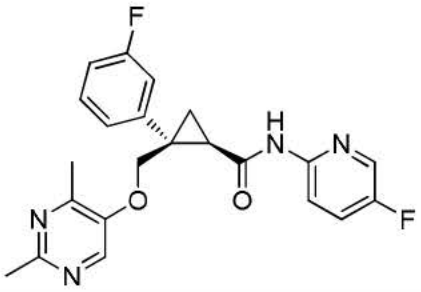
2.6 非臨床試験の概要文及び概要表
2.6.1 緒言

表 2.6.1-1 レンボレキサントの化学構造

JAN:	レンボレキサント（Lemborexant）
INN:	lemborexant
化学名:	(1*R*,2*S*)-2-{[(2,4-Dimethylpyrimidin-5-yl)oxy]methyl}-2-(3-fluorophenyl)-*N*-(5-fluoropyridin-2-yl)cyclopropanecarboxamide
開発コード:	E2006, ER-562007-00 (ER-888235-00[a])
CAS 登録番号:	1369764-02-2
分子式:	$C_{22}H_{20}F_2N_4O_2$
分子量:	410.42
化学構造:	

製剤原料の記載は，Module 3.2.S.1.3.参照。

CAS = Chemical Abstracts Service，INN = 国際一般名，JAN = 医薬品一般的名称.

a: ER-888235-00 は，開発初期に使用された番号である。

不眠症は，睡眠の開始や持続等に障害が認められる睡眠障害である。先進国では，人口の約 30%が兆候を示し，少なくとも 6%が不眠症の診断に適合すると言われている（Roth, 2007）。精神疾患の診断・統計マニュアル第 5 版（DSM-5）では，入眠障害，中間覚醒又は早朝覚醒のいずれか 1 つ以上を，日中の疲労感，エネルギー欠乏，集中力の低下又は興奮性等とともに，少なくとも 1 週間に 3 日，3 か月間以上訴える場合，不眠症であると診断される。不眠症は生活の質を低下させ，未治療の場合，同時に気分障害や，職業的機能を悪化させるリスクが増大する（Bolge, et al., 2009; DiBonaventura, et al., 2015）。また，不眠症に対する医療福祉サービスの増加や職業的機能低下が，経済に及ぼす影響は大きい。

現在，他の不眠症治療として，γ-アミノ酪酸（GABA）$_A$ 受容体作動性のベンゾジアゼピン及び非ベンゾジアゼピン系薬剤，抗うつ薬，メラトニン系作動薬及び抗ヒスタミン薬等が使用されている。しかし，これらの治療には，副作用が伴う場合もあり（DiBonaventura, et al., 2015），$GABA_A$ 受容体作動薬以外の睡眠薬が望まれてきた。近年，神経ペプチドであるオレキシン（オ

レキシン A 及びオレキシン B）は，G タンパク質共役型受容体である OX1R 及び OX2R（Sakurai, et al., 1998）を介して，主に覚醒を促進する神経伝達物質であるアセチルコリン，ヒスタミン，ノルエピネフリン及びセロトニン等（Connor, et al., 2016）を上流で支配していることが解明されてきた。さらに，オレキシン神経は，脳の睡眠促進中枢である腹外側視索前野の GABA 作動性神経に抑制的に作用すること（Sakurai, et al., 2005），動物モデル及び臨床において，オレキシン受容体のアンタゴニストは，覚醒神経系の抑制及び睡眠中枢抑制の阻害により睡眠を促進することが報告されている（Brisbare-Roch, et al., 2007）。

レンボレキサントはオレキシン受容体拮抗剤である。本薬は，日常生活への支障の有無にかかわらず入眠障害や中間覚醒を有する不眠症に対して開発されてきた。これまで，臨床試験において，6 種のオレキシン受容体拮抗剤（レンボレキサント［E2006］，アルモレキサント［ACT-078573］，ベルソムラ®［スボレキサント，MK-4305］，filorexant［MK-6096］，seltorexant［MIN-202］，及び nemorexant［ACT-541468］）で作用機序の妥当性を示したコンセプトの証明がなされている（Connor, et al., 2016; De Boer, et al., 2018; Herring, et al., 2012; Hoever, et al., 2012; Murphy, et al., 2017）。

非臨床試験より，レンボレキサントは，OX1R 及び OX2R 両方に対し競合的拮抗を示すデュアルオレキシン受容体拮抗剤であり，両受容体に対して速い結合及び解離を示す。本薬は，オレキシン受容体以外の覚醒/睡眠の調整にかかわる標的を含む，多くの標的分子（受容体，イオンチャネル等）に対して，結合性を示さなかった。本薬は，ラット機能性評価試験において，OX2R 選択的ペプチド作動性リガンドである[Ala^{11}, D-Leu^{15}]オレキシン B による副腎皮質刺激ホルモン分泌を抑制し，マウス及びラットにおける生理的な睡眠を増加させた。本薬は，プレプロオレキシン遺伝子（*Hcrt*）欠損マウス及びオレキシン神経欠損マウス（orexin/ataxin-3 Tg/+）において睡眠時間を増加しなかった。ラットにおいて，3 週間投与期間中の効果に耐性は認められず，休薬による反跳性不眠も観察されなかった。さらに，覚醒状態から直接レム睡眠へ移行するようなナルコレプシー様症状も観察されなかった。しかし，マウスにおいて，強い陽性情動刺激下でカタプレキシー様症状を惹き起こす可能性が示唆された。他のオレキシン拮抗薬であるスボレキサントで，イヌの食餌誘発性カタプレキシー試験においてカタプレキシー様症状が観察されたことが報告されているが（Daily Med, 2016），ヒトにおけるカタプレキシー症状との関係性は明らかにされていない。本薬は 300 mg/kg（睡眠誘発用量の 300 倍）までマウスにおける協調運動及びエタノール麻酔の持続に影響しなかった。

本薬の効能・効果及び用法・用量は以下のとおりである。

【効能・効果】不眠症
【用法・用量】通常，成人にはレンボレキサントとして 1 日 1 回 5 mg を就寝直前に経口投与する。なお，症状により適宜増減するが，1 日 1 回 10 mg を超えないこととする。

参考文献

Bolge SC, Doan JF, Kannan H, Baran RW. Association of insomnia with quality of life, work productivity, and activity impairment. Qual Life Res. 2009; 18:415–22.

Brisbare-Roch C, Dingemanse J, Koberstein R, Hoever P, Aissaoui H, Flores S, et al. Promotion of sleep by targeting the orexin system in rats, dogs and humans. Nat Med. 2007;13:150–5.

Connor KM, Mahoney E, Jackson S, Hutzelmann J, Zhao X, Jia N, et al. A Phase II dose-ranging study evaluating the efficacy and safety of the orexin receptor antagonist filorexant (MK-6096) in patients with primary insomnia. Int J Neuropsychopharmacol. 2016;19:1–10.

DailyMed [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US); 2014-2016. Belsomra-suvorexant tablet, film [cited 2018 May 16]; [about 35 pages]. Available from: https://dailymed.nlm.nih.gov/dailymed/drugInfo.cfm?setid=e5b72731-1acb-45b7-9c13-290ad12d3951.

De Boer P, Drevets WC, Rofael H, van der Ark P, Kent JM, Kezic I, et al. A randomized Phase 2 study to evaluate the orexin-2 receptor antagonist seltorexant in individuals with insomnia without psychiatric comorbidity. J Psychopharmacol. 2018;32:668–77.

DiBonaventura M, Richard L, Kumar M, Forsythe A, Flores NM, Moline M. The association between insomnia and insomnia treatment side effects on health status, work productivity, and healthcare resource use. 2015;PLoS ONE 10: e0137117. doi:10.1371/journal.pone.0137117.

Herring WJ, Snyder E, Budd K, Hutzelmann J, Snavely D, Liu K, et al. Orexin receptor antagonism for treatment of insomnia: a randomized clinical trial of suvorexant. Neurology. 2012;79:2265–74.

Hoever P, Dorffner G, Beneš H, Penzel T, Danker-Hopfe H, Barbanoj MJ, et al. Orexin receptor antagonism, a new sleep-enabling paradigm: a proof-of-concept clinical trial. Clin Pharmacol Ther. 2012;91(6):975–85.

Murphy P, Moline M, Mayleben D, Rosenberg R, Zammit G, Pinner K, et al. Lemborexant, a dual orexin receptor antagonist (DORA) for the treatment of insomnia disorder: results from a Bayesian, adaptive, randomized, double-blind, placebo-controlled study. J Clin Sleep Med. 2017;13:1289–99.

Roth T. Insomnia: definition, prevalence, etiology, and consequences. J Clin Sleep Med. 2007;3(Suppl 5):S7–10.

Sakurai T, Amemiya A, Ishii M, Matsuzaki I, Chemelli RM, Tanaka H, et al. Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. Cell. 1998;92:573–85.

Sakurai T, Nagata R, Yamanaka A, Kawamura H, Tsujino N, Muraki Y, et al. Input of orexin/hypocretin neurons revealed by a genetically encoded tracer in mice. Neuron. 2005;46:297–308.

目次

2.6.2 薬理試験の概要文 3
2.6.2.1 まとめ 3
2.6.2.2 効力を裏付ける試験 5
2.6.2.3 副次的薬理試験 20
2.6.2.4 安全性薬理試験 25
2.6.2.5 薬力学的薬物相互作用試験 28
2.6.2.6 考察及び結論 28
2.6.2.7 図表 31
2.6.2.8 参考文献 31

薬理試験の概要文の略号一覧表

略号	省略していない表現（英語）	省略していない表現（日本語）
ACTH	corticotropin	副腎皮質刺激ホルモン
CHO	Chinese hamster ovary	チャイニーズハムスター卵巣
CNS	central nervous system	中枢神経系
CV	cardiovascular	心血管
ECG	electrocardiogram	心電図
ED_{50}	50% effective dose	50%有効用量
EEG	electroencephalogram	脳波図
EMG	electromyogram	筋電図
EMPA	*N*-ethyl-2-[(6-methoxy-3-pyridinyl)[(2-methylphenyl)sulfonyl]amino]-*N*-(3-pyridinylmethyl)-acetamide	—
FOB	functional observational battery	機能観察総合評価
FPD	field potential duration	細胞外電位持続時間
GABA	γ-aminobutyric acid	γ-アミノ酪酸
GLP	Good Laboratory Practice	医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準
hERG	human ether-á-go-go related gene	ヒト ether-á-go-go 関連遺伝子
hES	human embryonic stem	ヒト胚性幹
IC_{50}	50% inhibitory concentration	50%阻害濃度
IKs	slow component of delayed rectifier potassium current	遅延整流性カリウム電流の遅い成分
K_i	inhibition constant	阻害定数
k_{off}	dissociation rate constant	解離定数
k_{on}	association rate constant	結合定数
MC	methylcellulose	メチルセルロース
MED	minimum effective dose	最小有効用量
MT1	melatonin 1	メラトニン 1
QTc	corrected QT	心拍数で補正した QT
RBA	receptor binding assay	受容体結合性試験
SD	Sprague Dawley	—（ラット系統名）
SOREM	sleep onset REM	入眠時レム睡眠
Tg	transgenic	遺伝子組換え
WT	wild type	野生型

2.6.2 薬理試験の概要文

2.6.2.1 まとめ

レンボレキサントは，OX1R 及び OX2R 両方に対し競合的拮抗を示すデュアルオレキシン受容体拮抗剤であり，OX2R により強い親和性を有する。ヒト組換え OX1R 及び OX2R に対する受容体結合性試験（RBA）における本薬の 50%阻害濃度（IC_{50}）は，それぞれ 6.1 及び 2.6 nmol/L であった。本薬は，ヒト OX1R 及び OX2R に対して速い結合及び解離を示す。OX1R に対する結合定数（k_{on}）及び解離定数（k_{off}）はそれぞれ 0.0262 $L \cdot nmol^{-1} \cdot min^{-1}$ 及び 0.244 min^{-1} であり，解離半減期は 2.8 分であった。OX2R に対する k_{on} 及び k_{off} はそれぞれ 0.0496 $L \cdot nmol^{-1} \cdot min^{-1}$ 及び 0.0626 min^{-1} であり，解離半減期は 11.1 分であった。本薬は，細胞を用いた機能性試験（レポーターアッセイ）において，評価した 4 種類全ての受容体（ヒト OX1R 及び OX2R，マウス OX1R 及び OX2R）に対して作動性は示さず，それぞれの阻害定数（K_i）14.1，0.391，16.3 及び 0.366 nmol/L の競合的拮抗剤として作用した。細胞を用いた機能性試験（カルシウム動員試験）における，ヒト OX1R 及び OX2R，マウス OX1R 及び OX2R，ラット OX1R 及び OX2R に対する K_i 値は，それぞれ 8.1，0.48，23，0.44，23 及び 0.68 nmol/L であった。ヒト血漿中で同定された 12 の代謝物のうち，9 の代謝物（M3, M4, M7, M8, M9, M10, M13, M14, M15）に，本薬と同程度のヒトオレキシン受容体結合性が確認された。

In vivo 試験では，脳波図（EEG）及び筋電図（EMG）測定より，マウスにおいて，本薬は 1 mg/kg（経口）以上で総睡眠時間（ノンレム睡眠時間とレム睡眠時間の合計）を増加させ，睡眠潜時（入眠するまでにかかる時間）を減少させる傾向を示した。本薬は，プレプロオレキシン遺伝子（*Hcrt*）欠損マウス及びオレキシン神経欠損マウス（orexin/ataxin-3 Tg/+）において 30 mg/kg（経口）でも睡眠時間を増加しなかったことから，本薬の睡眠時間増加作用はオレキシン受容体シグナル伝達を介すると考えられた。ラットにおいて，本薬の総睡眠時間の増加に対する ED_{50} 値は 4.4 mg/kg（経口）であった。マウス，ラットとも，媒体投与群と比較して総睡眠時間に対するレム睡眠時間の割合に有意な違いは認められなかったことから，本薬は，生理的な睡眠を増加させることが期待される。さらに，ラットにおいて，覚醒状態からノンレム睡眠を経ずに直接レム睡眠へ移行するようなナルコレプシー様症状も 300 mg/kg（経口）まで観察されなかった。また，ラットに本薬（30 mg/kg）を 3 週間経口投与後 2 日間休薬した試験において，3 週間の投与期間中の効果に耐性は認められず，休薬による反跳性不眠も観察されなかった。一方，同じラット試験において，広く不眠症治療に用いられている非ベンゾジアゼピン系入眠剤のゾルピデムは，耐性及び反跳性不眠を惹き起こした。さらに，ゾルピデムは，レム睡眠をほとんど完全に抑制するが，この抑制は投与期間が長くなると弱くなったことからも耐性が形成されたと考えられた。

ラット機能性評価試験において，本薬は，OX2R 選択的ペプチド作動性リガンドである[Ala^{11}, D-Leu^{15}]オレキシン B の脳室内投与による生理的な反応（血漿中の副腎皮質刺激ホルモン［ACTH］の増加）を 3 mg/kg（経口）以上で抑制した。

毒性試験の一般症状の変化として，ウサギ及びサルにおいて，10 mg/kg（経口）から睡眠誘発様作用（部分閉眼，傾眠）が見られた（2.6.7.13.D 及び 2.6.7.7.E 項参照）。

副次的薬理試験

レンボレキサント及びその代謝物（ヒト血漿中濃度が比較的高かった M4, M9 及び M10）の選択性を評価する目的で，生理的意義の高い 88 種（代謝物に対して 86 種）の標的分子（受容体，神経伝達物質トランスポーター及びイオンチャネル）に対する放射性リガンド結合性試験を行った。本薬及び代謝物は，10 μmol/L でヒトメラトニン 1（MT1）受容体に対してのみ 50%以上の結合阻害を示した。本薬は，ヒト MT1 受容体に対して K_i 値 922 nmol/L のアンタゴニスト活性を有することが確認された。また，本薬は，γ-アミノ酪酸（GABA）$_A$ 受容体発現細胞における GABA 誘発電流に影響しなかった。

情動刺激誘発カタプレキシーマウスモデルにおいて，本薬は，チョコレート投与による陽性情動刺激下では，10 mg/kg（経口）以上でカタプレキシー様症状を示した。

マウスロータロッド試験において，本薬は 300 mg/kg（経口）まで協調運動に影響しなかった。一方，ゾルピデムは 100 mg/kg（経口）で投与後 2 時間まで協調運動を抑制した。

マウスエタノール麻酔試験において，本薬及び他のデュアルオレキシン受容体拮抗剤アルモレキサントは 300 mg/kg（経口）までエタノール麻酔の持続に影響しなかったが，ゾルピデムは 10 mg/kg（経口）でエタノール麻酔の持続を延長した。

安全性薬理試験

レンボレキサントの心血管系（CV），中枢神経系（CNS）及び呼吸系に及ぼす影響を評価した。レンボレキサント及びその代謝物（M4，M9 及び M10）は，ヒト ether-à-go-go 関連遺伝子（hERG）カリウム電流を阻害し，IC_{50} 値はそれぞれ 6.1，5.2，11.2 及び 9.0 μmol/L であった。レンボレキサントは，遅延整流性カリウム電流の遅い成分（IKs）を 10 μmol/L で 24.3%阻害した。ヒト胚性幹（hES）由来心筋細胞の細胞外電位持続時間（FPD）を濃度依存的に延長し，10 μmol/L で約 10%遅延した。覚醒カニクイザル（雄 4 例）にレンボレキサントの 10，30 及び 100 mg/kg を日中経口投与し，血圧，心拍数及び心電図（ECG）パラメータに及ぼす影響を検討した。レンボレキサントは，100 mg/kg まで血圧，心拍数，PR 間隔及び QRS 時間に影響を及ぼさなかった。レンボレキサントは，10 mg/kg で QT 間隔及び心拍数で補正した QT（QTc）間隔に影響を及ぼさなかったが，30 及び 100 mg/kg で QTc 間隔を統計学的に有意に延長し，投与前値に対して 30 mg/kg では 6.3%延長，100 mg/kg では 4.2%延長した。覚醒カニクイザル（雄 4 例）にレンボレキサントの 30 及び 100 mg/kg を消灯時間前に経口投与し，血圧，心拍数及び ECG パラメータに及ぼす影響を検討した。レンボレキサントは，30 mg/kg で QTc 間隔に影響を及ぼさなかったが，100 mg/kg で QTc 間隔を統計学的に有意に延長し，投与前値に対して 11.0%延長した。覚醒ビーグル犬を用いた探索的試験では，経口投与の 30 mg/kg まで QTc 間隔を延長しなかった。麻酔ビーグル犬を用いた探索的試験では，1.08 mg/kg 以上の静脈内投与により PQ 間隔は短縮し，心拍数が増加した。

中枢神経系及び呼吸系に対するレンボレキサントの影響は，ラットに 100，300 及び 1000 mg/kg を経口投与して評価した。いずれのパラメータも 1000 mg/kg まで影響はなかった。

GLP に従って実施した安全性薬理試験のリストは，表 2.6.2-6 に示した。

2.6.2.2 効力を裏付ける試験

2.6.2.2.1 In Vitro 薬理試験

2.6.2.2.1.1 ヒト OX1R 及び OX2R に対する結合性（添付資料 4.2.1.1.1，試験番号 M10032）

^{125}I-オレキシン A を用いた RBA により，ヒト OX1R 又は OX2R に対するレンボレキサントの結合性を測定し，スボレキサントと比較した（Beuckmann, et al., 2017）。OX1R 及び OX2R に対し高い親和性を示す内在性基質には，オレキシン A とオレキシン B の 2 つがある。スボレキサントは，日本及び米国を含む数か国で不眠症治療薬として承認された初の OX1R 及び OX2R のデュアルオレキシン受容体拮抗薬である。

ヒト OX1R 及び OX2R への ^{125}I-オレキシン A の結合に対する阻害作用を検討した。ヒト OX1R 又は OX2R 発現チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞の膜画分に，本薬（0.6～200 nmol/L）又はスボレキサント（0.2～60 nmol/L）並びに ^{125}I-オレキシン A（0.2 nmol/L）を加え，室温で 30 分間インキュベーションした。過剰量のオレキシン A（10 μmol/L）で置換されない結合を非特異的結合として測定値から差し引いた。

その結果，本薬はヒト OX1R 及び OX2R 両方の拮抗剤であることが確認され，それぞれの受容体への ^{125}I-オレキシン A の結合を，IC_{50} 値 6.1 nmol/L（95%信頼区間：1.9～20 nmol/L）及び 2.6 nmol/L（95%信頼区間：1.9～3.6 nmol/L）で阻害した。スボレキサントのヒト OX1R 及び OX2R に対する IC_{50} 値は，それぞれ 8.8 nmol/L 及び 12.0 nmol/L であった。

2.6.2.2.1.2 ヒト OX1R 及び OX2R に対する結合反応速度（添付資料 4.2.1.1.2，試験番号 100026610）（添付資料 4.2.1.1.3，試験番号 M14007）

ヒト OX1R 及び OX2R 発現 CHO 細胞の膜画分において，それぞれ ^{125}I-オレキシン A 及び [^{3}H]*N*-ethyl-2-[(6-methoxy-3-pyridinyl)[(2-methylphenyl)sulfonyl]amino]-*N*-(3-pyridinylmethyl)-acetamide（EMPA）をトレーサーとしてレンボレキサントの結合反応速度解析を行い，スボレキサントと比較した（Beuckmann, et al., 2017）。EMPA は，OX2R に対して速い結合及び解離を示す選択的な OX2R 拮抗剤である。

ヒト OX1R 発現 CHO 細胞の膜画分に，本薬（7, 14, 28 nmol/L）及び ^{125}I-オレキシン A を加え，室温でインキュベーションし，拮抗作用の時間的経過を測定した。OX1R 拮抗剤 SB334867（1 μmol/L）で置換されない結合を非特異的結合として測定値から差し引いた。ヒト OX2R 発現 CHO 細胞の膜画分に，本薬又はスボレキサント（1, 3, 10 nmol/L）及び[^{3}H]EMPA を加え，室温でインキュベーションし，拮抗作用の時間的経過を測定した。過剰量の本薬又はスボレキサント（20 μmol/L）で置換されない結合を非特異的結合として測定値から差し引いた。カーブフィッティングソフトを用いて，本薬及びスボレキサントの k_{on}，k_{off} を算出した。

結果を表 2.6.2-1 に示す。本薬は，OX1R 及び OX2R に対し速い結合及び解離を示すことが確認された。本薬の OX2R に対する結合及び解離は，スボレキサントより速かった。

表 2.6.2-1 レンボレキサント及びスボレキサントの反応速度定数

Parameter	hOX1R	hOX2R	
	レンボレキサント	レンボレキサント	スボレキサント
k_{on} ($L \cdot nmol^{-1} \cdot min^{-1}$)	0.0262[a] (0.0175 – 0.0350)	0.0496[a] (0.0463 – 0.0528)	0.0052[b]
k_{off} (min^{-1})	0.244[a] (0.171 – 0.317)	0.0626[a] (0.0582 – 0.0671)	0.0164[b]
解離半減期(min)	2.8 (0.9 – 4.7)	11.1 (10.3 – 11.9)	42.2[b]

それぞれの値は，3 重測定の独立した 3 回の実験の平均値である。（ ）内数値は 95%信頼区間を示す。
hOX1R＝ヒト OX1R, hOX2R＝ヒト OX2R, 解離半減期＝ln2/k_{off}, k_{off} =解離定数, k_{on} =結合定数.
a：調和平均を示す。
b：3 重測定の 1 回の実験の値である。
出典：添付資料 4.2.1.1.2（100026610），4.2.1.1.3（M14007）及び Beuckmann, et al., 2017

2.6.2.2.1.3 ヒト，マウス又はラット OX1R，OX2R 発現細胞を用いた機能性試験

2.6.2.2.1.3.1 レポーターアッセイ（添付資料 4.2.1.1.4，試験番号 W-20110320［参考］）

ヒト又はマウス組換え OX1R 及び OX2R 発現細胞を用いて，レンボレキサントがアゴニストとして作用するかアンタゴニストとして作用するかを，レポーターアッセイにより検討した（Beuckmann, et al., 2017）。さらに，アンタゴニスト作用が競合的であるか，非競合的であるかを検討した。

ヒト又はマウス組換え OX1R 又は OX2R を発現させた HEK-293 ヒト胎児腎臓由来細胞を 96 ウェルプレートに 1×10^4 細胞/ウェルの濃度で播種し一晩培養した。培地中に本薬（1～1000 nmol/L）を加え 1 時間 35 分～2 時間 45 分インキュベーション後に，0.01 から 1000 nmol/L のオレキシン A，オレキシン B（ヒト又はマウス）又は[Ala^{11}, D-Leu^{15}]オレキシン B を加えた。オレキシン A のアミノ酸配列は，ヒト，マウス及びラットで同一である（Sakurai, et al., 1998）。オレキシン B 及び[Ala^{11}, D-Leu^{15}]オレキシン B は主に OX2R に結合し，[Ala^{11}, D-Leu^{15}]オレキシン B はオレキシン B より OX2R 選択性が高い（Asahi, et al., 2003）。37 ℃で 20 時間インキュベーション後，胎盤アルカリフォスファターゼ（PLAP）の化学発光レポーターアッセイにより細胞内カルシウム濃度上昇を測定した。また同時に alamarBlue™を用いて，本薬（100, 300, 1000 nmol/L）の細胞障害性も評価した。

その結果，本薬は，OX1R 及び OX2R 両方に対するデュアルオレキシン受容体拮抗剤であり，OX2R により強い親和性を有することが確認された（表 2.6.2-2）。シルドプロットの傾きは，全て約 1 であることから，本薬はこれら全ての受容体に対し競合的な拮抗剤であると考えられた。本薬はヒト又はマウスの OX1R 及び OX2R に対して作動性は示さなかった。なお，本薬は，最高濃度の 1000 nmol/L まで細胞毒性を示さなかった。

表 2.6.2-2 レンボレキサントの K_i 値及びシルドプロットの傾き

Agonist	mOX1R	hOX1R	mOX2R	hOX2R
K_i (nmol/L)				
Orexin-A	16.3 (10.5 – 25.2)	14.1 (9.55 – 20.9)	0.366 (0.253 – 0.527)	0.391 (0.268 – 0.569)
Orexin-B	—	—	0.280 (0.173 – 0.453)	0.585 (0.389 – 0.880)
[Ala^{11}, D-Leu^{15}]-orexin-B	—	—	0.489 (0.401 – 0.597)	0.421 (0.341 – 0.521)
Schild Slope				
Orexin-A	0.951 (0.847 – 1.05)	1.08 (0.976 – 1.19)	0.997 (0.945 – 1.05)	0.998 (0.951 – 1.05)
Orexin-B	—	—	0.990 (0.928 – 1.05)	0.928 (0.880 – 0.976)
[Ala^{11}, D-Leu^{15}]-orexin-B	—	—	1.03 (0.994 – 1.07)	1.01 (0.983 – 1.04)

それぞれの値は，4 重測定の 1 回の実験の値である。（ ）内数値は 95%信頼区間を示す。
hOX1R = ヒト OX1R, hOX2R = ヒト OX2R, K_i = 阻害定数, mOX1R = マウス OX1R, mOX2R = マウス OX2R, — = 該当なし.
出典：添付資料 4.2.1.1.4（W-20110320［参考］）

2.6.2.2.1.3.2 カルシウム動員試験（添付資料 4.2.1.1.5, 試験番号 M16023）

ヒト，マウス又はラット組換え OX1R 及び OX2R 発現細胞を用いて，レンボレキサントがアゴニストとして作用するかアンタゴニストとして作用するかを，FLIPR®カルシウムアッセイキットにより検討した。

ヒト，マウス又はラット組換え OX1R 及び OX2R を発現させた HEK-293 細胞を 384 ウェルプレートに 4.25×10^3 細胞/ウェルの濃度で播種し一晩培養した。プレートにカルシウム感受性色素を加え 37 ℃ で約 1 時間インキュベーションした。アゴニスト試験では，プレートに本薬（0.051～13,280 nmol/L）を加え蛍光強度を測定した。アンタゴニスト試験では，プレートに本薬（0.038～9960 nmol/L）を加え約 40 分間インキュベーション後，オレキシン A（ヒト及びマウス受容体発現細胞では 1.0 nmol/L，ラット受容体発現細胞では 0.3 nmol/L）を加え蛍光強度を測定した。本薬はいずれの受容体に対してもアゴニスト活性を示さず，アンタゴニスト活性を示した。本薬の K_i 値を表 2.6.2-3 に示す。本薬は，OX1R 及び OX2R 両方に対するデュアルオレキシン受容体拮抗剤であり，OX2R により強い親和性を有することが確認された。

表 2.6.2-3 レンボレキサントの K_i 値

mOX1R	rOX1R	hOX1R	mOX2R	rOX2R	hOX2R
23 (9.1 – 59)	23 (3.2 – 170)	8.1 (5.9 – 11)	0.44 (0.14 – 1.3)	0.68 (0.39, 1.2)[a]	0.48 (0.18 – 1.3)

それぞれの値は，4 重測定の独立した 3 回の実験の平均値（単位：nmol/L）である。（ ）内数値は 95%信頼区間を示す。
hOX1R = ヒト OX1R, hOX2R = ヒト OX2R, K_i = 阻害定数, mOX1R = マウス OX1R, mOX2R = マウス OX2R, rOX1R = ラット OX1R, rOX2R = ラット OX2R.
a：4 重測定の独立した 2 回の実験の平均値を示す。（ ）内数値は個々の値を示す。
出典：添付資料 4.2.1.1.5（M16023）

2.6.2.2.1.4 代謝物のヒト OX1R 及び OX2R に対する結合性（添付資料 4.2.1.1.6, 試験番号 M13009）

^{125}I-オレキシン A を用いた RBA により，ヒト OX1R 又は OX2R に対するレンボレキサントの代謝物（M2，M3，M4，M7，M8，M9，M10，M11，M12，M13，M14 及び M15）の結合性を測定した。

ヒト OX1R 又は OX2R 発現 CHO 細胞の膜画分を用いて，各代謝物（0.6～600 nmol/L）と ^{125}I-オレキシン A を室温で 30 分間インキュベーションした。過剰量のオレキシン A（10 μmol/L）で置換されない結合を非特異的結合として測定値から差し引いた。

結果を表 2.6.2-4 に示す。12 種の代謝物のうち，9 種の代謝物（M3，M4，M7，M8，M9，M10，M13，M14 及び M15）が本薬と同程度のヒトオレキシン受容体結合性を示すことが確認された。

表 2.6.2-4 ヒト OX1R 及び OX2R に対する代謝物の結合性

Metabolites	Laboratory Code	IC_{50} (nmol/L)	
		hOX1R	hOX2R
M2	ER-571788-00	>600 (—)	410 (75 – 2200)
M3	ER-571795-00	160 (69 – 380)	5.2 (0.57 – 48)
M4	ER-571789-00	12 (1.8 – 74)	3.8 (2.4 – 6.1)
M7	ER-583149-00	31 (2.6 – 370)	4.5 (1.0 – 20)
M8	ER-583153-00	240 (31 – 1800)	6.3 (4.0 – 10)
M9	ER-577483-00	19 (7.9 – 44)	4.7 (1.0 – 21)
M10	ER-571792-00	4.2 (1.9 – 9.2)	2.9 (0.63 – 13)
M11	ER-888234-00	>600 (—)	>600 (—)
M12	ER-001021776-000	>600 (—)	460 (150 – 1400)
M13	ER-001000372-000	380 (120 – 1200)	12 (2.5 – 53)
M14	ER-001021109-000	16 (2.2 – 120)	4.5 (1.7 – 12)
M15	ER-001021108-000	16 (3.3 – 79)	6.9 (1.7 – 29)

それぞれの値は，3 重測定の独立した 3 回の実験の平均値である。（ ）内数値は 95%信頼区間を示す。
hOX1R = ヒト OX1R, hOX2R = ヒト OX2R, IC_{50} = 50%阻害濃度，— = 該当せず.
出典：添付資料 4.2.1.1.6（M13009）

2.6.2.2.2 In Vivo 薬理試験

2.6.2.2.2.1 マウスにおける睡眠に対する効果（添付資料 4.2.1.1.7，試験番号 W-20100965［参考］）

マウスに脳波図（EEG）及び筋電図（EMG）測定電極を埋め込み，齧歯類の覚醒状態の基準（Radulovacki, et al., 1984）を用いて，総睡眠時間（ノンレム睡眠時間とレム睡眠時間の合計），睡眠潜時（初めに 270 秒間の持続した睡眠が現れるまでの時間，ただし，270 秒間中に 2 回まで 10 秒間の覚醒があっても良い）及びレム睡眠割合（総睡眠時間におけるレム睡眠時間の割合）を測定した。

雄 C57BL/6 マウス（14～17 週齢）に，1 週間に 1 回の間隔で 4 週間，本薬（0.1, 0.3, 1, 3 mg/kg），アルモレキサント（1, 3, 10, 30 mg/kg），ゾルピデム（0.3, 1, 3, 10 mg/kg）又は媒体（0.5%［w/v］メチルセルロース［MC］）のいずれかを同じ処置が重複することなく経口投与するクロスオーバー試験を実施した。動物は 12 時間明暗サイクルで飼育し，明期開始から 4 時間後に薬物投与を行った。投与直後から 3 時間の EEG 及び EMG を測定した。アルモレキサントはオレキシン受容体拮抗剤，ゾルピデムは $GABA_A$ 受容体に作用する非ベンゾジアゼピン系睡眠薬であり，ともに臨床で効果が確認されている。

その結果，本薬（1, 3 mg/kg），アルモレキサント（30 mg/kg）及びゾルピデム（3, 10 mg/kg）は，総睡眠時間を有意に同程度増加させた（図 2.6.2-1）。

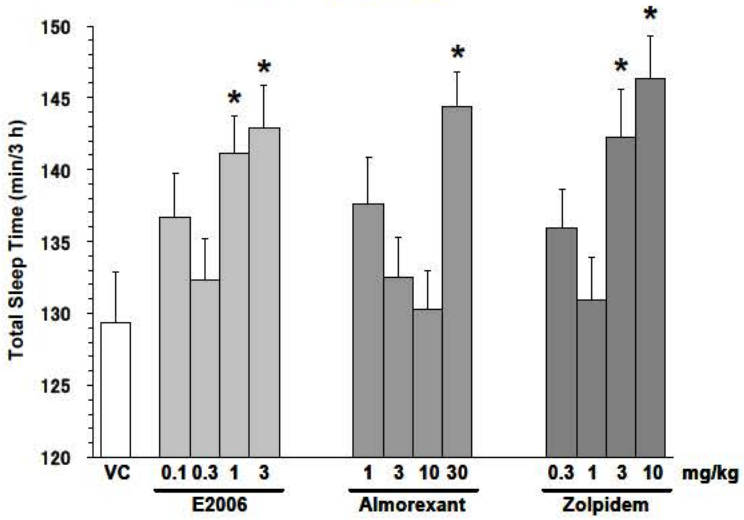


図 2.6.2-1　C57/BL6 マウスにおける本薬，アルモレキサント及びゾルピデムの総睡眠時間に対する効果

データは平均値±標準誤差（9～11 例/群）を示す。E2006＝ レンボレキサント，VC＝ 媒体対照. * P<0.05 は媒体対照群に対して一元配置分散分析後，Dunnett 検定により解析した。出典：添付資料 4.2.1.1.7（W-20100965［参考］）

睡眠潜時について，本薬（1, 3 mg/kg）は短縮する傾向（それぞれ，P=0.051, 0.082）を示し，ゾルピデム（3, 10 mg/kg）は有意に短縮した（図 2.6.2-2）。

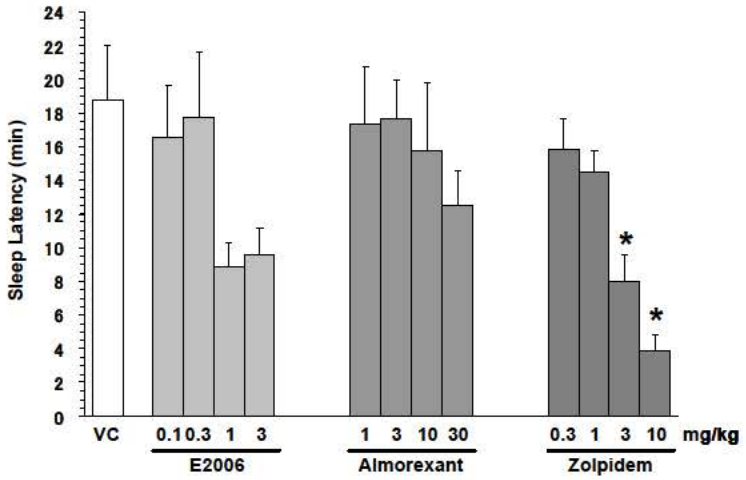


図 2.6.2-2　C57/BL6 マウスにおける本薬，アルモレキサント及びゾルピデムの睡眠潜時に対する効果

データは平均値±標準誤差（9～11 例/群）を示す。E2006＝ レンボレキサント，VC＝ 媒体対照. * P<0.05 は媒体対照群に対して一元配置分散分析後，Dunnett 検定により解析した。出典：添付資料 4.2.1.1.7（W-20100965［参考］）

レム睡眠割合について，本薬及びアルモレキサントは影響を及ぼさなかったが，ゾルピデム（10 mg/kg）は有意に減少させた（図 2.6.2-3）。

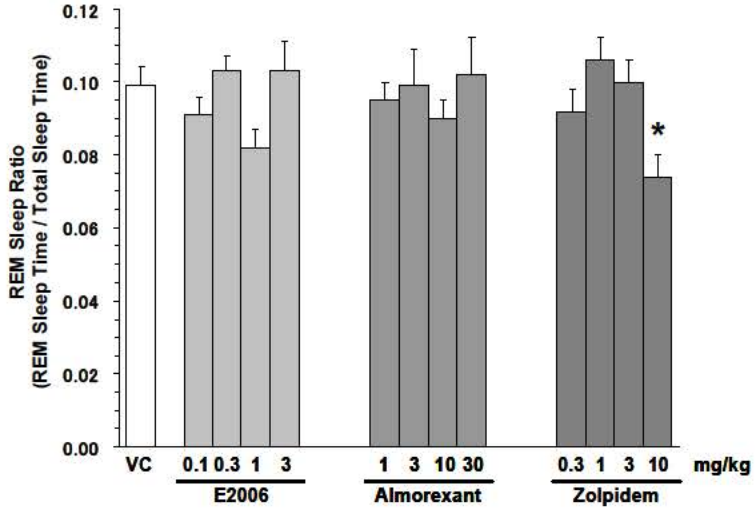


図 2.6.2-3　C57/BL6 マウスにおける本薬，アルモレキサント及びゾルピデムのレム睡眠割合に対する効果

データは平均値±標準誤差（9～11 例/群）を示す。E2006 ＝ レンボレキサント，VC ＝ 媒体対照，REM＝ レム睡眠. * P<0.05 は媒体対照群に対して一元配置分散分析後，Dunnett 検定により解析した。出典：添付資料 4.2.1.1.7（W-20100965［参考］）

以上より，本薬，アルモレキサント及びゾルピデムの総睡眠時間に対する最小有効投与量（MED）は，それぞれ 1，30，3 mg/kg（経口）であった。本薬は，総睡眠時間に対するレム睡眠時間の割合を変えなかったため，生理的な睡眠を増加したと考えられる。

2.6.2.2.2.2 オレキシン神経欠損マウスにおける睡眠時間，睡眠潜時及びレム睡眠の割合に対する効果（添付資料 4.2.1.1.8，試験番号 M12001［参考］）

オレキシン神経欠損マウス（orexin/ataxin-3 Tg/+［Hara, et al., 2001］）におけるレンボレキサントの睡眠に対する効果を検討した。

C57BL/6 を遺伝的背景とするオレキシン神経欠損マウス（orexin/ataxin-3 Tg/+）とオレキシン神経を有する同腹仔の野生型（WT）マウスに EEG 及び EMG 測定電極を埋め込み，齧歯類の覚醒状態の基準（Radulovacki, et al., 1984）を用いて，総睡眠時間（ノンレム睡眠時間とレム睡眠時間の合計），睡眠潜時（初めに 270 秒間の持続した睡眠が現れるまでの時間，ただし，270 秒間中に 2 回まで 10 秒間の覚醒があっても良い）及びレム睡眠割合（総睡眠時間におけるレム睡眠時間の割合）を測定した。マウスは 12 時間明暗サイクルで飼育した。明期開始から 3.5～4 時間後に，雄マウス（23～24 週齢）に，本薬（30 mg/kg）又は媒体（0.5% MC）を経口投与し，投与開始から 3 時間の EEG 及び EMG を測定した。本薬 30 mg/kg は C57BL/6 マウスにおける MED より 30 倍高い用量である（2.6.2.2.2.1 項参照）。

その結果，本薬は WT マウスにおいて睡眠時間を増加させたが，オレキシン神経欠損マウスにおいて睡眠時間の増加は認められなかった（図 2.6.2-4）。

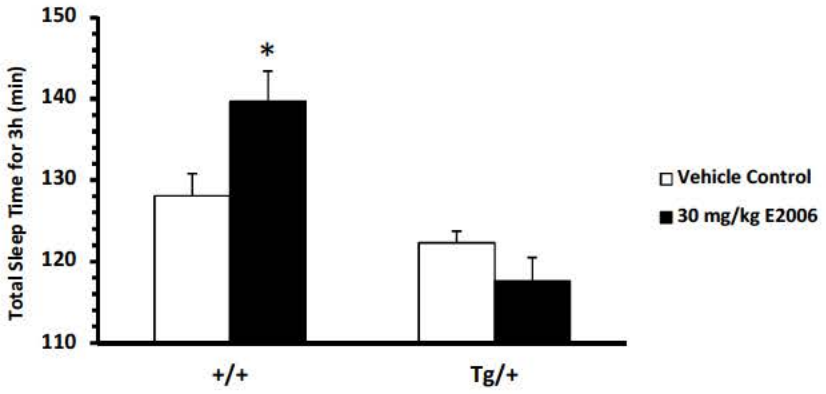


図 2.6.2-4　オレキシン神経欠損マウスと野生型マウスにおける総睡眠時間に対する本薬の効果

データは平均値±標準誤差（7 例/群）を示す。E2006＝ レンボレキサント，Tg/+ = orexin/ataxin-3 Tg/+，+/+ = 野生型マウス. * P<0.05 は媒体対照群に対して対応のない t 検定により解析した。出典：添付資料 4.2.1.1.8（M12001［参考］）

WT マウス，オレキシン神経欠損マウスのいずれにおいても，レム睡眠割合に影響を及ぼさなかった（図 2.6.2-5）。

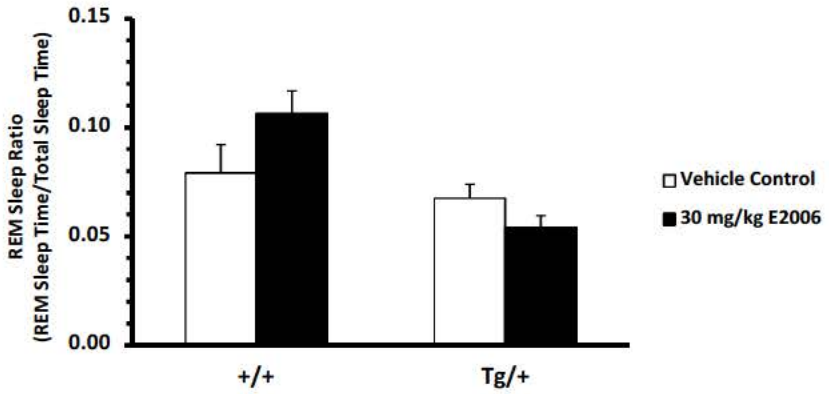


図 2.6.2-5　オレキシン神経欠損マウスと野生型マウスにおけるレム睡眠時間の割合に対する本薬の効果

データは平均値±標準誤差（7 例/群）を示す。E2006＝ レンボレキサント，REM＝ レム睡眠，Tg/+＝orexin/ataxin-3 Tg/+，+/+＝ 野生型マウス． 対応のない *t* 検定により解析したが 2 群間に有意差無し。出典：添付資料 4.2.1.1.8（M12001［参考］）

また，WT マウスにおいて睡眠潜時の減少傾向（*P*=0.071）が認められたが，オレキシン神経欠損マウスにおいて睡眠潜時の増加が認められた（図 2.6.2-6）。増加が認められた理由は不明である。

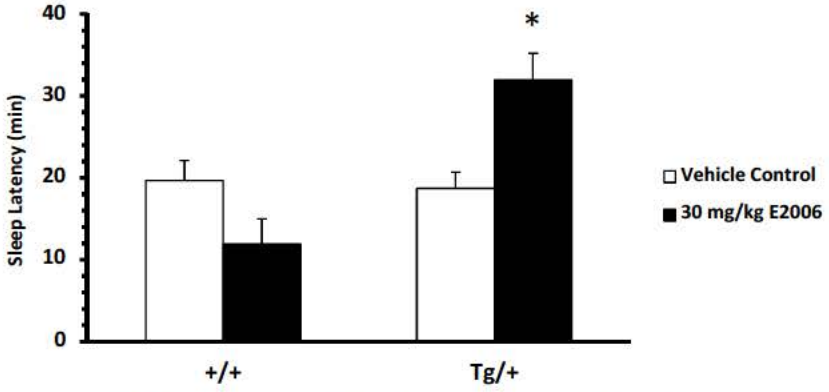


図 2.6.2-6　オレキシン神経欠損マウスと野生型マウスにおける睡眠潜時に対する本薬の効果

データは平均値±標準誤差（7 例/群）を示す。E2006＝ レンボレキサント，Tg/+＝orexin/ataxin-3 Tg/+，+/+＝ 野生型マウス. * *P*<0.05 は媒体対照群に対して対応のない *t* 検定により解析した。出典：添付資料 4.2.1.1.8（M12001［参考］）

以上より，レンボレキサントは WT マウスにおいて睡眠時間を増加させたが，オレキシン神経欠損マウスにおいて睡眠時間を増加させなかったことから，本薬の睡眠時間増加作用はオレキシン受容体シグナル伝達を介すると考えられた。なお，オレキシン神経欠損マウスにおいて本薬投与により睡眠潜時の増加が認められた理由は不明である。

2.6.2.2.2.3 *Hcrt* 欠損マウスにおける睡眠時間，覚醒時間及び睡眠潜時に対する効果（添付資料 4.2.1.1.9，試験番号 W-20140712）

オレキシン A 及び B の前駆体であるプレプロオレキシン遺伝子（*Hcrt*）欠損マウス及び WT マウスを用いて，レンボレキサントの効果を検討した。

C57BL/6 系統を遺伝的背景とするプレプロオレキシン遺伝子欠損マウス及び C57BL/6 WT マウス（雄，15～18 週齢）に EEG 及び EMG 測定電極を埋め込み，齧歯類の覚醒状態の基準（Radulovacki, et al., 1984）を用いて，覚醒時間，ノンレム睡眠時間，レム睡眠時間及び睡眠潜時を測定した。マウスは 12 時間明暗サイクル（7:00～19:00 明期）で飼育した。術後 8 日目から，ゼリー混合薬剤（レンボレキサントとして 1, 10, 30 mg/kg，ただし遺伝子欠損マウスは 30 mg/kg のみ）又は媒体（0.5% MC）を暗期開始 15 分前（18:45）にクロスオーバー試験で自発摂取により投与した。本薬のカタプレキシーに対する作用も検討した（2.6.2.3.4 項参照）。

本薬は，WT マウスにおいて覚醒時間及び睡眠潜時の減少，ノンレム及びレム睡眠時間の増加を示したが，欠損マウスの覚醒時間，ノンレム及びレム睡眠時間には影響しなかった（図 2.6.2-7）。

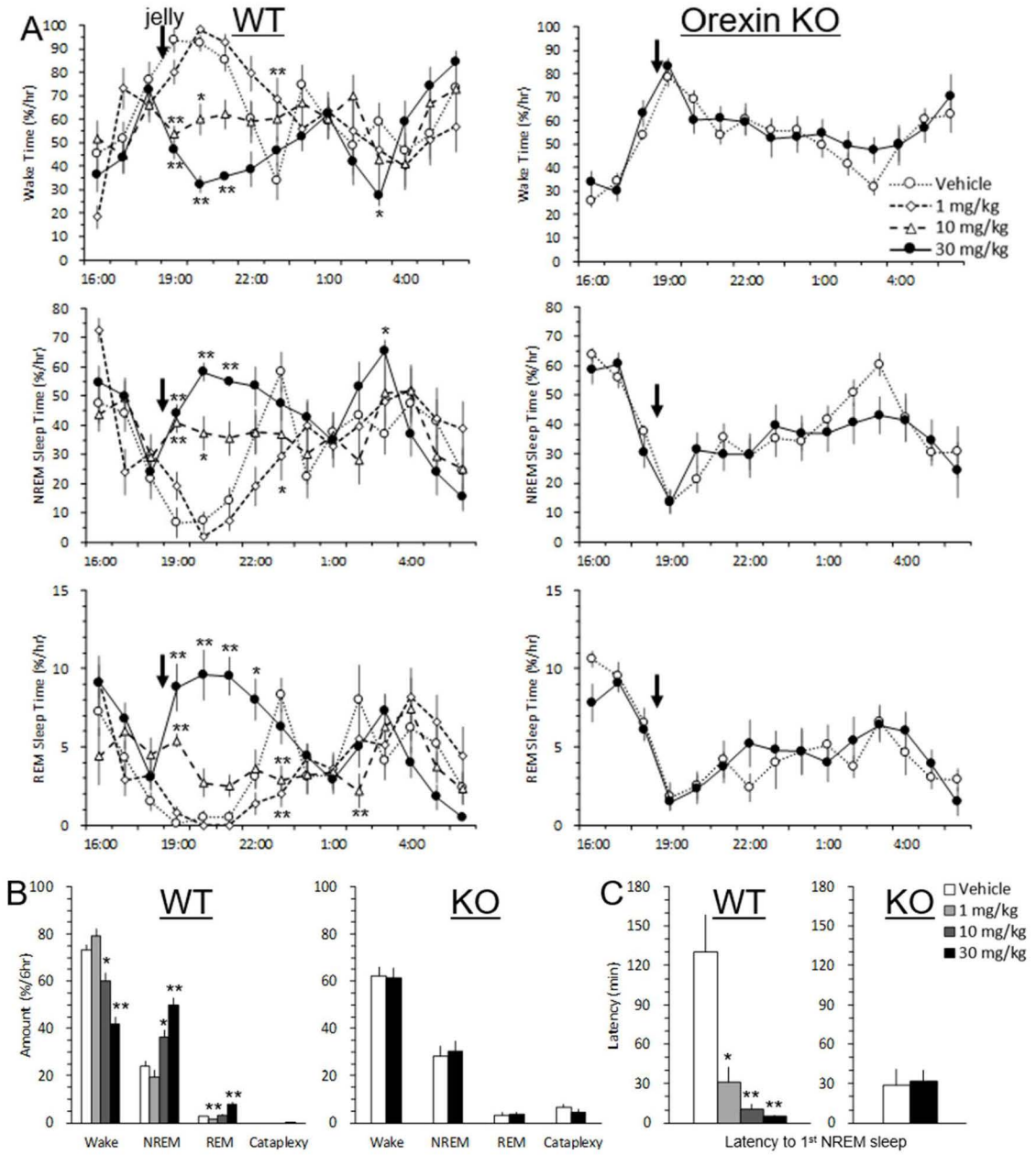


図 2.6.2-7　プレプロオレキシン遺伝子欠損マウス及び野生型マウスにおける睡眠及び覚醒に対する本薬の効果

データは平均値±標準誤差（8 例/群）を示す。
A：覚醒，ノンレム睡眠及びレム睡眠の時間（%）推移。矢印は媒体又は本薬を与えた時刻（18:45）。
B：薬剤投与から 6 時間の覚醒，ノンレム睡眠，レム睡眠及びカタプレキシー様症状の平均時間（%）。
C：薬剤投与後から最初にノンレム睡眠（30 秒以上持続）を惹き起こすまでの睡眠潜時
E2006 = レンボレキサント，KO = ノックアウト，NREM = ノンレム睡眠，REM = レム睡眠，WT = 野生型．*P<0.05, **P<0.01 は，媒体対照群に対して（A）二元又は（B, C）一元配置経時型分散分析後，Dunnett 検定により解析した。出典：添付資料 4.2.1.1.9（W-20140712）

以上より，レンボレキサントは WT マウスにおいて睡眠時間を増加させたが，*Hcrt* 欠損マウスにおいて睡眠時間を増加させなかったことから，本薬の睡眠時間増加作用はオレキシン受容体シグナル伝達を介すると考えられた。

2.6.2.2.2.4 ラットにおける睡眠時間及びレム睡眠の割合に対する効果（添付資料 4.2.1.1.10，試験番号 M10037）

SD ラットに EEG 及び EMG 測定電極を埋め込み，齧歯類の覚醒状態の基準（Radulovacki, et al., 1984）を用いて，総睡眠時間（ノンレム睡眠時間とレム睡眠時間の合計），レム睡眠割合（総睡眠時間におけるレム睡眠時間の割合）を測定した。さらに，ナルコレプシー様症状を惹き起こす可能性を調べるため，覚醒状態からノンレム睡眠を経ずに直接レム睡眠へ移行する入眠時レム睡眠（SOREM）の有無を調べた。12 時間明暗サイクルで飼育し，明期開始から 2～3 時間後に薬物投与を行った。

雄 SD ラット（9 週齢）に，本薬（3～300 mg/kg），ゾルピデム（3～100 mg/kg）又は媒体（0.5% MC）を経口投与し，投与開始から 2 時間の EEG 及び EMG を測定した。

その結果，図 2.6.2-8 に示すように，本薬は用量依存的に 30 mg/kg から有意に総睡眠時間を増加させた。本薬の総睡眠時間増加作用の ED_{50} は 4.4 mg/kg（経口）であった。一方，ゾルピデムはノンレム睡眠時間を増加させたが，レム睡眠時間を減少させたため総睡眠時間として有意な増加は認められなかった。

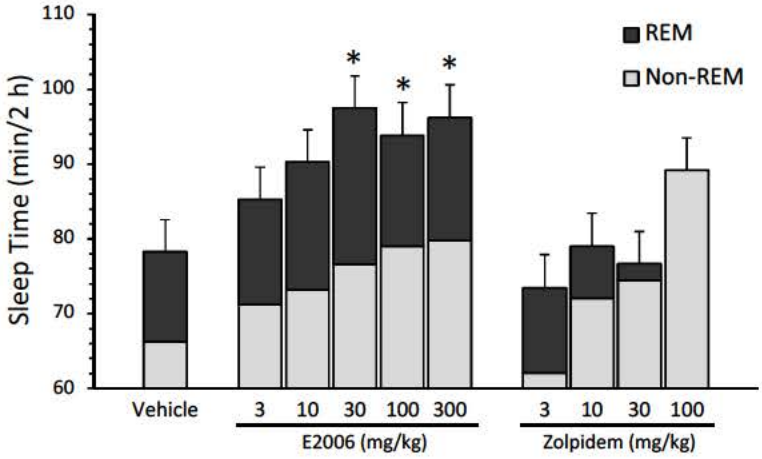


図 2.6.2-8　SD ラットにおける本薬及びゾルピデムの睡眠時間に対する効果

データは平均値±標準誤差（6 例/群）を示す。E2006＝ レンボレキサント，Non-REM＝ ノンレム睡眠，REM＝ レム睡眠．総睡眠時間について，* P<0.05 は，媒体対照群に対して，混合効果モデルを用いた分析後，Dunnett 型多重比較検定により解析した。出典：添付資料 4.2.1.1.10（M10037）

また，図 2.6.2-9 に示すように，本薬は総睡眠時間に対するレム睡眠時間の割合に有意な影響を及ぼさなかった。一方，ゾルピデムはレム睡眠時間の抑制により，レム睡眠時間の割合を用量依存的に減少させた。

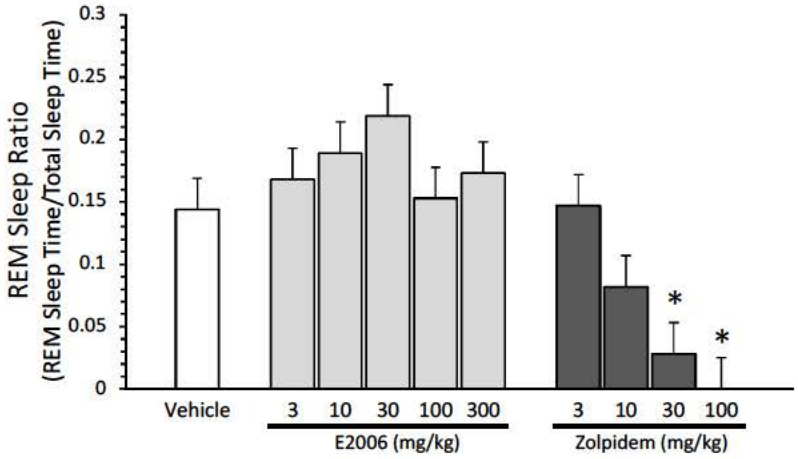


図 2.6.2-9　SD ラットにおける本薬及びゾルピデムのレム睡眠割合に対する効果

データは平均値±標準誤差（6 例/群）を示す。E2006＝ レンボレキサント，REM＝ レム睡眠.
* $P<0.05$ は媒体対照群に対して混合効果モデルを用いた分析後，Dunnett 型多重比較検定により解析した。出典：添付資料 4.2.1.1.10（M10037）

さらに，本薬投与により観察された睡眠は，全てノンレム睡眠から出現し，ナルコレプシー様症状である SOREM は観察されなかった。

以上より，レンボレキサントは SD ラットにおいて，ゾルピデムで見られたようなレム睡眠時間の割合を変えることなく，又，ナルコレプシー様症状である SOREM を惹き起こすことなく睡眠時間を増加させた。よって，本薬は生理的な睡眠を増加させると考えられた。本薬の総睡眠時間増加作用の ED_{50} は 4.4 mg/kg（経口）であった。

2.6.2.2.2.5 ラットにおけるレンボレキサント連投による耐性及び反跳性不眠の検討（添付資料 4.2.1.1.11, 試験番号 M10038）

睡眠薬は，長期使用により耐性や休薬による反跳性不眠を起こしやすいことが知られている。そこで，耐性や休薬による反跳性不眠を調べるため，本薬又はゾルピデムを 3 週間経口投与した後に 2 日間休薬し，その間の EEG 及び EMG 測定を行った。ゾルピデムはラットで 1 週間以上の連投により耐性を生じることが報告されているため（Ebert, et al., 2008），陽性対照として用いた。

SD ラットに EEG 及び EMG 測定電極を埋め込み，齧歯類の覚醒状態の基準（Radulovacki, et al., 1984）を用いて，ノンレム睡眠時間，レム睡眠時間，総睡眠時間（ノンレム睡眠時間とレム睡眠時間の合計），レム睡眠割合（総睡眠時間におけるレム睡眠時間の割合），睡眠潜時（投与後から最初の 1 分以上続く睡眠までの時間）及び SOREM（覚醒状態からノンレム睡眠を経ずに直接レム睡眠へ移行）の有無を調べた。12 時間明暗サイクルで飼育し，明期開始から 2～3 時間後に，本薬（30 mg/kg），ゾルピデム（100 mg/kg）又は媒体（0.5% MC）を，雄 SD ラット（11 週齢）に，1 日 1 回 21 日間経口投与し，投与から 2 時間のデータを 3～4 日ごとに測定して解析した。

本薬は，投与期間中の睡眠潜時を投与前に比べて有意に短縮させた（図 2.6.2-10）。ゾルピデ

ムも同程度の睡眠潜時の短縮を示したが，有意差はなかった。

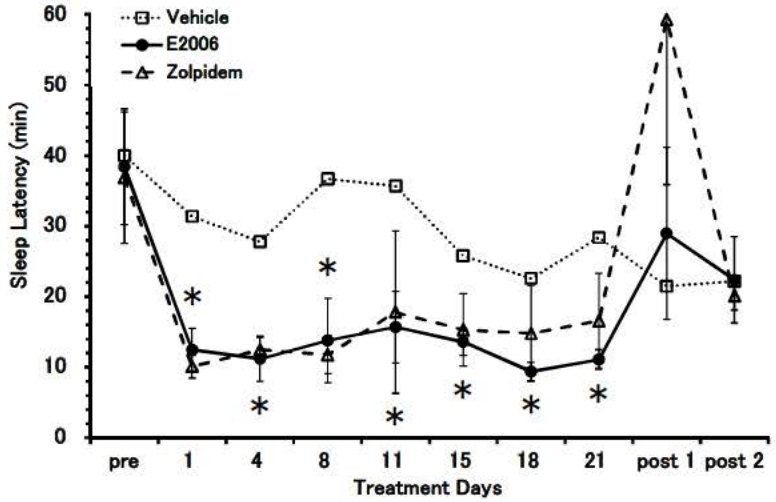


図 2.6.2-10 SD ラットにおける本薬及びゾルピデムの睡眠潜時に対する効果

データは平均値±標準誤差（4～5 例/群，ただし媒体対照群は 2 例の平均値）を示す。E2006＝レンボレキサント，post＝ 休薬，pre＝ 薬物投与の 3 日前と 2 日前の平均，SD = Sprague Dawley.
* $P<0.05$ は本薬投与群の pre に対して経時型分散分析後，Dunnett 型多重比較検定により解析した。
出典：添付資料 4.2.1.1.11（M10038）

本薬は，投与 15 日目を除いた投与期間中のノンレム睡眠時間（図 2.6.2-11A）及び総睡眠時間（図 2.6.2-11C）を投与前に比べて有意に増加させた。レム睡眠時間（図 2.6.2-11B）は，投与 18 日目を除いた投与期間中，投与前に比べて有意な変化は示さなかった。休薬（post 1, post 2）により，本薬投与群の睡眠時間は，ほぼベースラインに戻り，反跳性不眠を惹き起こさなかった。

一方，ゾルピデムは，投与 1 日目のみノンレム睡眠時間（図 2.6.2-11A）を増加させたが，その後は減少し耐性を生じたと考えられた。レム睡眠時間（図 2.6.2-11B）は，投与 1 日目に顕著な減少を示したが，その後減弱し耐性を生じたと考えられた。休薬による反跳性不眠も観察されたが可逆的であった（図 2.6.2-11A, C）。

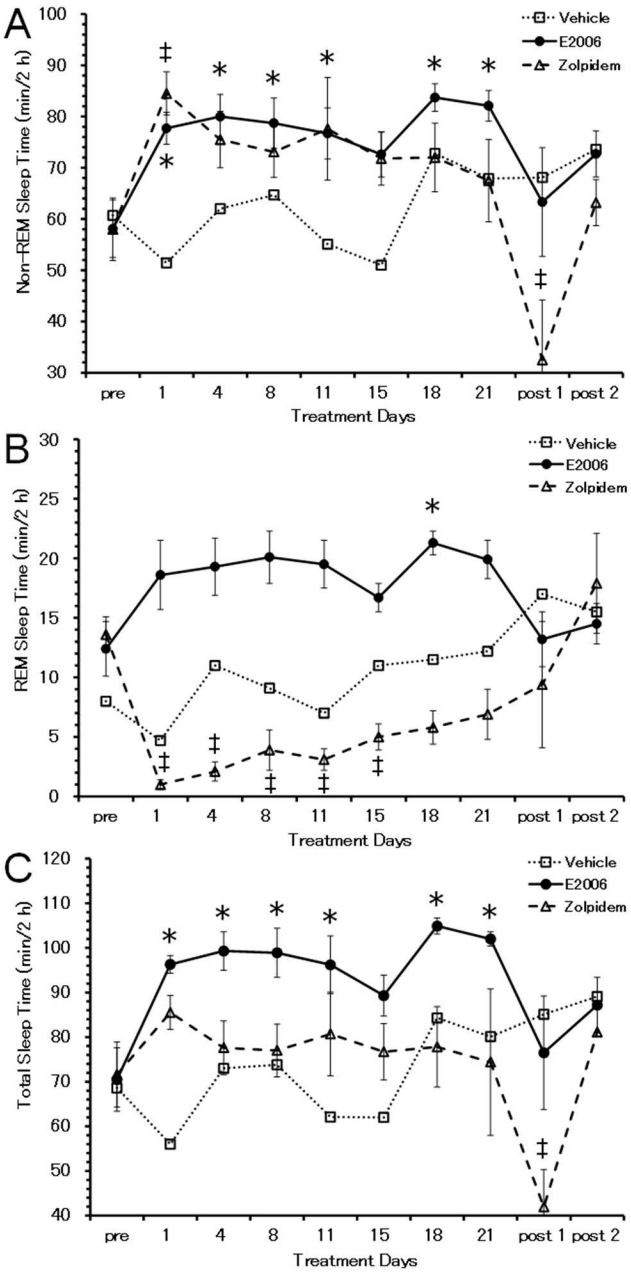


図 2.6.2-11 SD ラットにおける本薬及びゾルピデムのノンレム睡眠，レム睡眠及び総睡眠時間に対する効果

データは平均値±標準誤差（4～5 例/群，ただし媒体対照群は 2 例の平均値）を示す。（A）ノンレム睡眠時間，（B）レム睡眠時間，（C）総睡眠時間（ノンレム及びレム睡眠時間の合計）
E2006 = レンボレキサント，post = 休薬，pre = 薬物投与の 3 日前と 2 日前の平均，REM = レム，SD = Sprague Dawley．　* $P<0.05$, ‡ $P<0.05$ は pre に対して経時型分散分析後，Dunnett 型多重比較検定により解析した。出典：添付資料 4.2.1.1.11（M10038）

さらに，本薬は，総睡眠時間に対するレム睡眠時間の割合に影響しなかった（図 2.6.2-12）。一方，ゾルピデムは投与 1 日目に顕著な減少を示したが，その作用は徐々に減弱し 18 日目以降は有意差がなくなり耐性を生じたと考えられた。休薬により，ゾルピデム投与群のレム睡眠時間の割合は，ベースレベルに回復した。

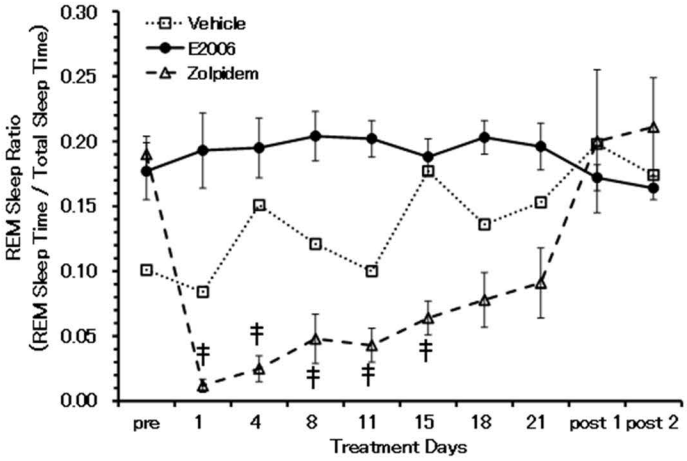


図 2.6.2-12 SD ラットにおける本薬及びゾルピデムのレム睡眠割合に対する効果

データは平均値±標準誤差（4～5 例/群，ただし媒体対照群は 2 例の平均値）を示す。E2006 = レンボレキサント，post = 休薬，pre = 薬物投与の 3 日前と 2 日前の平均，REM = レム，SD = Sprague Dawley. ‡ $P<0.05$ はゾルピデム投与群の pre に対して経時型分散分析後，Dunnett 型多重比較検定により解析した。出典：添付資料 4.2.1.1.11（M10038）

いずれの投与においても，投与から 2 時間の測定時間に，SOREM（覚醒状態からノンレム睡眠を経ずに直接レム睡眠へ移行）は観察されず，全ての睡眠はノンレム睡眠から入眠した。

2.6.2.2.2.6 ラットにおける OX2R 機能性評価（添付資料 4.2.1.1.12, 試験番号 W-20110223 ［参考］）

ラットにおいて，OX2R の活性化は，血漿中への ACTH 分泌を促進し，その分泌促進は OX2R 拮抗剤で抑制される（Chang, et al., 2007）。副腎皮質刺激ホルモン放出因子受容体やニューロペプチド Y1 受容体も ACTH 分泌にかかわる可能性があるが（Jászberényi, et al., 2000; Dimitrov, et al., 2007），本薬は 10 μmol/L でもこれらの受容体に対して結合性を示さなかったことから（2.6.2.3.1 項参照），本試験は，OX2R を介した反応を評価していると考えられる。

OX2R に高い選択性を示すペプチドアゴニスト[Ala^{11}, D-Leu^{15}]オレキシン B による，OX2R を介した血漿中への ACTH 分泌促進作用に対する本薬の効果を検討した。[Ala^{11}, D-Leu^{15}]オレキシン B は，ヒト OX1R よりもヒト OX2R に対して 400 倍高い選択性を示すが（Asahi, et al., 2003），ヒトとラットの OX2R の相同性は 95%と高いので（Sakurai, et al., 1998），ラットにおいても[Ala^{11}, D-Leu^{15}]オレキシン B は，OX2R に対して高い選択性を有すると考えられる。よって，本実験によりレンボレキサントの OX2R における in vivo 機能性評価が可能であると考えられた。

雄 F344 ラット（6 週齢）に，本薬（1, 3, 10, 30 mg/kg）又は媒体（5% DMSO，9.5% Cremophor® 含有生理食塩水）を経口投与し，1 時間後に[Ala^{11}, D-Leu^{15}]オレキシン B

（1 nmol/head）又は媒体（リン酸緩衝生理食塩水）を脳室内投与した。15 分後に採血し，血漿中の ACTH を放射免疫測定キットにより測定した。

その結果，図 2.6.2-13 に示すように，ラットにおいて，[Ala^{11}, D-Leu^{15}]オレキシン B は血漿中への ACTH 分泌を促進し，本薬は 3, 10 及び 30 mg/kg で ACTH 分泌を有意に抑制した。

よって，本薬はラットにおいて OX2R 拮抗剤として作用することが示された。

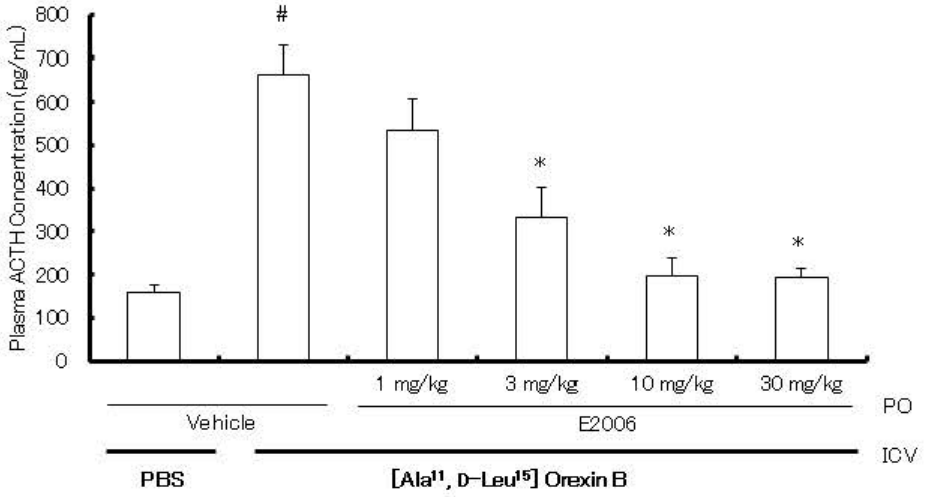


図 2.6.2-13 F344 ラットにおける[Ala^{11}, D-Leu^{15}]オレキシン B 誘発 ACTH 分泌促進に対する効果

データは平均値±標準誤差（4～5 例/群）を示す。ACTH = 副腎皮質刺激ホルモン，E2006 = レンボレキサント，PBS = リン酸緩衝生理食塩水．# P<0.05 は PBS [ICV]コントロール群に対して対応のない t 検定により解析した。* P<0.05 は Vehicle［PO］コントロール群に対して一元配置分散分析後，Dunnett 検定により解析した。出典：添付資料 4.2.1.1.12（W-20110223［参考］）

2.6.2.3 副次的薬理試験

2.6.2.3.1 受容体結合性

2.6.2.3.1.1 レンボレキサントの結合性（添付資料 4.2.1.2.1, 試験番号 929062）

図 2.6.2-5 に示す生理的意義の高い 88 種の標的分子（受容体，神経伝達物質トランスポーター及びイオンチャネル）に対する本薬の 1 及び 10 µmol/L の結合性を放射性リガンド結合性試験により検討した。その結果，1 µmol/L では有意な結合性（50%以上の阻害）を示す標的分子はなかった。10 µmol/L ではメラトニン MT1 受容体のみ 74%の結合阻害を示した。

2.6.2.3.1.2 代謝物の結合性（添付資料 4.2.1.2.2, 試験番号 100023762）

図 2.6.2-5 に示す生理的意義の高い 86 種の標的分子（受容体，神経伝達物質トランスポーター及びイオンチャネル）に対する代謝物（M4，M9，M10）の 1 及び 10 µmol/L の結合性を放射性リガンド結合性試験により検討した。その結果，1 µmol/L では有意な結合性（50%以上の阻害）を示す標的分子はなかった。10 µmol/L では，メラトニン MT1 受容体のみ，M4，M9 及び M10 は，それぞれ 51%，55%及び 71%の結合阻害を示した。

表 2.6.2-5 受容体，トランスポーター及びイオンチャネルに対する結合性試験

Target	Origin
Adenosine, A_1	human recombinant
Adenosine, A_{2A}	human recombinant
Adenosine, A_3	human recombinant
α_1 Adrenergic (non-selective)	rat cerebral cortex
α_2 Adrenergic (non-selective)	rat cerebral cortex
β_1 Adrenergic	human recombinant
β_2 Adrenergic	human recombinant
Angiotensin, AT_1	human recombinant
Angiotensin, AT_2	human recombinant
Benzodiazepine (central)	rat cerebral cortex
Benzodiazepine (peripheral)	rat heart
Bombesin, BB (non-selective)	rat cerebral cortex
Bradykinin, B_2	human recombinant
Calcitonin gene related peptide, CGRP	human recombinant
Cannabinoid, CB_1	human recombinant
Cholecystokinin CCK_A (CCK_1)	human recombinant
Cholecystokinin CCK_B (CCK_2)	human recombinant
Corticotropin releasing factor, CRF1	human recombinant
Corticotropin releasing factor, $CRF_{2\alpha}$ [a]	human recombinant
Dopamine, D_1	human recombinant
Dopamine, D_{2S}	human recombinant
Dopamine, D_3	human recombinant
Dopamine, $D_{4.4}$	human recombinant
Dopamine, D_5	human recombinant
Endothelin, ET_A	human recombinant
Endothelin, ET_B	human recombinant
GABA (non-selective)	rat cerebral cortex
Galanin, GAL_1	human recombinant
Galanin, GAL_2	human recombinant
PDGF	BALB/c 3T3 cells (mouse)
CXCR2 (IL-8B)	human recombinant
CCR1	human recombinant
TNF-α	U-937 cells (human)
Histamine, H_1	human recombinant
Histamine, H_2	human recombinant
Melanocortin, MC_4	human recombinant
Melatonin, MT_1 (ML_{1A})	human recombinant
Muscarinic, M_1	human recombinant
Muscarinic, M_2	human recombinant
Muscarinic, M_3	human recombinant
Muscarinic, M_4	human recombinant
Muscarinic, M_5	human recombinant
Neurokinin, NK_1	U-373MG cells (human)
Neurokinin, NK_2	human recombinant
Neurokinin, NK_3	human recombinant
Neuropeptide, Y_1	SK-N-MC cells (human)
Neuropeptide, Y_2	KAN-TS cells (human)
Neurotensin, NT_1 (NTS_1)	human recombinant
N neuronal α4β2	SH-SY5Y cells (human)
Opioid (nonselective)	rat cerebral cortex
δ_2 Opioid	human recombinant
κ Opioid	rat recombinant
μ Opioid	human recombinant
Nociceptin, NOP (ORL1)	human recombinant
PAC_1 (PACAP)	human recombinant
PPARγ	human recombinant
Phencyclidine, PCP	rat cerebral cortex
Prostaglandin D2, DP_1	human recombinant
Prostaglandin E2, EP_1	human recombinant
Prostaglandin E2, EP_2	human recombinant
Prostaglandin E2, EP_3	human recombinant
Prostaglandin E2, EP_4	human recombinant
TP (TXA_2/PGH_2) [a]	human recombinant
Prostacyclin, IP (PGI_2)	human recombinant
Purinergic, P2X	rat urinary bladder
Purinergic, P2Y	rat cerebral cortex
Serotonin, $5\text{-}HT_{1A}$	human recombinant
Serotonin, $5\text{-}HT_{1B}$	rat cerebral cortex
Serotonin, $5\text{-}HT_{2A}$	human recombinant
Serotonin, $5\text{-}HT_{2B}$	human recombinant
Serotonin, $5\text{-}HT_{2C}$	human recombinant
Serotonin, $5\text{-}HT_3$	human recombinant
Serotonin, $5\text{-}HT_{5a}$	human recombinant
Serotonin, $5\text{-}HT_6$	human recombinant
Serotonin, $5\text{-}HT_7$	human recombinant
Sigma (non-selective)	rat cerebral cortex
Somatostatin (sst) (non-selective)	AtT-20 cells (mouse)
Glucocorticoid, GR	IM-9 cells (human)
Vasoactive intestinal peptide, VIP_1 ($VPAC_1$)	human recombinant
Vasopressin, V_{1a}	human recombinant
L-Type Ca^{2+} channel (verapamil)	rat cerebral cortex
K^+_V channel	rat cerebral cortex
SK^+_{Ca} channel	rat cerebral cortex
Na^+ channel (site 2)	rat cerebral cortex
Cl^- channel (GABA-gated)	rat cerebral cortex
Norepinephrine Transporter	human recombinant
Dopamine Transporter	human recombinant
5-HT Transporter	human recombinant

a: 試験番号（100023762）では実施しなかった作用標的を示す。
出典：添付資料 4.2.1.2.1（929062），添付資料 4.2.1.2.2（100023762）

2.6.2.3.2 レンボレキサントのヒトメラトニン 1 受容体に対する機能性評価（添付資料 4.2.1.2.3，試験番号 M11009）

レンボレキサントは，MT1 受容体に対し 10 μmol/L で 74%の結合阻害を示したため（2.6.2.3.1.1 項参照），ヒト組換え MT1 受容体発現 HEK-293 細胞を用いて細胞内カルシウム濃度測定による機能性試験を行った。陰性対照としてヒト組換え MT1 受容体を発現していない HEK-293 細胞を用いた。本薬（0.1～30 μmol/L）を細胞に加えてアゴニスト活性を測定した。ア

ンタゴニスト活性測定では，本薬を加えた後にメラトニンを加えた。

その結果，本薬は，ヒト MT1 受容体に対してアゴニスト活性を示さないこと，K_i 値 922 nmol/L（95%信頼区間：178～1665 nmol/L）のアンタゴニスト活性を有することが示された。

2.6.2.3.3 レンボレキサントのヒト $GABA_A$ 受容体に対する機能性評価（添付資料 4.2.1.2.4，試験番号 W-20110355［参考］）

$GABA_A$ 受容体の活性化は，興奮性を抑制することにより催眠作用を惹き起こすため，ヒト組換え $GABA_A$ 受容体 α1，β3 及び γ2 サブユニット発現 HEK-293 細胞を用いて，パッチクランプ法によりレンボレキサントの $GABA_A$ 受容体への作用の有無を確認した。

GABA（0.3 μmol/L）誘発 Cl^- 電流に対する，本薬（0.2～5 μmol/L）の効果を検討した。

陽性対照として用いたフェノバルビタール（50, 100 μmol/L）は，GABA 誘発 Cl^- 電流を増加させたが，本薬は影響しなかった。

2.6.2.3.4 レンボレキサントの情動刺激誘発カタプレキシーマウスモデルにおける作用（添付資料 4.2.1.1.9，試験番号 W-20140712）

オレキシン遺伝子の欠損及び変異がカタプレキシー（情動脱力発作）様症状を惹き起こすことが知られている（Dauvilliers, et al., 2014）。そこで，情動刺激誘発カタプレキシーマウスモデルを用いて，レンボレキサントがカタプレキシー様症状を惹き起こす可能性を検討した。強い陽性情動刺激がヒト及び動物モデルに置いてカタプレキシーを惹き起こすことが知られており（Oishi, et al., 2013），本試験では強い陽性情動刺激としてチョコレートを用いた。なお，同じ試験の中で，睡眠時間，覚醒時間及び睡眠潜時に対する本薬の効果も検討した（2.6.2.2.2.3 項参照）。

C57BL/6 系統を遺伝的背景とするプレプロオレキシン遺伝子欠損マウス及び C57BL/6 WT マウス（雄，15～18 週齢）に EEG 及び EMG 測定電極を埋め込んだ。カタプレキシー様症状は，覚醒状態から筋弛緩状態（EEG シータ波 4～9Hz）へ突然移行し，筋弛緩状態から覚醒状態に突然戻ることと定義した。術後 8 日目から，ゼリー混合薬剤（レンボレキサントとして 1, 10, 30 mg/kg，ただし遺伝子欠損マウスは 30 mg/kg のみ）又は媒体（0.5% MC）を暗期開始（19:00）の 15 分前に，チョコレート（Hershey's Kiss™, 4.4 g）は暗期開始時（19:00）にそれぞれ与えて自発摂取させた。なお，試験はクロスオーバーで実施した。動物は 12 時間明暗サイクル（7:00～19:00 明期）で飼育した。

WT マウスにおいて，チョコレート投与によるカタプレキシーは観察されなかったが（図 2.6.2-14），本薬投与（1，10 及び 30 mg/kg）により，各群 8 例の内，それぞれ 3，7 及び 8 例でカタプレキシーが観察された。本薬（10 及び 30 mg/kg）及びチョコレート投与後 6 時間のカタプレキシー発生時間及びカタプレキシー発作回数は，媒体投与群に比べて有意に高かった（図 2.6.2-14A, B）。

一方，欠損マウスにおいて，本薬（30 mg/kg）投与後 6 時間に観察されるカタプレキシー発作時間は媒体投与群と変わらなかったが（図 2.6.2-14A），カタプレキシー発作回数に減少が見られた（図 2.6.2-14B）。欠損マウスにおいて，本薬投与により，カタプレキシー発作回数に減少が見られた理由は不明である。

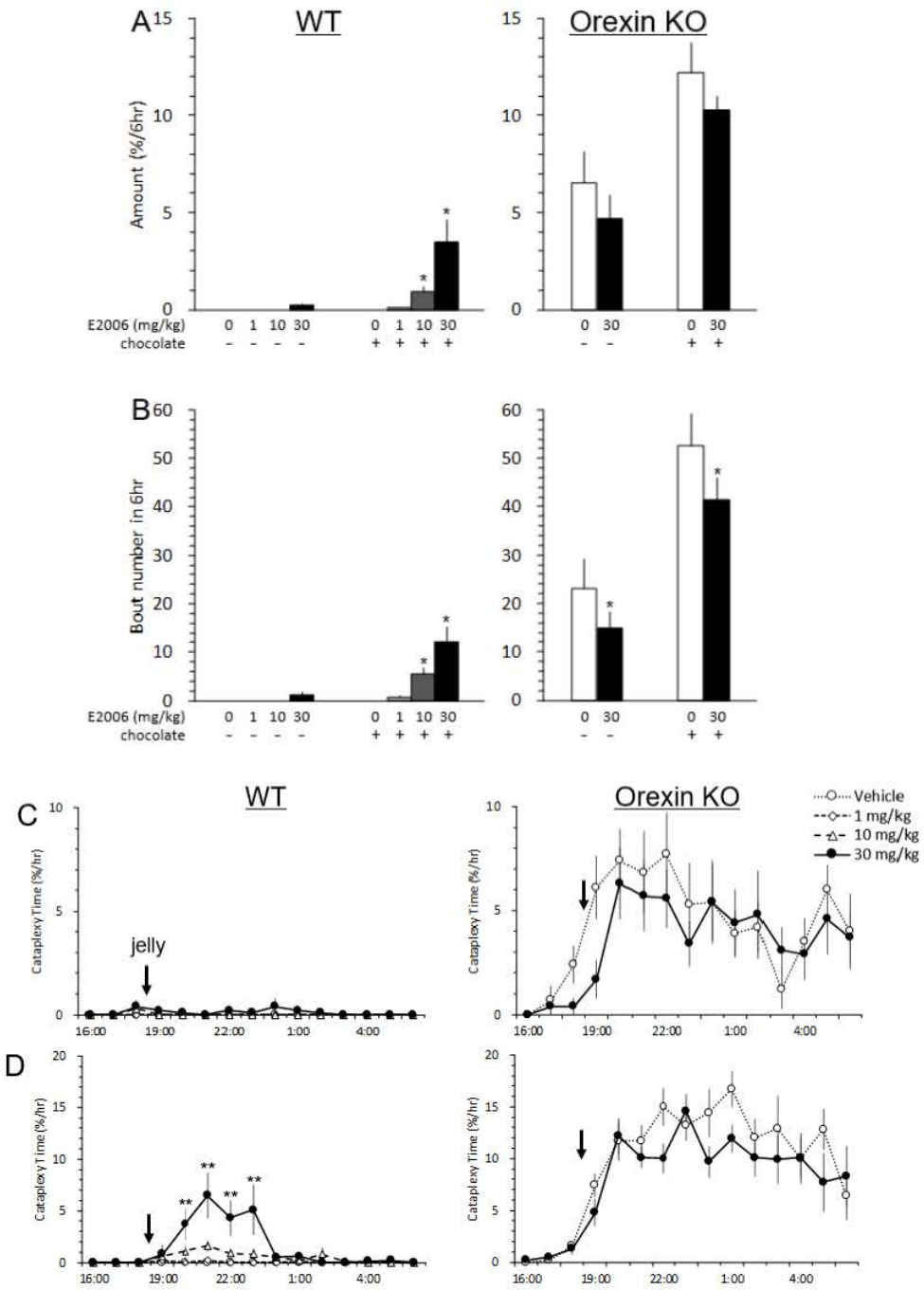


図 2.6.2-14 野生型マウス及びプレプロオレキシン遺伝子欠損マウスにおけるカタプレキシーに対する影響

データは平均値±標準誤差（8 例/群）を示す。A：本薬又は媒体並びにチョコレート投与から 6 時間のカタプレキシーの時間。B：本薬又は媒体並びにチョコレート投与から 6 時間のカタプレキシー発作の回数。C, D：1 時間毎のカタプレキシーの時間（C：チョコレートなし；D：19:00 にチョコレート投与あり）。矢印はゼリー混合本薬又は媒体が投与された時刻（18:45）を示す。E2006 = レンボレキサント，KO = ノックアウト，WT = 野生型．WT マウスにおいて，$^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$ は，媒体対照群に対して（A, B）一元又は（D）二元配置経時型分散分析後，Dunnett 検定により解析した。KO マウスにおいて，$^{*}P<0.05$ は，媒体対照群に対して対応のある t 検定により解析した。出典：添付資料 4.2.1.1.9（W-20140712）

WT マウスにおいて，チョコレート非投与下では，レンボレキサント投与によるカタプレキシーは，ほとんど観察されなかった。一方，チョコレート投与下では，本薬（10 及び 30 mg/kg）投与で投与後 6 時間のカタプレキシー時間及びカタプレキシー発作の回数に有意な増加が見られた。以上より，レンボレキサントは，強い報酬性の刺激下では高用量でカタプレキシーを起こす可能性があると考えられた。

2.6.2.3.5 マウスにおける協調運動に対する影響（添付資料 4.2.1.2.5, 試験番号 W-20110154［参考］）

レンボレキサント及びゾルピデムのマウスにおける協調運動に対する影響を検討した。

雄 C57BL/6 マウス（14 週齢）に，本薬（30，100，300 mg/kg），ゾルピデム（100 mg/kg）又は媒体（0.5%MC）を経口投与した。ロータロッド試験は，投与の 2 時間前，並びに 0.5，2.0，3.5 及び 5.0 時間後に，ロッドから落下するまでの時間を 180 秒間測定した。ロッドは，180 秒間の測定時間中に 0 rpm から 40 rpm に加速回転させた。

その結果，図 2.6.2-15 に示すように，媒体投与群は，ほぼ 180 秒間ロッド上に滞留した。本薬投与群も，媒体投与群と同程度の滞留時間を示した。一方，ゾルピデムは，投与 0.5 及び 2.0 時間後のロータロッド上への滞留時間を減少させた。なお，ゾルピデム投与の滞留時間の減少には回復性がみられた。

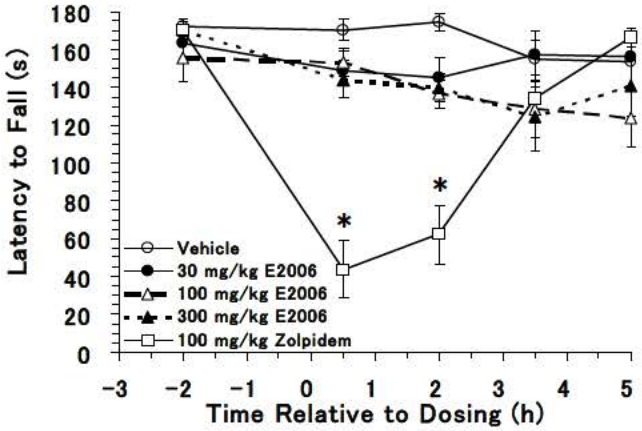


図 2.6.2-15 C57BL/6 マウスにおける協調運動に対するレンボレキサント及びゾルピデムの影響

データは平均値±標準誤差（11 例/群）を示す。E2006＝ レンボレキサント． * P<0.05 は，共変量として投与 2 時間前の値を用い，媒体対照群に対して経時型共分散分析後，共分散分析により解析した。出典：添付資料 4.2.1.2.5（W-20110154［参考］）

2.6.2.3.6 マウスにおけるエタノール麻酔の持続に対するレンボレキサントの影響（添付資料 4.2.1.2.6, 試験番号 W-20110180［参考］）

マウスにエタノールを腹腔内投与し，エタノール麻酔の持続に対するレンボレキサント，アルモレキサント及びゾルピデムの影響を検討した。アルモレキサントはオレキシン受容体拮抗剤であり，ゾルピデムは対照睡眠薬として用いた。

雄 C57BL/6 マウス（13 週齢）を用いて，本薬（1，3，10，30，100，300 mg/kg），ゾルピデム（3，

10, 30 mg/kg），アルモレキサント（30, 100, 300 mg/kg）又は媒体（0.5%MC）を経口投与した。5 分後，エタノール（3 g/kg）を腹腔内投与した。レンボレキサント，ゾルピデム及びアルモレキサントの睡眠に対する最小有効量は，それぞれ 1，3 及び 30 mg/kg であった（2.6.2.2.2.1 項参照）。よって，本試験で用いた用量は，最小有効量の 1，3 及び 10 倍である。なお，本薬のみ，300 倍まで用量を上げて実験した。

その結果を図 2.6.2-16 に示す。本薬及びアルモレキサントは，エタノール麻酔の持続に影響しなかった。一方，ゾルピデムは 10 mg/kg 以上の用量でエタノール麻酔の持続を延長させた。

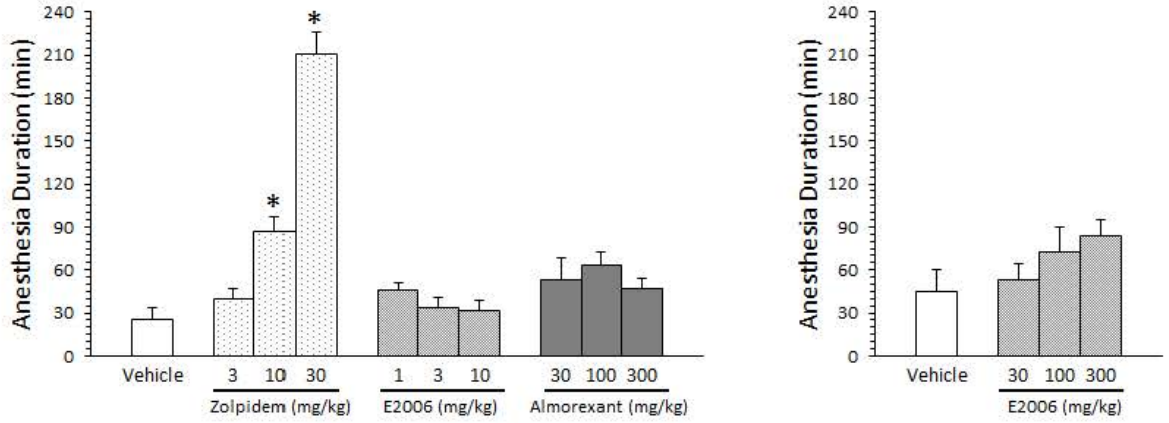


図 2.6.2-16 C57BL/6 マウスにおけるエタノール麻酔に対するゾルピデム，レンボレキサント及びアルモレキサントの影響

データは平均値±標準誤差（6 例/群）を示す。E2006＝ レンボレキサント．＊$P<0.05$ は，媒体対照群に対して一元配置分散分析後，Dunnett 検定により解析した。出典：添付資料 4.2.1.2.6（W-20110180［参考］）

2.6.2.4 安全性薬理試験

レンボレキサントの心血管系パラメータに対する評価は，2 つの GLP 試験（in vitro hERG 試験及び覚醒カニクイザルのテレメトリ試験）及び 2 つの探索的試験（麻酔ビーグル犬の心血管系試験及び覚醒ビーグル犬のテレメトリ試験）結果に基づいて実施された。2 つの in vitro 試験（CHO 細胞における IKs 試験及び hES 細胞における FPD 試験）及び 1 つの in vivo 試験（覚醒カニクイザルの消灯時間前投与によるテレメトリ試験）も，QT 間隔延長の性質に関する追加の情報を得るために実施した。中枢神経系及び呼吸器系の評価については，SD ラットにおける拡張型単回投与毒性試験の中で機能観察総合評価（FOB）及び呼吸パラメータ測定を実施した。安全性薬理試験のリストは，表 2.6.2-6 に示した。

表 2.6.2-6 安全性薬理試験のリスト

Type of Study and Test System	GLP Compliance	Reference Number
CHO cells transfected with hERG	GLP	添付資料 4.2.1.3.1（SBL038-047）
CHO cells transfected with hERG	Non-GLP	添付資料 4.2.1.3.2（W-20140611［参考］）
CHO cells transfected with KCNQ1/KCNE1	Non-GLP	添付資料 4.2.1.3.3（T11038［参考］）
hES cell-derived cardiomyocytes	Non-GLP	添付資料 4.2.1.3.4（T11031［参考］）
Anesthetized beagle dog CV study	Non-GLP	添付資料 4.2.1.3.5（W-20110322［参考］）
Conscious beagle dog telemetry CV study	Non-GLP	添付資料 4.2.1.3.6（W-20110279［参考］）
Conscious cynomolgus monkey telemetry CV study	GLP	添付資料 4.2.1.3.7（S10117）
Conscious cynomolgus monkey telemetry CV study by administration before habitual sleeping time	Non-GLP	添付資料 4.2.1.3.8（T11037［参考］）
FOB test in SD rats	GLP	添付資料 4.2.3.1.2（S10120）
Measurement of respiratory parameters by whole body plethysmography in SD rats	GLP	添付資料 4.2.3.1.2（S10120）

CV = cardiovascular, FOB = functional observational battery, GLP = Good Laboratory Practice, hERG = human ether-à-go-go related gene, hES = human embryonic stem, SD = Sprague Dawley.

2.6.2.4.1 In Vitro 安全性薬理

2.6.2.4.1.1 hERG チャネル発現 CHO 細胞における hERG カリウム電流に及ぼす影響（添付資料 4.2.1.3.1，試験番号 SBL038-047）

hERG チャネル遺伝子を安定的に導入した CHO 細胞を用いて，レンボレキサント（0，1，3 及び 10 μmol/L）の hERG カリウム電流に及ぼす影響を評価した。レンボレキサントは濃度依存的に hERG カリウム電流を阻害し，IC_{50} 値は 6.1 μmol/L であった。

2.6.2.4.1.2 hERG チャネル発現 CHO 細胞における M4，M9 及び M10 の hERG カリウム電流に及ぼす影響（添付資料 4.2.1.3.2，試験番号 W-20140611［参考］）

hERG チャネル遺伝子を安定的に導入した CHO 細胞を用いて，レンボレキサントの 3 つの代謝物 M4，M9 及び M10（0，1，3，10 及び 30 μmol/L）の hERG カリウム電流に及ぼす影響を評価した。M4，M9 及び M10 は，濃度依存的に hERG カリウム電流を阻害し，IC_{50} 値は，それぞれ 5.2，11.2 及び 9.0 μmol/L であった。

2.6.2.4.1.3 KCNQ1/KCNE1 チャネル発現 CHO 細胞における IKs 電流に及ぼす影響（添付資料 4.2.1.3.3，試験番号 T11038［参考］）

KCNQ1/KCNE1 チャネル遺伝子を安定的に導入した CHO 細胞を用いて，レンボレキサント（0，1，3，10 及び 30 μmol/L）の IKs 電流に及ぼす影響を評価した。レンボレキサントは，濃度非依存的で部分的に IKs 電流を阻害した。統計学的に有意な阻害は 10 μmol/L でのみ認められ，24.3%であった。

2.6.2.4.1.4 ヒト胚性幹由来心筋細胞における細胞外電位持続時間（FPD）に及ぼす影響（添付資料 4.2.1.3.4，試験番号 T11031［参考］）

ヒト胚性幹由来心筋細胞を用いて，レンボレキサント（0，1，3，10 及び 30 μmol/L）の FPD に及ぼす影響を評価した。レンボレキサントは，濃度依存的に FPD を延長し，10 μmol/L で約 10%延長した。

2.6.2.4.2 In Vivo 安全性薬理

2.6.2.4.2.1 心血管系

麻酔イヌにおける静脈内投与による心拍数，血圧及び心電図に及ぼす影響（探索的試験）（添付資料 4.2.1.3.5，試験番号 W-20110322［参考］）

探索的試験として，麻酔ビーグル犬（3 例）にレンボレキサントの 0，0.36，1.08 及び 3.6 mg/kg を静脈内持続投与し，心拍数，血圧及び ECG に及ぼす影響を評価した。

レンボレキサントは，血漿中濃度 753.1 ng/mL（0.36 mg/kg，静脈内持続投与，持続投与速度 0.018 mg/kg/min）まで ECG 及び血行動態に影響を及ぼさなかった。血漿中濃度 1802.7 及び 6958.0 ng/mL で，PQ 間隔は，それぞれ 4.7 及び 15.0%短縮した。血漿中濃度 4936.0 ng/mL で，心拍数は 13.8%増加し，血圧は 7.8%低下した。その他のパラメータに関しては，いずれの用量でも影響はみられなかった。

覚醒イヌにおける経口投与による心拍数，血圧及び心電図に及ぼす影響（探索的試験）（添付資料 4.2.1.3.6，試験番号 W-20110279［参考］）

探索的試験として，覚醒ビーグル犬（3 例）にレンボレキサントの 0，10 及び 30 mg/kg を単回経口投与し，心拍数，血圧及び ECG に及ぼす影響を評価した。レンボレキサントは，30 mg/kg（血漿中濃度 973.8 ng/mL）まで心拍数，血圧及び ECG に影響を及ぼさなかった。ケージサイドの観察では，10 mg/kg で投与 1.25 時間後に泥状便，粘液便及び流涎が観察された。さらに，赤色粘液便が，30 mg/kg の投与 1.25 時間後にみられた。嘔吐が，10 及び 30 mg/kg 群の全例でみられたことから，30 mg/kg より高い用量では評価できなかった。

覚醒サルにおける経口投与による心拍数，血圧及び心電図に及ぼす影響（添付資料 4.2.1.3.7，試験番号 S10117）

覚醒カニクイザル（雄 4 例）にレンボレキサントの 0，10，30 及び 100 mg/kg を単回経口投与し，心拍数，血圧及び ECG に及ぼす影響を評価した。レンボレキサントは全動物において 100 mg/kg まで血圧，心拍数，PR 間隔及び QRS 時間に影響を及ぼさなかった。10 mg/kg では QT 及び QTc（Bazett 式補正）間隔に影響を及ぼさなかった。30 及び 100 mg/kg で，統計学的に有意な QTc 間隔の最大延長が投与後 2 及び 4 時間に認められた。その変化は，投与前値に対して 30 mg/kg で 6.3%，100 mg/kg で 4.2%であり，用量依存性はなかった。QTc 間隔は投与後 8 時間まで持続した。レンボレキサントは，投与後 1，2 及び 4 時間に全ての用量で睡眠行動を誘発した。30 mg/kg の血漿中濃度は，投与 2 及び 4 時間後でそれぞれ 1335 及び 1316 ng/mL であった。

覚醒サルにおける消灯時間前投与による心拍数，血圧及び心電図に及ぼす影響（添付資料 4.2.1.3.8，試験番号 T11037［参考］）

覚醒カニクイザル（雄 4 例）にレンボレキサントの 0，30 及び 100 mg/kg を消灯時間約 0.5 時間前に経口投与し，心拍数，血圧及び ECG に及ぼす影響を評価した。レンボレキサントは，30 mg/kg で心拍数，血圧，PR 間隔，QRS 時間，QT 間隔及び QTc 間隔に影響を及ぼさなかった。100 mg/kg で QTc 間隔は，投与後 4 から 12 時間の間，投与前値に対して 9.5%から 11.0%延長した。投与後 4 時間の QTc 間隔の延長は，対照と比較して統計学的に有意であった。100 mg/kg では，心拍数，血圧，PR 間隔，QRS 時間及び QT 間隔に影響はみられなかった。いずれの用量においても一般症状に異常はみられなかったが，ビデオ観察から全ての動物で睡眠がみられた。100 mg/kg の血漿中濃度は，投与後 4 及び 14 時間で，それぞれ 2167 及び 3193 ng/mL であった。

2.6.2.4.2.2 中枢神経系
ラットにおける拡張型単回投与毒性試験（添付資料 4.2.3.1.2, 試験番号 S10120）

SD ラット（雄 6 例/群）にレンボレキサントの 0，100，300 及び 1000 mg/kg を経口投与し，中枢神経系に及ぼす影響をラットにおける拡張型単回投与毒性試験の中で評価した。中枢神経系の項目（ホームケージ，ハンドリング時及びオープンフィールドでの観察，後肢着地開足幅，前肢及び後肢握力，直腸温度）は FOB 法で実施した。1000 mg/kg まで中枢神経系に影響を及ぼさなかった。

2.6.2.4.2.3 呼吸系
ラットにおける拡張型単回投与毒性試験（添付資料 4.2.3.1.2, 試験番号 S10120）

SD ラット（雄 6 例/群）にレンボレキサントの 0，100，300 及び 1000 mg/kg を経口投与し，呼吸系（呼吸数，1 回換気量及び分時換気量）に及ぼす影響をラットにおける拡張型単回投与毒性試験の中で評価した。1000 mg/kg まで呼吸系に影響を及ぼさなかった。

2.6.2.5 薬力学的薬物相互作用試験
該当資料なし。

2.6.2.6 考察及び結論
レンボレキサントは，OX1R 及び OX2R 両方に対し競合的拮抗を示すデュアルオレキシン受容体拮抗剤であり，OX2R により強い親和性を有する。スボレキサントは不眠症治療薬として初めて承認されたデュアルオレキシン受容体拮抗薬であり，OX1R と OX2R を同程度に拮抗する（Beuckmann, et al., 2017）。ヒト OX1R 及び OX2R に対する本薬とスボレキサントの in vitro 活性を表 2.6.2-7 に示した。OX1R と OX2R のどちらがより覚醒／睡眠に寄与しているかは，未だ十分に解明されていないが，OX2R の方が覚醒／睡眠の調整により重要な役割を担っていることが示唆されている（Akanmu and Honda, 2005; Dugovic, et al., 2009; Hondo, et al., 2010）。さらに，デュアルオレキシン受容体拮抗剤は，どちらか片方のオレキシン受容体拮抗剤より強い睡眠促進作用があると考えられている（Morairty, et al., 2012）。

表 2.6.2-7 ヒト OX1R 及び OX2R に対するレンボレキサントとスボレキサントの比較

Assay	Lemborexant		Suvorexant	
	hOX1R	hOX2R	hOX1R	hOX2R
Binding affinity	IC_{50}: 6.1 nmol/L	IC_{50}: 2.6 nmol/L	IC_{50}: 8.8 nmol/L K_i: 0.55 nmol/L[a]	IC_{50}: 12.0 nmol/L K_i: 0.35 nmol/L[a]
Binding kinetics	k_{on}: 0.0262 L·nmol^{-1}·min^{-1}	k_{on}: 0.0496 L·nmol^{-1}·min^{-1}	k_{on}: 0.049 L·nmol^{-1}·min^{-1}[a]	k_{on}: 0.0052 L·nmol^{-1}·min^{-1} 0.00763 L·nmol^{-1}·min^{-1}[a]
	k_{off}: 0.244 min^{-1}	k_{off}: 0.0626 min^{-1}	k_{off}: 0.0085 min^{-1}[a]	k_{off}: 0.0164 min^{-1} 0.0078 min^{-1}[a]
Cell-based functional reporter enzyme assay	K_i: 14.1 nmol/L	K_i: 0.391 nmol/L	—	—
Cell-based calcium mobilization assay	K_i: 8.1 nmol/L 4.8 nmol/L	K_i: 0.48 nmol/L 0.61 nmol/L	IC_{50}: 49.9 nmol/L[a] K_i: 1.4 nmol/L	IC_{50}: 54.8 nmol/L[a] K_i: 2.2 nmol/L

hOX1R＝ヒト OX1R, hOX2R＝ ヒト OX2R, IC_{50}＝50%阻害濃度, K_i =阻害定数, k_{off} =解離定数, k_{on}＝ 結合定数, — ＝ 該当なし.

a: PMDA ウェブサイト（http://www.pmda.go.jp/PmdaSearch/iyakuSearch/）より引用。
出典：添付資料 4.2.1.1.1（M10032），添付資料 4.2.1.1.2（100026610），添付資料 4.2.1.1.3（M14007），添付資料 4.2.1.1.4（W-20110320［参考］），添付資料 4.2.1.1.5（M16023），Beuckmann, et al., 2017.

レンボレキサントの OX1R 及び OX2R に対する内在性基質を用いたシルドプロットの傾きは全て約 1 であったため，OX1R 及び OX2R のオルソステリック結合部位（内在性基質の結合部位と同一）に対する競合的な阻害剤であることが示された。さらに，ヒト及びマウス OX2R において，3 種の異なるペプチドアゴニストに対して同様の阻害作用を示したことから，オルソステリックであることが確認された（Kenakin, 2004）。In silico 分子ドッキング法においても，本薬のヒト OX1R 及び OX2R に対する結合部位はオルソステリックであると予測され（Beuckmann, et al., 2017），スボレキサントの OX1R（Yin, et al., 2016）及び OX2R（Yin, et al., 2015）に対する結合部位と同様であった。

In vivo 試験では，マウスにおいて，本薬は 1 mg/kg（経口）以上で総睡眠時間を増加させ，ラットにおいて，本薬の総睡眠時間の増加に対する ED_{50} 値は 4.4 mg/kg（経口）であった。マウス，ラットとも，媒体投与群と比較して総睡眠時間に対するレム睡眠時間の割合に有意な違いは認められなかったことから，本薬は生理的な睡眠を増加させることが期待される。毒性試験の一般症状の変化として，ウサギ及びサルにおいて，10 mg/kg（経口）から睡眠誘発様作用（部分閉眼，傾眠）が見られており，ウサギ及びサルにおいても，オレキシン受容体に対する阻害作用があると考えられた。本薬は，プレプロオレキシン遺伝子（*Hcrt*）欠損マウス及びオレキシン神経欠損マウス（orexin/ataxin-3 Tg/+）において 30 mg/kg（経口）でも睡眠時間を増加しなかったことから，本薬の睡眠時間増加作用はオレキシン受容体シグナル伝達を介すると考えられた。ラット機能性評価試験において，OX2R 選択的ペプチドアゴニスト誘発 ACTH 分泌促進を抑制したことから，OX2R 拮抗剤として作用することが確認された。また，ラットに本薬（30 mg/kg）を 3 週間経口投与後 2 日間休薬した試験において，3 週間の投与期間中の効果に耐性は認められず，休薬による反跳性不眠も観察されなかった。

一方，マウス及びラット試験において，広く不眠症治療に用いられている非ベンゾジアゼピン系入眠剤のゾルピデムは，総睡眠時間に対するレム睡眠時間の割合を減少させた。ゾルピデ

ムが総睡眠時間に対するレム睡眠時間の割合を減少させることは，一般的に知られている（Renger, et al., 2004）。また，ゾルピデムはラットにおける 3 週間経口投与後 2 日間休薬した試験において，耐性及び休薬による反跳性不眠を惹き起こしたが，同様の事象が Ebert, et al.（2008）によって報告されている。

ヒト血漿中で認められた 12 種の主な代謝物のうち，9 種の代謝物（M3，M4，M7，M8，M9，M10，M13，M14 及び M15）は，本薬と同程度のヒトオレキシン受容体結合性を示した。これら代謝物のうち M4，M9 及び M10 は，ヒト血漿中で比較的高い暴露を示すことから，血漿中非結合型暴露量及び OX2R に対する in vitro 結合親和性を基に，本薬，M4，M9 及び M10 のヒトにおける睡眠誘発効果への寄与率を見積もった（2.6.4.9 項，表 2.6.4-27 参照）。C_{max} 及び AUC ベースでの薬理作用への寄与率は，それぞれ本薬で 62.3%及び 46.7%，M4 で 21.8%及び 28.0%，M9 で 6.8%及び 7.1%，M10 で 9.0%及び 18.2%であった。M4 は最も高い寄与を示したが，M4 が P 糖タンパク（P-gp）の基質であること，又，ラット及びサルにおける M4 の脳脊髄液／血漿中非結合型薬物濃度比が本薬の脳脊髄液／血漿中非結合型薬物濃度比よりも少なくとも 2 倍低いことを考慮すると，ヒトにおいて M4 の脳移行性は本薬の脳移行性よりも低いと考えられた。したがって，本薬（未変化体）がヒトにおける薬理作用に主に寄与していると考えられ，代謝物の寄与は低いと推察された（2.6.4.9 項参照）。

覚醒／睡眠の調整にかかわるオレキシン受容体以外の他の標的（$GABA_A$ 受容体における GABA 及びベンゾジアゼピン結合部位，プロスタグランジン D2 及び E2 受容体，セロトニン受容体，ノルアドレナリン受容体，ヒスタミン受容体，アセチルコリン受容体，ドーパミン受容体，ガラニン受容体，副腎皮質刺激ホルモン放出因子受容体）を含む，88 種中の 87 種の標的分子（代謝物は 86 種中の 85 種）に対して，本薬及び代謝物（M4，M9 及び M10）は結合性を示さなかった。唯一，MT1 受容体に結合性を示し，アンタゴニスト活性があることが確認された。しかし，細胞を用いた機能性試験における，MT1 受容体及び OX2R に対する本薬の K_i 値は，それぞれ 922 及び 0.48 nmol/L であり，十分な乖離があることから，本薬の MT1 受容体拮抗作用は臨床におけるメラトニンの催眠効果に影響しないと考えられる。また，$GABA_A$ 受容体は睡眠薬の主なターゲットとされてきたため，$GABA_A$ 受容体発現 HEK-293 細胞を用いてパッチクランプ法により機能性試験を行った。その結果，本薬は，$GABA_A$ 受容体の機能に影響しないことが確認された。

In vivo マウス試験において，本薬は，10 mg/kg（睡眠誘発用量の 10 倍）以上の経口投与で，強い陽性情動刺激であるチョコレートと併用により有意にカタプレキシー様症状を惹き起こした。この結果は，本薬がカタプレキシーを惹き起こす可能性を示唆しているが，臨床における相関性は不明である。

本薬は 300 mg/kg（睡眠誘発用量の 300 倍）の用量まで，マウスにおける協調運動やエタノール麻酔の持続に影響しなかった。一方，ゾルピデムは低用量から，マウスにおける協調運動を悪化させるだけでなくエタノール麻酔の持続を延長させた。ヒトにおいて，ベンゾジアゼピン及び非ベンゾジアゼピン系睡眠薬が，協調運動の悪化やエタノール麻酔の持続を延長させることが報告されている（Mets, et al., 2010）。

レンボレキサントは，hERG カリウム電流を IC_{50} 値 6.1 µmol/L で阻害した。本薬は，IKs を 10 µmol/L で有意に 24.3%阻害した。本薬は，濃度依存的に FPD を延長し，10 µmol/L で約 10%

延長した。麻酔イヌにおける静脈内持続投与及び覚醒イヌにおける経口投与の探索的試験において，それぞれ 6958.0 及び 973.8 ng/mL の血漿中濃度で QTc 間隔の延長はみられなかった。しかし，本薬は，覚醒サルに 30 及び 100 mg/kg の日中投与で QTc 間隔を統計学的に有意に延長し，その延長は投与前値に対して 30 mg/kg で 6.3%及び 100 mg/kg で 4.2%であった。30 mg/kg 投与後の血漿中濃度は，投与後 2 及び 4 時間で，それぞれ 1335（血漿中遊離型濃度 235.0 ng/mL）及び 1316 ng/mL（血漿中遊離型濃度 231.6 ng/mL）であった。覚醒サルに 100 mg/kg の消灯時間前投与においても QTc 間隔の有意な延長がみられた。投与後 4 から 12 時間の間，投与前値に対して 9.5%から 11.0%延長した。投与後 4 時間の QTc 間隔の延長は，統計学的に有意であった。100 mg/kg 投与後の血漿中濃度は，投与後 4 及び 14 時間でそれぞれ 2167（血漿中遊離型濃度 381.4 ng/mL）及び 3193 ng/mL（血漿中遊離型濃度 561.9 ng/mL）であった。

In vitro の 3 試験において，1 μmol/L 以上で hERG チャネルの阻害活性を示し，10 μmol/L で IKs チャネルの阻害活性を示し，10 μmol/L 以上で hES 細胞由来心筋細胞の FPD 延長作用を示した。両イオンチャネルの阻害の程度は大きくないが，両チャネルの阻害は，FPD 及び QTc 間隔の延長に相乗的に寄与した可能性がある。覚醒サルに本薬を日中投与（30 及び 100 mg/kg）及び消灯時間前投与（100 mg/kg）した際，QTc 間隔を延長する用量に差があった。日中投与後の覚醒サルにおける QTc 間隔延長は，明確な用量依存性はなかった。反復投与臨床試験において，400 ng/mL（Murphy, et al., 2017）まで暴露しても QTc 間隔の延長が検出されなかったことは，臨床における QT 延長リスクがほとんどないことを示唆している。

中枢神経系及び呼吸系に対する本薬の影響を SD ラットにおける拡張型単回投与毒性試験の中で評価した。1000 mg/kg まで中枢神経系及び呼吸系に影響はなかった。このことから中枢神経系及び呼吸系の有害作用を起こす可能性は低いと考えられた。

以上より，レンボレキサントは，他の標的に対して作用を示さず，オレキシン受容体に高い結合性と選択性を持つデュアルオレキシン受容体拮抗薬であることが確認された。薬力学試験の結果から，本薬は，速やかに生理的な睡眠を誘発し，長期投与による耐性や休薬による反跳性不眠を惹き起こさないと考えられた。さらに，本薬は，ベンゾジアゼピン及び非ベンゾジアゼピン系睡眠薬にみられる転倒リスクの増加やアルコールの作用に対する影響がないと考えられた。

2.6.2.7 図表

図表は本文中に記載した。

2.6.2.8 参考文献

Akanmu MA, Honda K. Selective stimulation of orexin receptor type 2 promotes wakefulness in freely behaving rats. Brain Res. 2005;1048:138–45.

Asahi S, Egashira SI, Matsuda M, Iwaasa H, Kanatani A, Ohkubo M, et al. Development of an orexin-2 receptor selective agonist, [Ala^{11}, D-Leu^{15}]orexin-B. Bioorg Med Chem Lett. 2003;13:111–3.

Beuckmann CT, Suzuki M, Ueno T, Nagaoka K, Arai T, Higashiyama H. In vitro and in silico characterization of lemborexant (E2006), a novel dual orexin receptor antagonist. J Pharmacol Exp Ther.

2017;362:287–95.

Chang H, Saito T, Ohiwa N, Tateoka M, Deocaris CC, Fujikawa T, et al. Inhibitory effects of an orexin-2 receptor antagonist on orexin A- and stress-induced ACTH responses in conscious rats. Neurosci Res. 2007;57:462–6.

Dauvilliers Y, Siegel JM, Lopez R, Torontali ZA, Peever JH. Cataplexy—clinical aspects, pathophysiology and management strategy. Nat Rev Neurol. 2014;10:386–95.

Dimitrov EL, DeJoseph MR, Brownfield MS, Urban JH. Involvement of neuropeptide Y Y1 receptors in the regulation of neuroendocrine corticotropin-releasing hormone neuronal activity. Endocrinol. 2007;148:3666–73.

Dugovic C, Shelton JE, Aluisio LE, Fraser IC, Jiang X, Sutton SW, et al. Blockade of orexin-1 receptors attenuates orexin-2 receptor antagonism-induced sleep promotion in the rat. J Pharmacol Exp Ther. 2009;330:142–51.

Ebert B, Anderson NJ, Cremers TI, Rasmussen S, Vogel V, Fahey JM, et al. Gaboxadol—a different hypnotic profile with no tolerance to sleep EEG and sedative effects after repeated daily dosing. Pharmacol Biochem Behav. 2008;90:113–22.

Hara J, Beuckmann CT, Nambu T, Willie JT, Chemelli RM, Sinton CM, et al. Genetic ablation of orexin neurons in mice results in narcolepsy, hypophagia, and obesity. Neuron. 2001;30:345–54.

Hondo M, Nagai K, Ohno K, Kisanuki Y, Willie JT, Watanabe T, et al. Histamine-1 receptor is not required as a downstream effector of orexin-2 receptor in maintenance of basal sleep/wake states. Acta Physiol. 2010;198:287–94.

Jászberényi M, Bujdosó E, Pataki I, Telegdy G. Effects of orexins on the hypothalamic-pituitary-adrenal system. J Neuroendocrinol. 2000;12:1174–8.

Kenakin T. Allosteric modulators:　the new generation of receptor antagonist. Mol Interv. 2004;4:222–9.

Mets MAJ, Volkerts ER, Olivier B, Verster JC. Effect of hypnotic drugs on body balance and standing steadiness. Sleep Med Rev. 2010;14:259–67.

Morairty SR, Revel FG, Malherbe P, Moreau JL, Valladao D, Wettstein JG, et al. Dual hypocretin receptor antagonism is more effective for sleep promotion than antagonism of either receptor alone. PLoS One. 2012;7:e39131.

Murphy PJ, Yasuda S, Nakai K, Yoshinaga T, Hall N, Zhou M, et al. Concentration-response modeling of ECG data from early-phase clinical studies as an alternative clinical and regulatory approach to assessing

QT risk — experience from the development program of lemborexant. J Clin Pharmacol. 2017;57:96–104.

Oishi Y, Williams RH, Agostinelli L, Arrigoni E, Fuller PM, Mochizuki T, et al. Role of the medial prefrontal cortex in cataplexy. J Neurosci. 2013;33:9743–51.

Radulovacki M, Virus RM, Djuricic-Nedelson M, Green RD. Adenosine analogs and sleep in rats. J Pharmacol Exp Ther. 1984;228:268–74.

Renger JJ, Dunn SL, Motzel SL, Johnson C, Koblan KS. Sub-chronic administration of zolpidem affects modifications to rat sleep architecture. Brain Res. 2004;1010:45–54.

Sakurai T, Amemiya A, Ishii M, Matsuzaki I, Chemelli RM, Tanaka H, et al. Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. Cell. 1998;92:573–85.

Yin J, Babaoglu K, Brautigam CA, Clark L, Shao Z, Scheuermann TH, et al. Structure and ligand-binding mechanism of the human OX_1 and OX_2 orexin receptors. Nat Struct Mol Biol. 2016;23:293–9.

Yin J, Mobarec JC, Kolb P, Rosenbaum DM. Crystal structure of the human OX_2 orexin receptor bound to the insomnia drug suvorexant. Nature. 2015;519:247–50.