目次

略語・略号一覧 2
2.6 非臨床試験の概要文及び概要表 3
2.6.1 緒言 3

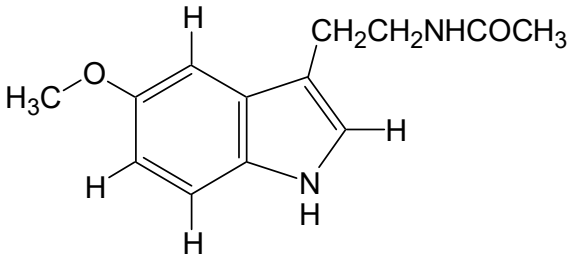
略語・略号一覧

略語・略号	内容
ASD	自閉スペクトラム症 (Autism spectrum disorder)
MT	メラトニン (Melatonin)

2.6 非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.1 緒言

本剤の適応疾患は、小児期の神経発達症に伴う入眠困難の改善である。本剤は1 g中にメラトニン（MT）2 mgを含む顆粒0.2%の製剤であり、添加物としてD-マンニトール、ヒドロキシプロピルセルロース、軽質無水ケイ酸を含んでいる。MTの構造式を以下に示す（図 2.6.1-1）。



分子式：$C_{13}H_{16}N_2O_2$

分子量：232.28

図 2.6.1-1 メラトニンの構造

現在、国内において、小児期の神経発達症に伴う入眠困難の改善を効能・効果とする処方薬は承認されていない。不眠症治療薬としては、従来からベンゾジアゼピン系や非ベンゾジアゼピン系睡眠薬が使用されており、さらに2010年に承認されたMT受容体アゴニストのラメルテオン及び 2014 年に承認されたオレキシン受容体拮抗薬のスボレキサントが睡眠障害の治療薬として処方されている。これらの薬剤は神経発達症に伴う睡眠障害の治療にも使用されているが、効能・効果としては承認されていない。この他、MT自体は医薬品として承認されてはいないが、自閉スペクトラム症（ASD）などの神経発達症の小児の睡眠障害に対し、数多くの臨床試験においてMTの有効性が報告されていることからMTの輸入サプリメントや試薬が使用されている。

一方、海外ではMT製剤として、Neurim社（イスラエル）により「55歳以上の原発性不眠症」を効能･効果とするCircadin®が2007年に欧州で､2009年にオーストラリアで承認されている。その後、Neurim社は、MTの小児用製剤を開発し、2018年に欧州において「ASD又はスミス・マゲニス症候群を伴う2～18歳の小児又は青年の不眠症」の効能・効果で承認を取得している。

MTは松果体においてL-トリプトファンからセロトニンのN-アセチル化とこれに続くO-メチル化を経て合成されるホルモンであり、MTの血中濃度は夜間に高く、昼間は低い。MTは睡眠覚醒サイクルなど概日リズムの調節に重要な役割を果たしている。

夜間における松果体からの MT 分泌の低下と神経発達症の患者でみられる睡眠障害との関連性に関し､神経発達症では夜間の血中MT濃度の低下が睡眠障害の一因であると考えられている。

本剤の主成分であるMTの睡眠作用に関し、効力を裏付ける試験において入眠潜時短縮作用、総睡眠時間の増加作用及び概日リズムの再同調作用などが認められ、睡眠構造には影響を与え

なかったことから、MT の睡眠作用は自然睡眠に近いものであった。また、現在市販されている鎮静型睡眠薬でみられる筋弛緩作用に伴う運動障害、前向性健忘作用による学習障害、持ち越し効果及び睡眠構造の変化などの作用は MT では認められなかった。従って、本剤は小児期の神経発達症に伴う入眠困難の改善に対し有用性及び安全性の高い治療薬となりうると考えられる。

非臨床試験において、MT の効力を裏付ける試験、副次的薬理試験については、1958 年の MT の発見以来、多数の非臨床及び臨床試験に関する文献が報告されていることから、新たな薬理試験は実施せず PubMed 検索により収集した文献の中から試験方法、使用された実験動物種などを考慮し、MT の睡眠改善作用に関する効力を裏付ける試験、副次的薬理試験の内容として適切と考えられる文献を採択し、CTD 様式に編集して参考資料とした。安全性薬理試験に関しても公表文献からの収集に加え、GLP に準拠して実施された反復投与毒性試験で得られた一般状態及び行動並びに循環器系に対する試験結果を用いて CTD を作成した。

薬物動態試験では、MT 単回投与時の吸収、たん白結合（in vitro）、血球移行（in vitro）、胎盤通過、代謝及び排泄については公表文献を使用し、CTD 様式に編集した。MT の反復投与時の血漿中濃度については毒性試験に付随するトキシコキネティクス試験の結果から評価した。分布試験では全身オートラジオグラフィー（白色及び有色ラット）による試験を実施し、薬物動態学的相互作用については、ガイドラインに準じた in vitro 試験を実施し評価した。

毒性試験では、イヌを用いた単回投与毒性試験、ラット及びイヌを用いた反復投与毒性試験、細菌、チャイニーズハムスター肺細胞及びラットを用いた遺伝毒性試験、ラット及びウサギを用いた生殖発生毒性試験並びに幼若ラットを用いた反復投与毒性試験を実施し評価した。これらの試験の内、用量設定試験及び検討試験を除くすべての試験は GLP に準拠して実施した。

なお、がん原性試験は実施しなかった。しかし、現在までに得られた MT の安全性試験成績、海外における MT の安全性情報、MT の生物学的特性及び MT 受容体作動薬の安全性情報を踏まえ、NPC-15（MT）のがん原性に関する知見について記述した。

MT の不純物の変異原性評価試験として、「潜在的発がんリスクを低減するための医薬品中 DNA 反応性（変異原性）不純物の評価及び管理ガイドライン（平成 27 年 11 月 10 日付け薬生審査発 1110 第 3 号）」に準拠し、NPC-15 の原薬製造工程由来の不純物＜2.3.S.3.2＞、製剤中に存在が予想される分解生成物＜2.3.P.5.5＞の化学構造について、対象となる 14 物質の in silico 変異原性予測を実施した。

目次

略語・略号一覧 2
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 4
2.6.2.2.1 in vitro 薬理試験 4
2.6.2.2.2 in vivo 試験 5
2.6.2.2.3 作用機序 14
2.6.2.3 副次的薬理試験 15
2.6.2.3.1 サルの MPTP 誘発パーキンソン病モデルにおける睡眠障害に対する作用 15
2.6.2.3.2 ラットのバルプロ酸曝露自閉症スペクトラム障害（ASD）モデルに対する作用 16
2.6.2.3.3 MT 及び 5-HT 受容体以外の神経伝達物質受容体親和性に対する作用 18
2.6.2.4 安全性薬理試験 18
2.6.2.4.1 中枢神経系に対する作用 18
2.6.2.4.2 循環器系に対する作用 21
2.6.2.4.3 呼吸器系（動脈血酸素飽和度）に対する作用 22
2.6.2.4.4 消化器系に対する作用 23
2.6.2.4.5 腎／泌尿器系に対する作用 24
2.6.2.4.6 自律神経系に対する作用 25
2.6.2.5 薬力学的薬物相互作用試験 26
2.6.2.6 考察及び結論 26
2.6.2.7 引用文献 29

略語・略号一覧

略語・略号	内容
ASD	自閉スペクトラム症（Autism spectrum disorder）
Cyclic AMP	環状アデノシン一リン酸（Cyclic adenosine monophosphate）
CHO	チャイニーズハムスター卵巣（Chinese hamster ovary（CHO））
DSPD	睡眠相後退障害（Delayed sleep-phase disorder）
GABA	γ-アミノ酪酸（γ-aminobutyric acid）
5-HT	セロトニン（Serotonin）
IC_{50}	最大阻害の半分を阻害する濃度
LS	浅いNREM（ノンレム）睡眠
MPTP	1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine
MT, Mel	メラトニン（Melatonin）
negative PAD	負の位相角差（Negative phase angel difference）
NREM睡眠	ノンレム睡眠
REM睡眠	レム睡眠
SCN	視交叉上核(Suprachiasmatic nucleus)
SE	睡眠効率（Sleep efficiency）
SOT	入眠時間（Sleep onset time）
SWS	徐波睡眠（Slow wave sleep）
TST	総睡眠時間（Total sleep time）
VPA	バルプロ酸ナトリウム（Sodium valproate）
WT	覚醒時間（Wake time）
ZT	ツァイトゲーバー時間：明周期の開始時刻をZT0（6:00），暗周期の開始時刻をZT12（18:00）とする12/12時間の明暗周期における体内時計の時刻

2.6.2 薬理試験の概要文

2.6.2.1 まとめ

in vitro メラトニン（MT）受容体結合親和性試験において、MT はヒト、サル及びニワトリの MT 受容体 1 及び 2 に対し、ピコモルオーダーの濃度で結合親和性を示したが、ハムスターの MT 受容体 3 に対する結合親和性はマイクロモルオーダーの濃度であり、MT 受容体 1 及び 2 のそれに比べて低かった。また、ヒト、ブタ及びラットのセロトニン（5-HT）受容体のサブタイプ（5-HT_{1A}、5-HT_{2A}、5-HT_{2B}及び5-HT_{2C}）に対し、5-HT_{1A}及び5-HT_{2B}受容体を除いて MT はほとんど結合親和性を示さなかった。しかしながら、MT の5-HT_{1A}及び5-HT_{2B}に対する親和性はマイクロモルオーダーと、MT 受容体への親和性に比べて低かった。MT はフォルスコリン誘発性環状アデノシン一リン酸（cyclic AMP）の生成を抑制した。

in vivo 試験において、MT を単回投与及び反復投与した無麻酔無拘束のサルに対し、入眠前に投与したとき、MT は入眠までの時間を短縮させるとともに睡眠総時間を増加させた。ネコにおいても MT を昼期に投与したとき、MT は入眠潜時を短縮させる傾向を示した。ラットの輪回し行動を指標に、明暗サイクルを前進させたときの概日リズムの再同調に対する MT の作用を検討した試験において、MT は再同調促進作用を示した。ラット睡眠相後退症候群（DSPD）モデルにおいて、後退した同調行動リズムは MT 投与により前進することが示された。

サルの 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine（MPTP）誘発パーキンソン病モデルにおいて認められた睡眠障害を MT は改善した。

ラットのバルプロ酸誘発性自閉症スペクトラム障害（ASD）モデルにおいて観察された社会性相互作用の低下を MT は回復させた。

安全性薬理試験において、コアバッテリーとして検討すべき中枢神経系、循環器系及び呼吸器系に加え、消化器系、腎泌尿器系及び自律神経系に対する MT の作用についても検討し評価した。MT の薬理作用と考えられるサルの体温低下作用以外では広い安全域が認められた。従って、MT が臨床用量付近の用量で中枢神経系、循環器系、呼吸器系、消化器系、腎泌尿器系及び自律神経系に影響を及ぼす懸念はほとんどないと推察された。

2.6.2.2 効力を裏付ける試験

2.6.2.2.1 in vitro 薬理試験

(1) MT 受容体親和性及びアゴニスト活性試験

＜添付資料 4.2.1.1-1（参考）、4.2.1.1-2（参考）＞

MT の MT 各種受容体に対する親和性に関しては、ニワトリ前脳（MT_1=Mel_{1a}、Mel_{1c}）、ハムスター全脳（MT_3）及びヒト又はサルの MT 受容体（MT_1 及び MT_2）遺伝子を導入したチャイニーズハムスター卵巣細胞（Chinese hamster ovary（CHO）細胞）を用いて競合的結合試験を行った。MT 受容体結合試験では放射性リガントとして 2-[^{125}I]-MT を用いた。MT のアゴニスト活性試験については、ヒトの MT 受容体（MT_1 及び MT_2）遺伝子を導入した CHO 細胞を用い、フォルスコリン誘発 cyclic AMP 生成反応の抑制を指標に IC_{50} 値を算出した。

MT の親和性試験結果を表 2.6.2-1 に示す。MT はヒト及びサルの MT_1 及び MT_2 受容体及びニワトリ前脳の MT 受容体に対し、ピコモルオーダーで親和性を示したのに対し、ハムスターの MT_3 受容体に対する親和性はナノモルオーダーで、MT_1 又は MT_2 受容体に対する親和性に比べ低かった。

アゴニスト活性試験で用いた MT の濃度は 0.01～1 nmol/L で、その試験結果を表 2.6.2-2 に示す。MT_1 及び MT_2 親和性試験結果と同様に MT のアゴニスト活性は MT_1 の方が MT_2 受容体に対するよりも若干強かった。

以上の結果をまとめると、MT は 3 種類の MT 受容体のうち、MT_1 及び MT_2 受容体に対する親和性及びアゴニスト活性は高く、MT_3 受容体に対しては低いことが明らかとなった。

表 2.6.2-1 MT の MT 各種受容体に対する親和性（K_i 値）

化合物	K_i					
	ニワトリ前脳 (pmol/L)[1)]	ハムスター全脳 MT_3 結合部位 (nmol/L)[1)]	ヒト MT_1 受容体遺伝子導入 CHO 細胞 (pmol/L)[1)]	ヒト MT_2 受容体遺伝子導入 CHO 細胞 (pmol/L)[1)]	サル MT_1 受容体遺伝子導入 CHO 細胞 (pmol/L)[2)]	サル MT_2 受容体遺伝子導入 CHO 細胞 (pmol/L)[2)]
MT	368±9	24.1±0.5	80.7±2.1	383±5	67.4±24.3	129±16.8

各データは 3 回の実験平均値結果（mean±S.E.M）、CHO:Chinese hamster ovary cell lines。
1):添付資料 4.2.1.1-1（参考）、2):添付資料 4.2.1.1-2（参考）。

表 2.6.2-2 MT のヒト受容体発現 CHO 細胞におけるフォルスコリン誘発 cAMP 生成抑制作用

化合物	IC_{50}(pmol/L)	
	ヒト MT_1 受容体	ヒト MT_2 受容体
MT	77.8±14.6	904（714-1150）

MT1 受容体：3 又は 4 回の実験結果の平均値（mean±SEM）、MT2 受容体：2 回の実験結果で、括弧内は 95%信頼区間を示す。

(2) 5-HT 受容体サブタイプに対する結合親和性試験

＜添付資料 4.2.1.1-1（参考）、4.2.1.1-3（参考）＞

5-HT 受容体に対する MT の結合親和性試験に関しては、ヒトの 5-HT 受容体（5-HT_{1A}、5-HT_{2A}、5-HT_{2B}及び5-HT_{2C}）、ラットの5-HT_{2A}及びブタの5-HT_{2C}受容体遺伝子を導入した CHO 細胞を用い、各種 5-HT 受容体の放射性リガント（5-HT_{2A}：[^{3}H]-ketanserin、5-HT_{2B}及び5-HT_{2C}：[^{3}H]-mesulergine、5-HT_{1A}：[^{3}H]-8-hydroxy-2-dipropylaminotetralin を用いた ）を用いて結合試験を行った。

結果を表 2.6.2-3 に示す。MT はヒト5-HT_{1A}及び5-HT_{2B}受容体に対し、マイクロオーダーと高濃度ではあるが親和性を示した。しかしながら、ヒト5-HT_{2A}及び5-HT_{2C}、ラット及びブタの 5-HT 受容体に対してはほとんど親和性を示さなかった。また、5-HT_{1B}、5-HT_2、5-HT_3、5-HT_4、5-HT_{5A}、5-HT_6及び5-HT_7受容体に対しても MT 10 μmol/L はほとんど結合親和性を示さなかった。

表 2.6.2-3 MT の 5-HT サブタイプ受容体に対する親和性（pK_i 値）

pKi（μmol/L）						
化合物	ヒト5-HT_{1A}受容体遺伝子導入 CHO 細胞 2)	ヒト5-HT_{2A}受容体遺伝子導入 CHO 細胞 1)	ヒト5-HT_{2B}受容体遺伝子導入 CHO 細胞 1)	ヒト5-HT_{2C}受容体遺伝子導入 CHO 細胞 1)	ラット5-HT_{2A}受容体遺伝子導入 CHO 細胞 1)	ブタ5-HT_{2C}受容体遺伝子導入 CHO 細胞 1)
MT	5.31*	<5.0	5.24±0.09	<5.0	<5.0	<5.0

各データは少なくとも 3 回の実験平均値（mean±S.E.M）、1):添付資料 4.2.1.1-3（参考）、2)添付資料 4.2.1.1-1（参考）、*:Ki 値＝5.6 μmol/L を pKi 値に変換した値。

2.6.2.2.2 in vivo 試験

(1) サルの睡眠に対する作用（単回投与試験）

＜添付資料 4.2.1.1-4（参考）＞

脳波測定用電極を装着した雌性カニクイザル（体重 2.5～4.9 kg）の無麻酔無拘束下における睡眠覚醒状態（覚醒、浅い NREM 睡眠（LS）、徐波睡眠（SWS）及びレム（REM）睡眠に分類）に対する MT 0.3、1 及び 3 mg/kg を投与したときの効果を検討した。12 時間明暗サイクル下において明期を 6:00～18:00、暗期を 18:00～6:00 とし、MT は 0.5%メチルセルロース溶液に懸濁後、経鼻カテーテルを鼻から胃内へ挿入し暗期直前の 17:50～17:59 に投与した。

LS 及び SWS の発現潜時に対する MT の結果を図 2.6.2-1 に示す。MT 0.3 mg/kg 投与では LS の有意な短縮作用が認められた。MT 1 mg/kg 投与では LS 及び SWS の短縮傾向が認められたもののその作用は有意ではなかった。MT 3 mg/kg は両睡眠潜時に対して影響を与えなかった。図 2.6.2-2 に示したように、総睡眠量に対し MT はいずれの投与量においても有意ではないが増加傾向を示した。

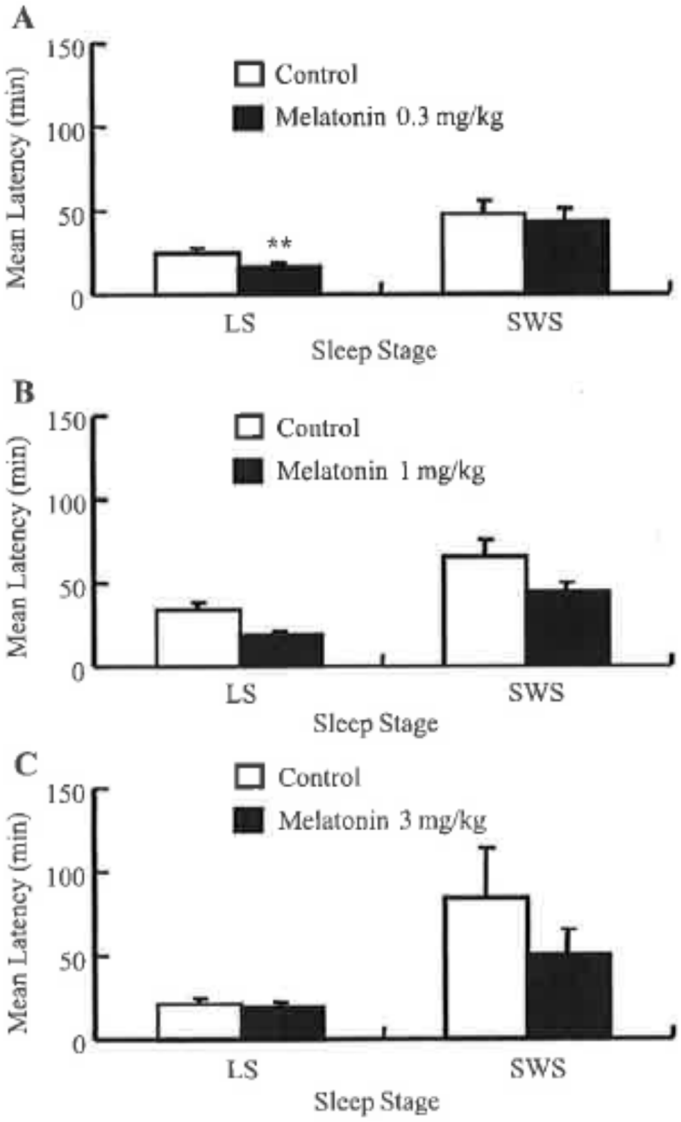


図 2.6.2-1 無麻酔無拘束サルの夜間入眠潜時に対する MT の作用

n=6～7、mean±SEM、**p<0.01 vs Control (paired t-test による比較)
LS：ステージ 1 及び 2 を含む浅い NREM 睡眠、
SWS：ステージ 3 及び 4 を含む徐波睡眠

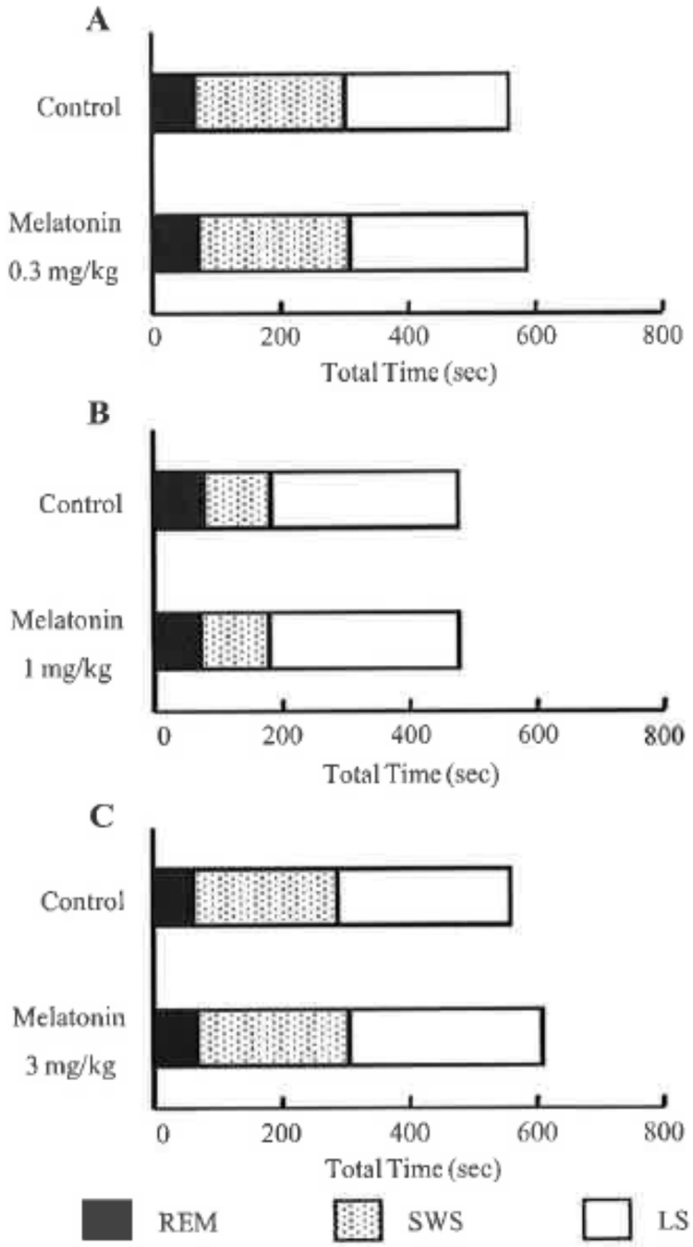


図 2.6.2-2 無麻酔無拘束サルの総睡眠時間に対する MT の作用

n=6～7、mean±SEM、
REM：レム睡眠、SWS：ステージ 3 及び 4 を含む徐波睡眠
LS：ステージ 1 及び 2 を含む軽睡眠

(2) サルの睡眠に対する作用（反復投与試験）

＜添付資料 4.2.1.1-5（参考）＞

3 種のサルを用いた。その内訳は 2 頭の雄性ブタオザル（5 及び 7 年齢）、3 頭の雌雄カニクイザル（4～7 年齢、雄 1 雌 2）及び 4 頭の雄性アカゲザル（5～7 年齢）の合計 9 頭である。これらのサルを 12 時間明期（6:00～18:00 時）／12 時間暗期（18～6 時）サイクル下で飼育した。なお、実験ではすべて Zeitgeber time（ツァイトゲーバー時間（ZT）：明周期の開始時刻

を ZT0（6:00），暗周期の開始時刻を ZT12（18:00）とする 12/12 時間の明暗周期における体内時計の時刻）を使用し、MT（投与量は 5～320 μg/kg）は暗期開始の 2 時間前にフルーツピューレに加えて経口投与し、対照群にはフルーツピューレのみを投与した。サルの入眠、睡眠効率、睡眠断片化及び運動活動量はアクチグラフィにより計測した。

9 頭のサルに MT 10 μg/kg を 3 日間連続経口投与したときの入眠潜時に対する作用を図 2.6.2-3 に示す。グラフはサルの個体毎の 3 日間の入眠時間の平均値を示しており、同一個体に対照又は MT を投与し、対照投与でみられた入眠潜時と MT 投与したときの入眠潜時の差を表している。MT 10 μg/kg を 3 日間連続投与したとき、MT は 3 種のサル、計 9 頭の入眠するまでに要する時間を有意（$p<0.05$ vs placebo）に短縮させた。この効果は MT 投与 1 時間以内に認められた。

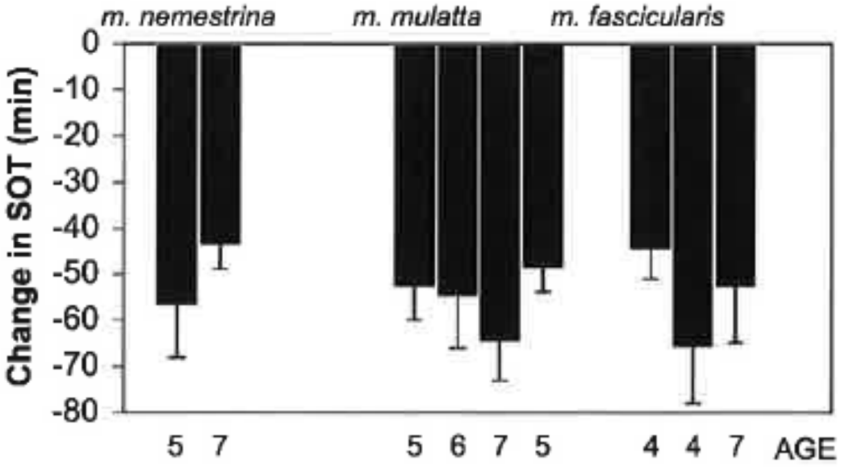


図 2.6.2-3 サルに MT 10 μg/kg を 3 日間連続経口投与したときの入眠潜時に対する作用

縦軸の SOT(Sleep onset time)：入眠潜時、横軸は各サルの年齢、m.nemestrine：ブタオザル、m.mulatta:アカゲザル、m.fascicularis:カニクイザル、各グラフは個体毎の 3 日間の mean±SEM を表す。同一個体において、メラトニン投与による入眠時間は対照投与に比べ有意に早まった（$p<0.05$）。

4 頭のアカゲザルに MT 5 μg/kg を 1 日/1 回、4 週間連続投与したときの入眠潜時に対する作用を図 2.6.2-4 に示す。MT 投与後 1、2、3 及び 4 週いずれの投与後も有意に入眠までの時間を促進させた（$p<0.05$：1 週間の対照投与に対し MT 投与後 1、2、3 及び 4 週との比較）が、起床時間には影響を与えなかった。また、MT 投与前 1 週、投与直後及び投与後 1 週間の入眠までに要した時間（h）はそれぞれ 2.1±0.11、0.8±0.06 及び 2.0±0.13 で、MT 投与により入眠までに要する時間は有意に短縮した（$p<0.0002$）。MT 投与終了後 2 日以内にサルの入眠時間及び昼間の活動量は MT 投与前のレベルまで回復した。

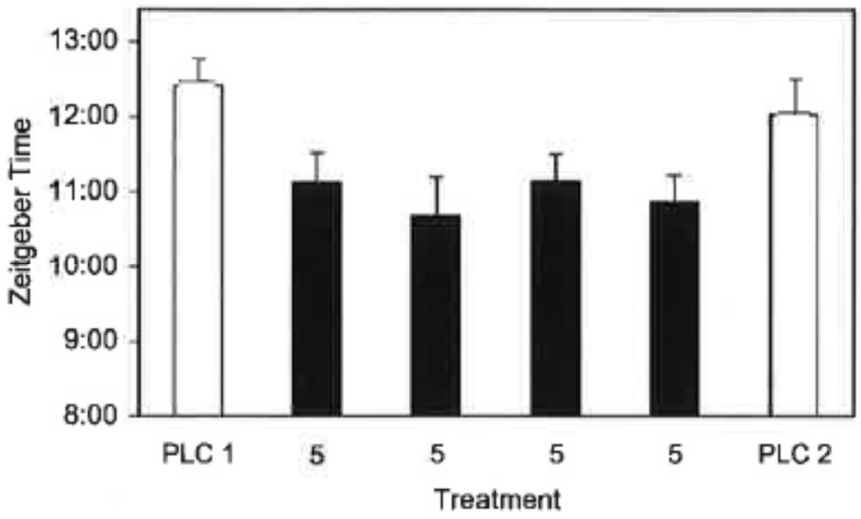


図 2.6.2-4 サルに MT5 μg/kg を 4 週間連続経口投与したときの投与 1、2、3 及び 4 週後の入眠時間に対する作用

Zeitgeber time:明周期の開始時刻を ZT0 (6:00), 暗周期の開始時刻を ZT12 (18:00) とする 12/12 時間の明暗周期における体内時計の時刻、PLC1:対照投与 1 週間後の値、PLC2：メラトニン投与終了後対照投与に切り替えて、その 1 週間後の値、黒棒グラフ：左からメラトニン投与後 1、2、3 及び 4 週後の値、n=4、グラフ：mean±SEM。

6 頭のサルに MT 5～320 (5、10、20、40、80、160 及び 320) μg/kg を 3 日間毎に漸増投与したときの入眠までに要する時間に対する作用を図 2.6.2-5 に示す。投与したすべての用量において MT は入眠潜時を短縮させた ($p<0.05$ vs 対照投与群) が、各投与群間における入眠潜時短縮作用の程度に差は認められなかった。また、MT は起床時間に対しても影響を与えなかった。MT の投与量に関し、低用量投与群 (5～20 μg/kg) と高用量投与群 (40～320 μg/kg) との 2 群に分けて試験成績を解析した結果、低用量投与群の総睡眠時間は増加していたが (対照投与群:9.7±0.85 h(時間)、MT 投与群 11.2±0.28 h、MT washout 後群:9.9±0.24 h、$p<0.02$)、夜間の睡眠効率に対しては影響を与えなかった。一方、高用量投与群では夜間の活動量は増加し (対照投与群：20.5±2.6 cpm、MT 投与群 29.3±2.7 cpm、MT washout 後群：20.3±2.3 cpm、$p<0.073$)、睡眠効率の低下と睡眠断片化の増加 (対照投与群：81.5±1.17%、MT 投与群 77.2±1.82%、MT washout 後群：82.5±2.0%、$p<0.02$) が認められた。

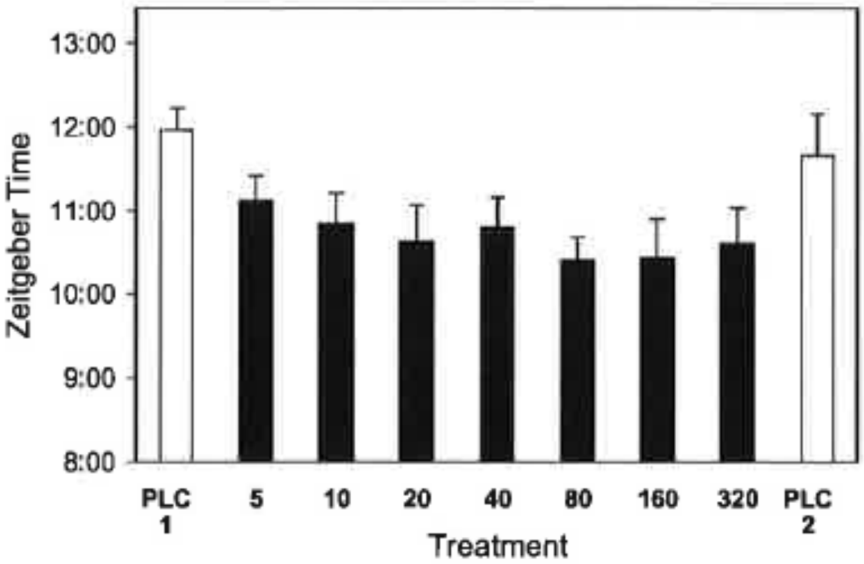


図 2.6.2-5 サルに MT 5～320（5、10、20、40、80、160 及び 320）μg/kg を 3 日間毎に漸増投与したときの入眠時間に対する作用

Zeitgeber time:明周期の開始時刻を ZT0（6:00），暗周期の開始時刻を ZT12（18:00）とする 12/12 時間の明暗周期における体内時計の時刻、PLC1:対照投与 3 日間後の値、
PLC2：MT 投与終了後対照投与に切り替えて、その 3 日間後の値、n=6、グラフ：mean±SEM。

MT の耐性発現又は MT の感受性変化の有無につき検討した結果を図 2.6.2-6 に示す。MT の漸増投与試験終了後 5 日に再度 MT 5 μg/kg を投与したときの入眠潜時短縮作用は、漸増投与前に投与した MT 5 μg/kg の作用と比較したとき、両者における MT の入眠潜時短縮作用の程度にはほとんど差が認められなかった。これらの MT 睡眠作用に関し、耐性発現及び感受性変化が認められなかった試験結果は図 2.6.2-3 及び図 2.6.2-4 の試験結果と一致する。

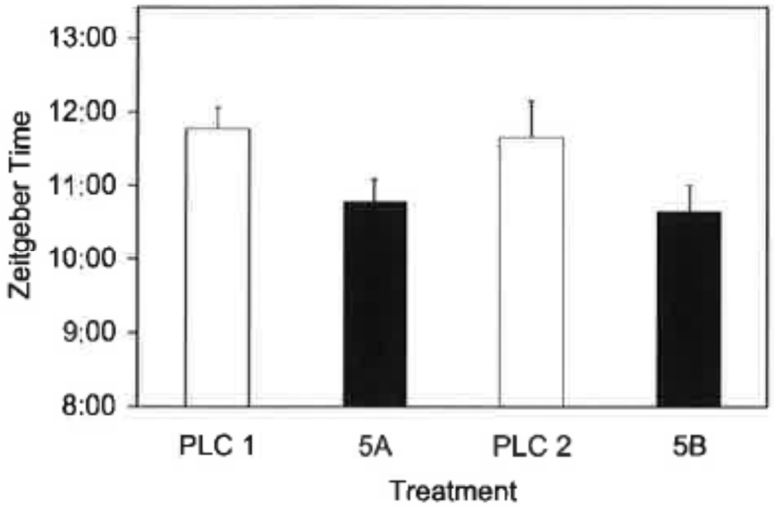


図 2.6.2-6 MT の連続投与による耐性発現又は感受性に対する影響

n=4、グラフ：mean±SEM、PLC1: 対照投与群、5A: メラトニンの漸増投与前に MT 5 μg/kg を投与した群、PLC2:washout 後に対照投与した群、5B:PLC2 群後に再び MT 5 μg/kg を投与した群

以上の結果から、ヒトにおけるMTの睡眠誘導作用はサルにおいても同様に認められることが明らかとなった。

(3) ネコの睡眠に対する作用（単回投与試験）

＜添付資料4.2.1.1-6（参考）＞

雌雄のネコ（体重2.5～6.1 kg）を用いた。ネコにペントバルビタール麻酔下で脳波記録用電極を埋め込み、回復後MTを経口投与（0.001、0.01、0.1及び1 mg/kg）した。無麻酔無拘束下のネコの覚醒（wakefulness)、徐波睡眠（SWS）及びレム（REM）睡眠に対する作用の結果を図 2.6.2-7に示す。MT 0.001 mg/kg投与では覚醒、徐波睡眠及びレム（REM）睡眠に対し、何ら影響を与えなかったが、MT 0.01及び0.1 mg/kg投与では徐波睡眠比率の有意な増加が認められた。MT 1 mg/kg投与では覚醒時間（WT）及び徐波睡眠比率の有意な増加が認められた。

以上の結果から、MTは自由行動下のネコの睡眠を増加させる作用を有することが示唆された。

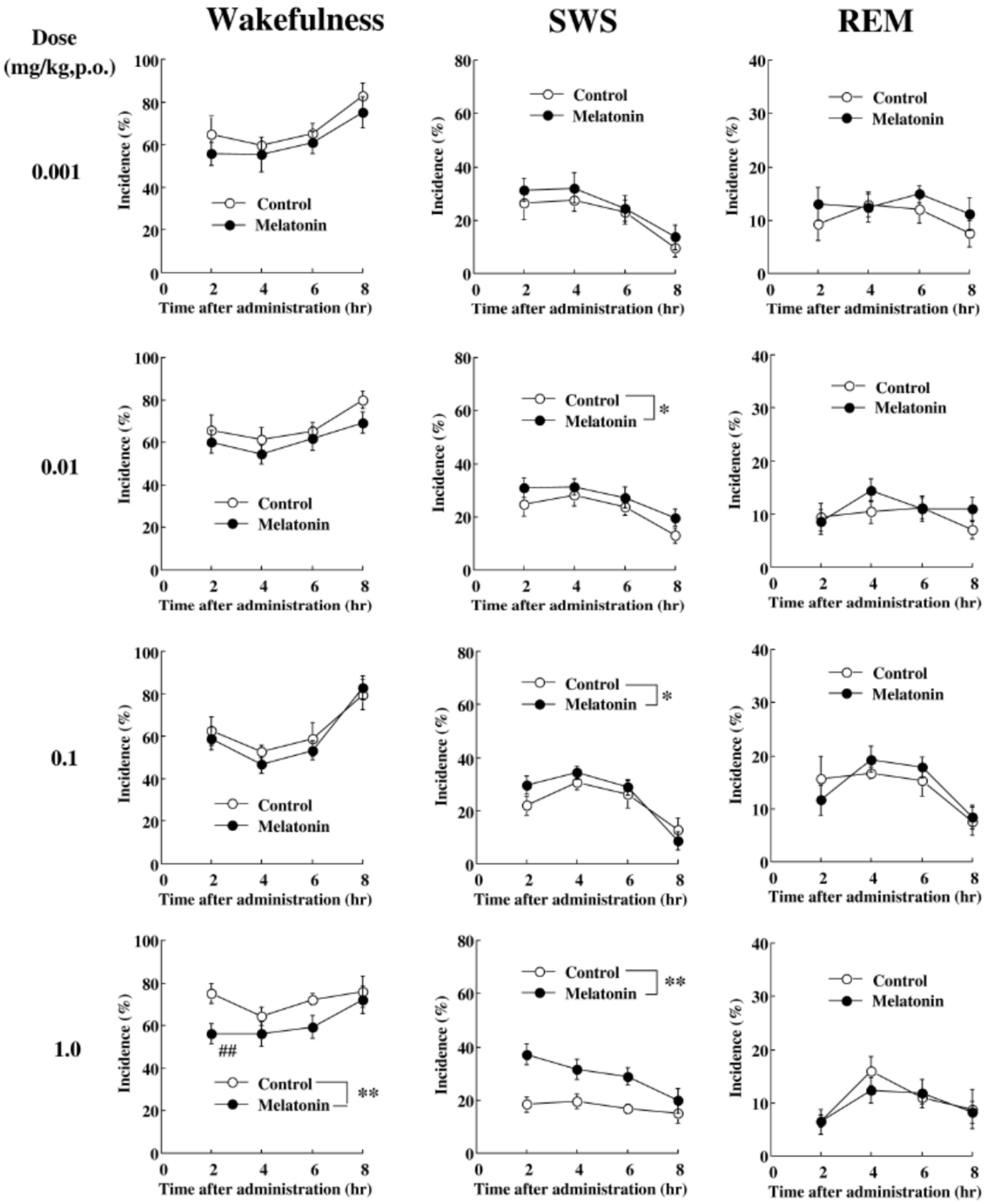


図 2.6.2-7 無麻酔無拘束ネコの睡眠覚醒に対する MT の作用

n=8、mean±SEM、Wakefulness:覚醒、SWS:徐波睡眠、REM:レム睡眠、
*:p<0.05 vs Control、 *:p<0.01 vs Control(分散分析による比較)
##:p<0.01 vs Control (paired t-test による比較)。

(4) ラットの睡眠相後退障害モデルにおける作用

＜添付資料 4.2.1.1-7（参考）＞

Long-Evans 系雄性ラット（体重 350～430 g）を用いた。12 時間の明期暗期サイクルで飼育したラットを 24 時間暗期（一定の暗さ：1 ルックス以下）の環境の中で 3 ヵ月間飼育し、再び 12 時間明暗サイクルの環境に戻したとき、これらのラットでは負の位相角差（negative PAD:

negative Phase Angel Difference）を示すことが認められる。negative PAD を示したラットのみを選択し、睡眠相後退症候群モデルラットとして実験に供した。これらのラットにつき、少なくとも 23 日間安定して PAD が認められることを確認後、MT 1 mg/kg 又はその溶媒（50% dimethyl sulfoxide）を暗期の始まる 30 分前に 22 日間連続投与した。ラットの回転かご廻し法における活動量の測定に関し、最初の 12 時間明暗サイクルの中での飼育から実験終了時点までラットの活動量を 15 分毎に測定した。溶媒群と MT 投与群それぞれにつき 6 匹のラットを用いた。

ラットの活動量の時間的変化を、溶媒群と MT 投与群の代表例として図 2.6.2-8 に示す。負の PAD に対し溶媒投与では変化を認めなかったが、MT の投与により負の PAD はゼロの状態まで減少した。これらの結果から、暗期に形成されたラットの後退した同調行動リズムは MT 投与により前進することが明らかとなった。

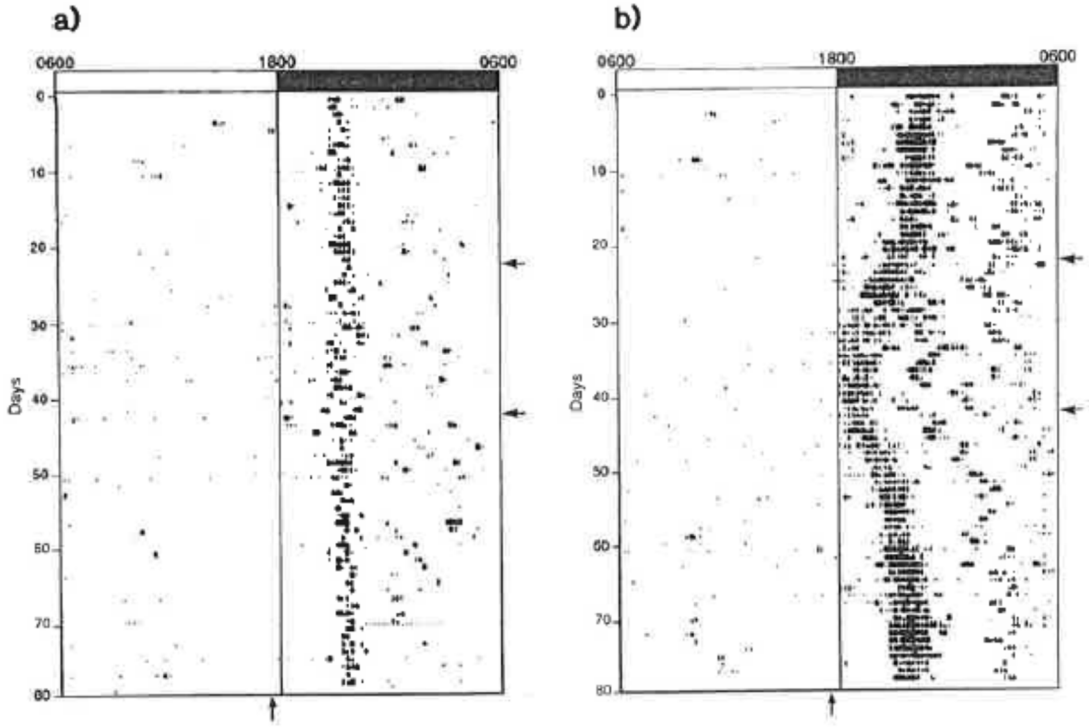


図 2.6.2-8 ラットの回転かご廻し法における活動量の時間的変化に対する MT の作用

a)溶媒投与群、b)MT 投与群、
06:00～18:00 明期、18:00～06:00 暗期、
右横矢印：溶媒又は MT 1 mg/kg 投与期間（22 日間投与の開始と終了時点）、
下の矢印：暗期の開始 30 分前に MT を投与した時間帯。

(5) ラット概日リズムの位相変位に対する作用

＜添付資料 4.2.1.1-8（参考）＞

9 週齢の Wister 系雄性ラットを用いた。ラットの回転かご廻し法における活動量を指標に概日リズム再同調に対する MT 1 及び 10 mg/kg 経口投与の作用を検討した。明期（7:00～19:00）／暗期（19:00～7:00）の 12 時間明暗サイクル下で長期飼育したラットを、その後、8 時間明暗サイクルを前進させ（23:00～11:00 明期）、この日から暗期直前の 10:30～10:55 の間に MT

又は溶媒の5%メチルセルロース溶液をラットに14日間経口投与し回転かご廻し法における活動量を測定した。

結果を図 2.6.2-9 に示す。ラットの回転かご廻し法における活動量は明期に少なく、暗期に多い。対照群、MT 1及び10 mg/kg投与したときの同調日数（1日の総活動量に対する夜間の活動量の比率が85%以上の日数)は、それぞれ8.1±1.1、8.0±0.6及び5.5±0.7日(p<0.020、1-tailed Williams test）であった。これらの結果から、明暗サイクルを8時間前進させたときの新規明暗サイクルにおける概日リズムの再同調は、MT 10 mg/kgを投与したときに促進することが示された。

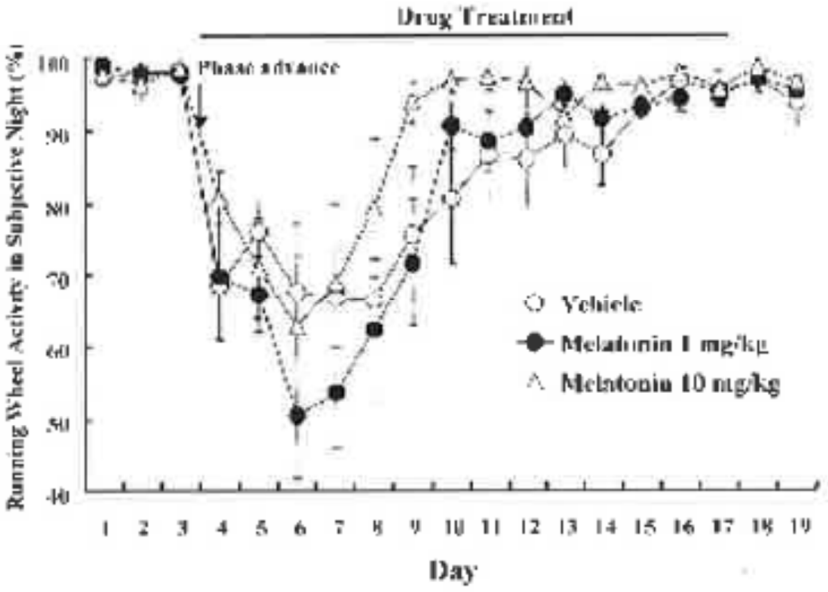


図 2.6.2-9 ラットの位相前進時（8時間）の概日リズム再同調に対するMTの作用

各群 n=8、mean±SEM、縦軸：1日の総活動量に対する夜間の活動量の比率（%)、横軸：実験日数。

2.6.2.2.3 作用機序

睡眠は先行する断眠時間の長さによって、睡眠の質と量とが決定される時刻とは無関係な恒常性維持機構（睡眠欲求）と体内時計機構の2つのシステムによって調節されている。これらの2つの振動過程間の相互作用により、夜間の定着した睡眠及び日中の定着した覚醒が得られる[1),2),3)]。

ヒトを含む哺乳動物では、視床下部の視交叉上核（SCN）に存在している体内時計によって約24時間の概日リズムが制御されている。SCNの体内時計を構成する神経活動は明期に高く、暗期に低い。明期におけるSCNの神経活動の活性化は交感神経の活性化を介して松果体を刺激し、MTの産生を促進し、暗期にMTを放出する。放出されたMTはSCNに高発現しているMT_1受容体に結合し神経活動を抑制する[4)]。MTの神経活動抑制作用にMT_1受容体が関与している可能性についてはMT_1受容体欠損マウスではMTの神経発火抑制作用はほとんど認められないことから支持される[5)]。MTによるSCN神経活動抑制の結果、睡眠と覚醒の切り替えの主役であるSCNに存在している“Sleep Switch”は睡眠優位状態に変わり、その後MTレベルの低下により、SCNからの覚醒シグナルへの抑制が解除され“Sleep Switch”は覚醒に移行する[2)]。以上のよ

うにMTはSCNに存在しているMT$_1$受容体を介して睡眠と覚醒サイクルを調節していると考えられている。明暗リズムの変化に対する概日リズムの同調においてもSCNの体内時計が重要な役割を担っている[6)]。

一方、マウスの視交叉上核スライスを用いた実験においてMTの神経発火に対する位相前進効果は、MT$_1$受容体ノックアウトマウスでは影響を受けないが、受容体（MT受容体はGタンパク質共役型の受容体）とGタンパク質の共役を阻害する百日咳毒素により遮断されること及びMT$_2$受容体アンタゴニストで抑制されることから、in vitroにおけるMTの位相前進効果はMT$_2$受容体の活性化を介すると推察されている[5),6),7)]。マウス自発運動における位相前進効果にはMT$_1$及びMT$_2$受容体の両受容体の活性化が関与しているとの報告もある[8)]。MTの睡眠作用におけるMT$_3$受容体の関与に関し、MTはMT$_1$及びMT$_2$受容体に対し、ピコモルオーダーと高い親和性を示したが、MT$_3$受容体に対する親和性はナノモルオーダーと低親和性を示したことからMTの睡眠覚醒サイクルに対する作用への関与は少ないと考えられる。Nosjeanら[9)]によって、MT$_3$受容体はヒトのquinone reductase 2というredox関連酵素であることが明らかとなり、MT固有の受容体ではないことが示されている。

以上のことから、外因性に投与されたMTの睡眠誘導作用機序として、内因性MTと同様にSCNのMT$_1$及びMT$_2$受容体を活性化することでSCNの機能を調節し睡眠誘導を惹起するものと推察される。また、MTは、その作用する時間帯に応じて活動期（明期）と休息期（暗期）の概日リズムの位相を前進又は後退させたりして、睡眠覚醒サイクルに同調させる作用をも有するものと推察される。

2.6.2.3 副次的薬理試験

2.6.2.3.1 サルのMPTP誘発パーキンソン病モデルにおける睡眠障害に対する作用

＜添付資料4.2.1.2-1（参考）＞

4頭の雄性サルを用い、脳波、電気眼球図記録及び筋電図を連続的に測定するため無線遠隔測定送信機を麻酔下でサルに取り付けた。外科手術後3週間にサルの覚醒（wake)、浅い睡眠（ステージ1及び2)、徐波睡眠（slow wave sleep（SWS）：ステージ3及び4）及びレム睡眠（REM sleep）を記録した。測定項目は総睡眠時間（TST:total sleep time)、睡眠効率（SE:sleep efficiency;夜間12時間に対する総睡眠時間の比率)、入眠潜時（sleep onset latency; 夜間開始時間の20:00から入眠するまでの時間）及びレム睡眠潜時（REM latency; 夜間開始時間の20:00からREM睡眠開始までの時間）である。

パーキンソン病モデル作製は、サルに1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine（MPTP）0.2～0.4 mg/kgを筋肉内投与し、パーキンソン病様症状が発現するまで投与を継続した（3～7日間)。サルのパーキンソン病様症状が安定する1～2ヵ月後にL-dopamine 20 mg/kgを1回/日、2週間経口投与し、L-dopamine単独時の睡眠への作用を検討した。MT 20 mg/kgはL-dopamineと併用下にL-dopamine投与終了前5日から終了日までの5日間連続経口投与した。MTとL-dopamine併用投与終了後3日に再びL-dopamineを単独投与して、併用前の睡眠への作用と比較することでMT単独の睡眠作用を検討した。

結果を表 2.6.2-4 に示す。サルのパーキンソン病様症状の尺度は、自発行動、寡動、振戦、フリージング、姿勢、バランス欠損及び摂餌の 7 項目につき、それぞれに 0（正常）～3（重度障害）のグレードを付けて合計 21 点としてスコアを付けた。MPTP を投与されたサルはヒトの重度障害のパーキンソン病に相当する症状と同様な症状を発現したが、L-dopamine 投与によりこれらの症状は抑制された。L-dopamine に MT を併用投与しても L-dopamine のパーキンソン病様症状改善効果に影響を与えなかった。MPTP を投与されたサルでは有意な TST の減少、SE の低下、WT の増加、浅い睡眠及びレム睡眠の低下が、また有意ではないが SOL の増加が観察され、MPTP 投与により睡眠障害が認められた。MPTP 投与したサルの睡眠障害に対し、L-dopamine 単独投与は WT 以外の睡眠パラメータには影響を与えなかったが、L-dopamine に MT を併用投与すると MPTP 単独投与したサルでみられた TST の減少、SE の低下及び WT の増加は有意に抑制され、SOL の増加も抑制される傾向が認められた。

以上の結果から、MPTP 誘発パーキンソン病サルモデルでみられた睡眠障害は MT 投与により改善することが示唆された。

表 2.6.2-4 サルのパーキンソン病モデルにおける睡眠障害に対する L-dopamin 単独及び L-dopamine+(MT)melatonin 併用投与の作用

測定項目	Control	MPTP	L-dopamine alone	Melatonin + L-dopamine	L-dopamine alone ‡
Motor score	0	10.4±1.9***	2.2±0.3	2.0±0.8¶	2.2±0.3
TST(min)	597±12	414±45*	447±35	508±42¶	450±27
SE(%)	83.3±1.6	57.7±6.1***	61.8±4.5	70.8±5.6¶	62.9±3.0
Wake time(%)	17.0±1.8	42.9±5.9***	37.9±5.3#	29.8±3.6¶	37.1±2.9
S1 及び S2(%)	52.1±4.0	64.7±7.8**	61.3±10.4	58.7±16.2	70.1±2.6
SWS(%)	23.8±6.1	12.5±5.3***	13.1±4.7	15.1±5.7	12.6±0.9
REM(%)	22.0±1.7	17.3±3.0***	19.5±3.1	18.8±3.2	17.3±2.7
SOL(min)	19.2±7.2	43.2±6.4	41.5±7.5	30.5±5.7	42.3±4.9

略語:TST;Total sleep time, SE;Sleep efficiency, S1 及び S2;stage1 及び 2, SWS;Slow wavesleep, SOL:Sleep onset latency
‡Melatonin+ L-dopamine の併用投与終了後 3 日に投与した群、
*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.005 (MPTP vs Control)、#p<0.05 (L-dopamine vs MPTP)、
¶p<0.05 (Melatonin + L-dopamine vs L-dopamine alone)、
Mean±SD、n=4。

2.6.2.3.2 ラットのバルプロ酸曝露自閉症スペクトラム障害（ASD）モデルに対する作用

＜添付資料 4.2.1.2-2（参考）＞

ラット ASD モデルの作製法は以下の通りである。Sprague-Dawley 系雌性ラット（体重 200～230 g）を妊娠させ（この時の受精日を胎生 1 日（E1））、E12.5 にバルプロ酸ナトリウム（VPA）600 mg/kg を妊娠ラットに経口投与し、妊娠を継続させ、出産した雄性の新生仔ラットが生後 22 日になってから ASD ラットとして実験に用いた。生後 22 日の仔ラットに MT 1 及び 5 mg/kg を 28 日間、1 日 1 回経口投与（午前 9:00）し、生後 50 日目に three chambers 装置（30×40

×40cm:この装置は 2 枚の仕切りで区切られた 3 部屋から構成されており、各部屋はしきりにある出入口から行き来可能）の内、中央の部屋（ストレンジャーラットなし）に ASD ラットを入れて、各部屋にいる総時間及び接触行動時間（ラットに対する臭い嗅ぎや立ち上がり行動の時間)を評価することで社会性行動を評価した。ASD ラットの社会性行動を評価するにあたり、探索対象として用いた 2 匹のストレンジャーラット（ストレンジャー1（被験ラットとの接触経験あり、左側の部屋）及びストレンジャー2（被験ラットとの接触経験なし、右側の部屋））は週令及び性別を被験ラットに一致させ、3 部屋のうち左右の部屋にある囲いケージに 10 分間入れて馴化した。なお、MT はエタノールに溶解させた後 saline で希釈して使用した。

結果を図 2.6.2-10 に示す。VPA 投与したラット(ASD ラット)はストレンジャーラット 2(S2)の居る部屋にいる総時間がコントロールラットに比べて少なかった。しかしながら、MT 1 及び 5 mg/kg を投与することにより ASD ラットでみられた総時間の減少は増加した(図 2.6.2-10 A)。ASD ラットにみられたストレンジャーラット 1 との社会性相互関係の頻度や接近の低下も MT 投与により改善することが示された（図 2.6.2-10 B)。

以上の結果から ASD ラットで観察された社会性行動の低下を MT は回復させることが明らかとなった。

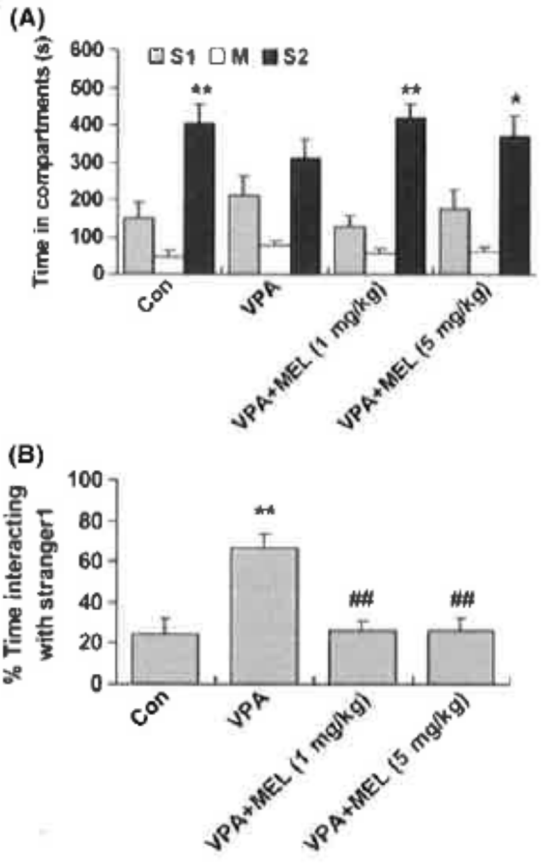


図 2.6.2-10 ラットのバルプロ酸誘発曝露自閉症モデルにおける MT の作用

(A) 3 部屋の各部屋に居る総時間数に対する MT の作用、
S1:ストレンジャーラット 1 の部屋、M:ストレンジャーラット 1 の居ない中央の部屋、
S2:ストレンジャーラット 2 の部屋、VPA: バルプロ酸、MEL:メラトニン、
mean±SEM、n=6、*p<0.05、**p<0.01 （それぞれの処置グループにおける S1 との比較において）
(B) MT 投与したときのストレンジャーラット 1 の部屋に居る総時間に対する接触行動時間時間の比率、
mean±SEM、n=6、**p<0.01 vs Conrtol、##p<0.01 vs VPA

2.6.2.3.3 MT 及び 5-HT 受容体以外の神経伝達物質受容体親和性に対する作用

＜添付資料 4.2.1.1-1（参考）＞

MT につき、以下の諸種神経伝達物質受容体に対する親和性を検討した（なお、サブタイプは記載していない）。Adenosine、Adrenergic、Angiotensin、Atrial natriuretic factor、Bombesin、Bradykinin、Calcitonin、Calcium channel、Cannabinoid、Cholecystokinin、Calcitonin gene-related peptide、Choline transporter、Dopamine、Endothelin、Epidermal growth factor、Estrogen、γ-aminobutyric acid、Galanin、Glucagon-like peptide-1、Glucocorticoid、Glutamate、Glycine、Histamine、Imidazoline、Inositol triphosphate、Insulin、Interferon、Interleukin、Leukotriene、Monoamine transporter、Muscarinic、Neurokinin、Neuropeptide、Neurotensin、Nicotinic、Opiate、Phorbol ester、Platelet-activating factor、Platelet-derived growth factor、Potassium channel、Progesterone、Purinergic、Rolipram、Serotonin、Sigma、Sodium channel、Somatostatin、Testosterone、Thromboxane、Thyrotropin releasing hormone、Transforming growth factor-β_1、Tumor necrosis factor-α、Vasointestinal peptide$_1$ 及び Vasopressin V_{1a}。

上記受容体いずれに対しても MT は 10 μmol/L で 50%以上の阻害作用を示さなかった。

2.6.2.4 安全性薬理試験

2.6.2.4.1 中枢神経系に対する作用

(1) マウスを用いた試験（行動）

＜添付資料 4.2.1.3-1（参考）、4.2.1.3-2（参考）、4.2.1.3-3（参考）＞

マウスの Irwin 試験[10]では、MT を 8、16、64、128、及び 256 の用量で腹腔内投与した。MT は 8 mg/kg で行動に影響を及ぼさなかった。軽度の鎮静が 16 mg/kg でみられた。128 mg/kg では、恐れ、反応性、筋緊張及び体温の低下を示した。256 mg/kg では、鎮静が増強し体温低下は重度であり、また軽度の散瞳がみられた。64 mg/kg 未満では、これらの影響持続時間は 15 分と短かったが、それより高用量（128 及び 256 mg/kg）では約 120 分まで持続した（添付資料 4.2.1.3-1（参考））。

CD-1 系雄性マウス（体重 15～16 g）の自発運動量に対しビデオ・トラッキング・システムを用いて測定した試験では、MT 30 mg/kg を腹腔内投与したとき、マウスの自発運動量に変化は認められなかった（図 2.6.2-11）。また、MT は用量依存的（3、10 及び 30 mg/kg を腹腔内投与）にペントバルビタール誘発睡眠時間を延長し、睡眠開始までの時間を減少させた（図 2.6.2-12）（添付資料 4.2.1.3-2（参考））。

NMRI 系雄性マウス（体重 20～26 g）における MT の抗不安作用を検討した試験では、抗不安作用の指標として 4 プレート法で電撃刺激からの逃避数（Number of punished cross）及び尾懸垂法で無力状態の期間（Duration of immobility）を測定した。MT を 64、128 及び 256 mg/kg の用量で腹腔内投与した。MT のいずれの用量でも変化はみられなかったが、MT をジアゼパム（0.5 mg/kg 経口投与）と併用投与すると逃避数の増加と無力状態の期間の延長が認められた（添付資料 4.2.1.3-3（参考））。

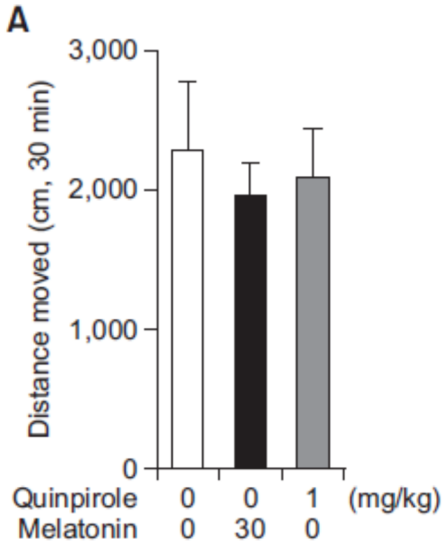


図 2.6.2-11 マウスに MT を投与した時の自発運動量に対する作用

自発運動量はマウスに MT を投与後 30 分間の移動距離で表示、mean ± S.E.M (n=8～9) (one-way ANOVA followed by Fisher's LSD、post-hoc test)。 Quinpirole: Dopamine D2-like receptor。

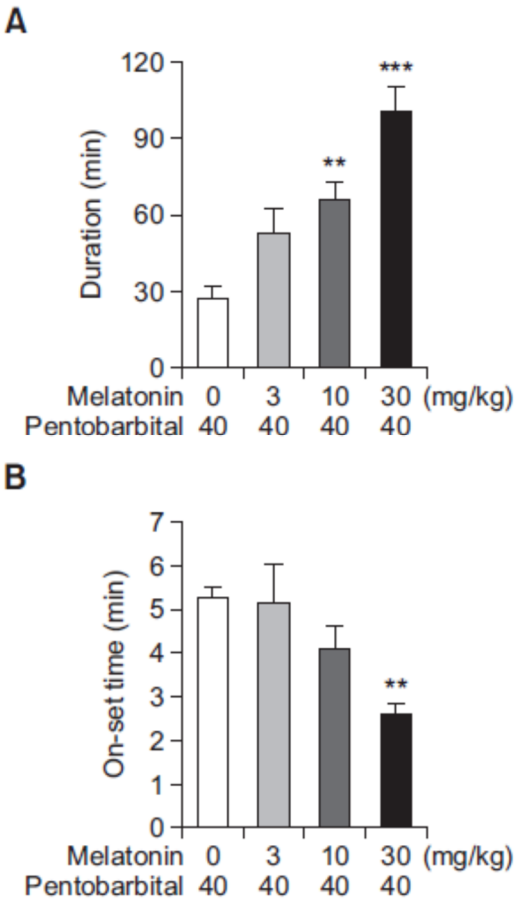


図 2.6.2-12 マウスのペントバルビタール誘発睡眠に対する MT の作用

A: ペントバルビタール誘発睡眠時間、B: ペントバルビタール誘発睡眠開始時間、
MT 投与後 30 分にペントバルビタールを投与、mean ± S.E.M (n=6)、
**p<0.01 and ***p<0.001 vs the control group (one-way ANOVA followed by the Fisher's LSD post-hoc test)。

(2) 幼若ラットを用いた試験（行動）

＜添付資料 4.2.3.5.4-1＞

NPC-15 の幼若ラットを用いた 4 週間反復経口投与毒性試験において、NPC-15 の一般状態への影響を検討した試験では、雌雄 SD ラット（体重：雄 17.13～17.58 g、雌 16.63～16.98 g）に MT を 0（媒体）、15、75 及び 375 mg/kg の用量で生後 7 日から毎日経口投与した。その結果、375 mg/kg 群の雌雄に自発運動の低下及び削痩、雄に腹臥位及び緩徐呼吸が認められ、雄 6 例と雌の 3 例が死亡した。15 及び 75 mg/kg 群では、投与期間を通して、NPC-15 投与に起因した異常は認められなかった。

(3) サルを用いた試験（体温）

＜添付資料 4.2.1.3-4（参考）＞

4 頭の雄カニクイザル（体重 4.0～6.4 kg）にテレメトリーを装着し、第 1 週に MT を 0（媒体）、0.2、2 及び 20 mg/kg の順に 24 時間間隔で毎日 9:00 に経口投与した。第 4 週に同様の手順で MT を 16:00 に投与した。第 5 週に 3 日間間隔で MT 200 mg/kg を 9:00 と 16:00 の 2 回投与した。テレメトリーのプローブを用いて、腹腔内の体温を中核体温（core body temperature: CBT）として継続的に測定した。その結果、MT を 9:00 に投与したとき、200 mg/kg の用量では有意な（Williams test による）CBT の低下が認められたが、2 及び 20 mg/kg では有意な作用は認められなかった。MT を 16:00 に投与したとき、最初の 4 時間は媒体を含む全ての投与用量で CBT の低下が認められた。4 時間以降も媒体及び MT 0.2～20 mg/kg では CBT の低下が認められたのに対し、200 mg/kg では CBT の低下はみられなかった（図 2.6.2-13）。MT を 9:00 に投与した場合の CBT 低下は MT の睡眠導入作用の機序のひとつと考えられる。MT を 16:00 に投与した場合に CBT 低下がみられなかった理由として、夜間の CBT 低下が MT の作用をマスクした可能性が考えられる。16:00 に MT 200 mg/kg を投与した 4 時間後以降に CBT の低下がみられなかった理由は不明であった。

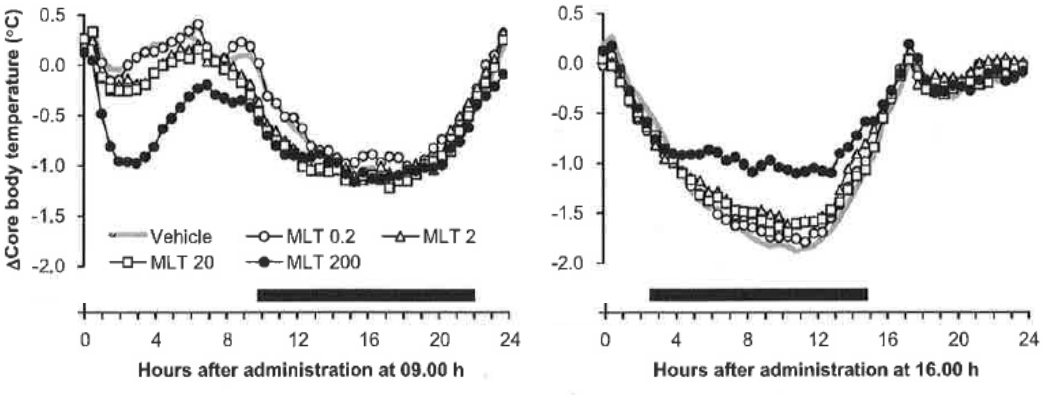


図 2.6.2-13 カニクイザルに MT を投与したときの中核体温の変化量

4 頭のサルを用いて 1 分間隔で測定し、30 分間の平均値を算出した値を測定値としてプロットした。黒のバーは消灯した時間を示す。MLT:メラトニン。

2.6.2.4.2 循環器系に対する作用

(1) ラットのランゲンドルフ灌流心を用いた試験（活動電位）

＜添付資料 4.2.1.3-5（参考）＞

Sprague Dawley 系雌性ラットのランゲンドルフ灌流心を用いた試験において、MT（0、5、10、20 及び 50 μmol/L）の静止膜電位、活動電位振幅、APD_{90}（90%再分極した時の活動電位持続時間）、再灌流性不整脈への影響を検討した。MT は静止膜電位、活動電位振幅及び ADP_{90} に影響しなかった(図 2.6.2-14)。一方、冠動脈左前下行枝を 10 分間結紮後再灌流したときに発生する不整脈を MT は有意に減少させた（図 2.6.2-15)。

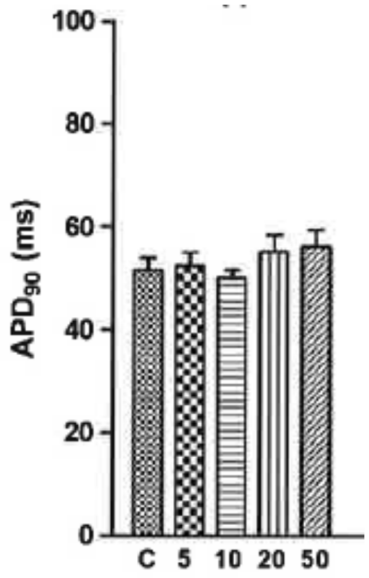


図 2.6.2-14 ラットランゲンドルフ灌流心臓の APD90 に対する MT の作用

means±S.E.M、対照群(C)：n=11、MT 群（5, 10, 20, 50 μmol/L）：各濃度 n=10。

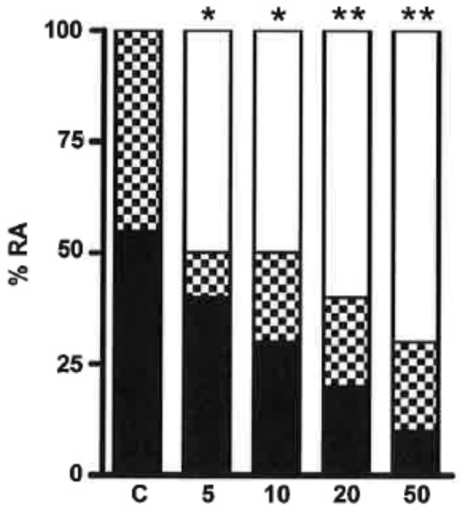


図 2.6.2-15 ラットランゲンドルフ灌流心の再灌流性不整脈に対する MT の作用

RA：再灌流性不整脈(Reperfusion arrhythmia)、対照群(C)：n=11、MT 群(5, 10, 20, 50 μmol/L)：各濃度 n=10、Black portion:不可逆性の心室細動(VF)あるいは心室頻拍(VT)、Checkered portion:自然経過で洞調律に戻った VF あるいは VT、*p<0.05, **p<0.01（x^2 乗検定)。

(2) ヒヒを用いた心機能試験（循環動態、心電図）

＜添付資料 4.2.1.3-6（参考）＞

6 頭の雄ヒヒ（体重:25～30 kg）を用いた。ケタミンとペントバルビタールによる麻酔下のヒヒに MT（0.3～0.4 mg/kg）を静脈内投与し、血圧、心拍数、心電図、放射性核種心室造影法で左室拡張末期容積、左室収縮末期容積、一回拍出量、心拍出量及び左室駆出率に対する MT の作用を投与後 60 分にわたって測定した。MT は投与直後に心拍出量を増加させ、投与直後と 30 分後に左室駆出分画率を増加させたが、投与後 60 分には回復した。心電図を含むその他の検査項目に変化は認められなかった。

(3) イヌを用いた試験（心電図）

＜添付資料 4.2.3.2-4、4.2.3.2-5＞

NPC-15 のイヌを用いた毒性試験において、NPC-15 のイヌ心電図に対する影響を検討した。4 週間反復投与毒性試験では NPC-15 を 15、75 及び 375 mg/kg の用量を経口投与し、投与開始前及び投与開始後 4 週に心電図を測定した。39 週間反復投与毒性試験では NPC-15 を 15、75 及び 250 mg/kg の用量を経口投与し、投与開始前及び投与開始後 13 週と 39 週に心電図を測定した。その結果、いずれの試験においても NPC-15 投与に起因した心電図の変化は認められなかった。

2.6.2.4.3 呼吸器系（動脈血酸素飽和度）に対する作用

＜添付資料 4.2.1.3-7（参考）＞

Sprague Dawley 系雄性ラット（体重 200～250 g）を用いた。環境心毒性物質 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin（TCDD）、MT、TCDD＋MT 及び対照群（Control）の 4 群を設け、体重、心重量、動脈血酸素飽和度（PO_2%）、心拍数（HR）及び平均血圧（MBP）に対する作用を検討した。TCDD は 2 μg/kg の用量で週 1 回経口投与し、MT は 5 mg/kg を 1 日 1 回、45 日間腹腔内投与した。PO_2%、HR、MBP は頸動脈に挿入したカテーテルを用いて測定した。表 2.6.2-5 に結果を示す。MT はいずれの測定項目にも影響を示さなかった。

表 2.6.2-5 MT(Mel)の体重、心重量、動脈血酸素飽和度、心拍数及び平均血圧への影響

Groups	Body weight (kg)	Heart weight (mg)	PO_2%	HR (beats/min)	MBP (mmHg)
Control	244.43 ± 36.03	0.90 ± 0.07	92.86 ± 2.34	351.86 ± 28.67	121.57 ± 10.15
TCDD	193.43 ± 32.93[a]	0.73 ± 0.08[a]	81.0 ± 5.41[a]	243.86 ± 35.05[a]	83.86 ± 11.94[a]
Mel	241.14 ± 24.16	0.88 ± 0.09	90.43 ± 5.29	356.86 ± 40.73	110.0 ± 8.66
TCDD+Mel	239.14 ± 10.85[b]	0.88 ± 0.06[b]	91.86 ± 2.85[b]	338.57 ± 40.07[b]	107.29 ± 9.16[b]
P	*a*=0.011 *b*=0.025	*a*=0.004 *b*=0.012	*a*=0.001 *b*=0.001	*a*=0.001 *b*=0.001	*a*=0.001 *b*=0.001

TCDD: 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin; **Mel:** Melatonin.
Data are expressed as Mean ± S.D., n=7 in each group.
[a] *vs.* control
[b] *vs.* TCDD

2.6.2.4.4 消化器系に対する作用

(1) ラットを用いた試験（胃排泄）

＜添付資料 4.2.1.3-8（参考）＞

Sprague Dawley 系雄性ラット（体重 250～300 g）を用い、ラットの胃排泄に対する作用を検討した。ラットの腺胃にステンレスのカニューレを挿入し、2～3 週間の回復期間の後胃排泄の試験を実施した。胃排泄測定前 15 分に MT 0.001、0.01、0.03、0.1、1、3、10、30 及び 100 mg/kg の用量（n=6/群）をラットの腹腔内に投与した。フェノルレッドを 60 mg/L の濃度で溶解した生理食塩液 3 mL を腺胃に注入し、5 分後に生理食塩液を回収し、胃排泄率（mL/5 min）を測定した。図 2.6.2-16 に示したように、MT 3 及び 10 mg/kg は有意な胃排泄抑制作用を示した。

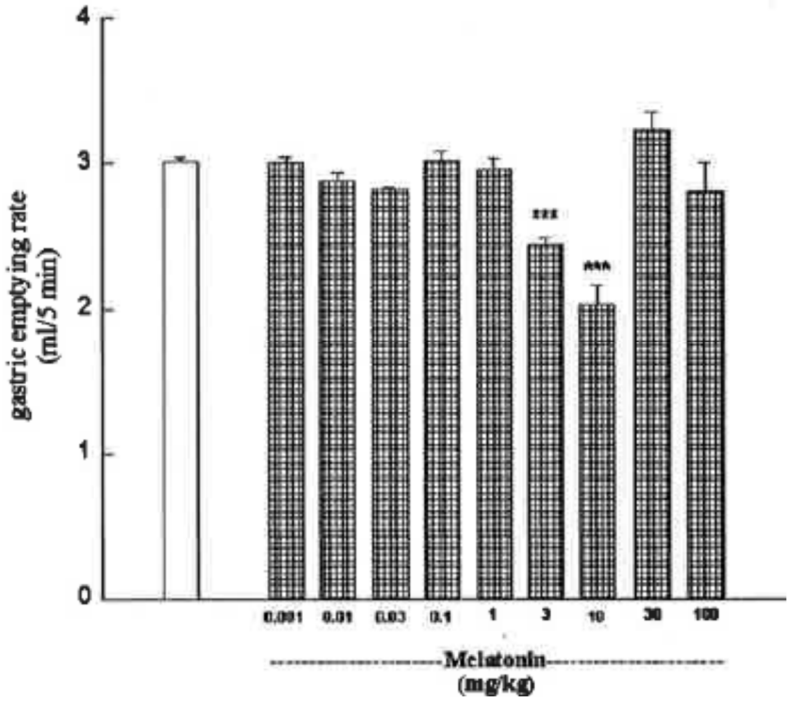


図 2.6.2-16 ラット胃排泄に対する MT の影響

***p<0.001 vs Control group (Student's t test)。

(2) ラットを用いた試験（消化管運動）

＜添付資料 4.2.1.3-9（参考）＞

Sprague Dawley 系雄性ラット（体重 180～200 g）を 24 時間絶食させた後に水道水に溶解したコチニール色素を 1 g/10 mL/kg の用量で経口投与し、MT を 1、10、100 及び 1000 μg/kg の用量で腹腔内投与した。60 分後に消化管を取り出し、コチニール色素に染色された消化管の長さを測定し、消化管運動の指標として消化管全長（胃の幽門部から肛門まで）に対する割合（%）を算出した。その結果、低用量の 1 及び 10 μg/kg は消化管運動を亢進し、高用量の 100 及び 1000 μg/kg は消化管運動を抑制した（図 2.6.2-17）。10 μg/kg の消化管運動亢進作用は、MT 受容体拮抗薬 luzindol（0.25 mg/kg 腹腔内投与）で抑制され、コリン作動薬 neostigmine（0.01 mg/kg 腹腔内投与）及びムスカリン受容体拮抗薬 atropine（0.01 mg/kg 腹腔内投与）

の影響を受けなかった。以上の結果から、MT の消化管運動亢進は副交感神経の興奮を介さず、MT 受容体を介した作用と考えられた。

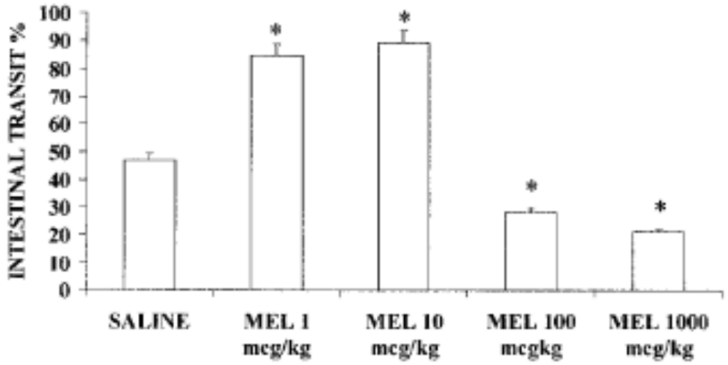


図 2.6.2-17 ラット消化管運動に対する MT の影響

n=7/group、mean±S.E.M.、*:p<0.05 (Dunnett's test)。

2.6.2.4.5 腎／泌尿器系に対する作用

＜添付資料 4.2.3.5.4-1、4.2.3.2-3、4.2.3.2-5＞

NPC-15 のラット及びイヌを用いた毒性試験において、腎パラメーターにおける NPC-15 の作用を検討した。幼若ラットを用いた 4 週間反復経口投与毒性試験（添付資料 4.2.3.5.4-1）では、Sprague Dawley 系雌雄性ラットに NPC-15 を 0（媒体)、15、75 及び 375 mg/kg の用量で生後 7 日から経口投与し、尿検査（尿量、浸透圧、pH、タンパク、細胞を含む）及び血液生化学的検査（尿素窒素、クレアチニン、タンパク、電解質を含む）を実施した。その結果、尿検査に変化は認められなかった。血液生化学的検査では 375 mg/kg 群で雌雄に尿素窒素の高値、雌にクロライドの高値が認められた。しかし、375 mg/kg 群の雌雄では自発運動の低下及び削痩、加えて死亡例も認められたことから、尿素窒素とクロライドの高値が腎機能以外の変化を反映した可能性もあると考えられる。15 及び 75 mg/kg 群では腎パラメーターに変化は認められなかった。ラットを用いた 26 週間反復経口投与毒性試験（添付資料 4.2.3.2-3）では、雌雄 SD ラットに NPC-15 を 0（媒体)、15、75 及び 375 mg/kg の用量で経口投与し、尿検査及び血液生化学的検査を実施した。その結果、尿検査では 375 mg/kg 群の雌雄にビリルビン陽性反応の頻度の増加傾向が認められた。血液生化学的検査ではいずれの投与群においても腎パラメーターに変化は認められなかった。イヌを用いた 39 週間反復経口投与毒性試験(添付資料 4.2.3.2-5)では NPC-15 を 0 (媒体)、15、75 及び 250 mg/kg の用量で雌雄のビーグルイヌに経口投与した。その結果、尿検査では 250 mg/kg 群の雄にビリルビン陽性反応と尿中カリウム排泄量の低値が認められた。血液生化学的検査では 250 mg/kg 群の雄に尿素窒素及びカルシウムの低値が認められた。しかし、250 mg/kg 群の雌雄では嘔吐、摂餌量と体重の低下から死亡例が認められており、幼若ラットと同様にこれらの変化は腎機能以外の変化を反映した可能性もあると考えられる。

2.6.2.4.6 自律神経系に対する作用

(1) 受容体結合試験

＜添付資料 4.2.1.1-1（参考）＞

MT 10 μmol/L はアドレナリン、ニューロペプチド、ムスカリン、ニコチン受容体並びにカルシウム、ナトリウムチャネルに対して 50%以上の阻害作用を示さなかった（2.6.2.3.3 ）。

(2) ラットを用いた試験（交感神経－副腎髄質系）

＜添付資料 4.2.1.3-10（参考）＞

Wistar 系雄性ラット(体重：350～400 g)の脳室内にウレタン麻酔下で MT 100 μg/animal 及び IL-1β（インターロイキン 1β）100 ng/animal を投与し、血漿中アドレナリン（Ad）及びノルアドレナリン（NA）を測定し MT の交感神経－副腎髄質系への影響を検討した。その結果、無処置ラットにおいて MT は血漿中 Ad 及び NA 濃度に影響しなかった。IL-1β は血漿中 Ad 濃度に影響しなかったが、血漿中 NA 濃度を有意に増加させた。MT の前投与は IL-1β の血漿中 NA 濃度増加に影響しなかった（図 2.6.2-18)。松果体を切除したラットにおいて、血清中 MT 濃度は減少した。松果体切除ラットに IL-1β を投与したところ、血漿中 Ad 及び NA 濃度は無処置ラットに比べて顕著に増加した。その IL-1β による血漿中 Ad 及び NA 濃度の増加は、MT の前投与によって抑制された。したがって、松果体から分泌される内因性の MT は交感神経－副腎髄質系に対し抑制的に働くと考えられた。

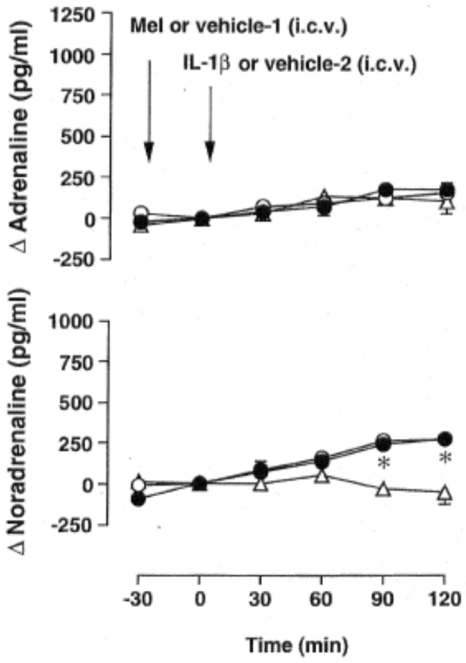


図 2.6.2-18 無処置ラットの血漿中 Ad 及び NA 濃度に対する MT と IL-1β の作用

●:MT＋IL-1β（n=5)、○:溶媒＋IL-1β（n=5)、△:MT＋溶媒（n=4)、i.c.v：脳室内投与、
IL-1β:インターロイキン-1β、mean±S.E.M、*: p<0.05 Student's t-test（MT＋溶媒群に対する検定）

2.6.2.5 薬力学的薬物相互作用試験

実施していない。

2.6.2.6 考察及び結論

自閉症スペクトラム障害（ASD）など、神経発達症を有する患者では社会性相互作用の質的欠如、コミュニケーション障害、常同行動の顕在化などに加え、睡眠障害を合併する患者が非常に多くみられることが知られている[11),12),13),14)]。睡眠障害としては総睡眠時間の減少、睡眠潜時の延長、夜間及び早朝覚醒などが、また、概日睡眠覚醒リズム障害としては睡眠相後退障害（DSPD）が最も多くみられる。神経発達症患者でみられる睡眠障害の原因のひとつに夜間における松果体からのメラトニン分泌の低下が関与していると考えられている。事実、神経発達症では血中のメラトニン濃度の低下が複数報告されている[15),16),17)]。

睡眠障害の治療薬として、これまでの睡眠薬は主として $GABA_A$ 受容体アゴニスト（ベンゾジアゼピン及び非ベンゾジアゼピン系薬剤）が使用されてきており、これらの薬剤はベンゾジアゼピン受容体に作用し、$GABA_A$ 神経系を介して鎮痛作用を発揮し、これによって睡眠作用を惹起している。しかしながら、$GABA_A$ 受容体アゴニストでみられる睡眠誘発作用は睡眠の質の観点から自然睡眠とは異なる。また、$GABA_A$ アゴニストの懸念点として、$GABA_A$ 受容体アゴニストが有する筋弛緩作用に伴う運動障害や前向性健忘作用による学習障害などが挙げられる[18),19)]。これらの副作用は高齢者や小児の不眠症患者を治療する上で深刻な問題である。従って、自然な睡眠をプロモートし、かつ筋弛緩作用や学習障害を惹起しない睡眠障害改善薬が望まれる。

ヒトと同様な昼行性動物のサルの睡眠覚醒に対する MT の単回投与による作用を検討した試験（添付資料 4.2.1.1-4（参考））では、睡眠脳波測定装置を用い、MT を単回投与（投与時間は暗期の 18:00 直前に 0.3、1 及び 3 mg/kg 経口投与）したとき、MT 低用量において入眠潜時の有意な短縮作用が認められた。また、有意ではないが総睡眠時間を MT は増加させた。また、徐波睡眠時の脳波の周波数解析の結果では、MT の睡眠脳波パターンは自然睡眠時のパターンと同様であった（添付資料 4.2.1.1-4（参考））。アクチグラフィを用いたサルの睡眠覚醒に対する MT の反復投与による作用を検討した試験（添付資料 4.2.1.1-5（参考））では、MT（5～320 μg/kg）を反復投与（投与時間は暗期 18:00 の 2 時間前に投与）したとき、総睡眠時間の増加及び入眠潜時の促進が認められ、起床時間に対しては影響を認めなかった。また、このサルの MT 反復投与試験では、耐性や反跳性不眠なども認められなかった。ネコは昼行性でも夜行性でもない薄明性動物だが、ネコを用いた試験（添付資料 4.2.1.1-6（参考））においても MT を昼期 10:00 前後の時間に単回投与したとき、睡眠増加作用が認められた。

概日リズム障害に対する MT の作用に関しては、ラットの行動を指標にした概日リズムの位相を 8 時間前進させた際の再同調を MT は促進させた。さらに、ラット睡眠相後退症候群モデルにおいて 24 時間暗期の環境の中で形成されたラットの同調行動リズム後退は、MT を投与することにより前進した。これらの結果から、MT は概日リズム障害に対し、リセットする作用があることから MT を就寝前に投与することで睡眠相後退症候群の治療においても有効性が期待される。

神経発達症を有する小児患者の睡眠障害に対する MT の作用に関しては、MT は入眠までの時間を短縮するとともに総睡眠時間を増加させることが多数報告されている[13),14),20),21),22),23)]。従って、サルの試験で認められた MT の睡眠作用は臨床試験の結果を支持するものと考えられる。

また、先に述べたように神経発達症では睡眠障害以外に社会性相互作用の欠如が認められているが、VPA 誘発マウス ADS モデルでみられた幼若マウスの社会性相互作用の欠如に対しても MT は改善作用を示した。この結果は神経発達症でみられる睡眠障害以外の行動に対しても MT の有効性が期待される。

睡眠障害はアルツハイマー病やパーキンソン病患者又は高齢者においても認められているが、サルの MPTP 誘発性パーキンソン病モデルでみられた睡眠障害に対し、MT は改善作用を示した。

安全性薬理試験に関し、ICH S7A に従い安全性薬理試験のコアバッテリーとして検討すべき中枢神経系、循環器系及び呼吸器系に加え、消化器系、腎／泌尿器系及び自律神経系に対する MT の影響についても情報を収集し、評価した。表 2.6.2-6 に安全性薬理試験結果の要約と MT 5 mg を健常男性に単回投与したときの血中 MT C_{max}（9.6 ng/mL）（添付資料 5.3.3.1-1）に対する無影響域を示した。なお、無影響域の算出においては、幼若ラットとイヌの血中 MT C_{max} は NPC-15 の毒性試験（添付資料 4.2.3.5.4-1、4.2.3.2-4、4.2.3.2-5）の中で測定した値を用い、それ以外の動物の C_{max} は投与用量と正の相関があるという前提で、公表文献[24),25)]において報告された C_{max} に投与用量を乗じた値を用いた。その結果、MT の薬理作用と考えられるサルの体温低下以外の変化において広い安全域が認められたことから、MT が臨床用量付近の用量で中枢神経系、循環器系、呼吸器系、消化器系、腎／泌尿器系及び自律神経系に影響を及ぼす懸念はほとんどないと判断した。なお、ラットに低用量の MT（1 及び 10 μg/kg）を腹腔内投与したときに消化管運動の亢進が認められたが、幼若ラット、ラット及びイヌを用いた MT の反復投与毒性試験（添付資料 4.2.3.5.4-1、4.2.3.2-1～5）において消化管への作用に対する広い安全域が認められたことから安全性上懸念される作用ではないと考えられた。

表 2.6.2-6 安全性薬理試験結果の要約

試験項目		動物	投与経路／用量 (mg/kg)	結果	無影響量の C_{max} (ng/mL)	無影響域
中枢神経系	Irwin	マウス[1)]	腹腔内投与/8, 16, 64, 128, 256	>16:鎮静、恐れ・反応性・筋緊張低下、体温低下	1520	158
	自発運動		腹腔内投与/30	30:自発運動量の変化なし	5700	594
	抗不安作用		腹腔内投与/64, 128, 256	256:抗不安作用なし	48640	5067
	一般状態	幼若ラット（4 週間反復投与）	経口投与/15, 75, 375	375:死亡、削痩	8991[3)]	937
	中核体温	カニクイザル[2)]	経口投与/0.2, 2, 20	>0.2:体温低下	<140	<14.6
循環器系	活動電位（APD_{90}）	ラット心臓	5, 10, 20, 50 μmol/L	>50:影響なし	－	－
	血圧、心拍数、心電図	ヒヒ[2)]	静脈内投与/0.3-0.4	0.3-0.4:影響なし	800	83
	心拍数、心電図	イヌ	経口投与/15, 75, 250（39 週間反復投与）	250:影響なし	35570[3)]	3705
呼吸器系	動脈血酸素飽和度	ラット[2)]	腹腔内投与/5（45 日間反復投与）	5:影響なし	2750	286
消化器系	胃排泄	ラット[2)]	腹腔内投与/0.001, 0.01, 0.03, 0.1, 1, 3, 10, 30, 100	3、10:胃排泄抑制	550	57
	消化管運動	ラット[2)]	腹腔内投与/1, 10, 100, 1000 μg/kg	1, 10:消化管運動亢進 100, 1000:消化管運動抑制	＜550	＜57
腎／泌尿器系	尿検査 血液生化学的検査	幼若ラット	経口投与/15, 75, 375（4 週間反復投与）	375:血液化学検査－血清尿素窒素、クロライドの高値	8991[3)]	937
		イヌ	経口投与/15, 75, 250（39 週間反復投与）	250：尿検査－ビリルビン陽性反応とカリウム排泄量、血液化学検査－尿素窒素及びカルシウムの低値	23670[3)]	2466
自律神経系	自律神経興奮に関連する受容体及びチャネル	in vitro	10 μmol/L	阻害活性：＜50%	－	－
	交感神経－副腎髄質系	ラット（無処置）	脳室内投与／100 μg/animal	100:影響なし	－	－

1)：引用文献 24) より、マウスにメラトニン 1 mg/kg 腹腔内投与したときの C_{max}=190 ng/mL を引用。
2)：引用文献 25)より、グラフから C_{max} を読み取った。カニクイザルに 10 mg/kg 経口投与したときの C_{max}=7000 ng/mL、カニクイザルに 3 mg/kg 静脈内投与したときの C_{max}=6000 ng/mL、ラットに 10 mg/kg 腹腔内投与したときの C_{max}=5500 ng/mL。
3):最終投与における雌雄 C_{max} の数値の低い性の値を用いた。

以上の結果をまとめると、小児期の神経発達症患者にみられる睡眠障害の治療に対し、MT は入眠時間の短縮、総睡眠時間の延長及び概日リズム再調性を有すること及び安全性薬理試験での広い安全域を有することから有益性の高い薬剤であると考えられる。

2.6.2.7 引用文献

[1] Lavie P, SLEEP-WAKE AS A BIOLOGICAL RHYTHM, Annu Rev Psychol 2001;52:277-303.
[2] Saper C.B, Chou T.C and Scammell T.E, The sleep switch: hypothalamic control of sleep and wakefulness, Trends Neurosci 2001;24:726-731.
[3] Schwartz J.R.L and Roth T, Neurophysiology of sleep and wakefulness: basic science and clinical implications, Curr Neuropharmacol 2008;6:367-378.
[4] Dubocovich M.L, Rivera-Bermudez M.A, Gerdin M.J and Masana M.I, Molecular pharmacology, regulation and function of mammalian melatonin receptor, Front Biosci 2003;8:d1093-d1108.
[5] Liu C, Weaver D.R, Jin X, Shearman L.P, Pieschi R.L, Gribkoff V.K and Reppert S.M, Molecular Dissection of two distinct actions of melatonin on the suprachiasmatic circadian clock, Neuron 1997;19:91-102.
[6] Jin X, von Gall C, Pieschl R.L, Gribokoff V.K, Stehle J.H, Reppert S.M and Weaver D.R, Targeted disruption of the mouse Mel1b melatonin receptor, Mol Cell Biol 2003;23:1054-1060.
[7] Dubocovich M.L, Yun K, Al-Ghoul W.M, Benloucif S and Masana M.I, Setective MT2 melatonin receptor antagonists block melatonin-mediated phase advances of circadian rhythms, FASEB J 1998;12:1211-1220.
[8] Dubocovich M.L, Hudson R.L, Sumaya I.C, Masana M.I and Manna E, Effect of MT1 melatonin receptor deletion-mediated phase shift of circadian rhythms in the C57BL/6 mouse, J Pineal Res 2005;39:113-120.
[9] Nosjean O, Ferro M, Coge F, Beauverger P, Henlin J-M, Lefoulon F, Fauche`re J-L, Delagrange P, Canet E and Boutin J.A, Identification of the melatonin-binding site MT3 as the quinone reductase 2, J Biol Chem 2000;275:31311-31317.
[10] Irwin S, Comprehensive observational assessment: Ia. A systematic, quantitative procedure for assessing the behavioral and physiologic state of the mice, Psychopharmacologia (Berl) 1968;13:222-257.
[11] Devnani P.A and Hegde A. U, Autism and sleep disorders, J Pdiatr Neurosci 2015;10:304-307.
[12] Veatch O.J, Maxwell-Horn A.C and Malow B.A, Sleep in autism spectrum disorders, Curr Sleep Med Rep 2015;1:131-140
[13] van Geijlswijk I.M, Korzilius H.P.L.M and Smiths M.G, The use of exogenous melatonin in delayed sleep phase disorder: a meta-analysis, SLEEP 2010;33:1605-1614.
[14] Tordjman S, Najjar I, Bellissant E, Anderson G.M, Barburoth M, Cohen D, Jaafari N, Schischmanoff O, Fagard R, Lagdas E, Kermarrec S, Ribardiere S, Botbol M, Fougerou C, Bronsard G and Vernay-Leconte J, Advances in the Research of Melatonin in Autism Spectrum Disorders: Literature Review and New Perspectives, Int JMol Sci 2013;14:20508-20542.
[15] Kulman G, Lissoni P, Roselli M.G, Brivio F and Sequeri P, Evidence of pineal endocrine hypofunction in autistic children, Neuro Endocrinol Lett 2000;21:31-34.
[16] Tordjman S, Anderson G, Pichard N, Charbuy H and Touitou Y, Nocturnal excretion of 6-sulphatoxymelatonin in children and adolescents with autistic disorder, Biol Psychiatry. 2005;15;57:134-138.
[17] Melke J, Goubran Botros H, Chaste P, Betancur C, Nygren G, Anckarsäter H, Rastam M, Ståhlberg O, Gillberg IC, Delorme R, Chabane N, Mouren-Simeoni MC, Fauchereau F, Durand CM, Chevalier F, Drouot X, Collet C, Launay JM, Leboyer M, Gillberg C and Bourgeron T and the PARIS study, Abnormal melatonin synthesis in autism spectrum disorders, Mol Psychiatry. 2008;13:90-98.

[18] Wafford K A and Ebert B, Emerging anti-insomnia drugs: tackling sleeplessness and the quality of wake time, Nature Rev Drug Discovery 2008;7:530-540.
[19]日本神経治療学会、標準的神経治療：不眠・過眠と概日リズム障害、神経治療 2016;33:575-604.
[20] Rossingnol D.A and Frye R. E, Melatonin in autism spectrum disorders: a systematic review and meta-analysis, Develop Med & Child Neurol 2011;53:783-792.
[21] Andersen I.M, Kaczmarska J, McGrew S.G and Malow B.A, Melatonin for insomnia in children with autism spectrum disorders, J Child Neurol. 2008;23:482-485.
[22] Gringras P, Melatonin for sleep problems in children with neurodevelopmental disorders: randomised double masked placebo controlled trial, BMJ 2012;345:e6664.
[23] Gringras P, Nir T, Breddy J, Frydman-Marom A and Findling R.L, Efficacy and Safety of Pediatric Prolonged-Release Melatonin for Insomnia in Children With Autism Spectrum Disorder, J Am Acad Child Adolesc Psychiatry 2017;56:948-957.
[24] Akagi T, Ushinohama K, Ikesue S Chronopharmacology of melatonin in mice to maximize the antitumor effect and minimize the rhythm disturbance effect, J Pharmacol Exp Ther. 2004;308(1):378-84.
[25] Yeleswaram K, McLaughlin L.G and Knipe J.O, Pharmacokinetics and oral bioavailability of exogenous melatonin in preclinical animal models and clinical implications, J Pineal Res. 1997;22(1):45-51.

目次

略語・略号一覧 2
2.6.3 薬理試験概要表 3
2.6.3.1 薬理試験：一覧表 3
2.6.3.2 効力を裏付ける試験 6
2.6.3.3 副次的薬理試験 9
2.6.3.4 安全性薬理試験 10
2.6.3.5 薬力学的薬物相互作用試験 13

略語・略号一覧

略語・略号	内容
ASD	自閉スペクトラム症 (Autism spectrum disorder)
CHO	チャイニーズハムスター卵巣 (Chinese hamster ovary)
Cyclic AMP	環状アデノシン一リン酸 (Cyclic adenosine monophosphate)
DSPS	睡眠相後退障害 (Delayed sleep-phase disorder)
5-HT	セロトニン (Serotonin)
MT、Mel	メラトニン (Melatonin)
LS	浅いNREM (ノンレム) 睡眠
MPTP	1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine
SWS	徐波睡眠 (Slow wave sleep)

2.6.3 薬理試験概要表

2.6.3.1 薬理試験：一覧表

被験物質：メラトニン

試験の種類	試験系	動物種／組織	投与方法	発行年及び実施施設	添付資料番号
効力を裏付ける試験	メラトニン（MT）受容体親和性及びアゴニスト活性試験	ニワトリ／前脳、 ハムスター/全脳、 ヒトMT_1及びMT_2受容体遺伝子導入チャイニーズハムスター卵巣（Chainese hamster Ovary(CHO)）細胞	in vitro	2005年 武田薬品工業株式会社医薬研究本部	4.2.1.1-1 （参考）
	メラトニン（MT）受容体親和性及びアゴニスト活性試験	サルMT_1及びMT_2受容体遺伝子導入CHO細胞	in vitro	2009年 武田薬品工業株式会社医薬研究本部	4.2.1.1-2 （参考）
	セロトニン（5-HT）受容体サブタイプに対する結合親和性試験	ヒト、ラット及びブタ5-HTサブタイプ（2A,2B,2C,1A）受容体遺伝子導入CHO細胞	in vitro	2003年 仏セルヴィエ社（LES LABORATOIRES SERVIER）精神薬理研究部 2005年 武田薬品工業株式会社医薬研究本部	4.2.1.1-1 （参考） 4.2.1.1-3 （参考）
	サルの睡眠に対する作用（単回投与試験）	雌性カニクイザル	経口投与	2004年 武田薬品工業株式会社医薬研究本部	4.2.1.1-4 （参考）
	サルの睡眠に対する作用（反復投与試験）	雄性ブタオザル 雌雄カニクイザル 雄性アカゲザル	経口投与	2002年 マサチューセッツ工科大学、ボストン大学、エモリー大学及びハーバード大学	4.2.1.1-5 （参考）
	ネコの睡眠に対する作用（単回投与試験）	雌雄ネコ	経口投与	2004年 武田薬品工業株式会社医薬研究本部	4.2.1.1-6 （参考）
	ラットの睡眠に対する作用（ラット睡眠相後退障害モデル）	雄性ラット	腹腔内投与	1993年 ラ･トローブ大学、仏セルヴィエ及びモナッシュ大学心理学研究部	4.2.1.1-7 （参考）
	ラット概日リズムの位相変位に対する作用	雄性ラット	経口投与	2005年 武田薬品工業株式会社医薬研究本部	4.2.1.1-8 （参考）

試験の種類	試験系	動物種／組織	投与方法	発行年及び実施施設	添付資料番号
副次的薬理試験	サルのMPTP誘発パーキンソン病モデルにおける睡眠障害に対するMTの作用	雄性サル	経口投与	2015年 ソルボンヌ大学	4.2.1.2-1 (参考)
	ラットのバルプロ酸曝露自閉スペクトラム症（ASD）モデルに対する作用	雌性ラットから生まれた雄性新生仔ラット	経口投与	2014年 浙江大学、東北大学薬学部及び寧夏医科大学	4.2.1.2-2 (参考)
	MT及び5-HT受容体以外の神経伝達物質受容体親和性に対する作用	マウス、ラット、ハムスター、モルモット及びウサギの脳、末梢臓器、株化細胞あるいは血球細胞、ヒト型受容体発現株化細胞	in vitro	2005年 武田薬品工業株式会社医薬研究本部	4.2.1.1-1 (参考)
安全性薬理試験	中枢神経系に対する作用	雄性マウス	腹腔内投与	1991年及び1992年 仏 セルヴィエ社（Institut de Recherches Internationales Servier) 2016年 韓国 成均館大学校	4.2.1.3-1 (参考) 4.2.1.3-2 (参考) 4.2.1.3-3 (参考)
		雌雄幼若ラット	経口投与	20[redacted]年 [redacted]	4.2.3.5.4-1
		雄性サル	経口投与	2010年 武田薬品工業株式会社医薬研究本部	4.2.1.3-4 (参考)
	循環器系に対する作用	雌性ラット心臓	in vitro	2009年 アルゼンチン クヨ国立大学生理学研究室（National university of Cuyo)	4.2.1.3-5 (参考)
		雄性ヒヒ	静脈内投与	1991年 南アフリカプレトリア大学生理学研究室（University of Pretoria)	4.2.1.3-6 (参考)
		雌雄イヌ	経口投与	20[redacted]及び20[redacted]年 [redacted]	4.2.3.2-4 4.2.3.2-5
	呼吸器系に対する作用	雄性ラット	腹腔内投与	2015年 イノニュ大学（Inonu university)	4.2.1.3-7 (参考)

試験の種類	試験系	動物種／組織	投与方法	発行年及び実施施設	添付資料番号
安全性薬理試験 （続き）	消化器系に対する作用	雄性ラット	腹腔内投与	2005年 トルコ マルマラ大学生理学研究室	4.2.1.3-8 （参考）
		雄性ラット	腹腔内投与	2002年 イタリアカターニア大学非臨床及び臨床薬理学研究室(University of Catania Medical school)	4.2.1.3-9 （参考）
	腎／泌尿器系に対する作用	雌雄幼若ラット	経口投与	20[redacted]年 [redacted]	4.2.3.5.4-1
		雌雄ラット	経口投与	20[redacted]年 [redacted]	4.2.3.2-3
		雌雄イヌ	経口投与	20[redacted]年 [redacted]	4.2.3.2-5
	自律神経系に対する作用	マウス、ラット、ハムスター、モルモット及びウサギの脳、末梢臓器、株化細胞あるいは血球細胞、ヒト型受容体発現株化細胞	in vitro	2005年 武田薬品工業株式会社医薬研究本部	4.2.1.1-1 （参考）
		雄性ラット	脳室内投与	1999年 高知大学医学部薬理学研究室	4.2.1.3-10 （参考）

2.6.3.2 効力を裏付ける試験

筆頭著者・雑誌名	表題	試験目的	動物種／被験物質	試験結果	添付資料
Kato K ら、Neuropharmacol. 2005;48:301-310.	Neurochemical properties of ramelteon (TAK-375), a selective MT_1/MT_2 receptor agonist.	ヒトの MT_1 及び MT_2、ニワトリの MT_1、及びハムスターの MT_3 受容体に対する結合親和性及び MT のアゴニスト活性につき検討する。	ニワトリ前脳、ハムスター全脳及びヒト MT_1 及び MT_2 受容体遺伝子導入 CHO 細胞／メラトニン（MT）	ヒトの MT_1 及び MT_2 受容体に対する Ki 値はそれぞれ 80.7 及び 383 pmol/L、ハムスターの MT_3 受容体に対する Ki 値は 24.1 nmol/L、ニワトリの Mel_{1a}/Mel_{1c} 受容体に対する Ki 値は 368 pmol/L であった。ヒトの MT_1 及び MT_2 受容体におけるフォルスコリン誘発 cyclic AMP 生成に対する抑制作用の IC_{50} 値はそれぞれ 77.8 及び 904 pmol/L であった。	4.2.1.1-1（参考）
Nishiyama K ら、J Pharmacol Exp Ther 2009;330:855-863.	Molecular cloning and pharmacological characterization of Monkey MT_1 and MT_2 melatonin receptors showing high affinity for the agonist ramelteon.	MT のサルの MT_1 及び MT_2 受容体に対する結合親和性を検討する。	サル MT_1 及び MT_2 受容体遺伝子導入 CHO 細胞／メラトニン（MT）	サルの MT_1 及び MT_2 の受容体に対する Ki 値はそれぞれ 67.4 及び 129 pmol/L であった。	4.2.1.1-2（参考）
Millan M.J ら、J Pharmacol Exp Ther 2003;306:954-964.	The novel melatonin agonist agomelatine (S20098) is an antagonist at 5-hydroxytryptamine 2C receptor, blockade of which enhances the activity of frontocortical dopaminergic and adrenergic pathways.	MT のヒト、ブタ及びラットの 5-HT 受容体サブタイプに対する結合親和性を検討する。	ヒト、ブタ及びラット $5\text{-}HT_{2A}$、$5\text{-}HT_{2B}$ 及び $5\text{-}HT_{2C}$ 受容体遺伝子導入 CHO 細胞／メラトニン（MT）	ヒトの $5\text{-}HT_{2B}$ 及び $5\text{-}HT_{1A}$ 受容体に対する pKi 値はそれぞれ 5.24 及び 5.31 μmol/L であったが、ヒトの $5\text{-}HT_{2A}$ 及び $5\text{-}HT_{2C}$、ブタの $5\text{-}HT_{2C}$ 及びラットの $5\text{-}HT_{2A}$ に対してはほとんど親和性を示さなかった。	4.2.1.1-3（参考）
Yukihiro N ら Brain Res 2004;1027:59-66	Effects of ramelteon (TAK-375) on nocturnal sleep in freely moving monkeys.	MT を入眠前に単回投与したとき、サルの睡眠に対する作用を検討する。	カニクイザル／メラトニン（MT）	MT を暗期直前に 0.3 mg/kg 経口投与したとき、軽度睡眠（LS）の入眠潜時は有意に短縮した。1.0 及び 3 mg/kg を経口投与したとき、LS 及び徐波睡眠（SWS）の入眠潜時は短縮傾向を示した。総睡眠量に対し MT は増加傾向を示した。	4.2.1.1-4（参考）

筆頭著者・雑誌名	表題	試験目的	動物種／被験物質	試験結果	添付資料
Zhdanova I ら、Physiol Behav、2002;75:523-529.	Melatonin promotes sleep in three species of diurnal nonhuman primates.	MT を入眠前に反復投与したとき、サルの睡眠に対する作用を検討する。	雄性ブタオザル 雌雄カニクイザル 雄性アカゲザル／ メラトニン（MT）	ブタオ、アカゲ及びカニクイザルの 3 種を用いた。3 種のサルに MT 10 μg/kg を 3 日間反復経口投与したとき、入眠潜時を早め、睡眠時間を延長した。覚醒時間には影響を与えなかった。 MT 5 μg/kg を 4 週間投与した試験又は 5～320 μg/kg を 3 週間に亘って漸増投与（3 日間毎に漸増）した試験において、MT の入眠潜時短縮作用及び総睡眠時間増加作用に関し、耐性発現又は感受性変化は認められなかった。また、MT の睡眠作用は投与終了後に回復性を有することが認められた。MT 5～20 μg/kg の用量は睡眠効率に対し影響を与えなかったが、40～320 μg/kg の用量では睡眠効率の低下及び夜間の運動量増加が認められた。	4.2.1.1-5 （参考）
Miyamoto M ら SLEEP 2004;27:1319-1325.	The sleep-promoting action of ramelteon (TAK-375) in freely moving cats.	MT を昼期に単回投与したとき、ネコの睡眠に対する作用を検討する。	雌雄ネコ／メラトニン（MT）	MT 0.001 mg/kg 経口投与したとき、対照投与に比べ MT は覚醒、SWS 及びレム睡眠に対し有意な作用を示さなかった。0.01 及び 0.1 mg/kg 投与では SWS において有意な作用（増加）が、1 mg/kg では覚醒時間（減少）と SWS において有意な作用（増加）が認められた。	4.2.1.1-6 （参考）
Armstrong S.M ら Pharmacol Biochem Behav 1993;46:45-49.	Successful use of S20098 and melatonin in an anima lmodel of delayed sleep-phase syndrome (DSPS).	ラットの DSPS モデルにおける MT の作用を検討する。	Long-Evans 系雄性ラット／メラトニン（MT）	ラットを 12 時間の明期（6:00～）／暗期（18:00～）サイクルの環境から 24 時間の暗期の環境に曝すことで睡眠相後退障害モデルを作製した。ラットの行動を指標に評価した。暗期に形成された後退した同調リズムは MT 1 mg/kg の 22 日間反復投与により前進した。	4.2.1.1-7 （参考）

筆頭著者・雑誌名	表題	試験目的	動物種／被験物質	試験結果	添付資料
Hirai K ら、 J Biol Rhythms 2005;20:27-37.	Ramelteon (TAK-375) accelerates reentrainment of circadian rhythm after a phase advance of the light-dark cycle in rats.	ラットの概日リズムの位相変位に対するMT作用を検討する。	Wister系雄性ラット／メラトニン（MT）	12時間の明期(7:00～)／暗期(19:00～)サイクルを8時間前進させることでラットの概日リズムの位相を変位させた。このラットにMT 10 mg/kgを14日間反復投与したとき、ラットの回転かご廻し行動を指標にした概日リズムにおいて、位相を8時間前進させた際の再同調をMTは促進させた。	4.2.1.1-8 （参考）

2.6.3.3 副次的薬理試験

筆頭著者・雑誌名	表題	試験目的	動物種／被験物質	試験結果	添付資料
Belaid H ら、 Sleep Med. 2015;16:1245-1251.	Effect of melatonin on sleep disorders in a monkey model of parkinson's disease.	サルの MPTP 誘発パーキンソン病モデルにみられる睡眠障害に対する MT の作用を検討する。	雄性サル／MT、 L-dopamine	サルの MPTP 誘発パーキンソン病モデルにおいて、パーキンソン病治療薬の L-dopamine はこのモデルでみられる行動障害（自発行動、寡動、振戦、フリージング、姿勢、バランス欠損及び摂餌）を改善するが、睡眠障害に対してはほとんど改善作用を示さなかった。L-dopamine に MT 20 mg/kg を併用経口投与すると、パーキンソン病モデルでみられる睡眠障害は改善された。	4.2.1.2-1 （参考）
Tian Y ら、 J Pineal Res 2014;56:1-11.	Melatonin reverses the decreases in hippocampal protein serine/threonine kinases observed in an animal model of autism.	自閉症スペクトラム障害モデル(ASD)における社会性相互作用の欠如に対する MT の改善効果の有無を検討する。	Sprague Dawkey 系雌性ラットから生まれた雄性新生仔ラット	妊娠ラットにバルプロ酸ナトリウムを妊娠と同時に投与することにより、雄性新生仔ラットに ASD を誘発させた。この新生仔ラットではヒト ASD でみられる社会性相互作用の欠如と同様な行動異常は認められ、この行動異常は MT 1 又は 5 mg/kg を 28 日間反復経口投与することにより回復することが示された。	4.2.1.2-2 （参考）
Kato K ら、 Neuropharmacol. 2005;48:301-310.	Neurochemical properties of ramelteon (TAK-375), a selective MT1/MT2 receptor agonist.	MT 及び 5-HT 受容体サブタイプ以外の神経伝達物質受容体に対する結合親和性を検討する。	マウス、ラット、ハムスター、モルモット及びウサギの脳、末梢臓器、株化細胞あるいは血球細胞、ヒト型受容体発現株化細胞／MT	MT は 10 μmol/L で 50%以上の阻害作用を示さなかった。	4.2.1.1-1 （参考）

2.6.3.4 安全性薬理試験

被験物質：メラトニン

筆頭著者／雑誌 試験名及び試験番号	動物種／系統	投与方法	投与量 (mg/kg)	性別及び 動物数/群	評価対象 項目	特記すべき所見	GLP 適用	添付資料
Guardiola-Lemaître B Advances in pineal research. Josephine Arendt & Paul Pevrt eds. John Libbey & Co Ltd. 1991;351-363	マウス／不明	腹腔内投与	8、16、64、128、256	不明	行動及び一般症状	8 mg/kg 以下の用量で腹腔内投与した MT は行動に影響を及ぼさなかった。軽度の鎮静が 16 mg/kg でみられた。128 mg/kg では、恐れ、反応性、筋緊張の減少及び低体温を示した。256 mg/kg では、鎮静が増強し低体温は重度であり、また軽度の散瞳がみられた。64 mg/kg 未満では、これらの影響持続時間は 15 分と短かったが、それより高用量（128 及び 256 mg/kg）では約 120 分まで持続した。	非適	4.2.1.3-1 （参考）
Hong SI ら Biomol Ther 2016;24(2):115-22	マウス／CD-1	腹腔内投与	0、3、10、30	雄 8-9／群	自発運動量	MT 3～30 mg/kg はマウスの自発運動量に対し影響を与えなかった。しかしながら、MT は用量依存的にペントバルビタールの睡眠時間を延長し、睡眠開始までの時間を減少させた。	非適	4.2.1.3-2 （参考）
Guardiola-Lemaître B ら Pharmacol Biochem Behav 1992;41(2):405-8	マウス／NMRI	腹腔内投与	0、64、128、256	雄 6／群	抗不安作用	抗不安作用の指標として電撃刺激からの逃避数及び尾懸垂法で無力状態の期間を測定した。MT はいずれの用量でも逃避数及び無力状態の期間に変化はみられなかったが、ジアゼパム（0.5 mg/kg、経口投与）と併用投与すると逃避数の増加と無力状態の期間の延長が認められた。	非適	4.2.1.3-3 （参考）
[redacted]、20[redacted]年 NPC-15 の幼若ラットを用いた 4 週間反復経口投与毒性試験 [redacted]	幼若ラット／SD	経口投与	0、15、75、375	雌雄 12／性／群	一般症状	高用量の MT 375 mg/kg において、雌雄のラットの自発運動低下及び削痩が認められ、雄においてのみ腹臥位及び緩徐呼吸が認められ、雄 6 例と雌の 3 例が死亡した。15 及び 75 mg/kg では、投与期間を通して異常は認められなかった。	適	4.2.3.5.4-1

筆頭著者／雑誌 試験名及び試験番号	動物種／系統	投与方法	投与量 (mg/kg)	性別及び 動物数/群	評価対象 項目	特記すべき所見	GLP 適用	添付資料
Inui Y ら J Toxicol Sci 2010;35(3):383-91	サル／カニクイ	経口投与	0、0.2、2、20、200	雄 4頭に漸増投与	中核体温	MT を 9:00 に投与したとき、200 mg/kg の用量では有意な中核体温（core body temperature:CBT）の低下が認められたが、2 及び 20 mg/kg では有意な作用は認められなかった。MT を 16:00 に投与したとき、最初の 4 時間は媒体を含むすべての投与用量で CBT の低下が認められた。4 時間以降も媒体及び MT 0.2～20 mg/kg では CBT の低下が認められたのに対し、200 mg/kg では CBT の低下はみられなかった。	非適	4.2.1.3-4 （参考）
Diez ER ら J Pineal Res. 2009;46(2):155-60	ラット（心臓）／Sprague Dawley	灌流	0、5、10、20、50 μmol/L	雌 10／群	心臓	MT はいずれの投与量でも静止膜電位、活動電位振幅及び APD_{90}（90%再分極した時の活動電位持続期間）に影響しなかった。一方、冠動脈左前下行枝を 10 分間結紮後再灌流したときに発生する不整脈を有意に減少させた。	非適	4.2.1.3-5 （参考）
Bosman H ら J Pineal Res. 1991;11(3-4):179-81	ヒヒ	静脈内投与	0.3-0.4	雄 6 頭	循環器系	血圧、心拍数、心電図、左室拡張末期容積、左室収縮末期容積、一回拍出量、心拍出量、左室駆出率を MT 投与後 60 分にわたって測定した。MT は投与直後に心拍出量を増加させ、投与直後と 30 分後に左室駆出率を増加させたが、投与後 60 分には回復した。心電図を含むその他の検査項目に変化は認められなかった。	非適	4.2.1.3-6 （参考）
[redacted]、20[redacted]年 NPC-15 のイヌを用いた 4 週間反復経口投与毒性試験及び 4 週間回復試験 [redacted]	イヌ／ビーグル	経口投与	0、15、75、375	雌雄 4／性／群	心電図	MT はいずれの投与量においても投与に起因した心電図の変化は認められなかった。	適	4.2.3.2-4
[redacted]、20[redacted]年 NPC-15 のイヌを用いた 39 週間反復経口投与毒性試験 [redacted]	イヌ／ビーグル	経口投与	0、15、75、250	雌雄 4／性／群	心電図	MT 投与に起因した心電図の変化は認められなかった。	適	4.2.3.2-5

筆頭著者／雑誌 試験名及び試験番号	動物種／系統	投与方法	投与量 (mg/kg)	性別及び動物数/群	評価対象項目	特記すべき所見	GLP適用	添付資料
Sarihan ME ら Eur J Pharmacol 2015;762:214-20	ラット／SD	腹腔内投与	0、5	雄 7／群	呼吸器系	MT の動脈血酸素飽和度、心拍数及び平均血圧に対する作用を検討した。MT はいずれの測定項目にも影響を示さなかった。	非適	4.2.1.3-7 (参考)
Kasimay O ら J Physiol Pharmacol. 2005;56(4):543-53	ラット／SD	腹腔内投与	0、0.001、0.01、0.03、0.1、1、3、10、30、100	雄 6／群	胃排泄	ラットの胃排泄に対する作用を検討した。MT 3及び10 mg/kg においてのみ有意な胃排泄抑制作用を示した。	非適	4.2.1.3-8 (参考)
Drago F ら、 Dig Dis Sci 2002;47(9):1969-74	ラット／SD	腹腔内投与	0、1、10、100、1000 μg/kg	雄 7／群	消化管運動	MT の低用量の1及び10 μg/kg は消化管運動を亢進し、高用量の100及び1000 μg/kg は消化管運動を抑制した。	非適	4.2.1.3-9 (参考)
[redacted]、20[redacted]年 NPC-15 の幼若ラットを用いた4週間反復経口投与毒性試験 [redacted]	幼若ラット／SD	経口投与	0、15、75、375	雌雄 12／性／群	腎／泌尿器系	尿検査にいずれの用量にも変化は認められなかった。血液生化学的検査ではMT 375 mg/kg 群で雌雄に尿素窒素の高値、雌にクロライドの高値が認められた。	適	4.2.3.5.4-1
[redacted]、20[redacted]年 NPC-15 のラットを用いた26週間反復経口投与毒性試験 [redacted]	ラット／SD	経口投与	0、15、75、375	雌雄 12／性／群	腎／泌尿器系	尿検査では375 mg/kg 群の雌雄にビリルビン陽性反応の頻度の増加傾向が認められた。血液生化学的検査の腎パラメーターにいずれの用量にも変化は認められなかった。	適	4.2.3.2-3
[redacted]、20[redacted]年 NPC-15 のイヌを用いた39週間反復経口投与毒性試験 [redacted]	イヌ／ビーグル	経口投与	0、15、75、250	雌雄 4／性／群	腎／泌尿器系	尿検査ではMT 250 mg/kg 群の雄にビリルビン陽性反応と尿中カリウム排泄量の低値が認められた。血液生化学的検査ではMT 250 mg/kg 群の雄に尿素窒素及びカルシウムの低値が認められた。	適	4.2.3.2-5
Kato K ら、 Neuropharmacol. 2005;48:301-310.	in vitro	曝露	10 μmol/L	－	受容体及びチャネルへの阻害率	自律神経の活動に関連するアドレナリン、ニューロペプチド、ムスカリン、ニコチン受容体並びにカルシウム、ナトリウムチャネルに対し、50%以上の阻害作用を示さなかった。	非適	4.2.1.1-1 (参考)
Wang M ら、 Jpn J Pharmacol 1999;81:29-33	ラット／Wistar	脳室内投与	100 μg/animal	雄 5／群	交感神経-副腎髄質系	血漿中アドレナリン及びノルアドレナリン濃度に影響はなかった。	非適	4.2.1.3-10 (参考)

2.6.3.5 薬力学的薬物相互作用試験

実施していない。