056-010)
NOEL: no observed effect level, NA: not applicable.

モルモット乳頭筋の活動電位に関する試験で、レミマゾラムは 10 及び 30 µmol/L の濃度で溶媒対照群と比較して有意な変化を示さなかった（[redacted]、[redacted]、2.6.2.4.2.2 項）。100 及び 300 µmol/L の濃度では、30%及び 50%再分極時の活動電位持続時間（APD_{30} 及び APD_{50}）の短縮が認められた。さらに、最高濃度の 300 µmol/L では静止膜電位（RMP）の上昇及び 90%再分極時

の活動電位持続時間（APD_{90}）の延長も認められた。レミマゾラム、溶媒対照群及び陽性対照群（ソタロール、30 μmol/L）のΔAPD_{90}はそれぞれ 5.4、-1.8 及び 37 ms であった。

これらの試験から、レミマゾラムは 100 μmol/L 以上の濃度でカルシウムチャネルを阻害し、300 μmol/L の濃度で内向き整流性及び遅延整流性カリウムチャネルを阻害することが示唆された。以上より、心筋活動電位に対するレミマゾラムの無影響濃度は 30 μmol/L と考えられた。CNS 7054（10～300 μmol/L）は 300 μmol/L の濃度でカルシウムチャネル阻害によるAPD_{30}及びAPD_{50}の短縮が認められ、無影響濃度は 100 μmol/L と考えられた。

血液機能に対する影響をヒト血漿で検討した試験において、レミマゾラム（[redacted]）及び CNS 7054（[redacted]）はいずれも、検討した最高濃度の 300 μmol/L（約 132μg/mL に相当）まで血小板凝集能、凝固系及び線溶系に影響しなかった（2.6.2.4.2.3 項）。またラット血漿を用いた試験において、レミマゾラムは血小板凝集能及び凝固系に対して、それぞれ最終濃度 333 μg/mL 及び 1000 μg/mL まで影響しなかった（[redacted]）。したがって、臨床試験で認められた血漿中遊離型レミマゾラム濃度（表 2.4-3）を考慮すると、レミマゾラムが患者の凝固系及び線溶系に影響する可能性は極めて低いと考えられる。

2.4.3.3.2.2 *In vivo* 試験

ミニブタにレミマゾラム（12.5~100 μg/kg/min、15 分間）を静脈内持続投与期間中又は投与後 75 分間に心電図（ECG）の異常な変化は認められなかった（[redacted]、2.6.2.4.2.6 項）。

医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準（GLP）安全性薬理試験において、覚醒下のテレメトリー装着雄カニクイザルにレミマゾラム（0.5、1、2 及び 5 mg/kg）を急速静注した（[redacted]、2.6.2.4.2.8 項）。QT 及び補正 QT（QTc）間隔を含む ECG パラメータに変化は認められなかった。同試験でレミマゾラム（6、18、30 及び 60 mg/kg）を 6 時間かけて静脈内持続投与した結果、18、30 及び 60 mg/kg の投与開始 1 又は 3 時間後に投与前値と比較してわずかな QTc 間隔延長が認められた（それぞれ 7.6%、8.2%及び 10.0%）。投与終了後も 60 mg/kg では、投与前値と比較して 4.4%～6.0%の延長が認められた。しかし、以下に示すように QT 間隔延長は薬物に直接起因した変化ではなく、同時に認められた腹腔内体温の低下に関連すると考えられた。

別の試験で、カニクイザルに 2 時間の静脈内持続投与を週 1 回 4 週間（計 5 回）実施した時も QT 間隔の延長が認められた（[redacted]、2.6.6.3.6.1 項）。各投与の約 1 時間後に、体温低下、心拍数減少が認められた。有意な QT 間隔の延長は初回投与後 4 時間まで観察されたが、用量依存性は認められなかった。次回投与前までには、ECG パラメータは正常値に戻った。

生理的な夜間の低下を含む体温低下は、ヒトを含む様々な動物種で QT 間隔延長と関連していることが知られている[3),4),5)]。本知見は静脈内持続投与中の QT 間隔延長といった遅延型の所見と一致していて、徐々に体温が低下することとの関連が示唆される。対照的に、レミマゾラムを急速静注すると、速やかに血中より消失するため、体温に作用する時間が不十分となるとみられ、それゆえ、低体温に関連する QT 間隔延長を誘導するにも作用時間が不十分になると考えられた。

カニクイザルを用いた別の GLP 毒性試験（[redacted]、2.6.6.3.3 項）で、レミマゾラム（6.75、9.0、11.25 及び 22.5 mg/kg）を 1 日 1 回 9 時間の静脈内持続投与で、2 週間反復投与した。投与 12 日目及び休薬 12 日目に実施した ECG 検査において、投薬に関連した ECG パラメータの異常はいずれの群でも認められなかった。

反復投与毒性試験（[redacted]、2.6.6.3.2 項）で、カニクイザルにレミマゾラム（5、10 及び 20 mg/kg）を 1 日 1 回 28 日間急速静注した。ベースライン及び／又は対照群と比較して、RR、PR、QRS 及

び QT 間隔の変化が複数の投薬群で観察された。これらの変化に明確な用量相関性は認められず、心拍数及び体温の変化による二次的なものと考えられる。したがって、心興奮性に対するレミマゾラムの直接作用に起因すると考えられる QTc 間隔の変化は認められなかった。

2.4.3.3.2.3 まとめ

hERG チャネル阻害は QT 間隔延長を誘導する主要な作用機序である。ヒト（表 2.4-3）及びサル（[redacted]）での遊離型レミマゾラムの最高血漿中濃度（C_{max}）は、*in vitro* での hERG チャネル電流に対する IC_{50} 値よりもはるかに低値（1/100 未満）を示した。このことから、カニクイザルで観察された QTc 間隔の変化が、hERG チャネル阻害を介した心興奮性変化を反映している可能性は極めて低いと考えられる。静脈内持続投与試験では、観察された QT 間隔延長と体温低下との関連性が示唆された。レミマゾラムが意味のある QT 間隔延長作用を発現する可能性が極めて低いことは、hERG チャネル阻害試験（[redacted]）での IC_{50} 値が、臨床試験で得られた血漿中遊離型レミマゾラム濃度（C_{max}）の 200 倍を超えることからも支持される。この 200 倍を超える安全域は、催不整脈作用からの安全性を十分に確保できると考えられる。以上より、レミマゾラム及び CNS 7054 の非臨床試験結果から、QT 間隔延長又はその他の心興奮性に対する作用発現を増大するリスクは示唆されなかった。

2.4.3.3.3 心血管系に対する影響

2.4.3.3.3.1 ラット

覚醒下のテレメトリー装着ラットを用いた試験で、レミマゾラム（20 及び 30 mg/kg）の単回急速静注後に血圧及び心拍数の増加が認められた（[redacted]、2.6.2.4.2.4 項）。これらの変化にはある程度用量依存性が認められたが、一過性で軽度な変化であることから有害事象とは判断しなかった。血圧及び心拍数の増加並びに溶媒及びレミマゾラムを投与した両群でハンドリングのアーティファクトが認められたのは本試験だけであり、これらの変化は本試験デザインに特有のものであると考えられる。

2.4.3.3.3.2 ミニブタ

ミニブタを用いてレミマゾラム、ミダゾラム、プロポフォール及びデクスメデトミジンの血圧に対する影響を評価した（[redacted]、2.6.2.4.2.6 項）。レミマゾラム（12.5～100 µg/kg/min、15 分間）は 50 µg/kg/min で平均血圧の増加、12.5～50 µg/kg/min で心拍数増加がいずれも麻酔導入時及び回復時に認められた。過剰量として追加検討した 100 µg/kg/min では、同様に麻酔導入時の血圧及び心拍数の増加が認められた。レミマゾラムの静脈内持続投与中又は投与後 75 分間に ECG の異常な変化は認められなかった。50 µg/kg のレミマゾラムと同等の鎮静作用を示す用量で、プロポフォールは血圧を低下させ、デクスメデトミジンは血圧及び心拍数の増加並びに QT 及び QTc 間隔の延長を誘導した。

2.4.3.3.3.3 ヒツジ

雌ヒツジ 3 匹にレミマゾラムを 12 mg/kg までの投与量で 2 分間かけて急速静注すると、用量依存的な一過性の平均動脈圧の低下が認められた（最大低下 12%）（[redacted]、2.6.2.4.2.7 項）。全投与量で中心静脈圧が低下（最大低下 34%）したことから、静脈貯留が示唆された。また、心拍出量が変化することなく、代償性に心拍数が増加した（最大増加 25%）。雌ヒツジ 6 匹にレミ

マゾラム（0.5、1 及び 2 mg/kg）を急速静注すると、鎮静深度と比例して用量依存的な心血管系の抑制作用が認められた。

2.4.3.3.3.4 サル

テレメトリー装着雄カニクイザルに、レミマゾラム（0.5、1、2 及び 5 mg/kg）を急速静注した（[redacted]、2.6.2.4.2.8 項）。2 及び 5 mg/kg の投与直後に一過性で軽度な血圧低下が認められたものの、心拍数には影響しなかった。静脈内持続投与（6、18、30 及び 60 mg/kg、6 時間）では、血圧及び心拍数のいずれにも影響しなかった。

2 週間の反復投与毒性試験（[redacted]）で、カニクイザル（2 低用量群では各群雌雄 3 匹、対照群及び 2 高用量群では各群雌雄 5 匹）にレミマゾラム（6.75、9.0、11.25 及び 22.5 mg/kg）を 1 日 1 回 9 時間静脈内持続投与した。投与中及び回復期間を通して、体温、血圧及び ECG パラメータに異常は認められなかった。

4 週間の反復毒性試験（[redacted]）では、カニクイザル（各群雌雄 4 匹）にレミマゾラム（12.5、25 及び 50 mg/kg）を週 1 回 2 時間（合計 5 回）静脈内持続投与した。Day 1（初回投与日）、15 及び 29 に体温及び心拍数の低下が認められたが、血圧に対する影響は認められなかった。

2.4.3.3.3.4.1 まとめ

各動物種におけるレミマゾラムの心血管系への影響は、試験によってばらつきが認められた。血圧低下は麻酔薬の既知の副作用であり、サルで認められた一過性で軽度の血圧低下は、より臨床を反映していると考えられる。

2.4.3.3.4 呼吸系に対する影響

ヒツジ 3 匹にレミマゾラム（0.05～12 mg/kg）を急速静注すると、呼吸数の減少（最大減少 33%）及び動脈血二酸化炭素分圧（pCO_2）の上昇（最大上昇 12%）を伴う用量依存的な呼吸抑制作用が認められた（[redacted]、2.6.2.4.2.7 項）。一過性だが、有意で用量依存的な動脈血酸素分圧（pO_2）の低下（最大低下 34%）及びヘモグロビン酸素飽和度（SO_2）の低下（最大低下 4%）が認められた。

ヒツジを用いた別試験 [6]で、レミマゾラムの作用をミダゾラム及びプロポフォールの作用と比較した。これら 3 薬物は、いずれも用量依存的な呼吸抑制作用を示し、中程度（ミダゾラム及びプロポフォール）から強度（レミマゾラム）の鎮静作用が認められる投与量で呼吸抑制が認められた。

安全性薬理試験において、覚醒下のカニクイザルにレミマゾラム（0.5、1、2 及び 5 mg/kg）を急速静注した時の呼吸系に対する影響を評価した（[redacted]、2.6.2.4.2.8 項）。レミマゾラムはいずれの用量でも呼吸数、動脈血 pH、pO_2 及び SO_2 に影響しなかった。しかし、5 mg/kg では投与 20 分後に pCO_2 を約 5 mmHg 上昇させた。静脈内持続投与（6、18、30 及び 60 mg/kg、6 時間）では、pCO_2 のわずかな上昇が認められた（18 及び 30 mg/kg で約 6 mmHg、60 mg/kg で約 10 mmHg）。いずれの投与量でも動脈血 pH、pO_2 及び SO_2 に投薬に関連した変化は認められなかった。

別試験（[redacted]）で、覚醒下のテレメトリー装着雄カニクイザルにレミマゾラム（0.5、1、2 及び 5 mg/kg）を急速静注した結果、いずれの投与量でも呼吸数に影響しなかった。同様にレミマゾラムの静脈内持続投与（6、18、30 及び 60 mg/kg、投与 6 時間）では、評価したいずれの投与量でも呼吸数に影響を及ぼさなかった。

レミマゾラムで呼吸抑制作用がほとんど又は全く認められないことは、別の動物種を用いた試験からも明らかである。ミニブタにレミマゾラム（12.5～100 μg/kg/min、15 分間）を静脈内持続投与した試験において、レミマゾラムは最高用量の 100 μg/kg/min まで動脈血液ガスに影響しなかった（[redacted]、2.6.2.4.2.6 項）。ウサギにレミマゾラム（2.5、5 及び 7.5 mg/kg、2 分間）を急速静注後、5 及び 7.5 mg/kg で呼吸数の低下が認められた（[redacted]、2.6.2.4.2.5 項）。7.5 mg/kg の 2 分間急速静注後、パルスオキシメトリーにより非侵襲的に測定した SO_2 は投与前値と比較して 18%～20%低下した。一方、7.5 mg/kg の 4 分間静脈内持続投与では、統計学的有意差が認められた投与 3 分後（投与前値と比較して 4%低下）を除き、SO_2 の有意な変動は認められなかった。鎮静作用を示す 5 mg/kg で SO_2 の変化は認められなかった。2 種類の投与速度で異なる反応が認められたのは、到達する C_{max} の違いに関連していると考えられる。

2.4.3.3.4.1 まとめ

レミマゾラムは他のベンゾジアゼピン系薬剤の薬理作用の一つとして知られている呼吸抑制作用[7)1)]をある程度有しているが、その呼吸抑制作用は、同程度の鎮静作用が認められる用量のプロポフォール及びミダゾラムと比較してより軽度であった。概して、複数の動物種を用いた試験においてレミマゾラムが呼吸系に及ぼす影響はいずれも軽度であった。

2.4.3.4 薬力学的薬物相互作用

2.4.3.4.1 鎮静作用

ラットにおいて、フェンタニル（[redacted] 及び [redacted]）、レミフェンタニル（[redacted]）、プロポフォール、デクスメデトミジン、チアミラール、ミダゾラム（[redacted]）、ヒドロキシジン（[redacted]）及びアトロピン（[redacted]）とレミマゾラムとの併用を含む多数の薬力学的薬物相互作用試験を実施した（2.6.2.5.1 項）。

オピオイド系鎮痛薬（フェンタニル及びレミフェンタニル）及び $GABA_A$ 受容体ベンゾジアゼピン部位以外に活性部位を有する鎮静薬（プロポフォール、デクスメデトミジン、チアミラール及びヒドロキシジン）との併用投与で、レミマゾラムの LRR を指標とした鎮静作用に相乗効果が認められた。レミマゾラムと同じベンゾジアゼピン系薬剤であるミダゾラム又は抗コリン薬のアトロピンと併用した場合には、レミマゾラムの鎮静作用に相乗効果は認められなかった。

レミマゾラムの鎮静作用に対する ED_{50} 値は麻酔薬ケタミンとの併用投与により 93%低下し、レミマゾラムの鎮静作用に相乗効果が認められた（[redacted]）。同様の結果はセボフルラン併用でも得られた（[redacted]）。同様に、レミマゾラム、プロポフォール、ミダゾラム及びレミフェンタニルとの併用投与についてサルで評価したところ、レミマゾラム単剤投与と比較して、鎮静作用量はそれぞれ、92%、58%及び 98%低下し、レミマゾラムの鎮静作用に相乗効果が認められた（[redacted]）。

以上のように、レミフェンタニルなどのオピオイド系鎮痛剤及びケタミンなどの非ベンゾジアゼピン系麻酔剤との併用投与により、レミマゾラムの鎮静作用に相乗効果が認められた。こうした薬力学的薬物相互作用の結果、レミマゾラムの鎮静作用量は最大 90%まで低下する可能性が考えられる。

レミマゾラム自体に鎮痛作用は認められず、併用時のフェンタニル又はレミフェンタニルの鎮痛作用に影響しなかったことから、レミマゾラムは臨床使用時にもフェンタニル又はレミフェンタニルの鎮痛作用に影響しないことが期待される（[redacted]、[redacted]、[redacted]）。

2.4.3.4.2 心血管系に対する作用

各動物種において、レミマゾラム単剤投与で血圧低下及び心拍数増加が認められた。ラットでの血圧低下作用はドパミン及びフェニレフリンとの併用で減弱し、ランジオロール、ミルリノン、ニカルジピン、ニトログリセリン、アルプロスタジル及びセボフルランとの併用で増強し、リドカイン及びジゴキシンとの併用では影響されなかった（[redacted]、[redacted]、[redacted]、[redacted]、[redacted]、2.6.2.5.2 項）。しかし、セボフルランとの併用下において、レミマゾラムの鎮静作用が増強される用量と、血圧低下が増強される用量との間には十分な乖離があると考えられることから、両剤を有効かつ安全に併用投与することは可能と考えられた。レミマゾラムによる心拍数増加作用は、ドパミン、フェニレフリン、リドカイン、ランジオロール、ジゴキシン及びニカルジピンと併用投与した場合に減弱し、ミルリノン、ニトログリセリン及びアルプロスタジルと併用投与した場合は影響を受けなかった（[redacted]、[redacted]、[redacted]、[redacted]、[redacted]、2.6.2.5.2 項）。

2.4.4 薬物動態試験

レミマゾラムの薬物動態（吸収・分布・代謝・排泄・薬物相互作用など）を明らかにするため、*in vitro* 及び *in vivo* の各試験を実施した。試験の結果を以下に要約した。

2.4.4.1 薬物動態概要

ラット、ウサギ、イヌ、ブタ及びサルを用いて *in vivo* 薬物動態試験を実施した。反復投与試験は、GLP 適用トキシコキネティクス試験として実施し、バリデートされた生体試料分析法を用いて測定した。

生体試料分析試料の保存には、試料安定化のためエステラーゼ阻害剤を使用し、安定性が確認できているバリデートされた保存期間内に測定に供した。また、薬物動態データはバリデートされた液体クロマトグラフィー・タンデムマススペクトロメトリー（LC/MS/MS）法で得ており、データは測定基準を満たしていた。なお、添加物であるデキストラン 40 の測定にはバリデートされた enzyme-linked immunosorbent assay（ELISA）法を用いた。

2.4.4.2 吸収

2.4.4.2.1 単回投与：経口投与したときのバイオアベイラビリティ

レミマゾラムを雌ウサギ（ニュージーランド白色）に経口投与してバイオアベイラビリティを検討した。高い初回通過効果により CNS 7054 に代謝され、バイオアベイラビリティは 10%未満と低かった（2.6.4.3.1 項）。

2.4.4.2.2 単回投与

レミマゾラムの単回投与試験として下記の動物を用い、レミマゾラム及び主代謝物 CNS 7054 について検討した。

2.4.4.2.2.1 ラット

Sprague Dawley（SD）ラットに急速静注したとき、レミマゾラムの C_{max} は最初の試料採取時点（投与 1 分後）にみられ、その後消失半減期（$t_{1/2}$）約 3 分で減衰した。分布容積（V_{ss}）はラット

の体液量に比べ非常に大きかった。CNS 7054 の投与 1 分後の濃度は未変化体より約 12 倍高い濃度を示し、投与 4 分後で C_{max} となり、その後 $t_{1/2}$ 約 30 分で減衰した（[redacted]）。^{14}C-レミマゾラムを SD ラットに急速静注したとき、血漿中放射能濃度の C_{max} は最初の試料採取時点（投与 2 分後）にみられ、その後 $t_{1/2}$ 約 39 時間で減少した（[redacted]、2.6.4.3.2.1 項）。

2.4.4.2.2.2 ウサギ

レミマゾラムをウサギ（ニュージーランド白色）に 4 分以上かけて静脈内投与したとき、レミマゾラム及び CNS 7054 の C_{max} はそれぞれ約 7 及び約 13 分、その後の $t_{1/2}$ はそれぞれ約 46 及び約 55 分であった（2.6.4.3.2.2 項）。

2.4.4.2.2.3 イヌ

レミマゾラムをイヌ（ビーグル）に急速静注したとき、レミマゾラムの C_{max} は投与 2 分後にみられ、その後 $t_{1/2}$ 約 64 分で減少した。V_{ss} はイヌの体液量に比べ大きく、レミマゾラムの広範な組織分布が示唆された。CNS 7054 の投与 1 分後の濃度は、未変化体の約 1/28 と低い濃度を示した。C_{max} は投与 8 分後であり、その後 $t_{1/2}$ 153 分（2.6 時間）で減少した（2.6.4.3.2.3 項）。

2.4.4.2.2.4 ブタ

レミマゾラムをミニブタに急速静注したとき、レミマゾラムは $t_{1/2}$ 12～25 分で減少した。CNS 7054 は投与後 10～20 分で C_{max} に達し、その後 $t_{1/2}$ 78～150 分で減少した。レミマゾラムの無限時間までの濃度-時間曲線下面積（$AUC_{0-\infty}$）は投与量と共に増大し、レミマゾラムの薬物動態は線形であると考えられた。同様にレミマゾラムを 4 時間静脈内持続投与終了後、レミマゾラムは $t_{1/2}$ 20～47 分、CNS 7054 は 87～100 分で減少した。急速静注終了後のレミマゾラムの血漿中濃度は、動脈血より静脈血の方が高かったが、CNS 7054 は動脈血と静脈血で差がみられなかった（2.6.4.3.2.4 項）。

2.4.4.2.2.5 サル

レミマゾラムをカニクイザルに 5 分間かけて静脈内投与したとき、レミマゾラム及び CNS 7054 の C_{max} は投与開始後 5.0～6.7 分及び 16.7～20.8 分にそれぞれ認められ、その後の $t_{1/2}$ はそれぞれ 42～58 分及び 57～62 分であった。なお、薬物動態に性差はみられなかった。

カニクイザルに 2 時間静脈内持続投与したとき、レミマゾラム及び CNS 7054 の C_{max} はそれぞれ投与開始後 1.7～1.8 時間及び 2 時間に認められ、その後 $t_{1/2}$ 約 1.3 時間及び 1.4～1.6 時間でそれぞれ減少した。持続投与時間が 5 分間及び 2 時間のいずれの場合もレミマゾラム及び CNS 7054 の C_{max} 及び AUC はほぼ投与量に比例して増加した。一方、カニクイザルに 6.75、9.0、11.25 及び 22.5 mg/kg で静脈内持続投与後の曝露は投与量比に対してやや増加する傾向がみられた（2.6.4.3.2.5 項）。

2.4.4.2.3 反復投与

2.4.4.2.3.1 反復投与：急速静注又は短時間静脈内持続投与

ラット及びサルにレミマゾラムを 28 日間、急速静注（1 日 1 回）を行ったときの薬物動態をトキシコキネティクス試験で検討した。

2.4.4.2.3.1.1 ラット

ラット（SD、雌雄）にレミマゾラム 10、20 及び 30 mg/kg を単回及び 1 日 1 回反復急速静注（28 日間）したときのレミマゾラム及び CNS 7054 のトキシコキネティクスを検討した。

レミマゾラム 10 mg/kg を単回急速静注したときの血漿中レミマゾラム濃度は、全て定量下限未満であった。試験全体を通して、雌雄ラットに高用量を単回又は反復急速静注したとき、レミマゾラムは投与後 5 又は 10 分までのみ測定可能であった（[redacted] 及び [redacted]、2.6.4.3.3.1.1 項）。そのため、C_{max} 以外の薬物動態パラメータは算出できなかった。

血漿中 CNS 7054 濃度は投与後 12 時間まで測定可能であった。血漿中濃度は $t_{1/2}$ 約 1～2 時間で減少した。投与量 10～30 mg/kg において CNS 7054 の C_{max} は投与量に比例して増加した。

Day 1 での CNS 7054 全身曝露量に性差はみられなかった。しかし、反復急速静注したときの CNS 7054 の曝露量は雌より雄の方が大きかった。

2.4.4.2.3.1.2 サル

カニクイザル（雌雄）にレミマゾラムの 5、10 及び 20 mg/kg を単回急速静注及び 1 日 1 回 4 週間反復急速静注を行った。

血漿中レミマゾラム濃度は投与後 6 時間から 12 時間まで、CNS 7054 濃度は最終試料採取時点である投与後 12 時間までそれぞれ測定可能であった（[redacted]、 2.6.4.3.3.1.2 項）。

レミマゾラム及び CNS 7054 の $t_{1/2}$ はそれぞれ 0.62～1.02 時間及び 1.32～1.57 時間であり、最高投与量群での CNS 7054 の $t_{1/2}$（$t_{1/2\ 0\text{-}24h}$）は 3.70～3.80 時間と長かった。最高投与量群以外では、濃度が低いため真の $t_{1/2}$ が算出されていないと考えられる。

レミマゾラム 5～20 mg/kg の投与量において、Day 1 及び Week 4 におけるレミマゾラム及び CNS 7054 の全身曝露量（$AUC_{0\text{-}12}$）は投与量に比例した増加及び短い $t_{1/2}$ を示したことから、顕著な蓄積性はみられなかった。レミマゾラム及び CNS 7054 ともに、全身曝露量に性差はみられなかった。

2.4.4.2.3.2 反復投与：静脈内持続投与

カニクイザル（3～5 歳）にレミマゾラムの 1 又は 5 mg/kg/h を後大静脈に留置したカテーテルを介して 1 日 24 時間、7 日間静脈内持続投与した（[redacted]、 2.6.4.3.3.2.1 項）。

血漿中レミマゾラムは、投与終了までほぼ一定濃度で推移し、7 日間持続投与中に血漿中レミマゾラムの上昇はみられなかった。投与終了後、血漿中レミマゾラムは速やかに減少した。
CNS 7054 の血漿中濃度も投与終了までほぼ一定で推移した。投与終了後は 5 mg/kg/h で一過性の上昇が認められたが、その後は速やかに低下した。

レミマゾラムに対する CNS 7054 の血漿中濃度比は投与期間を通じて大きな変動は認められず、レミマゾラムの CL が投与期間中に低下しなかったことを示唆している。

2.4.4.3 分布

2.4.4.3.1 ラットに ^{14}C-レミマゾラムを単回急速静注したときの組織内分布

雄ラット（SD、非絶食）に ^{14}C-レミマゾラム 10 mg/kg を単回急速静注したとき、投与 5 分後では腎臓で最も放射能が高く、次に肝臓と十二指腸であった（[redacted]、2.6.4.4.1 項）。他の組織内放射能濃度は血漿より低値を示した。投与 8 時間後では、血中濃度を上回る組織内濃度が認められ、投与後 8 時間以降で精嚢、大腿骨、胸腺及び骨格筋中放射能の $t_{1/2}$ は血漿中放射能（$t_{1/2}$：

37 時間）より緩徐であったが、他の組織では血漿と同程度あるいは短い $t_{1/2}$ で減少・推移した（表 2.6.4-17）。

2.4.4.3.2 ヒツジにレミマゾラムを単回静脈内投与したときの組織内分布

大動脈、肺動脈及び矢状静脈洞カテーテルを留置したヒツジにレミマゾラム投与後のレミマゾラム及び CNS 7054 の組織内濃度を測定した。肺及び脳ともに、持続投与開始後 2～3 分以内に最高濃度がみられた。代謝物の肺及び脳への取り込みはほとんどみられなかった（2.6.4.4.2 項）。

2.4.4.3.3 サルに ^{14}C-レミマゾラムを単回急速静注したときの組織内分布

カニクイザルに ^{14}C-レミマゾラム 10 mg/kg を急速静注したとき、投与 5 分後では肝臓及び腎臓中の放射能濃度が最も高く、次に胃及び副腎であった（[redacted]）。大脳及び小脳では、血漿中放射能濃度とほぼ同じ値を示した。その他の大半の組織の放射能濃度は、血漿中放射能濃度と同程度あるいは低い値を示した。投与 168 時間後では、各組織の放射能濃度は投与 5 分後での放射能の 5%からそれ以下となった。また、メラニン色素を含む組織である虹彩及び毛様体における投与 5 分後及び 168 時間後の値は、17700 から 85.6 ng eq./g に減少し、網膜及び脈絡集網で 12700 から 109 ng eq./g に減少した。この推移は、血漿中放射能濃度の消失と同様であった（23400 から 96.4 ng eq./mL）（表 2.6.4-18、2.6.4.4.3 項 ）。

2.4.4.3.4 乳汁移行

分娩後 11 日の授乳ラット（SD）に ^{14}C-レミマゾラム 10 mg/kg を単回急速静注した。投与 1 時間後に、乳汁中には血漿中放射能濃度と同程度（91%）の濃度が検出された（[redacted]、2.6.4.4.4 項）。投与後 8 時間以降の乳汁中／血漿中放射能濃度比は同程度で推移し、2.10～2.89 の範囲にあった。乳汁中にはレミマゾラム及び／又はその誘導体に由来する代謝物が移行したが、血漿中濃度に伴い消失した。

2.4.4.3.5 妊娠ラットにおける組織内分布、胎盤通過性

妊娠 17 日のラットに ^{14}C-レミマゾラム 10 mg/kg を単回急速静注して組織内分布を検討した（[redacted]、2.6.4.4.5 項）。組織内放射能濃度は投与 5 分後に最高値を示し、雄ラットに急速静注したときの分布と類似していた。投与 5 分後の胎児血液及び胎児（全体）における放射能濃度は、母動物の血漿中放射能度の 0.07 及び 0.05 倍であった。投与後 8 時間以降の羊膜中放射能濃度は、母動物の血漿中放射能濃度よりも緩やかに減少した（$t_{1/2}$： 82 時間対 15 時間）。胎児血液における $t_{1/2}$ は 37 時間、胎児における $t_{1/2}$ は 24 時間であった。投与後 48 時間までに胎児血液及び胎児の放射能は投与 5 分後での 1%未満となった。

したがって、レミマゾラム及び／又はその代謝物の胎盤への移行は限られており、胎児における曝露は一過性であることが示された。

2.4.4.3.6 血清タンパク結合

^{14}C-レミマゾラムのラット、サル、ヒト血清及びヒト血清アルブミン（HSA）並びに α_1-酸性糖タンパク（α_1-AGP）へのタンパク結合率を、限外ろ過法により測定した。なお、ラット血清の場合は、エステラーゼ阻害剤であるジイソプロピルフルオロリン酸（DFP）存在下で実施した。

ラット、サル及びヒト血清に ^{14}C-レミマゾラムを添加（1～10 μg/mL）したときのタンパク結合

率は、70.1%～71.0%、76.0%～77.2%及び91.6%～92.1%であった。

^{14}C-レミマゾラムのHSAへの結合率がα$_1$-AGPに対する結合率より高いことから、^{14}C-レミマゾラムは主にアルブミンに結合することが示唆された。また、この結合は可逆的であることが確認された（[redacted]、2.6.4.4.6項）。CNS 7054のHSAへの結合率は、α$_1$-AGPへの結合率よりもはるかに高かったことから、CNS 7054もヒト血清中で主にアルブミンに結合することが示唆された（[redacted]、2.6.4.4.6項）。

2.4.4.3.7 血球移行性

レミマゾラムの*in vitro*血球移行性を^{14}C-レミマゾラムを用いて、1～10 μg/mLの濃度範囲で検討した。レミマゾラムの血球移行率はヒトで8%～12%、ラットで13%～16%、サルで31%～33%であった（[redacted]、2.6.6.4.4.7項）。

2.4.4.4 代謝

2.4.4.4.1 *in vitro* 代謝

レミマゾラムは、ブタ全血及び血漿中で37℃で60分安定であった。同様の方法で安定性を検討した他の動物（ラット、イヌ、ウサギ、ミニブタ及びサル）の血漿でも室温で24時間以上の安定性が確認された（[redacted]、2.6.4.5.1項）。ヒト全血及び血清でレミマゾラムの異性化はみられなかった（[redacted]）。

レミマゾラムは、ラット、マウス、ミニブタ及びヒトの肝ホモジネート中で速やかにCNS 7054に代謝される（$t_{1/2}$はいずれも10分未満、CNS/03、CNS/06、2.6.4.5.1項）。レミマゾラムの代謝は、イヌで最も遅く（$t_{1/2}$：約20分）、カニクイザルでは中程度であった（$t_{1/2}$：約15分）。いずれの動物においても、肝以外の組織ホモジネートにおいても顕著な代謝がみられた（[redacted]、2.6.4.5.1項）。

ヒト肺及び肝ホモジネートにおいては^{14}C-レミマゾラムの経時的な濃度減少（それぞれ$t_{1/2}$ 110及び14分）がみられたが、腎ホモジネート及び血漿での減少はみられなかった。レミマゾラムはヒトでは主に肝臓で加水分解されることが示された。

また、非特異的阻害剤であるNaF及びエステラーゼ阻害剤［DFP、ビス（4–ニトロフェニル）リン酸ナトリウム塩（BNPP）、エゼリン及び*p*-ヒドロキシメルクリ安息香酸ナトリウム（PHMB）］を用いた検討から、ヒト肝臓におけるレミマゾラムの加水分解には、CESが関与していることが示された（[redacted]、2.6.4.5.1項）。

ヒトCES1及びCES2を発現させたBactosomes™を用いた^{14}C-レミマゾラムの代謝試験データから、レミマゾラムは主にCES1により加水分解されることが示唆された。（[redacted]、2.6.4.5.1項）。

レミマゾラムはCES1の基質であり、ブチリルコリンエステラーゼ又はパラオキソナーゼの基質ではないことから、これらの遺伝子多型によってレミマゾラムの代謝が影響されるリスクは低いと推定される。

2.4.4.4.2 ラットに^{14}C-レミマゾラムを単回静脈内投与したときの*in vivo*代謝プロファイル

ラットに^{14}C-レミマゾラムを単回静脈内投与したとき、投与5分後の血漿中にレミマゾラムは検出されず、4つの代謝物が認められ、主代謝物はCNS 7054であった。胆汁中には、レミマゾラ

ムが検出され（投与後 24 時間までに投与放射能の 0.6%）、その他に 5 つの代謝物ピークが検出されたが、胆汁中放射能の主代謝物は CNS 7054 及び RP-2 であった。

同様に、投与後 24 時間までの尿及び糞中にレミマゾラムは検出されず、尿中には 5 つ、糞中には 6 つの代謝物が認められ、尿中では CNS 7054、糞中では、RF-3（保持時間から CNS 7054 のピリジン環の水酸化体である RP-2 と同じであると推定）が主代謝物であった。（[redacted]、2.6.4.5.2 項）。

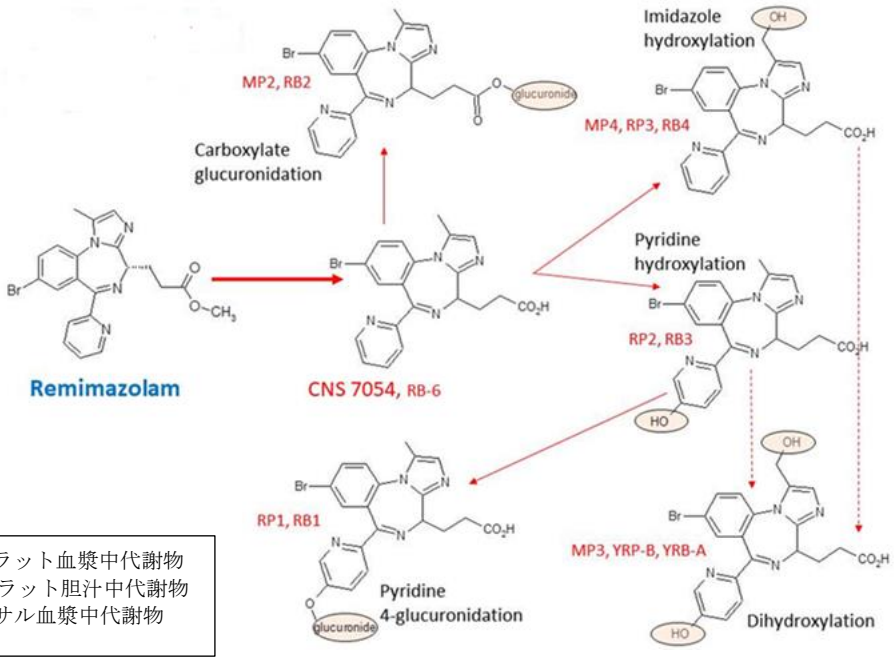
2.4.4.4.3 サルに ^{14}C-レミマゾラムを単回静脈内投与したときの *in vivo* 代謝プロファイル

カニクイザルに ^{14}C-レミマゾラムを単回静脈内投与したとき、投与 4 及び 8 時間後の血漿中にレミマゾラムは血漿中放射能のそれぞれ 5.1%及び 2.5%検出された。血漿中に 5 つの代謝物が認められ、いずれの時点でも主代謝物は CNS 7054 であった。投与後 24 時間までの尿中にレミマゾラムは検出されず、尿中には 4 つの代謝物が認められ、主代謝物は CNS 7054 であった。また、投与後 96 時間までの糞中にレミマゾラムは検出されず、9 つの代謝物が認められたが、主代謝物は血漿中の代謝物 MP-2 と一致する代謝物であった。胆汁中では、投与 5 分後にレミマゾラムは投与放射能の 9.1%検出され、主代謝物は CNS 7054 であった（[redacted]、2.6.4.5.3 項）。

2.4.4.4.4 推定代謝経路

ラット及びサルの代謝試験（[redacted] 及び [redacted]）で認められたレミマゾラムの代謝物の構造を LC/MS/MS 及び核磁気共鳴（NMR）スペクトルを用いて同定した（[redacted]）。代謝物及びレミマゾラムの推定代謝経路を図 2.4-2 に示す（2.6.4.5.4 項）。

図 2.4-2 レミマゾラムの推定代謝経路



RP 及び YRP：ラット血漿中代謝物
RB 及び YRB：ラット胆汁中代謝物
MP　　：サル血漿中代謝物

2.4.4.5 排泄

2.4.4.5.1 ラットに ^{14}C-レミマゾラムを単回静脈内投与したときの尿及び糞中排泄

ラットに ^{14}C-レミマゾラムを単回静脈内投与したとき、投与後 120 時間までの糞中及び尿中にそれぞれ投与放射能の 52.6%及び 45.5%が排泄され、糞中及び尿中への累積排泄率は投与放射能の 98.1%であった（[redacted]、2.6.4.6.1 項）。

2.4.4.5.2 サルに ^{14}C-レミマゾラムを単回静脈内投与したときの尿及び糞中排泄

カニクイザルに ^{14}C-レミマゾラムを単回静脈内投与したとき、投与後 168 時間までの糞中及び尿中にそれぞれ投与放射能の 17.5%及び 65.6%が排泄され、糞中及び尿中への累積排泄率は投与放射能の 83.2%であった（[redacted]、2.6.4.6.2 項）。投与後 168 時間での組織内分布から、レミマゾラム及びその代謝物が体内に残留する可能性は低いことが示唆された。

2.4.4.5.3 ラットに ^{14}C-レミマゾラムを単回静脈内投与したときの胆汁中排泄

胆管カニューレを施したラットに ^{14}C-レミマゾラムを単回静脈内投与したとき、投与後 48 時間までの胆汁中に投与放射能の 62.4%が、尿中及び糞中にそれぞれ 33.4%及び 0.8%が排泄された。胆汁中に排泄された放射能の大部分は、投与後 2 時間以内に排泄された（[redacted]、2.6.4.6.3 項）。

2.4.4.6 薬物動態学的薬物相互作用

In vitro 試験においてチトクローム P450（CYP）、CES 及びヒト薬物トランスポーターを介したレミマゾラム及び CNS 7054 の薬物相互作用を検討した。

2.4.4.6.1 チトクローム P450

レミマゾラム及び CNS 7054 の CYP を介した薬物相互作用を *in vitro* 試験で検討した。レミマゾラム及び CNS 7054 は、いずれの CYP 分子種も誘導しなかった。また、各 CYP に対する IC_{50} 値も高い値を示した。本試験で最も阻害された CYP2C8 活性に対するレミマゾラム及び CNS 7054 の IC_{50} 値はそれぞれ 29.2 及び 578 μmol/L であった（表 2.4-4）。この値は臨床試験（CNS7056-010）のレミマゾラム及び CNS 7054 の C_{max} に比べ非常に高いため、臨床使用時にレミマゾラム及び CNS 7054 が CYP を阻害することは考えにくい。

表 2.4-4 レミマゾラム及び CNS 7054 の各 CYP に対する IC_{50}

CYP isoform	IC_{50} (μmol/L)	
	Remimazolam	CNS 7054
CYP1A2	63.6	>600
CYP3A4	> 100	>600
CYP2B6	> 100	>600
CYP2C8	29.2	578
CYP2C9	> 100	>600
CYP2C19	> 100	>600
CYP2D6	> 100	>600

Data from [redacted]（2.6.4.7.1 項）

2.4.4.6.2 カルボキシルエステラーゼ

レミマゾラムをヒト肝 S9 画分とインキュベートしたとき、レミマゾラムは速やかに代謝され、高濃度のレミフェンタニルが共存してもレミマゾラムの加水分解速度は変化しなかった。したがって、レミフェンタニルと併用投与してもレミマゾラムの薬物動態は変化しないと考えられた（[redacted]、2.6.4.7.2 項）。

エステル構造を持ち、臨床使用の可能性のあるエスモロール及びランジオロールを ^{14}C-レミマゾラムとともにヒト肝ホモジネート中でインキュベートしたとき、エスモロール及びランジロールは ^{14}C-レミマゾラムの加水分解に影響しなかった（[redacted]、2.6.4.7.2 項）。また、ヒト肝 S9 画分を用いた検討では、CES1 の阻害剤であるアトルバスタチン及びジルチアゼム（100 µmol/L において 55%及び 80%阻害）[8]については、ジルチアゼムのレミマゾラム及びトランドラプリル（典型的基質）に対する IC_{50} 値はそれぞれ 57 及び 49 µmol/L であり、また、アトルバスタチンのトランドラプリルからトランドラプリレイトへの代謝物及びレミマゾラムから CNS 7054 への代謝に対する IC_{50} 値は 100 µmol/L（最高試験濃度）超であり、最高濃度でも 13%～14%程度の阻害であった。したがって、アメリカ食品医薬品局（FDA）のドラフトガイダンス [9]に基づくと、アトルバスタチン及びジルチアゼムの CES1 を介したレミマゾラムの代謝阻害による臨床薬物相互作用の可能性はほとんどないと考えられた（[redacted]、2.6.4.7.2 項）。

レミマゾラムは、30 µg/mL（68 µmol/L）まで、ヒト血漿中でのランジオロール及びヒト血球におけるエスモロールの加水分解に対して阻害作用（阻害率約 40%）を示すが、ヒト肝ホモジネートでのランジオロールの加水分解に対してはほとんど阻害しなかった。この濃度は、臨床試験（CNS7056-010）における遊離型レミマゾラム濃度である 0.9 µmol/L と比べて非常に高濃度である。したがって、レミマゾラムに CES1 を介した意味のある薬物動態学的相互作用を生じる可能性は低いと考える。

FDA のドラフトガイダンス（2017）[9]に基づいて得られた成績から、臨床において他剤との薬物相互作用は生じないと考えられる。

2.4.4.6.3 ヒト薬物トランスポーター

レミマゾラム及び CNS 7054 のヒト薬物トランスポーターを介した薬物相互作用を検討した。

レミマゾラムは、ヒト薬物トランスポーター［P 糖蛋白質（P-gp）、organic anion transporting polypeptide（OATP）1B1、OATP1B3 及び乳がん耐性タンパク質（BCRP）］の基質ではなかった。また、CNS 7054 は P-gp 及び BCRP の基質ではあるが、多剤耐性関連蛋白質（MRP）2、MRP3 及び MRP4 の基質ではなかった。レミマゾラムは有機アニオントランスポーター（OAT）3、organic cation transporter （OCT）2、OATP1B1、OATP1B3、multidrug and toxin transporter （MATE）1、MATE2-K 及び bile salt export pump （BSEP）をわずかに阻害した。CNS 7054 は OAT3、OATP1B1 及び OATP1B3 を阻害したが、P-gp、OAT1、OCT2、BCRP、MATE1、MATE2-K 及び BSEP を阻害しなかった。FDA ドラフトガイダンス （2017）[9]及び EMA のガイドライン（2012）[10]に基づいて評価したとき、*in vivo* において薬物相互作用は起きないと判定された（[redacted]、2.6.4.7.3 項）。これらの結果から、レミマゾラムが薬物動態学的薬物相互作用を生じる可能性もされる可能性も低いことが示された。

表 2.4-5　トランスポーターの基質又は阻害剤としてのレミマゾラム及び CNS 7054

SLC transporters	Remimazolam	CNS 7054	ABC transporters	Remimazolam	CNS 7054
	Substrate/inhibitor			Substrate/inhibitor	
OATP1B1	n/ (y)	ND/(y)	P-gp	n/n	y/n
OATP1B3	n/ (y)	ND/(y)	BCRP	n/n	y/n
OAT1	ND/n	ND/n	BSEP	ND/ (y)	ND/n
OAT3	ND/ (y)	ND/(y)	MRP2	ND/ND	n/ND
OCT2	ND/ (y)	ND/n	MRP3	ND/ND	n/ND
MATE1	ND/ (y)	ND/n	MRP4	ND/ND	n/ND
Mate2-K	ND/ (y)	ND/n			

SLC = solute carrier, ABC = ATP-binding cassette
n = not a substrate or inhibitor, y = substrate or inhibitor, (y) = weak or negligible inhibition, no clinical relevance, ND = not determined

2.4.4.7　その他の薬物動態試験

レミマゾラムの臨床試験前の初期評価の一環として、動物からヒトへの外挿手法を用いて、ヒトにおける動態を予測した。

イヌ、ミニブタ、ヒトのデータに基づいてレミマゾラムのヒトにおける代謝クリアランス値（CL_{vitro}）及び $t_{1/2}$ の予測を行った。その結果、レミマゾラムの CL_{vitro} はイヌ、ミニブタ及びヒトにおいてそれぞれ 1.09、20.3、3.95 mL/min/kg であった。レミマゾラムのヒトにおける $t_{1/2}$ を 130 分（イヌから推定）、67 分（ミニブタから推定）と予測した。CL/CL_{vitro} 比を scaling factor として補正したときのヒトにおける CL_{vitro} はそれぞれ 52.0 及び 3.87 mL/mi/kg、$t_{1/2}$ は、それぞれ 9.7 及び 68 分であった（2.6.4.8.1 項）。

2.4.4.8　考察

レミマゾラムの薬物動態を 5 種の動物で検討したところ、投与後の短い $t_{1/2}$ 及び速やかで広範囲の組織分布が示され、いずれの組織においても蓄積はほとんどみられないことが確認された。レミマゾラムは主にアルブミンに結合し、いずれの試験濃度でもヒト血清ではほぼ一定の結合率（約 92%）を示し、その結合は可逆的であった。レミマゾラム及び代謝物の胎盤通過性は非常に低いことから、胎児における持続的な曝露はなく、乳汁中に移行するが、乳汁中の薬物濃度は母動物の血漿中濃度の推移に伴い減少した。また、メラニンを含有する眼組織にも移行することが確認されているが、血漿中濃度の推移に伴い減少することから、蓄積性は認められていない。

レミマゾラムの主な代謝経路は、主に肝臓中の CES による CNS 7054 への代謝、その後の水酸化及びグルクロン酸抱合である。このことから、CYP はレミマゾラムの消失には関与はせず、CYP を介した薬物相互作用の可能性は低いと考えられる。

レミマゾラムの主排泄経路は、ラットで胆汁を介した糞中排泄、サルで腎排泄であることが示された。

レミマゾラムの $t_{1/2}$ は短く、速やかな代謝減少が示され、臨床使用でも静脈内持続投与の終了後、麻酔・鎮静からの回復が早いことが期待される。

レミマゾラムは、*in vitro* 試験の結果から CES の基質（エスモロール及びランジオロール）及び CES1 阻害剤（アトルバスタチン及びジルチアゼム）との薬物相互作用のないことが示された。レミフェンタニルは、ヒト肝 S9 画分中でレミマゾラムの加水分解に影響しないため、臨床での併用投与でも薬物相互作用はないと考えられた。FDA ドラフトガイダンス（2017）[9]に基づく総合的な評価によっても、レミマゾラムが CES1 阻害剤により影響を受ける可能性は低いことが示

唆された。また、レミマゾラム及び CNS 7054 は CYP（CYP1A2、CYP2B6、CYP2C8、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6 又は CYP3A4）を阻害せず、誘導（CYP1A2、CYP2B6 及び CYP3A4）もしなかった。さらにレミマゾラムは、ヒト薬物トランスポーター（P-gp、OATP1B1、OATP1B3 及び BCRP）の基質ではなく、レミマゾラムは P-gp、BCRP 及び OAT1 を、CNS 7054 は P-gp、OAT1、OCT2、BCRP、BSEP、MATE1 及び MATE2-K を阻害しなかった。これらの結果を総合すると、レミマゾラムは薬物相互作用を引き起こす又は薬物相互作用を受ける可能性は非常に低い薬剤であると考えられた。

2.4.5 毒性試験

単回及び反復投与毒性試験はラット、マウス、サル、ウサギ及びミニブタを用いて、生殖発生毒性試験はラット及びウサギを用いて、局所刺激性試験はラット、ウサギ、ブタ／ミニブタ及びサルを用いて、それぞれ実施した。臨床投与経路は静脈内投与であることから、主要な毒性試験では、被験物質は静脈内投与（急速静注又は静脈内持続投与）した。

毒性試験で使用した被験物質の一覧を、概要表の表 2.6.7-4 に示す。主要な毒性試験には、異なる施設で製造された不純物プロファイルが同一な別々のバッチを使用した。9 つの類縁物質を含有するレミマゾラムのバッチ（不純物バッチ）を使用したサルの 4 週間反復投与毒性試験及び数種の遺伝毒性試験も併せて実施した。

2.4.5.1 単回投与毒性試験

レミマゾラムの単回投与毒性試験を、マウス、ラット、ウサギ及びカニクイザルを用いて実施した。（表 2.6.6-2）

レミマゾラムを 125 mg/kg の用量でマウスに単回静脈内投与したとき、本薬の鎮静作用に関連する一般状態の変化（腹臥位、舌舐めずり、円背位、行動抑制、立毛、頻呼吸、不整呼吸及び歩行異常）が観察された。試験期間中に死亡例はみられなかった。体重増加量及び摂餌量が軽度減少（可逆的）したが、剖検では異常所見は認められなかった。

ラットでは 100 mg/kg を投与した動物で死亡（9/10 例）が認められた。同時に投与した薬物のプロポフォール、ミダゾラム及び塩酸デクスメデトミジンでは最小致死量は、それぞれ 10 mg/kg（1/10 例）、100 mg/kg（4/10 例）及び 0.5 mg/kg（2/10 例）であった（[redacted]、2.6.6.2.1 項）。より多くの用量段階で実施した同様の試験（[redacted]、2.6.6.2.1 項）では、レミマゾラムの最小致死量は 90 mg/kg（2/12 例死亡）で、100 mg/kg で 4/12 例が死亡したことから、最大非致死量は 80 mg/kg であった。ラット及びウサギの単回経口投与試験では、レミマゾラムの 30 mg/kg（ベシル酸塩として）投与まで被験物質に起因する変化は認められなかった。

カニクイザルでは、レミマゾラムの鎮静作用に一致した一般状態の変化（失調歩行、半眼、自発運動の低下、座位）が、150 mg/kg まで全群で用量依存的に認められた。高用量群では、これ以外の症状として傾眠、横臥位及び昏睡が観察された。観察期間中の死亡はみられなかった（[redacted]、2.6.6.2.3 項）。

全投与群で投与部位に炎症性変化又は血栓性静脈炎がみられたが、明らかな用量依存性あるいは薬物濃度依存性は認められなかった。これらの局所反応は、主に留置カテーテルの血管内膜への物理的刺激に起因すると推定された（[redacted]、2.6.6.2.3 項）。一方で、高濃度（2.5 mg/mL）の被験物質を投与することによって、この作用が悪化する可能性も示唆された（[redacted]、2.6.6.2.4 項）。投与部位以外の組織・器官に被験物質と関連する変化はみられなかった。

2.4.5.2 反復投与毒性試験

レミマゾラムの反復静脈内投与毒性試験を、ラット、サル及びミニブタを用いて実施した（表 2.6.6-3）。さらに、ラットにレミマゾラムを反復経鼻投与した毒性試験を実施した。

2.4.5.2.1 ラット

ラットに 4 週間反復静脈内投与（[redacted]、2.6.6.3.1 項）したときの主な一般状態の変化とし

て、虚脱、失調歩行、自発運動の低下及び不整呼吸などが観察された。これらの症状はレミマゾラムの薬理作用に関連するものである。

レミマゾラムの投与に関連する組織学的所見は、投与部位の局所的な炎症性反応（血管周囲性炎症の増加及び血管内膜増殖の増加）のみであり、この変化はレミマゾラム投与群、特に高用量群において一層顕著であった。回復期間終了時、血管内膜増殖の増加は完全には回復しなかった。

高用量群（30 mg/kg）では、高度の鎮静及び呼吸抑制（本薬の薬理活性に関連する）に起因する死亡例が 1 例認められた。無毒性量（NOAEL）は 20 mg/kg と判断された。

2.4.5.2.2 サル

カニクイザルを用いた反復投与毒性試験を実施した。主要な所見を以下に示す。

2 週間静脈内投与毒性試験（1 日 9 時間持続投与、[redacted]、2.6.6.3.3 項）では、被験物質の薬理作用に関連する一般状態の変化として、レミマゾラムの全群（最高 22.5 mg/kg）で、用量依存的に半眼、閉眼、自発運動低下、鎮静、傾眠及び失調歩行などの症状が観察された。死亡例はみられなかった。

4 週間静脈内投与毒性試験（1 日 12 時間持続投与、[redacted]、2.6.6.3.4 項）では、30 mg/kg 以上の投与量で上記以外に座位、傾眠及び昏睡状態が認められた。60 mg/kg 群では、軽微な血液学的変化（赤血球数、ヘマトクリット値及び血色素濃度の減少、並びに網状赤血球割合の増加）が観察された。

4 週間静脈内投与毒性試験（週 1 回 2 時間持続投与、[redacted]、2.6.6.3.6.1 項）では、投与約 1 時間後に体温低下及び心拍数減少が観察された。QT 間隔延長が投与後 4 時間まで認められた。その後、これらの ECG パラメータは正常に戻った。

サルの静脈内持続投与における NOAEL は、2 週間の 1 日 9 時間持続投与で 22.5 mg/kg、4 週間の 1 日 12 時間及び週 1 回 2 時間持続投与でそれぞれ 30 mg/kg 及び 50 mg/kg（ベシル酸塩として）であった。

4 週間静脈内投与毒性試験（急速静注、[redacted]、2.6.6.3.2 項）では、中及び高用量群で用量依存的な乳酸脱水素酵素（LDH）の減少がみられた。しかし、対照群の雌でも 4 週目と回復期間の測定時点で変動（LDH 濃度が約 50%低下した）がみられたため、この所見の毒性学的意義は不明である。

全例について、投与開始前及び最終投与前日の投与前及び投与 15 分後に ECG（6 誘導）を記録した。第 II 誘導波形で ECG 間隔のマニュアル解析を行った。測定した各 QT 間隔を、Bazett（QTcB）、Fridericia（QTcF）及び van de Water（QTcV）の方法に従って心拍数で補正した。各投与群でベースライン及び／又は対照群と比較して、RR、PR、QRS 及び QT 間隔の変化が観察された。ECG 間隔解析の毒性学的意義については、安全性薬理試験の項で考察されている（2.4.3.3 項）。

投与部位の病理組織学的検査では、血管内膜の肥厚、血管壁の炎症及び血栓性静脈炎を示す動物がみられた。対照群でも同様の変化がみられたこと、また、被験物質投与群でこれらの変化の発現頻度及び程度に用量との関連が認められなかったことから、投与部位の変化はカテーテルによる血管壁の物理的傷害に関連するものと考えられた。

病理組織学的検査では、すべての群で腎臓に限局性又は多巣性の尿細管空胞化が観察された。腎臓の変化は溶媒対照群にもみられたが、10 mg/kg 以上の投与群で軽度の増加が認められた。これらの変化は 2 週間の回復期間により重症度が低減したが、完全な回復はみられなかった。10 及び 20 mg/kg 群の雌で、肝臓の細胞質淡明化が観察された。このような変化は、肝臓におけるグリ

コーゲン蓄積に関連した代謝反応を示唆するものである。回復期間後には、この変化は認められなかった。これ以外の器官／組織では、被験物質に関連した形態学的変化は認められなかった。サルの急速静注による NOAEL は 5 mg/kg と考えられた。

2.4.5.2.3 ミニブタ

ミニブタの 4 週間静脈内投与試験（[redacted]、2.6.6.3.5 項）では、鎮静作用を音及び前肢又は後肢への pinch 刺激に対する反応のスコア化により評価した結果、最高用量 120 mg/kg までの反復静脈内持続投与で、用量依存的な鎮静作用が発現した。鎮静作用は投与開始後 5 分でプラトーに達し、6 時間の持続投与中継続して、用量依存的に投与終了後 20～70 分まで観察された。

対照群を含む全群の一部の動物で、頸静脈のカテーテル先端部で炎症反応の形で局所反応が認められたが、対照群でも観察されたことから、レミマゾラムに関連する変化ではないと考えられた。

体重変化、摂餌量、血圧、体温、ECG 検査、眼科学的／聴覚検査並びに臨床検査パラメータ（血液学的検査、血液生化学的検査、尿検査、骨髄検査、精子運動性及び精子形態）には、被験物質に関連する変化は認められず、毒性所見は観察されなかった。

本試験の NOAEL は 120 mg/kg と推定され、この用量は鎮静作用の持続時間、注入ラインでのレミマゾラム濃度及びミニブタで許容される投与液量などの制約から、投与可能な最高用量であった。

2.4.5.2.4 反復経鼻投与毒性試験

ラットにレミマゾラムを反復経鼻投与して、吸収及び局所忍容性を検討した（表 2.6.6-10）。

雄ラットの 4 日間反復経鼻投与試験（[redacted]、2.6.6.3.6.2.1 項）では、投与可能最高用量（MFD）であるレミマゾラム 16 mg/kg までの用量で、明瞭な鎮静作用は認められなかった。4 日間投与直後及び 14 日間回復期間後のいずれにおいても、局所毒性の徴候はみられなかった。NOEL は 16 mg/kg 以上と考えられた。

2.4.5.2.5 反復投与毒性試験の動物における曝露量

トキシコキネティクス試験において動物の曝露量を評価した。

ラットの 4 週間急速静注試験（[redacted]、2.6.6.3.1 項）では、血漿中濃度が投与後 5～10 分まで測定可能であった（一方、主代謝物 CNS 7054 の血漿中濃度は投与後 12 時間まで測定可能であった）。ラットにおけるレミマゾラムの C_{max} は、初回採血時点で測定された。

ラットはレミマゾラムの代謝が著しく速いことから、本薬の毒性試験のモデルとして必ずしも理想的ではないが、主代謝物 CNS 7054 の毒性評価には非常に適している。このため、非げっ歯類の毒性試験で得られた試験データに重きを置く。

カニクイザルにレミマゾラム 5、10 及び 20 mg/kg の用量で 4 週間急速静注したとき（[redacted]、2.6.6.3.2 項）、投与後 6 又は 12 時間まで血漿中濃度が測定可能であった。レミマゾラムの C_{max} は、投与後の初回採血時点（投与 1 分後）でみられる傾向があり、血漿中濃度は消失半減期（$t_{1/2}$）の平均値が 0.620～1.02 時間で減少した。

遊離型の血漿中濃度に基づきヒトの曝露量と比較すると、カニクイザルの急速静注では、代表的な臨床試験の曝露量と比べて C_{max} は 7.2 倍、AUC は 5.8 倍高かった。NOAEL におけるカニク

イザルの曝露量は、代表的な臨床試験の曝露量と比べて C_{max} で 2.4 倍、AUC で 1.5 倍高値であった（表 2.6.6-12）。

カニクイザルに静脈内持続投与でレミマゾラムを反復投与（[redacted]、2.6.6.3.3 項及び[redacted]、2.6.6.3.4 項）した場合、NOAEL における C_{max} は臨床試験で観察されたヒトの C_{max} の 0.5～0.8 倍であった。AUC に関しては、最大 4.8 倍高値であった。静脈内持続投与で最大の曝露量比は[redacted]（C_{max} が最大 7.2 倍、AUC が最大 14.5 倍）で観察された（2.6.6.3.6.1 項）が、この試験は標準的な試験デザインではない（週 1 回で計 4 週間、5 回投与）ことから、重要性が低いと考えられた（表 2.6.6-13）。

ミニブタの 4 週間静脈内持続投与試験（32237、2.6.6.3.5 項）は、臨床試験におけるヒトの曝露量と比較（NOAEL における遊離型の曝露量の比較）して最大の曝露量比を示した。ヒトの曝露量と比較して C_{max} で 6.8 倍、AUC で 21.2 倍高かった（表 2.6.6-13）。

トキシコキネティクスデータでは、レミマゾラム及び代謝物 CNS 7054 の血漿中 C_{max} 及び AUC は用量に比例して増加した。反復投与による蓄積や性差はみられなかった。

2.4.5.3 遺伝毒性試験

レミマゾラムの遺伝毒性試験を表 2.6.6-14 に示す。

レミマゾラムは細菌を用いる復帰突然変異試験（[redacted]、2.6.6.4.1 項）において変異原性を示さなかった。

マウスリンフォーマ TK 試験（[redacted]、2.6.6.4.2 項）では、曝露方法を問わずレミマゾラムのいずれの用量においても、遺伝子突然変異発現頻度の有意な増加はみられなかった。また、ラット用いた小核試験（[redacted]、2.6.6.4.3 項）で小核の誘発は認められなかった。

不純物を含んだレミマゾラムを用いた細菌を用いる復帰突然変異試験（[redacted]、2.6.6.4.1 項）において変異原性は認められなかった。同じくマウスリンフォーマ TK 試験（[redacted]、2.6.6.4.2 項）では、S9 mix 存在下の短時間処理により、確認試験において細胞毒性の認められない 500 μg/mL で総突然変異頻度（T-MF）の有意な増加がみられたが、予備試験及び確認試験共に用量依存的な増加は認められず、再現性もないことから、レミマゾラムの変異原性作用によるものではないと考えられた。

また、ラットを用いた小核試験及びコメット試験［[redacted]、2.6.6.4.4 項］においてもレミマゾラムはラットに小核の誘発を示さず、コメットアッセイの最高用量において Tail に含まれる DNA の割合（% tail DNA）の増加を示さず、不純物を含んだレミマゾラムは *in vivo* で小核誘発能及び DNA 損傷能のエビデンスを示さなかった。

以上より、レミマゾラムは遺伝毒性を有さないと結論された。

2.4.5.4 がん原性試験

被験物質の化学構造は既知の発がん物質と関連がなく、遺伝毒性や組織増殖作用亢進の兆候がないことから、がん原性試験は実施しなかった。臨床投与期間が短いことからヒトに発がん性を示すリスクは低いと考えられる。

2.4.5.5 生殖発生毒性試験

レミマゾラムの生殖発生毒性試験を表 2.6.6-16 に示す。

2.4.5.5.1 受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験

ラットを用いた受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験（[redacted]、2.6.6.6.1 項）では、全投与群の動物で薬理作用による変化（運動性低下、鎮静、ケージを噛む行動又は身づくろい行動の増加）が用量依存的に観察された。これらの作用は有害とはみなさなかった。

雄の受胎率、精子数、精子形態並びに精巣及び精巣上体の絶対重量には、レミマゾラムの影響は認められなかった。雄にレミマゾラムの高用量（30 mg/kg、ベシル酸塩として）を投与したところ、運動精子の比率がわずかに低下した。雌の受胎率及び雌の生殖能パラメータには影響がみられず、流産、死亡胎児及び形態異常胎児は認められなかった。

親動物の一般毒性、雌の受胎能及び初期胚発生並びに雄の受胎能に関する NOAEL はいずれも 30 mg/kg であった。

2.4.5.5.2 胚・胎児発生に関する試験

ラットを用いた胚・胎児発生に関する試験（[redacted]、2.6.6.6.2 項）では、レミマゾラムの 3 mg/kg（ベシル酸塩として）以上の投与量で薬理作用に起因する変化が用量依存的に認められた。中用量（10 mg/kg）群の母動物の 1 例及び高用量（30 mg/kg）群の母動物の 1 例で、1 日のみに間代性／強直性痙攣が観察された。

外表・内部検査、骨格検査及び内臓検査では、3、10 又は 30 mg/kg の用量で、被験物質に関連した形態異常や変異は観察されなかった。骨化進行度にも被験物質の影響は認められなかった。

母動物の 10 mg/kg で痙攣が 1 例観察されたことから、NOAEL は 3 mg/kg と考えられた。胚・胎児に関して 30 mg/kg で早期及び総吸収胚が軽度増加したため、NOAEL は 10 mg/kg と判断された。

ウサギを用いた胚・胎児発生に関する試験（[redacted]、2.6.6.6.3 項）では、全投与群で鎮静及び体重増加量の減少がみられた。被験物質を投与した全母動物で、摂餌量に影響がみられた（高用量群では対照群と比較して最大 55%低値であった）。

高用量群で胎児体重及び胎盤重量が軽度減少した（雄胎児及び全生存胎児に関して、統計学的に有意であった）。外表・内部検査、骨格検査及び胎児頭部の軟組織検査では、被験物質に関連した形態異常又は変異は観察されなかった。頭蓋開放及び脳組織除去によっても異常は認められなかった。骨化進行度にも被験物質の影響は認められなかった。

レミマゾラムの母動物に関する NOAEL は 1.25 mg/kg 未満、胎児については 2.5 mg/kg であった（いずれもベシル酸塩として）。

2.4.5.5.3 出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験

ラットを用いた出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験（[redacted]、2.6.6.6.4 項）では、妊娠期間及び授乳期間を通して、全投与群で活動性低下、失調歩行、不整呼吸及び腹臥位が観察され、これ以外に 10 及び 30 mg/kg 群では側臥位及び鎮静が観察された。妊娠期間、分娩及び哺育行動に投与に関連する影響は認められなかった。

いずれの生存出生児にも外表異常は認められなかった。

雌雄 F_1 出生児の体重、4 日生存率及び離乳率、耳介展開、毛生、歯牙萌出及び眼瞼開裂の発現率、並びに反射（正向反射、背地走性）発現率に、投与に関連する影響は認められなかった。出生児の一般状態、体重及び剖検所見に関して、投与に関連した差異はみられなかった。

視覚性置き直し反応、瞳孔反射、プライヤー反射及び疼痛反応の陽性率は、全投与群のすべて

の雌雄 F_1 出生児で 100%であり、対照群といずれの投与群の間でも明らかな差異はなかった。行動観察（感覚機能試験、オープンフィールド試験、条件回避反応）でも、毒性学的意義のある変化はみられなかった。

生殖機能検査では、いかなる病理学的所見も認められなかった。

F_2 胎児では、対照群といずれの投与群の間でも差異は認められなかった。

以上より、母動物の一般毒性及び生殖機能並びに次世代（F_1）の発生に関するレミマゾラムの NOAEL は 30 mg/kg と判断された。

2.4.5.5.4 ウサギの拡張受胎能／交配試験

本試験（[redacted]、2.6.6.6.5 項）は、レミマゾラムを雌ウサギの交配の約 2 週間前から（妊娠 29 日から授乳 5 日の期間を除き）授乳約 30 日まで継続投与し、出生前（胚・胎児）及び出生から生後 35 日までの発生に及ぼす影響を評価した。投与は大腿動脈に留置カテーテルを用いて投与した［12.5、20 及び 30 mg/kg（ベシル酸塩として）を導入投与として急速静注、維持投与として 1.2～4 時間の静脈内持続投与］。

対照群を含む全群で早期死亡例がみられ、30 mg/kg 群では早期に 5/5 例が死亡したため、投与を打ち切った。注射針穿刺や乳汁採取のための指圧など、試験処置又は不快刺激に対する反応として、異常な中枢系行動（苦悶、痙攣様事象など）が認められた。死亡に伴う痙攣が全投与量で観察された。このように、処置に関連する早期死亡例は、被験物質特有な毒性作用の反映ではないと考えられた。むしろ、被験物質によって誘発された鎮静状態で、物理的な試験方法及び手順に対するウサギの過剰な反応が増強されたと考えられる。試験処置によって時に誘発される痙攣や興奮反応は、ベンゾジアゼピン処置に対する逆説的反応としてウサギで知られており、これにより予定外の早期死亡又は屠殺の結果となったと考えられる。

交尾能、妊娠率（受胎率）、妊娠期間、群当たりの同腹児数及び妊娠能力（妊娠維持）に影響は認められなかった。平均着床数、平均出生率、生後 29 日の平均生存児数及び生存率に影響はなかった。出生児の体重にも影響はみられなかった。出生児で検査を行った多くの行動パラメータで、影響が認められなかった。

本試験では試験の各期で以下の NOAEL が確認された。

- 交尾能及び受胎能に対する影響：30 mg/kg（最高用量）
- 妊娠維持、胚・胎児発育及び分娩に対する影響：20 mg/kg（評価した最高投与量。30 mg/kg は全例死亡したため）
- 授乳期間中の母動物の哺育能、出生児の生存性・発育・成長に対する影響：20 mg/kg（評価した最高投与量）
- 出生児の行動、接触刺激検査以外の行動検査に対する影響：20 mg/kg（評価した最高投与量。接触刺激検査の結果については結論できなかったため、NOAEL は確定できなかった。）

2.4.5.5.5 生殖発生毒性試験の動物における曝露量

ラット及びウサギ胚・胎児発生毒性試験並びにウサギ拡張受胎能／交配試験において、トキシコキネティクス評価を行った。その結果を表 2.6.6-18 に要約する。

レミマゾラム静脈内投与後の血漿中濃度測定により、用量に応じた曝露量が観察された。ラット及びウサギ胚・胎児発生毒性試験では、C_{max} は投与終了後 1～2 分で観察された。レミマゾラム

の平均血漿中 $t_{1/2}$ はラットで 0.03～0.10 時間、ウサギで 0.28～0.46 時間であった。トキシコキネティクスデータで経時的な蓄積は認められなかった。ウサギの拡張受胎能／交配試験では、レミマゾラムの C_{max} は約 20000 ng/mL、AUC は約 10000 ng•h/mL 以上であり、臨床試験の曝露量をそれぞれ 6.5 倍及び 2.5 倍上回った。

2.4.5.5.6 幼若動物を用いた試験

幼若動物を用いた試験は実施していない。

2.4.5.6 局所刺激性試験

レミマゾラムの局所刺激性について、数多くの非臨床試験で投与部位の局所反応を評価した（2.6.6.7 項）。その結果、急速静注及び静脈内持続投与のいずれにおいても、対照群及び比較対照薬として使用したミダゾラムを含むすべての試験群で、典型的な局所刺激性所見がみられた。見られた局所刺激性所見は、血管周囲浮腫、内膜壊死、フィブリン沈着、並びに血管炎／血管周囲炎、血管内膜増生又は血栓形成など種々の程度の所見として観察された。このような変化はラット、カニクイザル及びウサギで観察されたが、ブタでは観察されなかった。レミマゾラム及びミダゾラムの高用量投与で、持続投与部位の病変に悪化が認められた。血管壁の反応性炎症から生じた血栓形成は全身的な血栓形成を伴わなかった。レミマゾラムは *in vitro* 試験で、ヒトの患者で観察された全身濃度をはるかに上回る最高濃度 300 µmol/L まで、ヒトの血小板凝集又はヒトの血液凝固に影響がなかった（2.4.3.3.2 項）。

2.4.5.6.1 局所刺激性試験の考察

レミマゾラム投与により発現したこのような投与局所における刺激性の変化の発現について以下に考察する。

1) レミマゾラム投与に伴う血管反応・病変
レミマゾラムの非臨床試験で認められた血管所見は、一般に静脈内投与、特に留置カテーテルを用いた持続投与でその先端部に誘発される慢性血管炎、線維症及び線維性組織・フィブリンタグ沈着などの所見（血栓性静脈炎）[11]とは分けて考える必要がある。一般的に知られている局所変化は生理食塩液の様な不活性な液体の持続投与でも同様の変化が発現する可能性が報告されている[12),13)]。ヒトにおいても同様の障害が引き起こされる[14)]。

2) ベンゾジアゼピン系薬剤に認められる反応
ベンゾジアゼピン系薬剤投与で見られる血栓性静脈炎の反応は、ジアゼパム及びミダゾラムを典型例として古くから知られている[14),15),16),17)]。レミマゾラムのラット、サルでみられた投与部位の局所刺激性変化は、ベンゾジアゼピン系薬剤に共通する作用を反映したものと推測される。

3) 血管の直径と投与局所病変の関係。
静脈内投与に使用される静脈は、直径が 0.2～1.4（1.5） mm のグループ 1（ラット尾静脈、ウサギ耳介静脈、カニクイザル橈側皮静脈）、直径が 1.4（1.5） mm 以上のグループ 2（ミニブタ上大静脈、カニクイザル下大静脈、ヒト前腕静脈）の 2 つに分けられる（表 2.6.6-19、表 2.6.6-20）。原則として、投与した薬物は血流によって急速に希釈・緩衝されるため、投与部位の血流が局所刺激性発現の重要な決定要因となる。また、血流は血管のサイズに依存する。留置カテーテルは血管腔を部分的に塞ぎ、局所の血流を減少させて投与液の希釈

を妨げる。グループ 1 の投与部位は、ラット（投与液濃度：0.8 及び 1.2 mg/mL）及びカニクイザル（投与液濃度：0.8 及び 1.0 mg/mL）への持続投与で無影響濃度が低かった（各試験の無影響濃度及び最小影響濃度に基づく）。対照的に静脈の直径が大きいグループ 2 では、無影響濃度（試験に用いた最高濃度、最小影響濃度は決定できなかった）が 1、2、2.5 及び 5 mg/mL であった。ヒトでは、直径 2.6～約 5 mm の静脈が静脈内投与に通常使用され、これらは直径の大きな静脈に分類される。重篤な腎疾患の患者では前腕静脈の径が小さくなる傾向があるが、それでも 1.4～3.8 mm の直径を示す。そのため、2.5～5.0 mg/mL 以下の薬物濃度では、ヒトで血栓性静脈炎は発現しないとの結論が妥当と考えられる。

4) 局所刺激性変化と薬物濃度の関係
投与液中のレミマゾラム濃度と投与部位における血管病変の程度との関係を図 2.6.6-1 に示す。8 mg/mL までの急速静注用投与液及び 1.0 mg/mL までの持続投与用投与液は、血栓形成を評価指標とした血管の忍容性に特に影響がないことが示された。急速静注での非臨床試験で比較的高濃度のレミマゾラムは忍容性が良好であることが証明されたが、一部の非臨床試験では 1 mg/mL より高濃度のレミマゾラムを持続投与することによって曝露を延長すると、血栓性静脈炎のリスクを伴うことが明らかとなった。

5) 急速静注試験における病変と投与回数の関係
レミマゾラムの身体依存性形成能を検討したラットの試験（[redacted]、2.6.6.8.3.3 項）では動物の尾静脈に 1 日 1 回ではなく 1 日 2 回、連続 12 日間急速静注した。6 mg/mL のレミマゾラムを使用した 1 日 2 回投与では、12 日間の投与で尾部に肉眼的変化が誘発され、多くは血栓性静脈炎を反映した変化であった。一方、ラット、ウサギ及びサルの 1 日 1 回急速静注では、8 mg/mL まで肉眼的変化も病理組織学的な血栓形成も認められなかった（図 2.6.6-1）。
ラットの尾静脈のような非常に細い静脈に注射針を穿刺すると一時的な血流の停滞又は減少が起こりやすく、その結果、傷害を誘発する濃度の薬物への曝露が増加する。通常ヒトで使用されるような太い静脈（経験的範囲 2.7～5.5 mm）では、ヒトの橈側皮静脈で報告[18]されているように血流は 5 mL/分に近い速度となる。

6) 経鼻投与試験における局所刺激性
ラットでは 4 mg/animal まで投与部位の局所的安全性が認められ、ミニブタに乾燥レミマゾラム製剤粉末（25 mg/animal）を片側鼻腔の鼻粘膜に直接濃厚接触させると、鼻鏡検査において粘膜表面に変化の兆候はみられず、忍容性が認められた。

以上に示した通り、ラット及びサルで認められたレミマゾラム投与に起因する局所刺激性の変化はヒトで発現する危険は低いと推定される。しかしながら、患者の投与部位によっては細い血管を使用する可能性もあり、注意が必要である。

2.4.5.7 その他の毒性試験

2.4.5.7.1 抗原性試験／光毒性試験

レミマゾラム及びその主代謝物 CNS 7054 の光毒性について培養哺乳類細胞（Balb/c 3T3 細胞）を用いて、UVA 照射有り／なしの条件下で検討した（[redacted]、2.6.6.8.1 項）。レミマゾラムは 400 μg/mL（ベシル酸塩として）、CNS 7054 は 1000 μg/mL の濃度まで培養哺乳類細胞に光毒性を誘発しなかった。

レミマゾラムのアナフィラキシー誘発能についてモルモットを用いて検討した（[redacted]、2.6.6.8.1 項）。レミマゾラム 0.2 mg/kg 及び 1.0 mg/kg を腹腔内投与して動物を感作した。レミマゾラムを静脈内投与（0.4 mg/kg 及び 2.0 mg/kg）して惹起した結果、モルモットは被験物質に対するアナフィラキシー反応を示さなかった。

加えて、反復投与毒性試験では、代表的な免疫器官（胸腺、脾臓、リンパ節及び骨髄）の病理組織学的検査を実施し、血液学的及び血液生化学的パラメータにレミマゾラムの免疫系に対する影響を示す所見は認められなかった。これらの結果から、これ以上の免疫毒性試験は必要ないと考えられた。

2.4.5.7.2 血液適合性試験

レミマゾラムの臨床用凍結乾燥乳糖製剤の溶血作用を評価した（[redacted]、2.6.6.8.2 項）。

レミマゾラム（0.25 mg/mL、ベシル酸塩として）で健康成人ボランティアから採取した血液と共にインキュベートした結果、溶血性は認められなかった。より高濃度（0.8～4.8 mg/mL）で実施した追加試験でも、試験に用いた最高濃度 4.8 mg/mL まで影響がみられず、同様の結果が得られた（[redacted]、2.6.6.8.2 項）。同様にヒト全血を用いた試験でも、レミマゾラム及びヒトの主代謝物 CNS 7054 は、いずれも試験に用いた最高濃度（10 mg/mL）まで溶血を引き起こさなかった（[redacted]、2.6.6.8.2 項）。ヒト血漿を用いた試験では、レミマゾラムで 1.375 mg/mL 以上で沈殿が認められた（[redacted]、2.6.6.8.2 項）。また、ヒトの血漿を用いた別の試験では CNS 7054 では最高濃度 2.5 mg/mL まで沈殿が見られず、レミマゾラムは 1.5 mg/mL 以上で沈殿が認められた（[redacted]、2.6.6.8.2 項）。ブタ血漿（レミマゾラムの濃度 1.25 mg/mL まで沈殿がみられず、1.375 mg/mL 以上で沈殿を生じる、[redacted]、2.6.6.8.2 項）、ウサギ赤血球浮遊液（2.5 mg/mL まで溶血又は血球凝集は誘発されない、[redacted]、2.6.6.8.2 項）でも同様の結果が観察された。

2.4.5.7.3 乱用傾向及び依存性試験

ラット及びサルを用いてレミマゾラムの依存性を検討した。

Long-Evans ラットを用いた薬物弁別試験において、レミマゾラムの弁別刺激作用はミダゾラムと同程度であった（[redacted]、2.6.6.8.3.1 項）。

レミマゾラムの強化作用を検討するアカゲザルを用いた自己投与試験（[redacted]、2.6.6.8.3.2 項）において、レミマゾラムの強化作用が示された。

ラット（[redacted]、2.6.6.8.3.3 項）及びカニクイザル（[redacted]、2.6.6.8.3.4 項）を用いて、レミマゾラムの身体依存形成能を検討した。ラットの試験では、レミマゾラムは軽度の身体依存性を形成する傾向があり、投与を中止するとミダゾラムほど顕著ではない退薬症候を示した。カニクイザルでは、レミマゾラムを 4 週間連続投与後に明瞭な身体依存性症候を誘発した。

これらの試験により、レミマゾラムはこの系統の薬物で知られている依存性形成作用を有することが示唆された。

2.4.5.7.4 代謝物の毒性試験

主代謝物 CNS 7054 以外の各代謝物は、レミマゾラムの毒性試験において十分に評価されていることから、特に毒性試験は実施していない。ヒトの代謝物はいずれも、毒性試験に使用した動物種にも存在する。主代謝物 CNS 7054 はレミマゾラムをヒトに投与したときの曝露量の大部分を占めるが、安全性及び毒性評価に使用した主要動物種においても同様である。CNS 7054 は意義

のある濃度で毒性作用を示さないことが明らかとなっている（2.4.3.1.1 項）。

ラットを用いた毒性試験（[redacted]、2.6.6.8.4.1 項）では、レミマゾラムを 2 日間急速静注した後の一般状態、体重及び剖検所見から、NOAEL は 200 mg/kg を上回った。

カニクイザルを用いた毒性試験（[redacted]、2.6.6.8.4.2 項）では、24 時間持続投与を 4 日間行ったときの血液学的検査、体重、摂餌量、血液生化学的検査及び剖検所見から、NOAEL は 240 mg/kg を上回った。

ラットを用いた胚・胎児発生に関する試験（[redacted]、2.6.6.8.4.3 項）において、妊娠 6～10 日の急速静注で 1 例に鎮静徴候がみられ、この状態での C_{max} は 517000 ng/mL であった。これ以外には一般状態、体重及び摂餌量に影響はみられず、NOAEL は 200 mg/kg を上回った。妊娠 6 日に 200 mg/kg の用量で緩徐に投与した場合には、一般状態の変化は認められず、$AUC_{0\text{-}24}$ は 684000 ng•h /mL、C_{max} 492000 ng•h /mL であった。

ラットの反復投与毒性試験（[redacted]、2.6.6.3.1 項）では、C_{max} が 80000 ng/mL に近く臨床試験で観察されたヒトの血漿中濃度（C_{max}：18400 ng/mL）をはるかに上回ったが、鎮静作用は観察されなかった。

表 2.6.6-22 及び表 2.6.6-23 に示したように、急速静注並びに持続投与試験における NOAEL が示された。CNS 7054 の遊離型濃度について検討すると、臨床試験におけるヒトの曝露量と比較した動物の曝露量比は C_{max} が最大 13.2 倍（ラットの急速静注）、AUC が最大 36.6 倍（ミニブタの静脈内持続投与）に達した。このことより、CNS 7054 は標準的な安全性試験において十分に評価されている。

また、CNS 7054 の特性を明らかにするため多数の試験を実施した。各種の受容体結合アッセイにおいて、CNS 7054 は臨床濃度で薬理学的に不活性であった。実験動物における鎮静作用は、極めて高い用量でのみ発現することが明らかとなった（表 2.4-6）。レミマゾラムと主代謝物の間で 400 倍を上回る受容体親和性の差がみられ、同様に *in vivo* での鎮静作用にも大きな違いが認められることから、レミマゾラムの鎮静作用に対する CNS 7054 の寄与は無視しうるものと考えられる。これを最も適切に示すと考えられるのはサルの所見であり、240 mg/kg の用量で C_{max} が 39300 ng/mL であり、極めて高い AUC 値（$AUC_{0\text{-}48}$：1660000 ng•h/mL、$AUC_{0\text{-}96}$：3320000 ng•h/mL）がみられたが、これに伴う臨床所見は認められなかった。

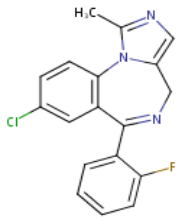
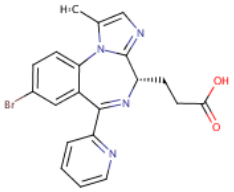
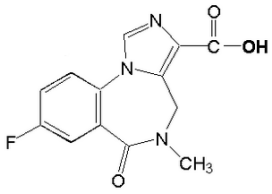
表 2.4-6　CNS 7054 とレミマゾラムの鎮静作用の比較（急速静注）

Species	Lowest effective dose (mg/kg)		Parameter tested	Study Number
	CNS 7054	Remimazolam		
Rat	100*	0.5	Ataxia	[redacted]
Mouse	> 100	40.8**	Loss of righting reflex	[redacted]
Cynomolgus monkey	> 240	0.5	Ataxia, general signs of sedation	[redacted]

* Ataxia at 50 mg/kg noted in a study ([redacted]) lacking a direct comparison with remimazolam
** Loss of righting reflex also noted at lower doses (20.4 mg/kg) (not statistically significant)

CNS 7054 における唯一の構造変化は加水分解による開裂であるため、新たな毒性が発現するとすれば、それは新たに成立したカルボキシル基又はそれにより無効化されて生じた構造の作用にあると考えられる。CNS 7054 の分子がミダゾラム、フルマゼニル及びフルマゼニルの不活性代謝

物であるフルマゼニル酸に極めて類似していることも考慮すると、これらの可能性はいずれも極めて低いと考えられる[19]。フルマゼニル及びフルマゼニル酸にはレミマゾラムのピリジン部分が欠如しているものの、レミマゾラムには構造アラートがないため、比較が無効になることはないと考えられる。

		
ミダゾラム	CNS 7054	フルマゼニル酸

さらに、以下の試験結果でもCNS 7054の毒性プロファイルが良性であることが裏付けられる。

- hERGチャネル及びモルモット乳頭筋のスクリーニングモデルにおいて、3～100 µmol/Lまでの用量で明らかな変化は認められなかった（[redacted]、[redacted]、2.6.2.4.2項）。
- ヒト血漿で血小板凝集、血液凝固又は繊維素溶解に対する影響はみられなかった（[redacted]、2.6.2.4.2.3項）。

いずれの試験においても、CNS 7054の曝露による安全性の問題点は示唆されなかった。

2.4.5.7.5 不純物

[redacted]、不純物A*、[redacted]、[redacted]、[redacted]、[redacted]、[redacted]及び[redacted]、並びに主代謝物CNS 7054を含有するレミマゾラムの「不純物バッチ」を使用して、遺伝毒性試験［復帰突然変異試験（[redacted]、2.6.6.4.1項）、マウスリンフォーマTK試験（[redacted]、2.6.6.4.2項）、ラット小核試験とコメット試験の組合せ試験［[redacted]）、2.6.6.4.4項）］及びカニクイザルを用いた4週間反復投与毒性試験（[redacted]、2.6.6.3.4項）を実施した。

遺伝毒性試験及びNOAELが最高投与量30 mg/kgであったカニクイザルの4週間投与毒性試験など、「不純物バッチ」を使用して実施したいずれの試験においても、特異な毒性所見は認められなかった。

また、[redacted]を投与した試験については、ラットの試験で死亡例がみられたことから特段の注意を払った（2.6.6.8.5項）。この化合物はレミマゾラム製剤を光線曝露すると産生される不純物であり、適正な保存条件では産生されない（遮光保存、保存条件参照）。そのため[redacted]が毒性作用を引き起こすことは考え難い。

不純物A*もマウスリンフォーマTK試験で検討した結果、S9 mixの存在下又は非存在下に係わらず、マウスリンパ腫細胞の遺伝子突然変異を誘発しなかった（[redacted]、2.6.6.8.5.1.2項）。

2.4.5.7.6 添加物（デキストラン40）の毒性試験

レミマゾラムの開発過程で、本剤を凍結乾燥することが必要であり、デキストラン40が安定化

*情報提供時に置換

剤として使用されている。デキストランは薬理作用を有さないが、薬液の体積補充及び血栓予防を目的に、高用量及び高濃度のデキストランを含有する製剤が臨床の静脈内投与で使用されている。腎臓の濾過装置よりサイズの小さいデキストラン分子は尿中に排泄され、大きい分子は網内系細胞によって血漿中から除去される。デキストラン重合体溶液は濃度依存的に粘度が増加し、これにより高用量のデキストラン投与で報告される乏尿や腎不全が説明される[20]。また、デキストランの抗血栓作用は外科手術の患者で出血のリスクを伴う。抗血栓作用の病理学的機序として、血小板機能不全、血液凝固第 II、V 及び VIII 因子の活性低下、並びに線維素溶解の増加が関与する[21]。

デキストラン 40 の毒性試験はラット及びウサギを用いて実施した。ラットの毒性試験（[redacted]、[redacted] 及び[redacted]、2.6.6.8.6.1 及び 2.6.6.8.6.2 項）は、レミマゾラムの開発過程で単独又はデキストラン 40 を溶媒に含めた毒性試験で評価した。また、公表されている情報を参照し評価した。

2.4.5.7.6.1 デキストラン 40 のラットにおける毒性試験

デキストラン 40 の毒性を評価するため、正常ラット及び腎障害ラットを用いて反復投与毒性試験を実施した。

正常ラットを用いた 4 週間投与毒性試験（[redacted]、2.6.6.8.6.1 項）では、Wistar ラットにデキストラン 40 を最高 2000 mg/kg/日まで静脈内（4 時間）持続投与した結果、デキストラン 40 の全投与群で一過性の腫脹／浮腫が誘発された。この所見はラットの特有なアナフィラキシー様反応として知られており[22]、ヒトには関連がないと考えられた。デキストラン 40 の 4 週間反復投与により、高用量群の雄で有意差は認められないが体重減少が認められ、数種の器官（肝臓、脾臓及び副腎）で軽度の重量増加がみられた。これらの変化は、種々の器官で泡状／空胞化細胞が観察されたことから明らかなように、デキストランの蓄積に起因すると考えられ、文献情報[23),24)]と一致した。投与量 600 mg/kg/日まで、腎機能関連マーカーに影響はみられず、高用量群 2000 mg/kg で血清尿素の増加（雄で統計学的に有意に増加）、アルブミン及びアルブミン／クレアチニン比（ACR）の増加が認められたがいずれも腎不全判定基準を下回っていた。

2000 mg/kg 群の雄で体重への影響、雌で散発的な臨床検査値の変化が認められたことから、NOAEL は 600 mg/kg と判断された。

ラットのシスプラチン誘発性腎障害モデルを用いて、デキストラン 40 が腎障害に及ぼす影響を検討した（[redacted]、2.6.6.8.6.2 項）。腎障害ラットにデキストラン 40 を最高 2000 mg/kg の用量で 7 日間反復投与した結果、シスプラチン誘発性腎障害の程度の悪化は認められず、腎障害の回復過程にも影響はみられなかった。以上のように、正常ラット及び腎障害ラットを用いた試験において、デキストラン 40 は最高 2 g/kg までの用量で腎障害のリスクを示さないことが明らかとなった。これらの結果は、次項に示すウサギを用いた試験の結果と一致した。

2.4.5.7.6.2 デキストラン 40 のウサギにおける毒性試験

ウサギにおけるデキストラン 40 の毒性が一連の試験で検討されている[24]。デキストラン 40 をウサギに 2 g/kg の用量で 1、3 及び 6 ヵ月間、4 g/kg で 1 及び 3 ヵ月間、並びに 8 g/kg で 1 ヵ月間静脈内持続投与した。ウサギの所見はラットと非常に類似しており、コロイド浸透圧の増加に伴う二次的変化、血液量の増加による循環系への負荷、又は細網内皮系、肝臓及び腎尿細管上皮の

泡状／空胞化細胞で示されるように、エンドサイトーシスによるデキストランの細胞内取り込みに起因する変化と考えられた。これらの結果から、特に腎機能及び出血傾向について注目された。

デキストラン 40 を 4 g/kg で 3 ヵ月間投与した動物では腎臓重量が顕著に増加した。デキストラン 40 の 8 g/kg で 1 ヵ月間投与及び 4 g/kg で 3 ヵ月間投与では腎臓及び尿細管に顕著なびまん性空胞化変性が認められた。2 g/kg の 1 ヵ月間投与でも、近位尿細管上皮細胞に多数の限局性空胞化が観察された。しかし、これらの病理組織学的変化と腎機能の間に明瞭な関連はみられなかった。

8 g/kg の 1 ヵ月間及び 4 g/kg の 3 ヵ月間投与で、ヘマトクリット、赤血球数及び血色素濃度が減少した。しかし、2 g/kg 投与では 6 ヵ月間投与試験を含むいずれの試験でも変化はみられなかった。デキストラン 40（生理食塩液溶液）の 4 g/kg 投与で血小板数の減少がみられたが、この群では血色素量及びヘマトクリットが有意に増加し赤血球数も増加したことから、血小板数の変化には疑問がある。

血漿中フィブリノゲンの減少は、機能低下につながる肝臓うっ血及び貧血に起因すると考えられる。フィブリノゲンの減少は、3 ヵ月及び 6 ヵ月間投与試験のデキストラン 40 投与量 2 g/kg では観察されていない。1 ヵ月間投与試験で報告された変化は用量反応性がみられなかった。

尿中に潜血は認められず、肉眼的病理検査及び病理組織学的検査で局所出血の徴候はみられなかった。

以上のように、デキストラン 40 の 2000 mg/kg 投与では、腎障害も出血傾向もみられ、ラットの毒性試験における NOAEL の 600 mg/kg とも合致した。

2.4.5.7.6.3　デキストラン 40 の生殖発生毒性

ラットの 4 週間投与毒性試験（[redacted]、2.6.6.8.6.1 項）において、デキストラン 40 の雌雄生殖器官に及ぼす影響を評価した。雌雄の生殖器官重量（絶対重量／脳比重量）にデキストラン 40 の影響はみられなかった。

ウサギ及びミニブタを用いた試験で溶媒対照群としてデキストラン 40 を投与し、生殖発毒性について検討した。ウサギの発生毒性用量設定試験（[redacted]、2.6.6.6.5 項）、及びウサギの拡張受胎能／交配試験（[redacted]、2.6.6.8.6.2 項）では、デキストラン 40 を含む溶媒を投与した動物で生殖能に影響は認められなかった。さらに、ミニブタの 4 週間静脈内持続投与試験（[redacted]、2.6.6.3.5 項項）においても、溶媒を投与した雄で精子数、精子の運動能及び形態に影響は認められなかった。

2.4.5.7.6.4　デキストラン 40 の臨床安全性

ラットの毒性試験で NOAEL は 600 mg/kg であり、公表されている一連のウサギの毒性試験と合致した。レミマゾラムを推奨される最大投与量で投与した場合のデキストラン 40 摂取量は 4 g（体重 60 kg のヒトで 66.7 mg/kg）であり、軽度の変化をもとに算出した NOAEL の 600 mg/kg と比べて 9 倍の安全域が確保される。

2.4.6 総括及び結論

レミマゾラムの薬理作用を、複数の動物種を用いた各種試験で広範囲に評価した。その結果、ベンゾジアゼピン系薬剤レミマゾラムの鎮静作用は、発現が速やかで持続時間が短く、フルマゼニルにより回復可能であることが確認された。レミマゾラムの安全性プロファイルは、本薬の作用様式､すなわち治療用量を上回る投与量での呼吸系及び心血管系に対する抑制作用と一致する。鎮静作用とこれら副作用間の安全域は、対照化合物（ミダゾラム、プロポフォール及びデクスメデトミジン）と比較してより大きいと考えられる。

QT 間隔延長は静脈内持続投与において認められたが、急速静注では認められなかった。QT 間隔延長と同時に腹腔内体温も低下しており、体温低下は QT 間隔延長を誘導することが知られていることから、観察された QT 間隔延長は体温低下が引き起こした二次的変化であった可能性が考えられる。また、心血管系に及ぼす影響を評価した安全性薬理試験において、臨床試験で確認された血漿中遊離型薬物濃度よりはるかに高い濃度まで心興奮性に影響する可能性は示唆されないことから、臨床使用において QT 間隔延長を発現する可能性は極めて低いと考えられる。

薬力学的薬物相互作用試験において、オピオイド系鎮痛剤の併用によるレミマゾラムの鎮静作用に相乗効果が認められたが、ベンゾジアゼピン系薬剤ミダゾラム及び抗コリン薬アトロピンとの併用で相乗効果はみられなかった。

In vitro 薬物動態試験において、レミマゾラムが CES1 により CNS 7054 に速やかに代謝されることが確認された。CNS 7054 への代謝には CYP の関与はなく、またレミマゾラム及び CNS 7054 は CYP を阻害しないことから、CYP を介した薬物動態学的薬物相互作用が起こる可能性は低いと考えられる。レミマゾラム及び CNS 7054 の血清タンパク結合率は高く、大きな分布容積を示す。サルを含む多くの動物種及びヒトにおける代謝は肝臓のみでみられたが、げっ歯類では血漿中でも代謝がみられた。^{14}C 標識レミマゾラムを使用した試験から、レミマゾラムの主排泄経路は、ラットでは胆汁を介した糞中排泄、サルでは腎排泄であることが示された。

レミマゾラムの急性毒性は弱く、反復投与毒性試験でみられた所見の多くは、レミマゾラムの過剰な薬理作用により説明が可能である。カニクイザルの投与では、体温低下及び心拍数減少が認められた。反復投与毒性試験で観察された病理組織学的所見及び臨床検査パラメータの軽微な変化は、可逆的又は用量依存性が認められず、特に毒性学的な問題を示唆するものではないと考えられた。

レミマゾラムの高濃度溶液を投与した試験では、投与部位の炎症性反応を悪化させる作用がみられたが、これは静脈内投与の手法に伴って生じることが知られている。比較対照として使用したミダゾラムでも同様の変化が誘発された。主な病変は被験物質の特異的な局所毒性作用によるものではなく、穿刺処置による血管壁の機械的刺激に起因するものと考えられた。一般毒性試験及び局所刺激性試験により、レミマゾラムの高濃度［1～2 mg/mL 超（静脈内持続投与）；5～8 mg/mL 超（急速静注)］では局所刺激性が増強することが示唆された。

レミマゾラムに変異原性は認められなかった。

最大耐量で実施した生殖発生毒性試験において、雌雄の受胎能及び生殖能パラメータへの影響は認められなかった。ラット及びウサギを用いた胚・胎児発生に関する試験では、母動物毒性及び軽微な胚毒性［(母動物の摂餌量及び体重増加量の減少に一致する) 胎児体重及び胎盤重量の減少、並びに早期吸収胚及び総吸収胚の増加］がみられた最高用量においても、形態異常、変異又は骨化遅延の発現頻度には変化が認められなかった。

毒性試験では動物に可能な最大量のレミマゾラムを曝露した。これにより動物に鎮静及び摂餌

量減少から痙攣及び昏睡状態に至る一般状態の変化がみられたため、忍容可能な最長時間で、可能な最高用量が投与されたことが示された。

反復投与毒性試験の結果、NOAEL は次表のとおりである。

試験	NOAEL（mg/kg）	試験番号
ラット（急速静注）	20	[redacted]
カニクイザル（持続投与）	22.5	[redacted]
	30	[redacted]
	50	[redacted]
カニクイザル（急速静注）	5	[redacted]

サルの反復静脈内投与試験における NOAEL での遊離型濃度の AUC は、ヒトと比較して急速静注で 1.2～1.5 倍、静脈内持続投与で 4.2～4.8 倍であった。また、ヒトと比較してサルの C_{max} は急速静注でヒトの 2.1～2.4 倍、静脈内持続投与でヒトの 0.5～0.6 倍であった

レミマゾラムの代謝物である CNS 7054 は、明確な薬理作用を示さなかった。レミマゾラムと比較して、CNS 7054 の $GABA_A$ 受容体結合親和性は *in vitro* で約 400 倍弱く（受容体結合アッセイ）、*in vivo* での鎮静作用は少なくとも 200 倍弱かった（マウス、ラット及びカニクイザルを用いた試験）。心興奮性、薬物輸送、タンパク質代謝、光毒性、血液適合性及びラットとカニクイザルを用いた毒性試験（臨床検査値及び一般状態）を含む安全性試験で問題点は認められなかった。

以上のことから、レミマゾラムの非臨床プロファイルは十分に特徴づけられており、本薬をヒトの治療に使用することは可能である。

2.4.7 参考文献

1) Martin IL and Lattmann E. Benzodiazepine recognition site ligands and $GABA_A$ receptors. Exp Opin Ther Patents. 1999; 9(10): 1347-58. (4.3.1)
2) Rudolph U and Knoflach F. Beyond classical benzodiazepines: novel therapeutic potential of $GABA_A$ receptor subtypes. Nat Rev Drug Discov. 2011; 10(9): 685-97. (4.3.2)
3) Mattu A, Brady WJ, Perron AD. Electrocardiographic manifestations of hypothermia. Am J Emerg Med. 2002; 20(4): 314-26. (4.3.3)
4) Van der Linde HJ, Van Deuren B, Teisman A, Towart R, Gallacher DJ. The effect of changes in core body temperature on the QT interval in beagle dogs: a previously ignored phenomenon, with a method for correction. Br J Pharmacol. 2008; 154(7): 1474−81. (4.3.4)
5) Holzgrefe H, Ferber G, Champeroux P, Gill M, Honda M, Greiter-Wilke A, et al. Preclinical QT safety assessment: cross-species comparisons and human translation from an industry consortium. J Pharmacol Toxicol Methods. 2014; 69(1): 61-101. (4.3.5)
6) Upton RN, Martinez AM, Grant C. Comparison of the sedative properties of CNS 7056, midazolam, and propofol in sheep. Br J Anaesth. 2009; 103(6): 848-57. (4.3.6)
7) Horsfall JT and Sprague JE. The pharmacology and toxicology of the 'Holy Trinity'. Basic Clin Pharmacol Toxicol. 2017; 120: 115-9. (4.3.7)
8) Thomsen R, Rasmussen HB, Linnet K, INDICES Consortium. In vitro drug metabolism by human carboxylesterase 1: Focus on angiotensin-converting enzyme inhibitors. Drug Metab Dispos 2014; 42: 126-33. (4.3.8)
9) FDA. Guidance for Industry. In vitro metabolism- and transporter-mediated drug-drug interaction studies. Draft Guidance. (2017) (4.3.9)
10) European Medicines Agency: Guideline on the Investigation of Drug Interactions. 2012 Committee for Human Medicinal Products. (CHMP) (4.3.10)
11) Weber K, Mowat V, Hartmann E, Razinger T, Chevalier HJ, Blumbach K, et al. Pathology in Continuous Infusion Studies in Rodents and Non-Rodents and ITO (Infusion Technology Organisation)-Recommended Protocol for Tissue Sampling and Terminology for Procedure-Related Lesions. J Toxicol Pathol. 2011 Jun; 24(2): 113-24. (4.3.11)
12) Lilbert J and Burnett R. Main vascular changes seen in the saline controls of continuous infusion studies in the cynomolgus monkey over an eight-year period. Toxicol Pathol 2003; 31(3): 273-80. (4.3.12)
13) Lilbert J and Mowat V. Common vascular changes in the jugular vein of saline controls in continuous infusion studies in the beagle dog. Toxicolo Pathol. 2004; 32: 694-700. (4.3.13)
14) Magni VC, Frost RA, Leung JWC, Cotton PB. A randomized comparison of midazolam and diazepam for sedation in upper gastrointestinal endoscopy. Br J Anaesth. 1983; 55: 1095-101. (4.3.14)
15) Graham CW, Pagano RR, Conner JT. Pain and clinical thrombophlebitis following intravenous diazepam and lorazepam. Anaesthesia. 1978; 33(2): 188-91. (4.3.15)
16) Hegarty JE and Dundee JW. Sequelae after the intravenous injection of three benzodiazepines – diazepam, lorazepam, and flunitrazepam. British Medical Journal. 1977; 2(6099): 1384-5. (4.3.16)
17) Jensen S, Hüttel MS, Olesen AS. Venous complications after i.v. administration of diazemuls (diazepam) and dormicum (midazolam). Br J Anaesth. 1981; 53(10): 1083-5. (4.3.17)

18) Okudera Y, Matsunaga T, Sato M, Chida S, Hatakeyama K, Watanabe M, et al. The impact of high-frequency magnetic stimulation of peripheral nerves: muscle hardness, venous blood flow, and motor function of upper extremity in healthy subjects. Biomedical Research (Tokyo). 2015; 36(2): 81-7. (4.3.18)
19) Kleingeist B, Böcker R, Geisslinger G, Brugger R. Isolation and pharmacological characterization of microsomal human liver flumazenil carboxylesterase. J Pharm Pharm Sci. 1998; 1(1): 38-46. (4.3.19)
20) Mitra S and Khandelwal P. Are all colloids same? How to select the right colloid? Indian J of Anaesth. 2009; 53(5): 592-607. (4.3.20)
21) Van der Linden P and Ickx BE. The effects of colloid solutions on hemostasis. Can J Anesth. 2006; 53(6): S30-S39. (4.3.21)
22) Gözsy B and Kátó L. Investigation into the mechanism of dextran-induced edema in rats. Can J Biochem Physiol. 1963; 41(9): 1855-63. (4.3.22)
23) Kitazawa I, Ito S, Kagawa Y, Suehiro-Narita M, Hashizume N, Minamisawa Y, et al. Effects of repeated intravenous administration of dextrans, water-soluble macromolecules, in rats. J Toxicol Pathol. 2014; 27(3-4): 231-4. (4.3.23)
24) 丸岡久雄, 幸田昇一, 森峰雄, 川口義郎, 竹本義枝, 中川準子 他; デキストラン 40 製剤の毒性試験. 薬理と治療. 1975; 3(2): 201-254. (4.3.24)