目次

略語・略号一覧 2
2.6.4 薬物動態試験の概要文 3
2.6.4.1 まとめ 3
2.6.4.1.1 吸収 3
2.6.4.1.2 分布 4
2.6.4.1.3 代謝 4
2.6.4.1.4 排泄 4
2.6.4.1.5 薬物動態学的薬物相互作用 4
2.6.4.2 分析法 5
2.6.4.2.1 [^{14}C]標識メラトニン 5
2.6.4.2.2 非標識体の分析 6
2.6.4.3 吸収 7
2.6.4.3.1 単回投与 7
2.6.4.3.2 ラット 4 週間反復投与トキシコキネティクス 8
2.6.4.3.3 ラット 13 週間反復投与トキシコキネティクス 9
2.6.4.3.4 幼若ラット 4 週間反復投与トキシコキネティクス 10
2.6.4.3.5 イヌ 4 週間反復投与トキシコキネティクス 11
2.6.4.3.6 イヌ 39 週間反復投与トキシコキネティクス 12
2.6.4.4 分布 14
2.6.4.4.1 全身オートラジオグラフィー 14
2.6.4.4.2 たん白結合 18
2.6.4.4.3 血球移行性 20
2.6.4.4.4 胎盤通過 21
2.6.4.5 代謝 22
2.6.4.5.1 In vivo 代謝 22
2.6.4.5.2 推定代謝経路 25
2.6.4.5.3 代謝酵素分子種の同定 26
2.6.4.5.4 薬物代謝酵素の誘導 27
2.6.4.6 排泄 28
2.6.4.6.1 尿糞中排泄 28
2.6.4.6.2 胆汁中排泄 28
2.6.4.6.3 乳汁排泄 29
2.6.4.7 薬物動態学的薬物相互作用 30
2.6.4.7.1 CYP 分子種に対する阻害作用 30
2.6.4.7.2 UGT 分子種に対する阻害作用 30
2.6.4.7.3 CYP 分子種に対する誘導作用 31
2.6.4.7.4 薬物トランスポーターに対する阻害作用 32
2.6.4.7.5 薬物トランスポーターによる輸送評価 32
2.6.4.8 その他の薬物動態試験 34
2.6.4.9 考察及び結論 35
2.6.4.10 図表 38

2.6.4.11 参考文献 38

略語・略号一覧

略語・略号	内容
AFMK	N-acetyl-N-formyl-5-methoxykynurenamine
α1-AGP	α1酸性糖たん白
AMK	N-acetyl-5-methoxykynurenamine
AUC	血漿中濃度-時間曲線下面積
AUC_{0-6h}	投与後6時間までの血漿中濃度-時間曲線下面積
AUC_{0-8h}	投与後8時間までの血漿中濃度-時間曲線下面積
BCRP	breast cancer resistance protein
Ci	キュリー
CL	クリアランス
C_{max}	最高血漿中濃度
CMC	カルボキシメチルセルロースナトリウム
CYP	シトクロムP450
C_{6h}	投与後6時間の血漿中濃度
C_{8h}	投与後8時間の血漿中濃度
DMSO	ジメチルスルホキシド
dpm	disintegration per minute：1分間あたりの崩壊数
FR	flux ratio
GC/MS	ガスクロマトグラフ質量分析計
6-Glu-MT	6-水酸化メラトニングルクロン酸抱合体
h	時間
HPLC/UV	紫外線検出器付き高速液体クロマトグラフ
IC_{50}	50%阻害濃度
LC/MS/MS	液体クロマトグラフ-タンデム質量分析計
MATE	multidrug and toxin extrusion
Bq	ベクレル：1秒間あたりの崩壊数
n	例数
NAS	N-アセチルセロトニン
NFR	net flux ratio
OAT	organic anion transporter
OATP	organic anion transporting polypeptide
OCT	organic cation transporter
6-OH-MT	6-水酸化メラトニン
P-gp	P-糖たん白質
6-Sul-MT	6-水酸化メラトニン硫酸抱合体
TFA	トリフルオロ酢酸
TLC	薄層クロマトグラフィー
t_{max}	最高血漿中濃度到達時間(C_{max}到達時間)
UGT	ウリジン2リン酸（UDP）グルクロン酸転移酵素
UR	uptake ratio

2.6.4 薬物動態試験の概要文

メラトニンの動物における吸収、分布、代謝及び排泄について検討した。本項では、公表論文にて評価可能な試験については公表論文を使用し、必要な試験は申請者が実施して取りまとめた。

単回投与時の吸収については公表論文（ラット、イヌ、及びサル）により、反復投与時の血漿中濃度については申請者が実施した毒性試験に付随するトキシコキネティクス試験（ラット及びイヌ）により評価した。分布試験として全身オートラジオグラフィー（白色及び有色ラット）を実施した。たん白結合（in vitro)、血球移行（in vitro)、胎盤通過（サル)、in vivo 代謝（ラット)、in vitro 代謝（ヒト）及び排泄（ラット及びウサギ）については公表論文を使用した。薬物動態学的相互作用については、ガイドライン[1)]に準じた in vitro 試験を実施した。

2.6.4.1 まとめ

2.6.4.1.1 吸収

ラット、イヌ及びサルにメラトニンを静脈内投与したとき、血漿中メラトニン濃度は半減期 0.31～0.57 時間で速やかに低下した。メラトニンをラットに静脈内（5 mg/kg)、腹腔内（10 mg/kg）及び経口（10 mg/kg）投与したときの血漿中メラトニン濃度の AUC から求めた経口投与時の吸収率及び生物学的利用率は、それぞれ、72 及び 53.5%であった。イヌにメラトニンを経口投与したときの生物学的利用率は、16.9（0.98 mg/kg）及び＞100%（10.30 mg/kg）であり非線形性が示唆された。サルにメラトニンを経口投与（10 mg/kg）したときの生物学的利用率は＞100%であった。

ラット及びイヌにメラトニンを経口投与したときの用量依存性と反復投与の影響を、トキシコキネティクス試験により評価した。雌雄ラットにメラトニンを 15、75 及び 375 mg/kg の用量で反復経口投与したとき、メラトニンは速やかに最高血漿中濃度（C_{max}）に達し、その後速やかに消失した。初回投与後では、投与量の増加率を上回る C_{max} 及び AUC の上昇が認められ、C_{max} 後の消失も高用量では遅延したことから、非線形性が示された。反復投与により、低用量群では血漿中濃度の上昇が認められたが、投与量の増加に伴い、上昇の程度は小さくなり、その結果、反復投与後には非線形性が減弱した。投与量及び投与回数に関わらず性差はみられなかった。雌雄幼若ラットにメラトニンを 15、75 及び 375 mg/kg の用量で反復経口投与したとき、初回投与後（投与時 1 週齢）の血漿中濃度（C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}6h}$）は、成熟ラットの初回投与後（投与時 6 週齢）と比較して明らかに高値を示したが、4 週間反復投与後（投与時 5 週齢）には低下し、成熟ラットの初回投与時とほぼ同程度となった。雌雄イヌにメラトニンを 15、75 及び 375 mg/kg の用量で反復経口投与したとき、メラトニンは速やかに最高血漿中濃度に達し、その後速やかに消失した。ラットと同様に非線形性がみられたが、反復投与による変化はみられなかった。投与量及び投与回数に関わらず性差はみられなかった。

2.6.4.1.2 分布

雄性白色ラット及び有色ラットに[^{14}C]メラトニンを単回経口投与（15 mg/kg）し、定量的全身オートラジオグラフィーにより放射能の組織分布を検討した。

白色ラット及び有色ラットのいずれにおいても、[^{14}C]メラトニンは速やかに吸収されて全身に分布し、投与後 0.25 時間には、膀胱内尿を除く全ての組織で最高放射能濃度を示した。投与後 0.25 時間と比較して投与後 1 時間では､膀胱内尿を除く全ての組織中放射能が速やかに低下し､投与後 24 時間では多くの組織で定量下限未満となった。有色ラットと白色ラットの比較では、ブドウ膜を除くといずれの時点においても血液及び組織中放射能濃度に顕著な差は認められなかった。有色ラットのブドウ膜には放射能の分布が確認されたことから、メラトニン及び/又はその代謝物はメラニンへの親和性を有するものと考えられたが、ブドウ膜からの放射能の消失は他の組織と同様に速やかであった。

メラトニンのラット及びヒトにおける血漿たん白結合率は､平衡透析法により検討した結果、種差は認められず 50～60%であった。結合たん白は主としてアルブミンであるが、α1 酸性糖たん白の寄与も確認された。

妊娠サルに[^{3}H]メラトニンを静脈内投与したとき、胎仔血漿中に[^{3}H]メラトニンの移行が確認された。

2.6.4.1.3 代謝

ラットにメラトニン又は代謝物を投与した後の尿を分析し、メラトニンの代謝経路について検討した。メラトニンの主たる代謝経路は 6 位の水酸化に続く硫酸抱合及びグルクロン酸抱合であり、その他の代謝経路として、N-脱アセチル化、5 位の脱メチル化及びインドールの開環が認められた。6 位の水酸化は、CYP1A1、CYP1A2 及び CYP1B1 により触媒され、5 位の脱メチル化は主に CYP2C19 により触媒された｡メラトニンの主たる代謝酵素は CYP1A2 であると考えられた。

2.6.4.1.4 排泄

放射性同位元素で標識したメラトニンをラットに静脈内又は腹腔内投与したとき、尿及び糞中に、それぞれ投与放射能の 60～70%及び 15～20%が排泄された。ウサギに[^{14}C]メラトニンを投与し、投与後 1 時間に胆嚢から回収した胆汁中放射能は投与放射能の 0.5%であり、尿中排泄率に対する割合は僅かに 4%であった。授乳中のラットに[^{3}H]メラトニンを皮下投与したとき、仔の胃内に[^{3}H]メラトニンが検出された。

2.6.4.1.5 薬物動態学的薬物相互作用

メラトニンの CYP 分子種､UGT 分子種及び薬物トランスポーターに対する阻害作用並びに CYP 分子種に対する誘導作用を検討した結果、いずれに対しても影響は認められなかった。このことから、メラトニンは併用他剤の薬物動態に影響を与える可能性は低いと考えられた。メラトニンのトランスポーターによる輸送の評価では、メラトニンは P-gp、OATP1B1 及び OATP1B3 では輸送されなかった。一方、メラトニンは BCRP の弱い基質であることが示唆されたが、薬物相

互作用が懸念されるものではなかった。メラトニンは主として CYP1A2 により代謝されるため、同酵素の阻害剤又は基質と併用投与すると、血漿中濃度が上昇する。

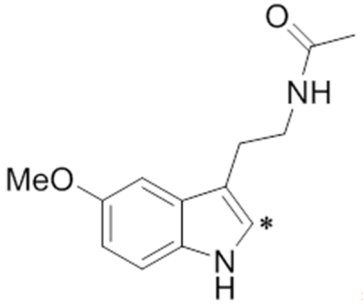
2.6.4.2 分析法

2.6.4.2.1 [^{14}C]標識メラトニン

＜添付資料 4.2.2.1-1＞

[^{14}C]標識メラトニンは[redacted]において合成された。[^{14}C]標識メラトニンの構造式及び標識位置を表 2.6.4-1 に示す。合成された[^{14}C]標識メラトニンは、ラットの全身オートラジオグラフィー及びトランスポーターによる輸送評価に使用した。

表 2.6.4-1 [^{14}C]標識メラトニン

構造式及び標識位置	 ＊：^{14}C
分子式	$^{14}C_1C_{12}H_{16}N_2O_2$
ロット番号	[redacted]
比放射能	2.09 GBq/mmol (56.6 mCi/mmol)
放射化学的純度	99.5%
化学的純度	99.9%
適用した試験	試験番号：[redacted]、添付資料：4.2.2.3-1
	試験番号：[redacted]、添付資料：4.2.2.6-3

2.6.4.2.2 非標識体の分析

＜添付資料 4.2.2.1-2、4.2.2.1-3、4.2.2.1-4＞

ラット、イヌ及びウサギの血漿中メラトニン濃度はLC/MS/MSにより測定した。各測定法のバリデーション試験結果を表 2.6.4-2 に示した。

表 2.6.4-2 メラトニン測定法のバリデーション試験結果（トキシコキネティクス試験）

	ラット	イヌ	ウサギ
マトリックス	血漿	血漿	血漿
測定対象	メラトニン	メラトニン	メラトニン
測定方法	LC/MS/MS	LC/MS/MS	LC/MS/MS
定量範囲	0.04～100 ng/mL	0.04～100 ng/mL	0.04～100 ng/mL
キャリーオーバー	認めず	認めず	認めず
定量下限	0.04 ng/mL	0.04 ng/mL	0.04 ng/mL
日内再現性 （0.1、2及び80 ng/mL）	RE [a)]：±6.2%以内 CV [b)]：4.2%以下	RE [a)]：±13.9%以内 CV [b)]：4.5%以下	RE [a)]：±9.5%以内 CV [b)]：3.3%以下
日間再現性 （0.1、2及び80 ng/mL）	RE [a)]：±6.4%以内 CV [b)]：4.7%以下	RE [a)]：±9.7%以内 CV [b)]：7.2%以下	RE [a)]：±2.8%以内 CV [b)]：5.7%以下
回収率	0.1 ng/mL:85.8% 80 ng/mL:84.8%	0.1 ng/mL:93.9% 80 ng/mL:93.4%	0.1 ng/mL:89.9% 80 ng/mL:89.2%
希釈妥当性	10～10,000倍	10～10,000倍	10～10,000倍
前処理後安定性 （0.1及び80 ng/mL）	4 ℃：48時間	4 ℃：48時間	4 ℃：48時間
凍結融解安定性 （0.1及び80 ng/mL）	-80 ℃：3回	-80 ℃：3回	-80 ℃：3回
短期保存安定性 （0.1及び80 ng/mL）	室温：24時間	室温：24時間	室温：24時間
長期保存安定性 （0.1及び80 ng/mL）	-80 ℃：60日間	-80 ℃：59日間	-80 ℃：62日間
試験施設	[redacted] [c)]	[redacted]	[redacted]
試験番号	[redacted]	[redacted]	[redacted]
添付資料	4.2.2.1-2	4.2.2.1-3	4.2.2.1-4
適用した試験	試験番号：[redacted] 添付資料：4.2.3.2-1	試験番号：[redacted] 添付資料：4.2.3.2-4	試験番号：[redacted] 添付資料：4.2.3.5.2-3
	試験番号：[redacted] 添付資料：4.2.3.2-2	試験番号：[redacted] 添付資料：4.2.3.2-5	
	試験番号：[redacted] 添付資料：4.2.3.5.4-1		

a：相対誤差（Relative error）＝（定量値 − 理論値）/ 理論値 × 100

b：変動係数（Coefficient of variance）＝ 定量値の標準偏差 / 定量値の平均値 × 100

c：[redacted]

2.6.4.3 吸収

2.6.4.3.1 単回投与

＜添付資料 4.2.2.2-1（参考）＞

メラトニンをラット、イヌ及びサルに単回投与したときの血漿中メラトニン濃度から算出した薬物動態パラメーターを表 2.6.4-3 に示した。

表 2.6.4-3 ラット、イヌ及びサルにメラトニンを投与したときの薬物動態パラメーター

薬物動態パラメーター	ラット			イヌ			サル	
	静脈内	腹腔内	経口	静脈内	経口	経口	静脈内	経口
投与量 (mg/kg)	5.00	10	10.00	2.95	0.98	10.30	2.98	10.00
AUC (mg･h/L)	2.38	3.53	2.49	0.81	0.05	3.44	1.78	8.85
クリアランス (L/h/kg)	2.11	－	－	3.84	－	－	1.68	－
半減期 (時間)	0.33	－	－	0.31	－	－	0.57	－
定常状態分布容積 (L/kg)	1.05	－	－	1.48	－	－	1.20	－
生物学的利用率 (%)	－	74.0	53.5	－	16.9	>100	－	>100
経口吸収率 a) (%)	－	－	72	－	－	－	－	－

a：腹腔内投与時の生物学的利用率を肝アベイラビリティーと仮定し、
[経口吸収率×肝アベイラビリティー＝生物学的利用率]から算出した
－：該当しない又は原資料に記載がない

雄ラットにメラトニンを静脈内投与（5 mg/kg）したとき、血漿中メラトニンは消失半減期 0.33 時間で速やかに消失し、全身クリアランスは 2.11 L/hr/kg、定常状態分布容積は 1.05 L/kg であった。雄ラットにメラトニンを経口投与（10 mg/kg）したときの生物学的利用率は、53.5%であった。雄ラットにメラトニンを腹腔内投与（10 mg/kg）投与したときの生物学的利用率は 74.0%であり、この値を肝アベイラビリティーと仮定すると、経口吸収率は 72%と算出された。

雄イヌにメラトニンを静脈内投与（2.95 mg/kg）したとき、血漿中メラトニンは消失半減期 0.31 時間で速やかに消失し、全身クリアランスは 3.84 L/hr/kg、定常状態分布容積は 1.48 L/kg であった。雄イヌにメラトニンを経口投与したときの生物学的利用率は、0.98 mg/kg 投与時で 16.9%、10.30 mg/kg 投与時では 100%を超え、非線形性が認められた。

雄サルにメラトニンを静脈内投与（2.98 mg/kg）したとき、血漿中メラトニンは消失半減期 0.57 時間で速やかに消失し、全身クリアランスは 1.68 L/hr/kg、定常状態分布容積は 1.20 L/kg であった。メラトニンを雄サルに経口投与（10 mg/kg）したときの生物学的利用率は、＞100%であった。

2.6.4.3.2 ラット 4 週間反復投与トキシコキネティクス

＜添付資料 4.2.3.2-1＞

メラトニンを雌雄ラットに 4 週間（28 回）反復経口投与したときの薬物動態パラメーターを表 2.6.4-4 に示した。

表 2.6.4-4 雌雄ラットにメラトニンを 4 週間反復経口投与したときの血漿中メラトニン濃度推移から求めた薬物動態パラメーター

投与回数	性別	雄			雌		
	投与量 (mg/kg/day)	15	75	375	15	75	375
1 回（初回投与）	t_{max} (h)	0.25	0.31	0.25	0.25	0.31	0.25
	C_{max} (ng/mL)	789.9	9688	48620	793.1	18460	54690
	C_{6h} (ng/mL)	0.9178	4.554	4882	0.3394	5.505	3194
	C_{max}/C_{6h} a)	861	2127	10	2337	3353	17
	AUC_{0-6h} (ng・h/mL)	425.1	11460	89760	340.7	19770	100400
28 回（最終投与）	t_{max} (h)	0.25	0.38	0.63	0.17	0.38	0.25
	C_{max} (ng/mL)	1980	10130	24080	2724	16660	32880
	C_{6h} (ng/mL)	0.8693	5.299	8482	0.3874	2.497	5048
	C_{max}/C_{6h} a)	2278	1912	3	7031	6672	7
	AUC_{0-6h} (ng・h/mL)	1358	13640	65550	1253	21750	53510

a：表内の C_{max} 及び C_{6h} から計算した

雌雄ラットにメラトニンを 15、75 及び 375 mg/kg/day の用量で 4 週間（28 回）反復経口投与し、初回及び 28 回投与後の血漿中メラトニン濃度を測定した。投与後、メラトニンは速やかに吸収され、0.25～0.63 時間に最高血漿中濃度（C_{max}）に達した。その後のメラトニン血漿中濃度の低下は速やかであり、投与後 6 時間には、低用量群及び中用量群では C_{max} の 1/861～1/7031 に低下した。高用量群での血漿中濃度の低下はやや緩徐であったが、投与後 6 時間には 1/3～1/17 に低下した。投与量の増加に伴い、C_{max} 及び AUC_{0-6h} は上昇した。初回投与後の AUC_{0-6h} の上昇の程度は用量増加比よりも明らかに大きかった。

反復投与により、低用量群では C_{max} 及び AUC_{0-6h} の増加が見られたが、中用量群では変化がなく、高用量群では低下傾向が見られた。そのため、28 回投与後の AUC_{0-6h} の用量増加に伴う変化は、用量増加比よりやや大きい程度であった。

いずれのパラメーターにおいても、投与量及び投与回数に関わらず、明確な性差は見られなかった。

2.6.4.3.3 ラット 13 週間反復投与トキシコキネティクス

＜添付資料 4.2.3.2-2＞

メラトニンを雌雄ラットに 13 週間（91 回）反復経口投与したときの薬物動態パラメーターを表 2.6.4-5 に示した。

表 2.6.4-5 雌雄ラットにメラトニンを 13 週間反復経口投与したときの血漿中メラトニン濃度推移から求めた薬物動態パラメーター

投与回数	性別	雄			雌		
	投与量 (mg/kg/day)	15	75	375	15	75	375
1 回（初回投与）	t_{max} (h)	0.25	0.38	0.25	0.25	0.33	0.25
	C_{max} (ng/mL)	672.2	6459	32480	937.1	9457	35170
	C_{6h} (ng/mL)	0.9866	3.838	2870	0.9597	12.00	6702
	C_{max}/C_{6h} a)	681	1683	11	976	788	5
	AUC_{0-6h} (ng・h/mL)	369.7	6672	64120	379.8	9165	75220
91 回（最終投与）	t_{max} (h)	0.21	0.31	0.50	0.21	0.50	0.25
	C_{max} (ng/mL)	4843	13670	34470	5701	17630	45750
	C_{6h} (ng/mL)	6.113	383.7	7562	1.065	42.37	1728
	C_{max}/C_{6h} a)	792	36	5	5353	416	26
	AUC_{0-6h} (ng・h/mL)	3803	19040	91850	2620	21330	70170

a：表内の C_{max} 及び C_{6h} から計算した

雌雄ラットにメラトニンを 15、75 及び 375 mg/kg/day の用量で 13 週間（91 回）反復経口投与し、初回及び 91 回投与後の血漿中メラトニン濃度を測定した。投与後、メラトニンは速やかに吸収され、0.21～0.50 時間に最高血漿中濃度（C_{max}）に達した。その後のメラトニン血漿中濃度の低下は速やかであり、投与後 6 時間には、低用量群及び中用量群では C_{max} の 1/36～1/5353 に低下した。高用量群での消失はやや緩徐であったが、投与後 6 時間には 1/5～1/26 に低下した。投与量の増加に伴い、C_{max} 及び AUC_{0-6h} は上昇した。初回投与後の AUC_{0-6h} の上昇の程度は用量増加比よりも明らかに大きかった。

反復投与により、低用量群及び中用量群では C_{max} 及び AUC_{0-6h} の増加が見られたが、高用量群では明確な変化は見られなかった。そのため、91 回投与後の AUC_{0-6h} の増加は、ほぼ用量増加比に等しかった。

いずれのパラメーターにおいても、投与量及び投与回数に関わらず、明確な性差は見られなかった。

2.6.4.3.4 幼若ラット4週間反復投与トキシコキネティクス

＜添付資料 4.2.3.5.4-1＞

メラトニンを雌雄幼若ラットに4週間（28回）反復経口投与したときの薬物動態パラメーターを表 2.6.4-6 に示した。

表 2.6.4-6 雌雄幼若ラットにメラトニンを4週間反復経口投与したときの血漿中メラトニン濃度推移から求めた薬物動態パラメーター

投与回数	性別	雄			雌		
	投与量 (mg/kg/day)	15	75	375	15	75	375
1回 a)（初回投与）	t_{max}(h)	1.0	1.0	6.0	1.0	1.0	6.0
	C_{max}(ng/mL)	4191	25570	122300	4792	24450	123900
	C_{6h}(ng/mL)	290.4	11340	122300	51.35	12850	123900
	C_{max}/C_{6h} c)	14	2	1	93	2	1
	AUC_{0-6h}(ng・h/mL)	12520	116400	556800	12350	113700	573400
28回 b)（最終投与）	t_{max}(h)	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
	C_{max}(ng/mL)	810.3	8991	12410	1118	13680	29940
	C_{6h}(ng/mL)	0.3185	15.45	1528	BLQ	1.315	1148
	C_{max}/C_{6h} c)	2544	582	8	>27950	10403	26
	AUC_{0-6h}(ng・h/mL)	341.8	8360	27230	364.8	11710	70570

a：投与時1週齢
b：投与時5週齢
c：表内の C_{max} 及び C_{6h} から計算した
BLQ：定量下限（0.04 ng/mL）未満

雌雄幼若ラットにメラトニンを15、75及び375 mg/kg/dayの用量で4週間（28回）反復経口投与し、初回及び28回投与後の血漿中メラトニン濃度を測定した。初回投与後のメラトニンの経口吸収は、成熟ラット（表 2.6.4-4、表 2.6.4-5）と比較してやや緩徐であり、低用量及び中用量群では投与後1時間に、高用量群では投与後6時間に最高血漿中濃度(C_{max})に達した。幼若ラットにおける初回投与後（投与時1週齢）の血漿中濃度（C_{max} 及び AUC_{0-6h}）は、成熟ラットの初回投与後（6週齢、表 2.6.4-4、表 2.6.4-5）と比較して明らかに高値を示したが、28回反復投与後（5週齢）には低下し、成熟ラットの初回投与時とほぼ同程度となった。

いずれのパラメーターにおいても、投与量及び投与回数に関わらず、明確な性差は見られなかった。

2.6.4.3.5 イヌ 4 週間反復投与トキシコキネティクス

＜添付資料 4.2.3.2-4＞

メラトニンを雌雄イヌに 4 週間（28 回）反復経口投与したときの薬物動態パラメーターを表 2.6.4-7 に示した。

表 2.6.4-7 雌雄イヌにメラトニンを 4 週間反復経口投与したときの血漿中メラトニン濃度推移から求めた薬物動態パラメーター

投与回数	性別	雄			雌		
	投与量 (mg/kg/day)	15	75	375 (150) [b]	15	75	375 (150) [b]
1 回 (初回投与)	t_{max} (h)	0.44	0.75	1.6	0.46	0.88	1.7
	C_{max} (ng/mL)	3875	20440	40470	2330	15280	43590
	C_{8h} (ng/mL)	0.4298	7.437	3424	0.2164	8.924	4691
	C_{max}/C_{8h} [a]	9016	2748	12	10767	1712	9
	AUC_{0-8h} (ng・h/mL)	3744	42020	191000	2070	39140	205200
用量変更日	AUC_{0-8h} (ng・h/mL)	— [c]	— [c]	121400 [d]	— [c]	— [c]	74500 [d]
28 回 (最終投与)	t_{max} (h)	0.40	1.5	0.75 [b]	0.50	0.63	1.3 [b]
	C_{max} (ng/mL)	4360	16750	27590 [b]	4762	26130	30970 [b]
	C_{8h} (ng/mL)	0.8409	19.49	524.1 [b]	0.9948	70.62	758.1 [b]
	C_{max}/C_{8h} [a]	5185	859	53 [b]	4787	370	41 [b]
	AUC_{0-8h} (ng・h/mL)	4909	43510	93240 [b]	5972	65710	106600 [b]

a：表内の C_{max} 及び C_{8h} から計算した
b：第 15 日以降、150 mg/kg に減量した
c：該当しない
d：用量変更日（15 日目）の値

雌雄イヌにメラトニンを 15、75 及び 375 mg/kg/day の用量で 4 週間（28 回）反復経口投与し、初回及び 28 回投与後の血漿中メラトニン濃度を測定した。初回投与後、メラトニンは速やかに吸収され、0.44～1.7 時間に最高血漿中濃度（C_{max}）に達した。ラット（表 2.6.4-4、表 2.6.4-5）と比較すると吸収はやや緩徐であり、用量の増加に伴い t_{max} が遅れる傾向が見られた。その後のメラトニン血漿中濃度の低下は速やかであり低用量群及び中用量群では投与後 8 時間には、C_{max} の 1/1712～1/10767 にまで低下した。高用量群での消失はやや緩徐であったが、投与後 8 時間には 1/9～1/12 にまで低下した。投与量の増加に伴い、C_{max} 及び AUC_{0-8h} は上昇した。AUC_{0-8h} の上昇の程度は、用量増加比よりも大きかった。

反復投与により、低用量群及び中用量群では C_{max} 及び AUC_{0-8h} に明確な変化は見られなかった。高用量群では、投与 15 日目から投与量が減量されたが、減量直後と 28 回投与後の AUC_{0-8h} に大きな差はみられなかった。

いずれのパラメーターにおいても、投与量及び投与回数に関わらず、明確な性差は見られなかった。

2.6.4.3.6 イヌ 39 週間反復投与トキシコキネティクス

＜添付資料 4.2.3.2-5＞

メラトニンを雌雄イヌに 39 週間（273 回）反復経口投与したときの薬物動態パラメーターを表 2.6.4-8 に示した。

表 2.6.4-8 雌雄イヌにメラトニンを 39 週間反復経口投与したときの血漿中メラトニン濃度推移から求めた薬物動態パラメーター

投与回数	性別	雄			雌		
	投与量 (mg/kg/day)	15	75	250 (150) [b]	15	75	250 (150) [c]
1 回（初回投与）	t_{max} (h)	0.38	0.44	1.3	0.50	0.88	1.3
	C_{max} (ng/mL)	4519	56980	69240	5431	59950	74630
	C_{8h} (ng/mL)	0.2707	17.83	3485	1.005	26.39	6600
	C_{max}/C_{8h} [a]	16694	3196	20	5404	2272	11
	AUC_{0-8h} (ng・h/mL)	4361	110800	246600	7294	120300	275900
91 回	t_{max} (h)	0.31	0.88	2.0	0.50	0.63	1.4
	C_{max} (ng/mL)	4558	29080	49990	4362	30330	49620
	C_{8h} (ng/mL)	0.6893	128.0	3983	1.846	29.28	4164
	C_{max}/C_{8h} [a]	6613	227	13	2363	1036	12
	AUC_{0-8h} (ng・h/mL)	5217	72040	234500	6933	60110	208400
用量変更日	AUC_{0-8h} (ng・h/mL)	— [d]	— [d]	195500 [e]	— [d]	— [d]	158400 [f]
273 回（最終投与）	t_{max} (h)	0.31	1.0	1.7 [b]	0.38	0.75	0.81 [c]
	C_{max} (ng/mL)	5698	23670	40620 [b]	5861	32680	35570 [c]
	C_{8h} (ng/mL)	0.8850	69.19	9403 [b]	1.863	47.98	954.4 [c]
	C_{max}/C_{8h} [a]	6438	342	4 [b]	3146	681	37 [c]
	AUC_{0-8h} (ng・h/mL)	6076	62410	157600 [b]	7788	84870	126400 [c]

a：表内の C_{max} 及び C_{8h} から計算した
b：第 217 日以降、150 mg/kg に減量
c：第 209 日以降、150 mg/kg に減量
d：該当しない
e：用量変更日（217 日目）の値
f：用量変更日（209 日目）の値

雌雄イヌにメラトニンを 15、75 及び 250 mg/kg/day の用量で 39 週間（273 回）反復経口投与し、初回、91 回及び 273 回投与後の血漿中メラトニン濃度を測定した。初回投与後、メラトニンは速やかに吸収され、0.38～1.3 時間に最高血漿中濃度（C_{max}）に達した。ラット（表 2.6.4-4、表 2.6.4-5）と比較すると吸収はやや緩徐であり、用量の増加に伴い t_{max} が遅れる傾向が見られた。その後のメラトニン血漿中濃度の低下は速やかであり、低用量群及び中用量群では投与後 8 時間には C_{max} の 1/2272～1/16694 に低下した。高用量群での消失はやや緩徐であったが、投与後 8 時間には 1/11～1/20 に低下した。投与量の増加に伴い、C_{max} 及び AUC_{0-8h} は上昇した。AUC_{0-8h} の増加の程度は用量増加比よりも大きかった。

反復投与により、低用量群及び中用量群ではC_{max}及びAUC_{0-8h}に明確な変化は見られなかった。高用量群では、初回投与後及び91回投与後のC_{max}及びAUC_{0-8h}に差はみられなかった。その後、投与量が減量されたが、減量直後と273回投与後のAUC_{0-8h}に大きな差はみられなかった。

いずれのパラメーターにおいても、投与量及び投与回数に関わらず、明確な性差は見られなかった。

2.6.4.4 分布

2.6.4.4.1 全身オートラジオグラフィー

＜添付資料 4.2.2.3-1＞

雄性白色ラット及び有色ラットに[^{14}C]メラトニンを単回経口投与（15 mg/kg）し、定量的全身オートラジオグラフィーにより放射能の組織分布を検討した（表 2.6.4-9、図 2.6.4-1、図 2.6.4-2）。

白色ラット及び有色ラットのいずれにおいても、膀胱を除く全ての組織中放射能が投与後 0.25 時間に最高濃度を示したことから、[^{14}C]メラトニンの速やかな吸収及び分布が示された。放射能は全身に分布したが、血液よりも高い放射能が検出されたのは、ブドウ膜、肝臓、腎臓、副腎及び膀胱内の尿であった。投与後 0.25 時間と比較して投与後 1 時間では、膀胱内尿の放射能は上昇したが、その他の全ての組織中放射能は速やかに低下し、投与後 24 時間では多くの組織で定量下限未満となったことから、吸収されたメラトニンは速やかに体外に排泄されることが示された。また、投与後 0.25 時間及び 1 時間において、膀胱内には消化管内容物と比較しても強い放射能が検出され（図 2.6.4-1）、[^{14}C]メラトニンの速やかな吸収と尿中排泄が示唆された。

有色ラットと白色ラットの比較では、ブドウ膜を除くといずれの時点においても血液及び組織中放射能に顕著な濃度差は認められず、同程度の放射能が分布した（表 2.6.4-9）。有色ラットのブドウ膜には放射能の分布が確認されたが、白色ラットでは眼球組織内に局所的な放射能は認められなかった（図 2.6.4-2）。このことから、メラトニン及び/又はその代謝物はメラニンへの親和性を有するものと考えられたが、ブドウ膜からの放射能の消失は他の組織と同様に速やかであり、蓄積性を示唆するものではなかった。

表 2.6.4-9 雄性白色ラット及び有色ラットに[^{14}C]メラトニンを単回経口投与（15 mg/kg）したときの組織中放射能濃度

組織/臓器	組織中放射能濃度（μg eq./g）						有色／白色 比		
	白色ラット			有色ラット					
	0.25 h	1 h	24 h	0.25 h	1 h	24 h	0.25 h	1 h	24 h
血液	13.4	2.62	ND	14.6	3.74	ND	1.09	1.43	NC
大脳	4.67	0.365	ND	4.58	0.323	ND	0.98	0.88	NC
小脳	4.56	0.378	ND	4.81	0.338	ND	1.05	0.89	NC
下垂体	12.0	1.16	ND	10.0	1.17	ND	0.83	1.01	NC
延髄	4.95	0.333	ND	4.94	0.332	ND	1.00	1.00	NC
脊髄	4.77	0.383	ND	4.44	0.352	ND	0.93	0.92	NC
ブドウ膜	NA	NA	NA	30.9	6.55	1.02	NA	NA	NA
眼球	2.26	0.736	ND	1.67	0.357	BLQ	0.74	0.49	NC
ハーダー氏腺	12.4	1.19	ND	12.1	1.50	BLQ	0.98	1.26	NC
顎下腺	11.3	1.12	ND	11.2	1.39	ND	0.99	1.24	NC
甲状腺	11.8	1.45	ND	11.1	1.69	ND	0.94	1.17	NC
胸腺	8.45	1.06	ND	8.17	1.09	ND	0.97	1.03	NC
心臓	9.70	1.13	BLQ	11.1	1.48	BLQ	1.14	1.31	NC
肺	11.8	2.06	BLQ	14.5	3.45	BLQ	1.23	1.67	NC
肝臓	32.8	6.18	0.506	35.3	11.3	0.505	1.08	1.83	1.00
腎臓	37.1	8.16	0.308	33.8	9.99	0.341	0.91	1.22	1.11
副腎	16.0	3.14	0.544	18.6	3.49	0.713	1.16	1.11	1.31
脾臓	8.23	1.03	0.246	9.58	1.14	BLQ	1.16	1.11	NC
膵臓	12.7	1.39	BLQ	13.6	1.85	BLQ	1.07	1.33	NC
前立腺	9.12	2.84	ND	8.68	1.61	ND	0.95	0.57	NC
精巣	3.65	1.43	ND	4.60	1.40	ND	1.26	0.98	NC
精嚢	7.47	1.18	ND	6.94	1.39	ND	0.93	1.18	NC
皮膚（有色部）	NA	NA	NA	9.90	3.02	ND	NA	NA	NA
皮膚（非有色部）	8.09	2.10	ND	6.36	2.75	ND	0.79	1.31	NC
骨格筋	9.63	0.891	BLQ	9.30	1.02	BLQ	0.97	1.14	NC
大腿骨	1.69	0.350	BLQ	0.879	0.339	BLQ	0.52	0.97	NC
骨髄（大腿骨）	8.50	1.25	0.398	8.68	1.40	0.369	1.02	1.12	0.93
白色脂肪	1.60	0.566	BLQ	2.83	0.446	BLQ	1.77	0.79	NC
褐色脂肪	8.83	1.32	ND	7.42	1.10	ND	0.84	0.83	NC
膀胱	23.9	29.7	ND	10.5	31.5	ND	0.44	1.06	NC

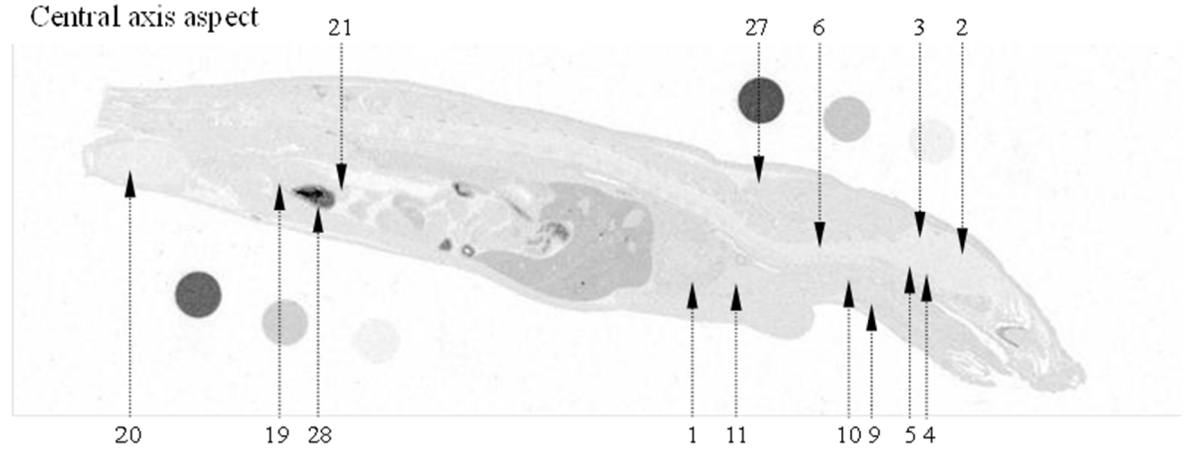
BLQ：定量下限（0.242 μg eq./g）未満

ND：目視にて放射能が認められない

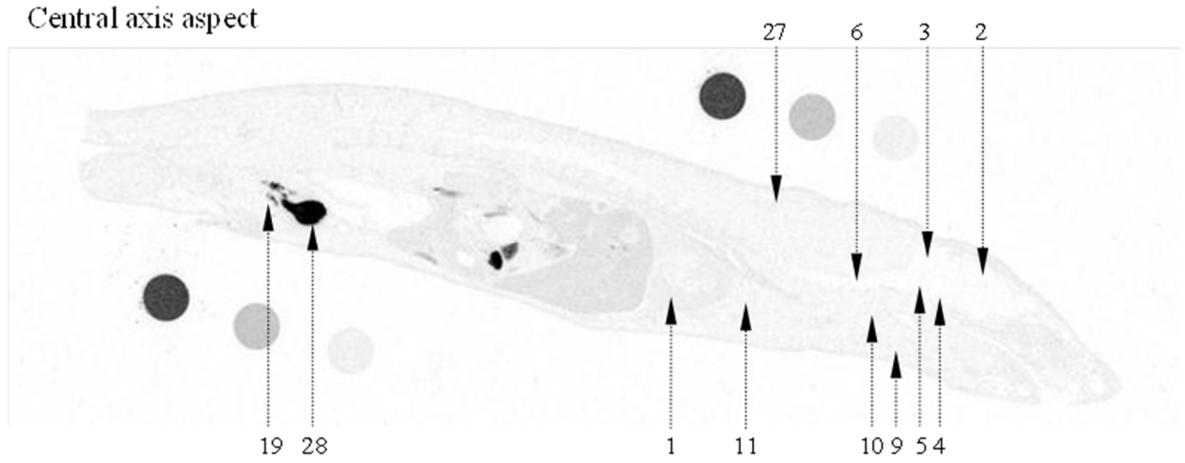
NC：算出しない

NA：該当しない

投与後 0.25 時間



投与後 1 時間



1	Blood	8	Harderian gland	15	Kidney	22	Skin
2	Cerebrum	9	Submaxillary gland	16	Adrenal	23	Skeletal muscle
3	Cerebellum	10	Thyroid	17	Spleen	24	Bone (femur)
4	Pituitary	11	Thymus	18	Pancreas	25	Bone marrow (femur)
5	Medulla oblongata	12	Heart	19	Prostate	26	White adipose tissue
6	Spinal cord	13	Lung	20	Testis	27	Brown adipose tissue
7	Eyeball	14	Liver	21	Seminal vesicle	28	Bladder

図 2.6.4-1 雄性白色ラットに[^{14}C]メラトニンを単回経口投与（15 mg/kg）したときの全身ラジオルミノグラム

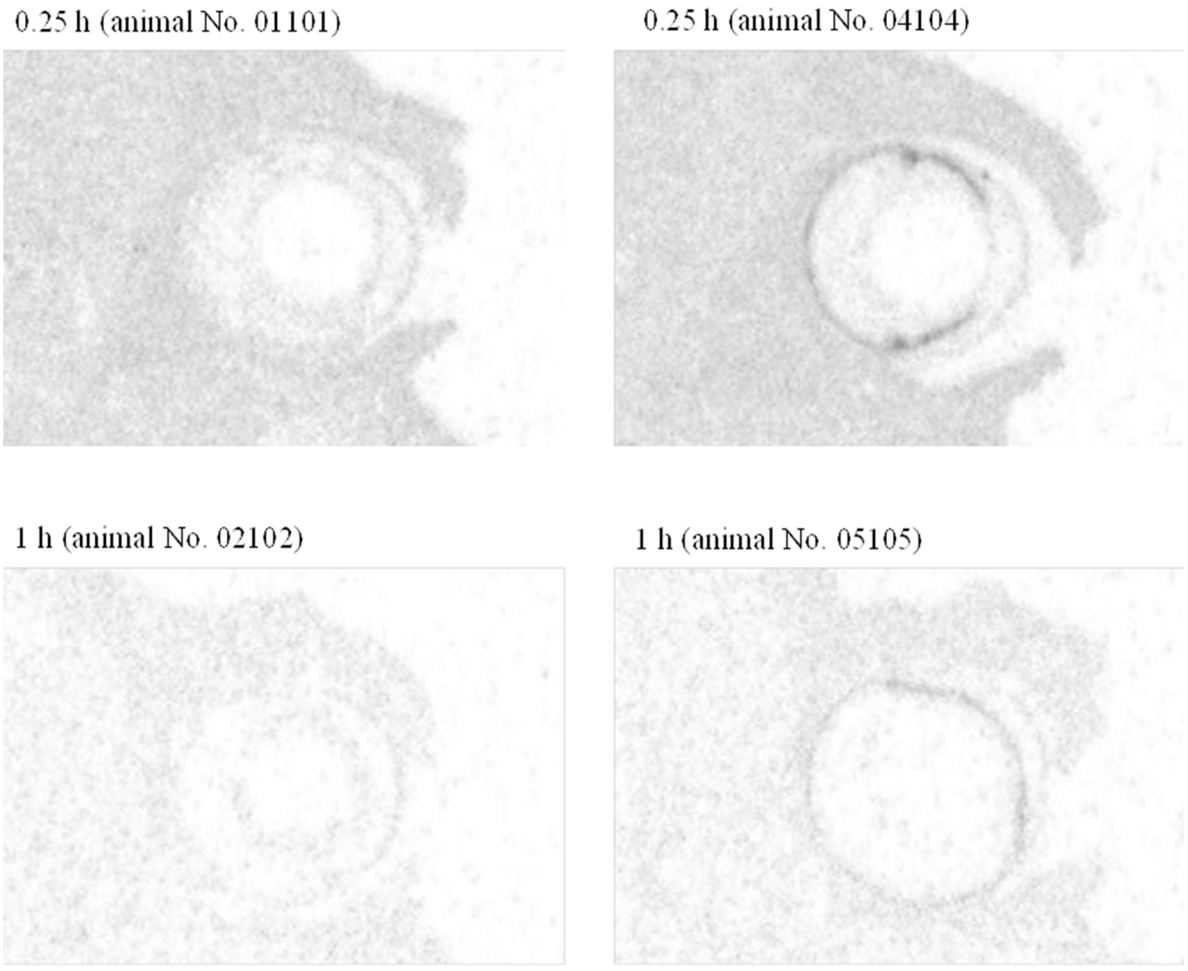
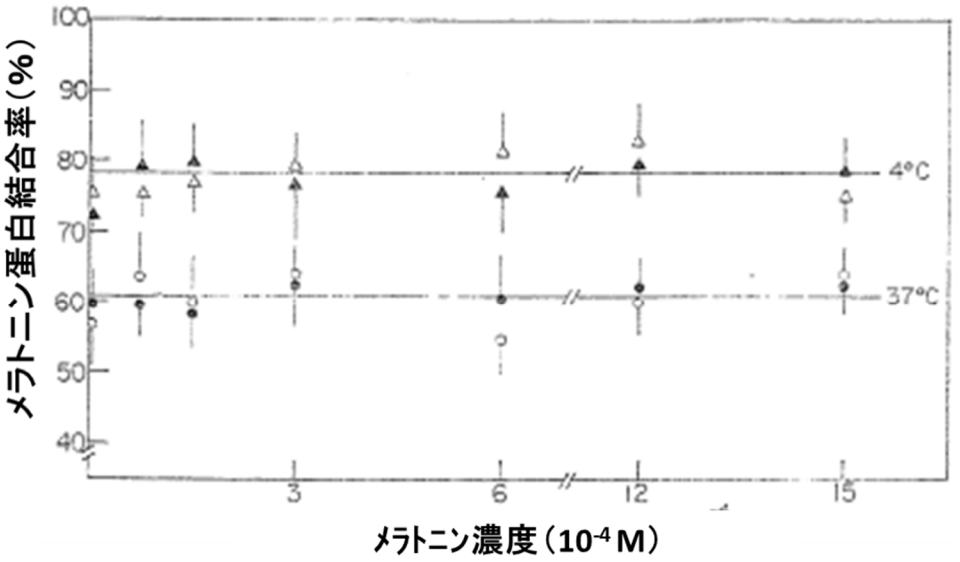


図 2.6.4-2 雄性白色ラット及び有色ラットに[^{14}C]メラトニンを単回経口投与（15 mg/kg）したときの眼球ラジオルミノグラム

2.6.4.4.2 たん白結合

＜添付資料 4.2.2.3-2（参考）、4.2.2.3-3（参考）＞

ラット又はヒト血漿と[^{3}H]メラトニン(約 8×10^5 dpm＋非標識メラトニン)をインキュベートし、平衡透析（透析温度：4 及び 37℃、透析時間 15 時間）によりメラトニンのたん白結合率を測定した（図 2.6.4-3)。ヒト及びラット血漿に対するメラトニンの結合に差異はなく、また、メラトニン濃度に依存せず、1.5 mmol/L までほぼ一定した結合率を示した。ラット及びヒトを合算した結合率は、4 ℃で 77.8±4.3%、37 ℃で 60.7±4.8%であった。



△:ラット/4 ℃、○:ラット/37 ℃、▲:ヒト/4 ℃、●:ヒト/37 ℃

図 2.6.4-3 ラット及びヒト血漿に対する[^{3}H]メラトニンの結合率

メラトニンの結合たん白を同定する目的で、[^{3}H]メラトニン(約 8×10^5 dpm)をヒトたん白溶液に添加してインキュベートしたときの結合率を測定し、表 2.6.4-10 に示した。[^{3}H]メラトニンはヒトαグロブリン、ヒトβグロブリン、ヒトγグロブリン及びヒトフィブリノゲンとは結合せず、ヒトアルブミンと結合することが示された。ヒトアルブミンに対する[^{3}H]メラトニンの結合率は 60.6%であった。

表 2.6.4-10 ヒト血漿たん白溶液に対する[^{3}H]メラトニンの結合率

結合たん白	たん白濃度（w/v %）[a)]	結合率（%）
ヒトアルブミン	4	60.6±3.5 [b)]
ヒトαグロブリン	1	0
ヒトβグロブリン	1	0
ヒトγグロブリン	2	0
ヒトフィブリノゲン	0.5	0

a：ヒト血漿と近似した濃度を設定した
b：平均値±標準誤差（n=4）

さらに、ヒトα1酸性糖たん白（α1-AGP）との結合率を検討した。[^{3}H]メラトニンをヒト血清、ヒトα1-AGP溶液又はヒトアルブミン溶液に添加し、37℃でインキュベートした後に平衡透析法により[^{3}H]メラトニンのたん白結合率を測定した（表 2.6.4-11）。[^{3}H]メラトニン添加濃度を、ヒト内因性レベルとした時の健康成人血清、癌患者血清、ヒトアルブミン及びα1-AGPに対する結合率はそれぞれ、53、58、32.3及び9.1%であった。ヒトアルブミン/ヒトα1-AGP混合溶液に対する結合率は54.2%であり、ヒト血清に対する結合率とほぼ一致した。[^{3}H]メラトニン添加濃度を、NPC-15の臨床第Ⅰ相試験におけるC_{max}を上回るレベルである0.9 μmol/L（197 ng/mL）としたときの健康成人血清に対する結合率は53%であった。

表 2.6.4-11 ヒト血清、ヒトアルブミン溶液及びヒトα1酸性糖たん白に対する[^{3}H]メラトニンの結合率

たん白結合率（%）						
ヒト血清又はヒトたん白溶液	たん白濃度（μmol/L）		[^{3}H]メラトニン濃度（上段：μmol/L）（下段：ng/mL）[a)]			
	アルブミン	α1-AGP	0.0003 [d)]	0.0004 [d)]	0.9 [e)]	111
			0.0696	0.0928	197	25638
健康成人血清	696 [b)]	17.5 [b)]	－	53±1	53±3	41±2
癌患者血清	563 [b)]	39 [b)]	－	58±1	－	－
ヒトアルブミン溶液	696 [c)]	該当しない	32.3±1.2	－	－	－
ヒトα1-AGP	該当しない	17.5 [c)]	9.1±2.1	－	－	－
ヒトアルブミン/ヒトα1-AGP混合溶液	696 [c)]	17.5 [c)]	54.2±0.7	－	－	－

a：メラトニンの分子量を232として換算
b：測定値
c：設定値
d：内因性メラトニン濃度に相当するレベル
e：第Ⅰ相試験におけるC_{max}（5 mg投与時、男性：9.6 ng/mL、女性：11.0 ng/mL）を上回るレベル
－：測定していない

以上のことから、メラトニンのヒト血漿たん白結合率は50～60%であり、その主たる結合たん白質はアルブミンであることが示された。加えて、α1酸性糖たん白の寄与も示唆された。

2.6.4.4.3 血球移行性

＜添付資料 4.2.2.3-2（参考）＞

ラット血液に[^{3}H]メラトニンを 1.84×10^5 dpm/mL（0.414 nmol/96 ng/mL）の濃度となるように添加し，37℃で 15～90 分間インキュベーション後の血液/血漿中濃度比（Rb 値）及び血球移行率を求めた（表 2.6.4-12)。インキュベーション時間を通じて、Rb 値及び血球移行率はほぼ一定した値を示し、各測定時点を平均した値はそれぞれ 0.75 及び 26.0%であった。

表 2.6.4-12 メラトニンの血球移行率

インキュベーション時間（分）	ヘマトクリット値	Rb 値	血球移行率（%）
15	0.44	0.70	20.5
30	0.46	0.73	25.9
60	0.44	0.81	30.0
90	0.46	0.75	27.6
平均値	0.45	0.75	26.0

2.6.4.4.4 胎盤通過

＜添付資料 4.2.2.3-4（参考）＞

妊娠中のサル 3 頭（動物番号：606A、922A、S92）に[^{3}H]メラトニン 1.0 μg(150 μCi)/頭を静脈内投与したときの母動物血漿、胎仔血漿及び羊水中の[^{3}H]メラトニン濃度を図 2.6.4-4 に示した。

サル胎仔の血漿中に[^{3}H]メラトニンが投与後速やかに検出され、母動物血漿中[^{3}H]メラトニン濃度に対する胎仔血漿中[^{3}H]メラトニン濃度の割合は、606A 及び 922A では、投与後 1～3 分において 84～90%であり、S92 では投与後 1 分において 27%、3 分において 63%であった。その後、母動物及び胎児血漿中[^{3}H]メラトニン濃度は平行して消失した。投与後 30 分における母動物血漿中[^{3}H]メラトニン濃度に対する胎仔血漿中[^{3}H]メラトニン濃度の割合(%)は、66±5%（3 例の平均値±標準誤差）であった。また、[^{3}H]メラトニンは羊水中にも投与後速やかに検出された。これらのことから、投与されたメラトニンは血液－胎盤関門を通過し、胎仔に移行することが示された。

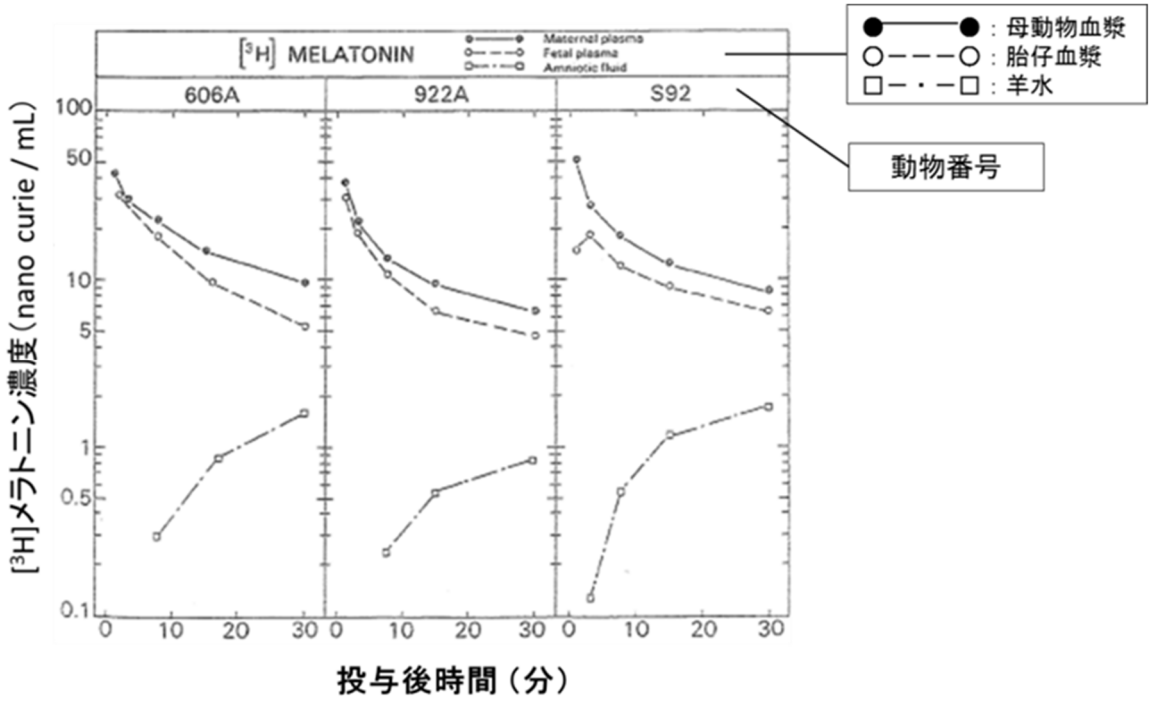


図 2.6.4-4 妊娠中のサルに[^{3}H]メラトニンを静脈内投与した後の母動物血漿、胎仔血漿及び羊水中[^{3}H]メラトニン濃度推移

2.6.4.5 代謝

2.6.4.5.1 In vivo 代謝

(1) 6-水酸化

＜添付資料 4.2.2.4-1（参考）＞

雄性 SD ラットに[acetyl-^{3}H]メラトニン、[2-^{14}C]メラトニン又は[methoxy-^{14}C]メラトニンを静脈内投与後 48 時間までに排泄された尿及び糞を採取し、放射能を測定したところ、投与放射能の 60～70%が尿中に、約 15%が糞中に回収された。標識位置の異なる標識体を投与した場合でも尿及び糞への放射能の排泄に違いは見られなかった。尿中の放射能をペーパークロマトグラフィーにより分析したところ、3 つの放射能スポットが検出された。そのうち 2 つはエールリッヒ反応陽性であること及び標品との比較から 6-水酸化メラトニン（6-OH-MT）の硫酸抱合体（6-Sul-MT、尿中放射能の 70-80%）及び 6-OH-MT のグルクロン酸抱合体（6-Glu-MT、同 5%）であることが示された。他の 1 つはエールリッヒ反応陰性の未知代謝物（同 12%）であった。未変化のメラトニンは、尿及び糞のいずれにも検出されなかった。以上のことから、メラトニンは 6 位が水酸化された後に主として硫酸抱合体として尿中に排泄されることが示された。この他、投与放射能の 0.5%に相当する 5-メトキシインドール酢酸が認められたことから、N-脱アセチル代謝物の生成が示唆された。

(2) N-脱アセチル化

＜添付資料 4.2.2.4-2（参考）＞

ラットに[^{14}C]メラトニンを腹腔内投与後 24 時間までに排泄された尿を採取し、放射能を測定したところ、投与放射能の 70%が回収された。尿中放射能をペーパークロマトグラフィーにより分析した結果、(1)項と同様に、尿中放射能の 55%が 6-Sul-MT、30%が 6-Glu-MT 及び 15%がエールリッヒ反応陰性の未知代謝物であり、投与放射能の 2%に相当する 5-メトキシインドール酢酸が検出された。

ラットに[^{14}C]-5-メトキシトリプタミンを腹腔内投与後 24 時間までに排泄された尿を採取し、放射能を測定したところ、投与放射能の≧80%が回収された。尿中放射能をペーパークロマトグラフィーにより分析した結果、尿中放射能の 90%以上が 5-メトキシインドール酢酸であり、約 2%が未変化の 5-メトキシトリプタミンであった。さらに、[^{14}C]-5-メトキシインドール酢酸を投与した後の尿中放射能を分析した結果、5-メトキシインドール酢酸のみが検出された。以上のことから、メラトニンは、僅かではあるが脱アセチル化して 5-メトキシトリプタミンを生成し、さらに 5-メトキシインドール酢酸に代謝されて尿中に排泄されることが示された。

なお、6-Glu-MT の尿中排泄率は、(1)項の検討では尿中放射能の 5%であったのに対し、本項の検討では 30%であり、高値を示した。(1)項の[^{3}H]又は[^{14}C]標識メラトニンの投与量はトレーサーレベルでありメラトニンとしては微量であるのに対し、本項の投与量は 10 mg/rat であった。このことから、6-OH-MT は硫酸抱合酵素に対して親和性が高く、内因性レベルあるいは低投与量においては優先して硫酸抱合が生じるが、投与量が多くなるに伴いグルクロン酸抱合の寄与が高まるのであろうと推察した。

(3) インドールの開環

＜添付資料 4.2.2.4-3（参考）＞

ウサギ脳から精製した酵素と[^{14}C]メラトニンをインキュベーションした後、薄層クロマトグラフィー（TLC）で分析した結果、N-acetyl-N-formyl-5-methoxykynurenamine（AFMK）及びN-acetyl-5-methoxykynurenamine（AMK）が検出された。インキュベーション溶液に、さらにホルムアミダーゼを加えたところ、AFMK は検出されず AMK のみが検出されたことから、AMK は AFMK から逐次的に生成することが示唆された。

雄性 SD ラットに[^{14}C]メラトニンを大槽内投与した後、20 及び 45 分後に脳を摘出して放射能を抽出した。抽出した放射能をカラムクロマトグラフィーにより分析したところ、未変化のメラトニンに加えて AMK が検出されたことから、メラトニンは脳内で AMK に代謝されることが示された。

ラットに[^{14}C]メラトニンを大槽内及び静脈内投与後 24 時間までに排泄された尿を採取し、放射能を測定したところ、いずれの投与経路でも投与放射能の 65%が回収された。尿中放射能をカラムクロマトグラフィーにより分析した結果、大槽内及び静脈内投与後の尿中放射能のそれぞれ 35%及び 15%が AMK であった。静脈内投与後のインドールの開環は主として肝臓において生じるものと考えられる。

以上のことから、メラトニンは脳内において AFMK を介して AMK に酵素的に代謝されること、及び、静脈内投与されたメラトニンの一部は肝臓で開環し、AMK として尿中に排泄されることが示された。なお、AMK はインドールが開環した構造のためエールリッヒ反応陰性となる。従って、(1)項及び(2)項において認められたエールリッヒ反応陰性の未知代謝物は、AMK である可能性が示唆される。

(4) 5-脱メチル化

＜添付資料 4.2.2.4-4（参考）＞

ラットに非標識メラトニンを腹腔内投与後 18 時間までの尿を採取した。TLC で分析した結果、3 つのエールリッヒ反応陽性スポットが検出された。主要なスポットは 6-Sul-MT の位置に、次いでやや弱いスポットが 6-Glu-MT の位置に、弱いスポットが未抱合の 6-OH-MT の位置に検出された。6-Sul-MT に相当するスポットをかき取り、抽出してトリフルオロ酢酸（TFA）で誘導体化後、ガスクロマトグラフ質量分析計（GC/MS）で分析した。その結果、2 つのピークが検出され、それぞれの溶出位置及びマススペクトルが、6-OH-MT の TFA 誘導体（TFA-6-OH-MT）及び N-アセチルセロトニン（NAS）の TFA 誘導体（TFA-NAS）と一致した。

ラットに NAS を腹腔内投与後 18 時間までの尿を採取し、TLC で分析した結果、6-Sul-MT、6-Glu-MT 及び NAS の位置にエールリッヒ反応陽性スポットが検出された。6-Sul-MT に相当するスポットをかき取り、抽出して TFA で誘導体化後、GC/MS で分析した。その結果、NAS の TFA 誘導体（TFA-NAS）のみが検出された。

ラットに 6-OH-MT を腹腔内投与後 18 時間までの尿を採取し、TLC で分析した結果、メラトニン投与時と同様に 3 つのエールリッヒ反応陽性スポットが検出された。6-Sul-MT に相当するス

ポットをかき取り、抽出して TFA で誘導体化後、GC-MS で分析した結果、6-OH-MT の TFA 誘導体（TFA-6-OH-MT）のみが検出された。

以上のことから、投与されたメラトニンの一部は、6 位の水酸化に加えて 5-脱メチル化を受けNASに代謝されることが示された。この実験ではNASの抱合体を直接検出した訳ではないが、非抱合の NAS は TLC 上 6-Sul-MT とは異なる位置に検出されたこと、6-Sul-MT に相当するスポットから GC/MS 分析により NAS が検出されたことから、尿中の NAS の少なくとも一部は抱合体として存在するものと考えられる。

重水素標識メラトニンを投与したラットの尿を、TLC による分離は行わず直接 TFA で誘導体化後、GC/MS により分析した。その結果、NAS の重水素体が検出されたことから、尿中に検出された NAS は生体由来ではなく､投与した外因性メラトニンに由来することが確認された。また、重水素標識メラトニンを 1、10 及び 50 mg/kg の用量で腹腔内投与して尿中の 6-OH-MT と NAS の生成比の変化を検討した。6-OH-MT のピーク高を 100％として NAS の存在比を求めた結果、6-OH-MT に対する NAS の比は、投与量が 1、10 及び 50 mg/kg のとき、それぞれ 30％、50％及び 60-80％であり、投与量の増加に伴い NAS の生成比が増加した。このことから、メラトニンは 6-水酸化酵素に対して親和性が高く、内因性レベルあるいは低投与量においては優先して 6 位の水酸化が生じるが、投与量が多くなるに伴い、5-脱メチル化の寄与が高まることが示唆された。

2.6.4.5.2 推定代謝経路

＜添付資料 4.2.2.4-1（参考）、4.2.2.4-2（参考）、4.2.2.4-3（参考）、4.2.2.4-4（参考）、4.2.2.4-6（参考）＞

前項（2.6.4.5.1）の検討結果に基づき、メラトニンの代謝経路を図 2.6.4-5 に示した。メラトニンの主要な代謝経路は 6 位の水酸化であり、他の代謝経路として 5-脱メチル化及びインドールの開環が存在する。さらに、僅かではあるが N-脱アセチル化も生じる。主たる代謝物である 6-OH-MT は、内因性レベル又は低投与量では、その大部分が硫酸抱合体として尿中に排泄されるが、一部はグルクロン酸抱合体として尿中に排泄される。また、他のマイナーな代謝物も尿中に排泄される。

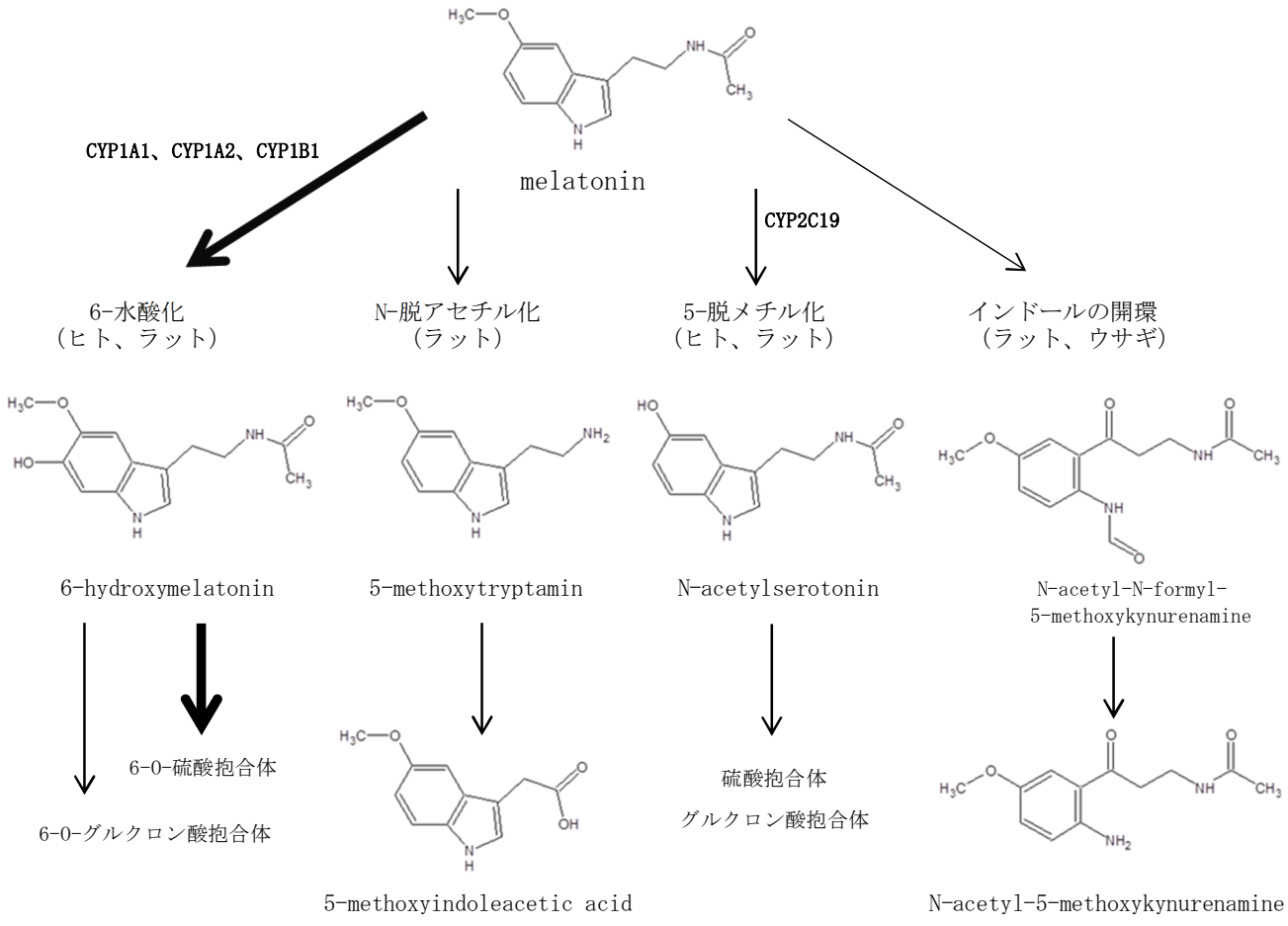


図 2.6.4-5 メラトニンの推定代謝経路

2.6.4.5.3 代謝酵素分子種の同定

＜添付資料 4.2.2.4-5（参考）、4.2.2.4-6（参考）＞

CYP 発現系ミクロソーム（2 mg/mL）にメラトニン 10 μmol/L を添加し、37℃、3 時間インキュベートした後、反応液中メラトニンを LC/MS/MS にて定量し、メラトニン残存率を求めた（表 2.6.4-13）。メラトニンは CYP1A1 及び 1A2 により速やかに代謝され、残存率はそれぞれ、10%及び 8%であった。その他の CYP 分子種ではメラトニンの代謝は認められなかった。

表 2.6.4-13 CYP 分子種によるメラトニン代謝

CYP 分子種	メラトニン残存率（%）
CYP1A1	10
CYP1A2	8
CYP2A6、2B6、2C8、2C9、2C19、2D6、2E1、3A4	≧95

CYP 発現系ミクロソーム（2 pmol）にメラトニン 10 μmol/L を添加し、37℃、10 分間インキュベートした後、6-水酸化メラトニン及び O-（5-）脱メチルメラトニン（N-アセチルセロトニンの別称）を LC/MS/MS にて定量し、それぞれの生成量を図 2.6.4-6 に示した。6-水酸化メラトニンは CYP1A2 によって最も多く生成し、次いで CYP1B1 及び CYP1A1 の順であった。僅かながら、CYP2C19 による代謝も認められた。O-（5-）脱メチルメラトニンは主として CYP2C19 により、また、僅かながら CYP1A2 により生成することが示された。

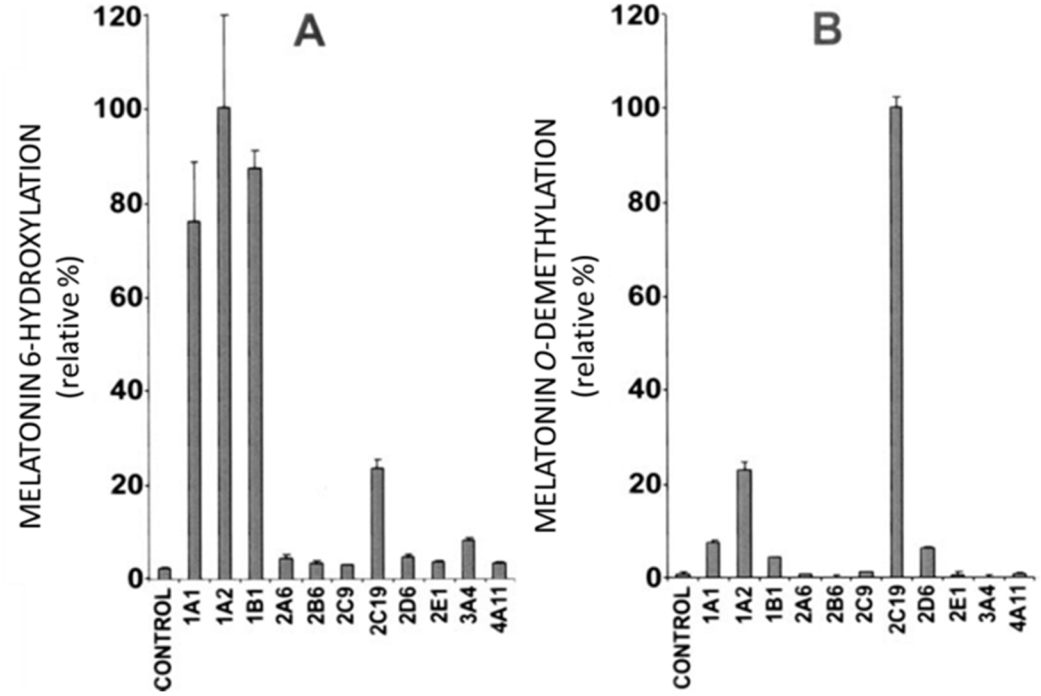


図 2.6.4-6 CYP 分子種によるメラトニン代謝物の生成

A：6-水酸化体の生成、B：O-脱メチル体の生成

2.6.4.5.4 薬物代謝酵素の誘導

＜添付資料 4.2.3.2-1＞

雌雄ラットにメラトニンを 15、75 及び 375 mg/kg/day の用量で 4 週間（28 回）反復経口投与後の肝 UDP-グルクロン酸転移酵素活性を表 2.6.4-14 に示した。375 mg/kg 群では、雌雄ともに、コントロールと比較して UDP-グルクロン酸転移酵素活性の上昇が認められた。

表 2.6.4-14 メラトニンをラットに 4 週間（28 回）反復投与したときの肝 UDP-グルクロン酸転移酵素活性

投与量 (mg/kg/day)	UDP-グルクロン酸転移酵素活性(nmol/min/mg)	
	雄	雌
コントロール	15.86±1.59	6.50±0.78
15	20.90±5.01	9.58±2.25 a)
75	19.52±3.11	8.82±1.89
375	53.00±6.66 b)	31.08±4.65 b)

平均値±標準偏差（n=5）
a：p<0.05（Dunnett の多重比較検定）
b：p<0.01（Dunnett の多重比較検定）

2.6.4.6 排泄

2.6.4.6.1 尿糞中排泄

＜添付資料 4.2.2.4-1（参考）、4.2.2.4-2（参考）＞

放射性同位元素で標識したメラトニンをラットに静脈内又は腹腔内投与したときの放射能の尿及び糞中排泄率を表 2.6.4-15 に示した。いずれの投与経路においても、投与放射能の 60～70%が尿中に、15～20%が糞中に排泄された。このことから、メラトニンの主排泄経路は尿中排泄であることが示された。

表 2.6.4-15[^{14}C]メラトニンを静脈内又は腹腔内投与したときの放射能の尿及び糞中累積排泄率

放射能の累積尿糞中排泄率（%）			
投与経路		静脈内	腹腔内
投与後時間		0～48 h	0～24 h
排泄経路	尿	60-70	70
	糞	15	20
	合計	75-85	90

2.6.4.6.2 胆汁中排泄

＜添付資料 4.2.2.4-2（参考）＞

ウサギに[^{14}C]メラトニン 7 mg を投与し、投与後 1 時間までの尿中及び胆汁排泄率を表 2.6.4-16 に示した。投与後 1 時間までに排泄された尿中放射能は投与放射能の 12.4%であった。投与後 1 時間に胆嚢から回収した胆汁中放射能は投与放射能の 0.5%であり、尿中排泄率の 4%であった。以上の結果から、メラトニンの胆汁排泄は尿中排泄と比較して僅かであり、メラトニンの主たる排泄経路は、尿中排泄であることが示された。

表 2.6.4-16[^{14}C]メラトニンを投与したときの放射能の胆汁排泄率

排泄経路	尿 a)	糞	胆汁 b)	合計
時間　0 - 1 hr	12.4	- c)	0.5 (4%) d)	12.9

a：投与後 1 時間までに排泄された尿＋投与後 1 時間に膀胱から回収した尿
b：投与後 1 時間に胆嚢から回収した胆汁
c：測定していない
d：尿中排泄率に対する割合

2.6.4.6.3 乳汁排泄

＜添付資料 4.2.2.5-1（参考）＞

授乳中の母ラット（B）から乳仔（b）を引き離し、乳仔（b）は絶食させた。その一方、母ラット（B）には、別の母ラット（A）の乳仔（a）に授乳させ、1時間後に乳仔（a）を引き離した。母ラット（B）に[^{3}H]メラトニンを皮下投与した後、絶食させていた乳仔（b）を同居させ、授乳を開始した。授乳開始後 0.5 及び 1 時間に、乳仔（b）のうち 5 匹ずつから胃を摘出した。5 例中 2 例について胃内総放射能を、5 例全例について[^{3}H]メラトニンを測定した(表 2.6.4-17)。乳児の胃内に[^{3}H]メラトニンが検出されたことから、母ラットに投与されたメラトニンの一部は乳汁中に排泄されることが示された。

表 2.6.4-17 授乳ラットに[^{3}H]メラトニンを皮下投与したときの乳汁排泄

哺乳時間（hr）	総放射能 (nCi) a)	[^{3}H]メラトニン (nCi) b)	総放射能に対する [^{3}H]メラトニンの割合 (%)
0.5	15.5、11.8	1.5±0.20	11
1.0	10.0、 5.7	1.0±0.05	13

a：5 例の乳仔のうち 2 例について胃内総放射能を測定し、個体別に表示した。
b：平均値±標準誤差（n=5）

2.6.4.7 薬物動態学的薬物相互作用

2.6.4.7.1 CYP 分子種に対する阻害作用

＜添付資料 4.2.2.6-1＞

ヒト肝ミクロソームを用いて CYP 分子種（CYP1A2、CYP2B6、CYP2C8、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6 及び CYP3A4）の特異的な代謝反応に対するメラトニン（0.005、0.05 及び 0.5 μmol/L）の可逆的阻害作用及びプレインキュベーション時間依存的な阻害作用を検討した（表 2.6.4-18）。その結果、メラトニンは 0.5 μmol/L まで、いずれの CYP 分子種に対しても、可逆的阻害作用及び時間依存的阻害作用を示さなかった。

表 2.6.4-18 CYP 分子種に対するメラトニンの阻害作用

CYP 分子種	代謝反応	メラトニン 0.5 μmol/L 存在下の残存活性（溶媒対照に対する%）	
		可逆的阻害	時間依存的阻害
CYP1A2	Phenacetin O-deethylation	97.2	97.9
CYP2B6	Bupropion hydroxylation	102.2	101.5
CYP2C8	Paclitaxel 6α-hydroxylation	100.0	100.0
CYP2C9	Diclofenac 4'-hydroxylation	102.5	101.4
CYP2C19	(S)-Mephenytoin 4'-hydroxylation	100.6	100.0
CYP2D6	Bufuralol 1'-hydroxylation	99.7	100.0
CYP3A4	Midazolam 1'-hydroxylation	102.5	99.1
CYP3A4	Testosterone 6β-hydroxylation	97.6	99.3

2.6.4.7.2 UGT 分子種に対する阻害作用

＜添付資料 4.2.2.6-1＞

ヒト肝ミクロソームを用いて UGT 分子種（UGT1A1 及び UGT2B7）の特異的な代謝反応に対するメラトニン（0.005、0.05 及び 0.5 μmol/L）の可逆的阻害作用を検討した（表 2.6.4-19）。その結果、メラトニンは 0.5 μmol/L まで、いずれの UGT 分子種に対しても阻害作用を示さなかった。

表 2.6.4-19 UGT に対するメラトニンの阻害作用

UGT 分子種	代謝反応	メラトニン 0.5 μmol/L 存在下の残存活性（溶媒対照に対する%）
UGT1A1	Estradiol 3β-glucuronidation	99.0
UGT2B7	3'-Azido-3'-deoxythymidine β-D-glucuronidation	100.0

2.6.4.7.3 CYP 分子種に対する誘導作用

＜添付資料 4.2.2.6-2＞

肝臓の薬物代謝酵素（CYP1A2、CYP2B6 及び CYP3A4）に対する誘導作用を評価する目的で、ヒト凍結肝細胞にメラトニン（0.005,0.05 及び 0.5 μmol/L）を曝露した後、CYP1A2,CYP2B6 及び CYP3A4 遺伝子の発現量（mRNA）を測定した（表 2.6.4-20）。その結果、いずれの CYP 分子種においても溶媒対照に対する mRNA の増加は、判断の目安[1)]とされる 2 倍未満（増加率として 100%未満）であり、メラトニンは 0.5 μmol/L まで酵素誘導作用を示さなかった。

表 2.6.4-20 ヒト凍結肝細胞における CYP 分子種に対するメラトニンの誘導作用

CYP 分子種	肝細胞ロット番号	溶媒対照に対する mRNA の増加率（%）[a)]			
		メラトニン（μmol/L）			陽性対照[b)]
		0.005	0.05	0.5	
CYP1A2	[redacted]	15.3	11.4	47.0	95939.6
		36.0	52.6	50.0	15163.2
		38.2	69.4	58.5	19412.2
CYP2B6	[redacted]	-2.5	-7.1	20.1	1073.1
		-4.5	16.4	22.7	1136.4
		9.3	52.8	40.4	980.7
CYP3A4	[redacted]	33.5	10.1	55.1	4691.1
		21.0	61.8	32.1	1364.6
		34.3	77.3	38.9	2828.3

a：増加率（%）＝｛(メラトニン群又は陽性対照群の mRNA 測定値/溶媒対照群の mRNA 測定値）－1｝×100
b：50 μmol/L Omeprazole（CYP1A2）、1000 μmol/L Phenobarbital（CYP2B6）、10 μmol/L Rifampicin（CYP3A4）

2.6.4.7.4 薬物トランスポーターに対する阻害作用

＜添付資料 4.2.2.6-3＞

P-gp、BCRP、OATP1B1、OATP1B3、OAT1、OAT3、OCT2、MATE1 及び MATE2-K による各典型基質の輸送に対するメラトニンの阻害作用を検討した（表 2.6.4-21)。P-gp では、メラトニン（1～100 μmol/L)の存在下において、典型基質の輸送に対する阻害作用は認められなかった。BCRP では、メラトニン（1～100 μmol/L）の存在下において、濃度依存的な阻害が認められ、その IC_{50} は 115 μmol/L であった。OATP1B1、OATP1B3、OAT1、OAT3、OCT2、MATE1 及び MATE2-K では、メラトニン（3～300 nmol/L）存在下において、典型基質の輸送に対する阻害作用は認められなかった。

表 2.6.4-21 薬物トランスポーターに対するメラトニンの阻害作用

トランスポーター	典型基質	メラトニン濃度	残存活性（%）
P-gp	[^{3}H]ジゴキシン	100 μmol/L	84.9
BCRP	[^{3}H]プラゾシン	100 μmol/L	42.8 (IC_{50}：115 μmol/L)
OATP1B1	[^{3}H]エストラジオール-17β-D-グルクロナイド	300 nmol/L	97.8
OATP1B3	同上	300 nmol/L	83.1
OAT1	[^{3}H]パラアミノ馬尿酸	300 nmol/L	104.5
OAT3	[^{3}H]エストロン硫酸	300 nmol/L	55.2
OCT2	[^{14}C]メトホルミン	300 nmol/L	133.9
MATE1	同上	300 nmol/L	118.1
MATE2-K	同上	300 nmol/L	94.8

2.6.4.7.5 薬物トランスポーターによる輸送評価

(1) P-gp 及び BCRP による輸送

＜添付資料 4.2.2.6-3＞

P-gp 及び BCRP によるメラトニンの輸送について検討した（表 2.6.4-22)。トランスウェルに P-gp 又は BCRP 発現細胞を培養し、基底膜側から頂端膜側への透過係数を反対方向の透過係数で除した flux ratio（FR）を求め、更に、コントロール細胞の FR で除した net flux ratio（NFR）を評価指標とした。

P-gp 発現細胞における[^{14}C]メラトニンの NFR は、3 及び 10 μmol/L においてそれぞれ 1.21 及び 1.10 であり、P-gp によるメラトニンの輸送は観察されなかった。

BCRP 発現細胞における[^{14}C]メラトニンの NFR は、3 及び 10 μmol/L においてそれぞれ 1.53 及び 1.33 を示した。典型的阻害剤である Ko143 の添加により、[^{14}C]メラトニン 3 μmol/L における NFR は 0.943 を示し、阻害傾向が認められたことから、メラトニンは BCRP の弱い基質であることが示唆された。しかしながら、NFR の値は薬物相互作用のリスクを考慮する基準[1)]である 2 よりも小さく、BCRP を介した薬物相互作用が懸念されるものではなかった。

表 2.6.4-22 P-gp 及び BCRP によるメラトニンの輸送

トランスポーター	[14C]メラトニン濃度（μmol/L）	阻害剤	FR		NFR
			コントロール細胞	トランスポーター発現細胞	
P-gp	3	なし	0.950	1.15	1.21
		ベラパミル	1.04	1.11	1.07
	10	なし	1.02	1.12	1.10
BCRP	3	なし	0.970	1.48	1.53
		Ko143	0.969	0.914	0.943
	10	なし	0.941	1.25	1.33

(2) OATP1B1 による輸送

＜添付資料 4.2.2.6-3＞

OATP1B1 によるメラトニンの輸送について検討した（表 2.6.4-23）。OATP1B1 発現細胞を培養して[14C]メラトニンの取込み量を測定し、コントロール細胞の取込み量を差し引いた OATP1B1 依存的取り込みを算出した。さらに OATP1B1 発現細胞の取込み量をコントロール細胞の発現量で除した uptake ratio（UR）を算出した。

OATP1B1 発現細胞における[14C]メラトニンの OATP1B1 依存的取込み量は、7.5 及び 15 μmol/L のいずれにおいても反応時間に依存した増加が見られず、UR は 0.830～1.41 であった。このことから、メラトニンは OATP1B1 により輸送されないものと考えられた。

表 2.6.4-23 OATP1B1 によるメラトニンの輸送

[14C]メラトニン濃度（μmol/L）	反応時間（分）	OATP1B1 依存的取込み（pmol/mg protrin）	UR
7.5	1	2.20	1.22
	2	0	0.856
	5	0	1.00
	10	2.43	1.41
15	1	4.70	1.28
	2	0	0.830
	5	0	1.00
	10	4.00	1.22

(3) OATP1B3 による輸送

＜添付資料 4.2.2.6-3＞

OATP1B3 によるメラトニンの輸送について検討した（表 2.6.4-24）。OATP1B3 発現細胞を培養して[^{14}C]メラトニンの取込み量を測定し、コントロール細胞の取込み量を差し引いた OATP1B3 依存的取り込みを算出した。さらに OATP1B3 発現細胞の取込み量をコントロール細胞の取込み量で除した uptake ratio（UR）を算出した。

OATP1B3 発現細胞における[^{14}C]メラトニンの取込み量は、7.5 及び 15 μmol/L のいずれにおいても反応時間に依存した増加が見られず、UR は 0.846～4.99 であった。UR が 2 を超える場合が散見されたが、典型的阻害剤であるリファンピシンを添加した場合に、明確な阻害効果が認められなかったことから、メラトニンは OATP1B3 により輸送されないものと考えられた。

表 2.6.4-24 OATP1B3 によるメラトニンの輸送

[^{14}C]メラトニン濃度（μmol/L）	阻害剤	反応時間（分）	OATP1B3 依存的取込み（pmol/mg protrin）	残存活性（%）	阻害率（%）	UR
7.5	なし	1	12.4	100.0	-	2.24
		2	12.7	100.0	-	2.02
		5	0	100.0	-	0.846
		10	23.8	100.0	-	4.99
	リファンピシン	1	17.7	142.7	-42.7	-
		2	10.4	81.9	18.1	-
		5	1.43	NC [a)]	NC [a)]	-
		10	2.26	9.5	90.5	-
15	なし	1	11.2	-	-	1.67
		2	30.8	-	-	2.25
		5	16.5	-	-	1.91
		10	19.8	-	-	2.10

-：阻害剤を加えていないので該当しない
a：対照（阻害剤なし）の OATP1B3 依存的取込みがゼロなので計算しない

2.6.4.8 その他の薬物動態試験

該当する試験は実施していない。

2.6.4.9 考察及び結論

【吸収】

メラトニンを、ラットに単回静脈内、腹腔内及び経口投与したときの AUC の比較から推定した経口投与時の吸収率及び生物学的利用率は、それぞれ、72%及び 53.5%であった。イヌにメラトニンを経口投与したときの生物学的利用率は、0.98 mg/kg 投与時で 16.9%、10.30 mg/kg 投与時では 100%以上であり、投与量の増加に伴う生物学的利用率の増加が認められ、非線形性が示唆された。サルについては、用量依存性は検討していないが、10 mg/kg 投与時の生物学的利用率が 100%以上であったことから、イヌと同様に非線形性が示唆される。トキシコキネティクス試験及び分布試験においてメラトニンの速やかな吸収が確認されたこと及びメラトニンが主として肝臓の CYP1A2 により代謝されることを考え併せると、メラトニンの非線形性は、肝臓における初回通過代謝の飽和によるものと推察された。

ラット及びイヌのトキシコキネティクス試験におけるに薬物動態パラメーターを評価した結果、メラトニンは経口投与後速やかに吸収され、血漿中メラトニン濃度は C_{max} に達した後、速やかに低下することが示された。初回投与後では、投与量の増加以上の C_{max} 及び AUC の増加並びに高用量における消失の遅延が認められ、メラトニンの体内動態は非線形であることが示された。反復投与により、低用量群では血漿中濃度の上昇が見られたが、投与量の増加に伴い、反復投与の影響は小さくなり、結果として反復投与後には非線形性が減弱した。ラット及びイヌのいずれにおいても、投与量及び投与期間に関わらず性差はみられなかった。

幼若ラットのトキシコキネティクス試験における薬物動態パラメーターを評価した結果、初回投与時の吸収及び消失ともに、成熟ラットのそれと比較して緩やかであった。また、初回投与時の血漿中濃度は成熟ラットと比較して明らかに高値を示したが、反復投与後には、血漿中濃度は顕著に低下し、成熟ラットの初回投与時（6 週齢）とほぼ同等レベルとなった。初回投与時、幼若ラットは 1 週齢であり、4 週間反復投与終了時では 5 週齢であった。メラトニンは CYP1A2 により代謝されるが、ラット肝臓の CYP1A2 遺伝子発現量及び活性は、出生後 1 週齢では成熟ラットと比較して低く、4～6 週齢では成熟ラットと同程度となることが報告されている[2), 3)]ことから、幼若ラットにおける血漿中濃度の低下は、反復投与による影響ではなく、成長に伴う CYP1A2 活性の上昇によるものと推察された。1 週齢の幼若ラットにおいても、性差はみられなかった。

【分布】

雄性白色ラット及び有色ラットに[^{14}C]メラトニンを単回経口投与（15 mg/kg）し、定量的全身オートラジオグラフィーにより放射能の組織分布を検討した（表 2.6.4-9）。

白色ラット及び有色ラットのいずれにおいても、経口投与された[^{14}C]メラトニンは速やかに吸収され全身に分布した。膀胱を除く全ての組織中放射能が投与後 0.25 時間に最高濃度を示し、血液よりも高い放射能が検出されたのは、ブドウ膜、肝臓、腎臓、副腎及び膀胱内尿のみであった。投与後 0.25 時間と比較して投与後 1 時間では、膀胱内尿の放射能は上昇したが、その他の全ての組織中放射能は速やかに低下し、投与後 24 時間では多くの組織で定量下限未満となっ

たことから、吸収されたメラトニンは速やかに体外に排泄されることが示された。また、投与後0.25時間及び1時間において、膀胱内には消化管内容物と比較しても強い放射能が検出され、[^{14}C]メラトニンの速やかな吸収と尿中排泄が示唆された。

有色ラットと白色ラットの比較では、全身の放射能分布に差異はみられなかったが、有色ラットのブドウ膜には放射能の分布が確認された（図 2.6.4-2)。白色ラットでは眼球組織内に局所的な放射能は認められなかった（図 2.6.4-2）ことから、メラトニン及び/又はその代謝物はメラニンへの親和性を有するものと考えられたが、ブドウ膜からの放射能の消失は他の組織と同様に速やかであり、蓄積性を示唆するものではなかった。

以上のことから、経口投与されたメラトニンは速やかに吸収され全身に分布し、体内からの消失も速やかであり、投与後 24 時間には、ほぼ体外へ排泄されるものと考えられた。メラトニンはメラニンへの親和性を有するものの、速やかに消失することが示された。

メラトニンのラット及びヒトにおける血漿たん白結合率は、平衡透析法により検討した結果、種差は無く 50～60％であった。メラトニン濃度として、内因性レベル(0.4 nmol/L＝0.0928 ng/mL)から臨床第Ⅰ相試験の C_{max}（5 mg 投与時、男性：9.6 ng/mL、女性：11.0 ng/mL）を上回るレベル（197 ng/mL）まで、濃度に依存した結合率の変化は見られなかった（表 2.6.4-11)。結合たん白は主としてアルブミンであるが、α1 酸性糖たん白（α1-AGP）の寄与も確認された。α1-AGP は炎症性たん白であり、種々の疾患において血漿中濃度が上昇することが知られている。しかしながら、メラトニンは、主としてアルブミンに結合することから、α1-AGP の変動による影響は受けにくいと考えられ、事実、血清中α1-AGP 濃度が健康成人の約 2 倍の癌患者血清を用いた結合試験において、結合率の大きな変化は見られなかった（表 2.6.4-11)。

妊娠中の母サルに[^{3}H]メラトニンを静脈内投与したとき、胎仔血漿中に[^{3}H]メラトニンの移行が確認された。

【代謝】

ラットにメラトニン又は代謝物を投与した後の尿を分析してメラトニンの代謝物及び代謝経路について検討した。

ラットに[^{14}C]又は[^{3}H]標識メラトニンを投与したとき、投与放射能の 60～70％が尿中に排泄され、その大部分が 6-水酸化メラトニン（6-OH-MT）の硫酸抱合体（6-Sul-MT）又はグルクロン酸抱合体（6-Glu-MT）であったことから、体外から投与されたメラトニンの主たる代謝経路は 6-水酸化に続く硫酸抱合及びグルクロン酸抱合であることが示された（2.6.4.5.1 (1)）。

その他の代謝経路として、N-脱アセチル化、インドールの開環及び 5-脱メチル化が確認された。脱アセチル化されて生成した 5-メトキシトリプタミンは、脱アミノ化され 5-メトキシインドール酢酸として尿中に排泄されるが、5-メトキシインドール酢酸の尿中排泄量が僅かであったことから、N-脱アセチル化代謝はマイナーな代謝経路であると考えられる(2.6.4.5.1 (2))。

メラトニンは 5-脱メチル化され、N-アセチルセロトニンを生成する。N-アセチルセロトニンはさらに硫酸抱合又はグルクロン酸胞合され尿中に排泄される。

インドールの開環により N-acetyl-N-formyl-5-methoxykynurenamine（AFMK）を経て N-acetyl-5-methoxykynurenamine（AMK）が生成され、尿中に排泄される。

メラトニンの代謝に関与する CYP 分子種を同定した結果(2.6.4.5.3)、6-水酸化は、CYP1A1、CYP1A2 及び CYP1B1 により触媒され、一部 CYP2C19 も関与することが示された。また、5-脱メチル化は主として CYP2C19 により触媒され、一部 CYP1A2 が関与することが示された。

【排泄】

放射性同位元素で標識したメラトニンをラットに静脈内又は腹腔内投与したときの放射能の尿・糞中排泄率の検討から、メラトニンの主たる排泄経路は尿であることが示された（表 2.6.4-15)。ウサギを用いた検討では、投与後 1 時間までの胆汁中排泄率は尿中排泄率の僅かに 4%であり、メラトニンの排泄における胆汁排泄の寄与は小さいものと考えられた（表 2.6.4-16)。また、授乳中のラットに[^{3}H]メラトニンを皮下投与したとき、仔の胃内に[^{3}H]メラトニンが検出され、メラトニンの乳汁排泄が確認された（表 2.6.4-17)。

【薬物動態学的薬物相互作用】

（併用他剤に与える影響）

メラトニンの CYP 分子種及び UGT 分子種に対する阻害作用を検討した結果、メラトニン 0.5 μmol/L まで阻害作用はみられなかった。また、CYP 分子種に対する誘導作用についても、メラトニン 0.5 μmol/L まで誘導作用はみられなかった。メラトニンの P-gp 及び BCRP に対する阻害作用を評価した結果、P-gp に対してはメラトニン 100 μmol/L まで阻害は認められず、BCRP については濃度依存的な阻害作用が認められその IC_{50} は 115 μmol/L であった。SLC トランスポーター（OATP1B1、OATP1B3、OAT1、OAT3、OCT2、MATE1 及び MATE2-K）に関しては、調べたいずれのトランスポーターに対してもメラトニン 300 nmol/L まで阻害作用はみられなかった。

臨床第 I 相試験における最高用量である 5 mg 経口投与時の血清中総メラトニン濃度の C_{max} は男性では 9592 pg/mL、女性では 11038 pg/mL であり（CTD2.7.2 表 2.7.2-3)、分子量を 232.28 としてモル濃度に換算すると、それぞれ 41.3 nmol/L 及び 47.5 nmol/L であった。これらの値から、臨床最大用量である 4 mg（CTD2.7.3.4）経口投与時の C_{max} は 33.0（男性）及び 38.0（女性） nmol/L と計算され、これらの濃度は、メラトニンが CYP 及び UGT に対する阻害作用並びに CYP に対する誘導作用を示さなかった 0.5 μmol/L に対して、また、SLC トランスポーターに対して阻害作用を示さなかった 300 nmol/L に対して、十分に低い濃度である。このことから、メラトニンは CYP 及び UGT に対する阻害並びに CYP に対する誘導を介した薬物相互作用を惹起する可能性は低いと考えられる。また、臨床最大用量である 4 mg を 250 mL で除して算出したメラトニンの最大消化管内濃度[1)]は 16 μg/mL である。分子量を 232.28 としてモル濃度に換算すると 69 μmol/L であり、メラトニンが P-gp に対して阻害作用を示さなかった 100 μmol/L 及び BCRP に対するメラトニンの IC_{50}（115 μmol/L）よりも低い値であった。このことから、消化管管腔側に発現する P-gp 及び BCRP の阻害を介した薬物相互作用を惹起する可能性は低いと考えられる。

以上のように、メラトニンは併用他剤に対して薬物動態学的相互作用を与える可能性は低いと考えられた。

（併用他剤から受ける影響）

メラトニンはシトクロム P450 分子種である CYP1A1、CYP1A2、CYP1B1 及び CYP2C19 により 6-水酸化及び 5-脱メチル化代謝を受ける（図 2.6.4-6)。これらの CYP 分子種のうち、肝臓での発現量は CYP1A2 が最も多く総 CYP 発現量の約 13%を占めている[4)]。一方、CYP1A1 たん白及び CYP1B1 たん白は肝臓には検出されないこと[5), 6)]及び CYP2C19 の肝臓での発現量は総 CYP 発現量の僅かに 1%程度であること[7)]から、これらの CYP 分子種のメラトニン代謝に対する寄与は小さいと考えられる。以上のことから、メラトニンは主として CYP1A2 により代謝されるものと考えられ、従って、メラトニンを CYP1A2 によって代謝される又は CYP1A2 を阻害する薬物と併用投与すると、薬物動態学的薬物相互作用を受けることが想定される。事実、臨床的に、CYP1A2 及び CYP2C19 を阻害するフルボキサミンを併用投与すると、血清中メラトニン濃度が増加した[8)]。また、メラトニンと CYP1A2 の基質であるカフェインを併用投与した時にも、メラトニンの血清中濃度の上昇が報告されている[9)]。

メラトニンのトランスポーターによる輸送の評価では、メラトニンは P-gp、OATP1B1 及び OATP1B3 では輸送されず、これらのトランスポーターを介した薬物相互作用を併用他剤から受ける可能性は低いと考えられる。また、メラトニンは BCRP の弱い基質であることが示唆されたが、その NFR の値は 1.53 であり、薬物相互作用のリスクを考慮する基準である 2[1)]よりも小さく、BCRP を介した薬物相互作用が懸念されるものではなかった。

2.6.4.10 図表

本文中に記載した。

2.6.4.11 参考文献

1 「医薬品開発と適正な情報提供のための薬物相互作用ガイドライン（最終案)」の公表について（平成 26 年 7 月 8 日付け厚生労働省医薬食品局審査管理課事務連絡)

2 de Zwart L, Scholten M, Monbaliu JG, et al. The ontogeny of drug metabolizing enzymes and transporters in the rat. Reprod Toxicol 2008;26(3-4):220-30

3 Asaoka Y, Sakai H, Sasaki J, et al. Changes in the gene expression and enzyme activity of hepatic cytochrome P450 in juvenile Sprague-Dawley rats. J Vet Med Sci 2010;72(4):471-9

4 Shimada T, Yamazaki H, Mimura M, et al. Interindividual variations in human liver cytochrome P-450 enzymes involved in the oxidation of drugs, carcinogens and toxic chemicals: studies with liver microsomes of 30 Japanese and 30 Caucasians. J Pharmacol Exp Ther 1994;270(1):414-23

5 Edwards RJ, Adams DA, Watts PS, et al. Development of a comprehensive panel of antibodies against the major xenobiotic metabolising forms of cytochrome P450 in humans. Biochem Pharmacol 1998;56(3):377-87

6 Chang TK, Chen J, Pillay V, et al. Real-time polymerase chain reaction analysis of CYP1B1 gene expression in human liver. Toxicol Sci 2003;71(1):11-9

[7] Inoue K, Yamazaki H, Imiya K, et al. Relationship between CYP2C9 and 2C19 genotypes and tolbutamide methyl hydroxylation and S-mephenytoin 4'-hydroxylation activities in livers of Japanese and Caucasian populations. Pharmacogenetics 1997;7(2):103-13
[8] Härtter S, Grözinger M, Weigmann H, et al. Increased bioavailability of oral melatonin after fluvoxamine coadministration. Clin Pharmacol Ther 2000;67(1):1-6
[9] Härtter S, Nordmark A, Rose DM, et al. Effects of caffeine intake on the pharmacokinetics of melatonin, a probe drug for CYP1A2 activity. Br J Clin Pharmacol 2003;56(6):679-82

目次

略語・略号一覧 2
2.6.5 薬物動態試験概要表 3
2.6.5.1 薬物動態試験：一覧表 3
2.6.5.2 分析方法及びバリデーション試験 5
2.6.5.3 薬物動態試験：吸収：単回投与 7
2.6.5.4 薬物動態試験：吸収：反復投与（トキシコキネティクス） 8
2.6.5.5 薬物動態試験：分布 13
2.6.5.6 薬物動態試験：たん白結合及び血球への移行 17
2.6.5.7 薬物動態試験：妊娠又は授乳動物における試験 21
2.6.5.8 薬物動態試験：代謝 in vivo 23
2.6.5.9 薬物動態試験：代謝 in vitro 26
2.6.5.10 薬物動態試験：推定代謝経路 28
2.6.5.11 薬物動態試験：薬物代謝酵素の誘導／阻害 29
2.6.5.12 薬物動態試験：排泄 30
2.6.5.13 薬物動態試験：薬物相互作用 32
2.6.5.14 薬物動態試験：その他 49

略語・略号一覧

略語・略号	内容
AFMK	N-acetyl-N-formyl-5-methoxykynurenamine
α1-AGP	α1酸性糖たん白
AMK	N-acetyl-5-methoxykynurenamine
AUC	血漿中濃度-時間曲線下面積
AUC_{0-6h}	投与後6時間までの血漿中濃度-時間曲線下面積
AUC_{0-8h}	投与後8時間までの血漿中濃度-時間曲線下面積
BCRP	breast cancer resistance protein
Ci	キュリー
CL	クリアランス
C_{max}	最高血漿中濃度
CMC	カルボキシメチルセルロースナトリウム
CYP	シトクロムP450
C_{6h}	投与後6時間の血漿中濃度
C_{8h}	投与後8時間の血漿中濃度
DMSO	ジメチルスルホキシド
dpm	disintegration per minute：1分間あたりの崩壊数
FR	flux ratio
GC/MS	ガスクロマトグラフ質量分析計
6-Glu-MT	6-水酸化メラトニングルクロン酸抱合体
h	時間
HPLC/UV	紫外線検出器付き高速液体クロマトグラフ
IC_{50}	50%阻害濃度
LC/MS/MS	液体クロマトグラフ-タンデム質量分析計
MATE	multidrug and toxin extrusion
Bq	ベクレル：1秒間あたりの崩壊数
n	例数
NAS	N-アセチルセロトニン
NFR	net flux ratio
OAT	organic anion transporter
OATP	organic anion transporting polypeptide
OCT	organic cation transporter
6-OH-MT	6-水酸化メラトニン
P-gp	P-糖たん白質
6-Sul-MT	6-水酸化メラトニン硫酸抱合体
TFA	トリフルオロ酢酸
TLC	薄層クロマトグラフィー
t_{max}	最高血漿中濃度到達時間(C_{max}到達時間)
UGT	ウリジン2リン酸（UDP）グルクロン酸転移酵素
UR	uptake ratio

2.6.5 薬物動態試験概要表

2.6.5.1 薬物動態試験：一覧表

試験の種類		試験系	投与方法	実施施設又は出典	試験番号	添付資料
分析方法及びバリデーション試験						
	標識化合物の合成	該当なし	該当なし	[redacted]	[redacted]	4.2.2.1-1
	LC/MS/MS のバリデーション	ラット血漿	該当なし	[redacted]*	[redacted]	4.2.2.1-2
		イヌ血漿	該当なし	[redacted]	[redacted]	4.2.2.1-3
		ウサギ血漿	該当なし	[redacted]	[redacted]	4.2.2.1-4
吸収						
	単回投与	ラット、イヌ、サル	静脈内、腹腔内、経口	J Pineal Res 1997;22(1):45-51	該当なし	4.2.2.2-1 (参考)
	反復投与（トキシコキネティクス）	ラット	4 週間反復経口	[redacted]	[redacted]	4.2.3.2-1
		ラット	13 週間反復経口	[redacted]	[redacted]	4.2.3.2-2
		幼若ラット	4 週間反復経口	[redacted]	[redacted]	4.2.3.5.4-1
		イヌ	4 週間反復経口	[redacted]	[redacted]	4.2.3.2-4
		イヌ	39 週間反復経口	[redacted]	[redacted]	4.2.3.2-5
分布						
	定量的全身オートラジオグラフィー	白色ラット、有色ラット	単回経口	[redacted]	[redacted]	4.2.2.3-1
	血漿たん白結合	ヒト血漿、ラット血漿、 ヒト血漿たん白溶液	In vitro	Endocrinology 1972;91(5):1213-8	該当なし	4.2.2.3-2 (参考)
		ヒト血清、 ヒト血漿たん白溶液	In vitro	Pharmacology 1997;54(5):271-5	該当なし	4.2.2.3-3 (参考)
	血球移行	ラット血液	In vitro	Endocrinology 1972;91(5):1213-8	該当なし	4.2.2.3-2 (参考)
妊娠又は授乳動物に於ける試験						
	胎盤通過	アカゲザル	静脈内	Pediatr Res 1979;13(6):788-91	該当なし	4.2.2.3-4 (参考)

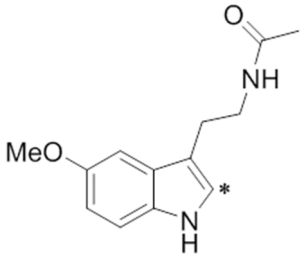
	乳汁排泄	ラット	皮下	Endocrinology 1978;102(2):582-8	該当なし	4.2.2.5-1 (参考)
代謝						
	In vivo 代謝	ラット	静脈内	J Biol Chem 1961;236:3072-5	該当なし	4.2.2.4-1 (参考)
		ウサギ、ラット	腹腔内又は経口	J Biol Chem 1961;236:3214-20	該当なし	4.2.2.4-2 (参考)
		ラット	大槽内、静脈内	J Biol Chem 1974;249(4):1311-3	該当なし	4.2.2.4-3 (参考)
		ラット	腹腔内	Endocrinology 1984;114(5):1825-32	該当なし	4.2.2.4-4 (参考)
	In vitro 代謝	CYP 発現系ミクロソーム	In vitro	J Pineal Res 1999;26(3):190-1	該当なし	4.2.2.4-5 (参考)
		CYP 発現系ミクロソーム	In vitro	Drug Metab Dispos 2005;33(4):489-94	該当なし	4.2.2.4-6 (参考)
	薬物代謝酵素の誘導	ラット	4 週間反復経口	[redacted]	[redacted]	4.2.3.2-1
排泄						
	尿糞中排泄	ラット	静脈内	J Biol Chem 1961;236:3072-5	該当なし	4.2.2.4-1 (参考)
		ラット	腹腔内	J Biol Chem 1961;236:3214-20	該当なし	4.2.2.4-2 (参考)
	胆汁中排泄	ウサギ	腹腔内又は経口	J Biol Chem 1961;236:3214-20	該当なし	4.2.2.4-2 (参考)
薬物動態学的薬物相互作用						
	薬物代謝酵素に対する阻害作用	ヒト肝ミクロソーム	In vitro	[redacted]	[redacted]	4.2.2.6-1
	薬物代謝酵素に対する誘導作用	ヒト凍結肝細胞	In vitro	[redacted]	[redacted]	4.2.2.6-2
	トランスポーターに対する阻害作用	トランスポーター発現細胞	In vitro	[redacted]	[redacted]	4.2.2.6-3
	トランスポーターによる輸送評価	トランスポーター発現細胞	In vitro	[redacted]	[redacted]	4.2.2.6-3
その他						

＊：[redacted]

2.6.5.2 分析方法及びバリデーション試験

2.6.5.2.1 標識化合物

＜添付資料 4.2.2.1-1＞

名称	[^{14}C]メラトニン
構造式及び標識位置	 ＊：^{14}C
分子式	$^{14}C_1C_{12}H_{16}N_2O_2$
ロット番号	[redacted]
比放射能	2.09 GBq/mmol (56.6 mCi/mmol)
放射化学的純度	99.5 %
化学的純度	99.9 %
適用した試験	試験番号：[redacted]、添付資料：4.2.2.3-1
	試験番号：[redacted]、添付資料：4.2.2.6-3

2.6.5.2.2 分析バリデーション試験一覧

＜添付資料 4.2.2.1-2、4.2.2.1-3、4.2.2.1-4＞

動物種	ラット	イヌ	ウサギ
マトリックス	血漿	血漿	血漿
測定対象	メラトニン	メラトニン	メラトニン
測定方法	LC/MS/MS	LC/MS/MS	LC/MS/MS
定量範囲	0.04～100 ng/mL	0.04～100 ng/mL	0.04～100 ng/mL
キャリーオーバー	認めず	認めず	認めず
定量下限	0.04 ng/mL	0.04 ng/mL	0.04 ng/mL
日内再現性 （0.1、2及び80 ng/mL）	RE [a)] ：±6.2 %以内 CV [b)] ：4.2 %以下	RE [a)] ：±13.9 %以内 CV [b)] ：4.5 %以下	RE [a)] ：±9.5 %以内 CV [b)] ：3.3 %以下
日間再現性 （0.1、2及び80 ng/mL）	RE [a)] ：±6.4 %以内 CV [b)] ：4.7 %以下	RE [a)] ：±9.7 %以内 CV [b)] ：7.2 %以下	RE [a)] ：±2.8 %以内 CV [b)] ：5.7 %以下
回収率	0.1 ng/mL:85.8 % 80 ng/mL:84.8 %	0.1 ng/mL:93.9 % 80 ng/mL:93.4 %	0.1 ng/mL:89.9 % 80 ng/mL:89.2 %
希釈妥当性	10～10,000 倍	10～10,000 倍	10～10,000 倍
前処理後安定性 （0.1 及び 80 ng/mL）	4 ℃：48 時間	4 ℃：48 時間	4 ℃：48 時間
凍結融解安定性 （0.1 及び 80 ng/mL）	-80 ℃：3 回	-80 ℃：3 回	-80 ℃：3 回
短期保存安定性 （0.1 及び 80 ng/mL）	室温：24 時間	室温：24 時間	室温：24 時間
長期保存安定性 （0.1 及び 80 ng/mL）	-80 ℃：60 日間	-80 ℃：59 日間	-80 ℃：62 日間
試験施設	[redacted] [c)]	[redacted]	[redacted]
試験番号	[redacted]	[redacted]	[redacted]
添付資料	4.2.2.1-2	4.2.2.1-3	4.2.2.1-4
適用した試験	試験番号：[redacted] 添付資料：4.2.3.2-1	試験番号：[redacted] 添付資料：4.2.3.2-4	試験番号：[redacted] 添付資料：4.2.3.5.2-3
	試験番号：[redacted] 添付資料：4.2.3.2-2	試験番号：[redacted] 添付資料：4.2.3.2-5	
	試験番号：[redacted] 添付資料：4.2.3.5.4-1		

a：相対誤差（Relative error）＝（定量値 − 理論値）/ 理論値 × 100

b：変動係数（Coefficient of variance）＝ 定量値の標準偏差 / 定量値の平均値 × 100

c：[redacted]

2.6.5.3 薬物動態試験：吸収：単回投与

＜添付資料 4.2.2.2-1（参考）＞

動物種／系統／週齢	ラット／SD／雄			イヌ／ビーグル／雄			サル／カニクイ／雄	
投与方法	静脈内	腹腔内	経口	静脈内	経口		静脈内	経口
食餌	記載なし	記載なし	絶食	記載なし	絶食		記載なし	絶食
媒体	25% DMSO	25% DMSO	10% DMSO	30% propylene glycol	20% propylene glycol		20% propylene glycol	20% propylene glycol
投与量（mg/kg）	5.00	10	10.00	2.95	0.98	10.30	2.98	10.00
動物数	6	6	6	2 a)	2 a)	2 a)	2 b)	2 b)
試料	血漿	血漿	血漿	血漿	血漿	血漿	血漿	血漿
定量法	HPLC/UV	HPLC/UV	HPLC/UV	HPLC/UV	HPLC/UV	HPLC/UV	HPLC/UV	HPLC/UV
定量物質	メラトニン	メラトニン	メラトニン	メラトニン	メラトニン	メラトニン	メラトニン	メラトニン
薬物動態パラメーター								
AUC（mg･h/L）	2.38	3.53	2.49	0.81	0.05	3.44	1.78	8.85
CL（L/h/kg）	2.11	－	－	3.84	－	－	1.68	－
$t_{1/2}$（h）	0.33	－	－	0.31	－	－	0.57	－
定常状態分布容積（L/kg）	1.05	－	－	1.48	－	－	1.20	－
生物学的利用率（%）	－	74.0	53.5	－	16.9	>100	－	>100
経口吸収率（%） c)	－	－	72	－	－	－	－	－

a，b：休薬期間をおいて同じ動物を使用
c：腹腔内投与時の生物学的利用率（74.0 %）を肝アベイラビリティーと仮定して、
［経口吸収率×肝アベイラビリティー＝生物学的利用率］から算出
－：該当しない又は原資料に記載がない

2.6.5.4 薬物動態試験：吸収：反復投与（トキシコキネティクス）

2.6.5.4.1 ラット 4 週間反復投与トキシコキネティクス

＜添付資料 4.2.3.2-1＞

動物種／系統／投与開始時週齢	ラット／Crl:CD(SD)／6 週齢
性別（雌/雄）／動物数（サテライト群）	雌雄／各群 4 例
給餌	自由摂取
媒体／投与形態	0.5 w/v% CMC 溶液／懸濁液
投与方法／投与期間（投与回数）	経口投与／4 週間（28 回）反復投与
投与量	15、75、375 mg/kg
試料	血漿
定量法	LC/MS/MS
定量物質	メラトニン

雌雄ラットにメラトニンを 4 週間反復経口投与したときの薬物動態パラメーター

性別	投与量 (mg/kg/day)	1 日目				28 日目			
		t_{max} (h)	C_{max} (ng/mL)	C_{6h} (ng/mL)	AUC_{0-6h} (ng・h/mL)	t_{max} (h)	C_{max} (ng/mL)	C_{6h} (ng/mL)	AUC_{0-6h} (ng･h/mL)
雄	15	0.25±0.00	789.9 ±507.2	0.9178 ±0.9062	425.1 ±242.2	0.25±0.00	1980 ±781	0.8693 ±1.0452	1358 ±531
	75	0.31±0.13	9688 ±4532	4.554 ±3.890	11460 ±3830	0.38±0.14	10130 ±4460	5.299 ±5.647	13640 ±2140
	375	0.25±0.00	48620 ±13080	4882 ±1458	89760 ±19530	0.63±0.25	24080 ±8480	8482 ±3008	65550 ±24910
雌	15	0.25±0.00	793.1 ±186.9	0.3394 ±0.2241	340.7 ±64.9	0.17±0.10	2724 ±473	0.3874 ±0.5604	1253 ±237
	75	0.31±0.13	18460 ±5140	5.505 ±6.936	19770 ±8150	0.38±0.14	16660 ±7240	2.497 ±3.025	21750 ±9730
	375	0.25±0.00	54690 ±9860	3194 ±2147	100400 ±15500	0.25±0.00	32880 ±14810	5048 ±7092	53510 ±12750

平均値±標準偏差（n=4）

2.6.5.4.2 ラット 13 週間反復投与トキシコキネティクス

＜添付資料 4.2.3.2-2＞

動物種／系統／投与開始時週齢	ラット／Crl:CD(SD)／6 週齢
性別（雌/雄）／動物数（サテライト群）	雌雄／各群 4 例
給餌	自由摂取
媒体／投与形態	0.5 w/v% CMC 溶液／懸濁液
投与方法／投与期間（投与回数）	経口投与／13 週間（91 回）反復投与
投与量	15、75、375 mg/kg
試料	血漿
定量法	LC/MS/MS
定量物質	メラトニン

雌雄ラットにメラトニンを 13 週間反復経口投与したときの薬物動態パラメーター

性別	投与量 (mg/kg/day)	1 日目				91 日目			
		t_{max} (h)	C_{max} (ng/mL)	C_{6h} (ng/mL)	AUC_{0-6h} (ng・h/mL)	t_{max} (h)	C_{max} (ng/mL)	C_{6h} (ng/mL)	AUC_{0-6h} (ng･h/mL)
雄	15	0.25 ±0.00	672.2 ±247.2	0.9866 ±0.5581	369.7 ±72.0	0.21 ±0.08	4843 ±1111	6.113 ±7.287	3803 ±428
	75	0.38 ±0.14	6459 ±2451	3.838 ±2.653	6672 ±2718	0.31 ±0.13	13670 ±2020	383.7 ±568.7	19040 ±4240
	375	0.25 ±0.00	32480 ±6800	2870 ±2264	64120 ±20750	0.50 ±0.00	34470 ±11190	7562 ±3906	91850 ±29970
雌	15	0.25 ±0.00	937.1 ±246.5	0.9597 ±0.9692	379.8 ±78.9	0.21 ±0.08	5701 ±1824	1.065 ±1.504	2620 ±995
	75	0.33 ±0.20	9457 ±3597	12.00 ±11.05	9165 ±5458	0.50 ±0.00	17630 ±8230	42.37 ±19.85	21330 ±9670
	375	0.25 ±0.00	35170 ±16010	6702 ±3896	75220 ±39050	0.25 ±0.00	45750 ±10340	1728 ±1675	70170 ±22320

平均値±標準偏差（n=4）

2.6.5.4.3 幼若ラット 4 週間反復投与トキシコキネティクス

＜添付資料 4.2.3.5.4-1＞

動物種／系統／投与開始時日齢	ラット／Crl:CD(SD)／7 日
性別（雌/雄）／動物数（サテライト群）	1 回投与：雌雄／各群、各時点 4 例（1 日目投与） 28 回投与：雄／15 及び 75 mg/kg 投与群、各時点 4 例／375 mg/kg 投与群、各時点 3 例 28 回投与：雌／15 及び 75 mg/kg 投与群、各時点 4 例／375 mg/kg 投与群、各時点 2 例
給餌	自由摂取
媒体／投与形態	0.5 w/v% CMC 溶液／懸濁液
投与方法／投与期間（投与回数）	経口投与／4 週間（28 回）反復投与
投与量	15、75、375 mg/kg
試料	血漿
定量法	LC/MS/MS
定量物質	メラトニン

雌雄幼若ラットにメラトニンを 4 週間反復経口投与したときの薬物動態パラメーター [a)]

性別	投与量 (mg/kg/day)	1 日目				28 日目			
		t_{max} (h)	C_{max} (ng/mL)	C_{6h} (ng/mL)	AUC_{0-6h} (ng・h/mL)	t_{max} (h)	C_{max} (ng/mL)	C_{6h} (ng/mL)	AUC_{0-6h} (ng・h/mL)
雄	15	1.0	4191	290.4±209.2	12520	0.25	810.3	0.3185±0.3907	341.8
	75	1.0	25570	11340±2870	116400	0.25	8991	15.45±20.45	8360
	375	6.0	122300	122300±17900 [b)]	556800	0.25 [c)]	12410 [c)]	1528±1706 [c)]	27230 [c)]
雌	15	1.0	4792	51.35±30.38	12350	0.25	1118	BLQ	364.8
	75	1.0	24450	12850±4440	113700	0.25	13680	1.315±1.725	11710
	375	6.0	123900	123900±7900	573400	0.25 [d)]	29940 [d)]	1148 [d)]	70570 [d)]

a：1 時点毎に n=4 の平均値からなる 1 本の血漿中濃度推移曲線から求めた、ただし、C_{6h} は n=4 の平均値±標準偏差
b：1 例死亡のため、n=3 の平均値±標準偏差
c：1 時点毎に n=3 の平均値からなる 1 本の血漿中濃度推移曲線から求めた、ただし、C_{6h} は n=3 の平均値±標準偏差
d：1 時点毎に n=2 の平均値からなる 1 本の血漿中濃度推移曲線から求めた、ただし、C_{6h} は n=2 の平均値
BLQ：定量下限（0.04 ng/mL）未満

2.6.5.4.4 イヌ 4 週間反復投与トキシコキネティクス

＜添付資料 4.2.3.2-4＞

動物種／系統	イヌ／ビーグル
性別（雌/雄）／動物数	雌雄／15 及び 75 mg/kg 投与群、各 4 例／375 mg/kg 投与群、6 例
給餌	投与後に 300 g/回/日
媒体／投与形態	0.5 w/v% CMC 溶液／懸濁液
投与方法／投与期間（投与回数）	経口投与／4 週間（28 回）反復投与
投与量	15、75、375 mg/kg（375 mg/kg 投与群では第 15 日以降 150 mg/kg に減量）
試料	血漿
定量法	LC/MS/MS
定量物質	メラトニン

雌雄イヌにメラトニンを 4 週間反復経口投与したときの薬物動態パラメーター

性別	投与量 (mg/kg/day)	1 日目				投与量変更日 a)	28 日目			
		t_{max} (h)	C_{max} (ng/mL)	C_{8h} (ng/mL)	AUC_{0-8h} (ng・h/mL)	AUC_{0-8h} (ng・h/mL)	t_{max} (h)	C_{max} (ng/mL)	C_{8h} (ng/mL)	AUC_{0-8h} (ng・h/mL)
雄	15	0.44 ±0.38	3875 ±2198	0.4298 ±0.7125	3744 ±1509	該当しない	0.40 ±0.41	4360 ±2643	0.8409 ±0.4554	4909 ±2272
	75	0.75 ±0.29	20440 ±6270	7.437 ±4.175	42020 ±19010	該当しない	1.5 ±1.0	16750 ±3620	19.49 ±10.41	43510 ±17780
	375 (150) a)	1.6 ±1.1	40470 ±10500	3424 ±3027	191000 ±36500	121400 a) ±38000	0.75 a) ±0.27	27590 a) ±6410	524.1 a) ±719.8	93240 a) ±33930
雌	15	0.46 ±0.40	2330 ±1561	0.2164 ±0.0670	2070 ±584	該当しない	0.50 ±0.00	4762 ±266	0.9948 ±1.0041	5972 ±1567
	75	0.88 ±0.25	15280 ±7610	8.924 ±9.618	39140 ±28410	該当しない	0.63 ±0.25	26130 ±720	70.62 ±116.62	65710 ±23160
	375 (150) a)	1.7 ±1.0	43590 ±23040	4691 ±4666	205200 ±115300	74500 a) ±58020	1.3 a) ±0.8	30970 a) ±11650	758.1 a) ±795.7	106600 a) ±36000

15 及び 75 mg/kg 投与群：平均値±標準偏差（n=4）
375(150) mg/kg 投与群：平均値±標準偏差（n=6）
a：第 15 日以降、375 mg/kg を 150 mg/kg に減量した。

2.6.5.4.5 イヌ 39 週間反復投与トキシコキネティクス

＜添付資料 4.2.3.2-5＞

動物種／系統	イヌ／ビーグル
性別（雌/雄）／動物数	雌雄／各群 4 例
給餌	投与後に 250 g/回/日
媒体／投与形態	0.5 w/v%カルボキシメチルセルロースナトリウム溶液／懸濁液
投与方法／投与期間（投与回数）	経口投与／39 週間（273 回）反復投与
投与量	15、75、250 mg/kg（250 mg/kg 投与群では第 217 日以降（雄）及び第 209 日（雌）以降 150 mg/kg に減量）
試料	血漿
定量法	LC/MS/MS
定量物質	メラトニン

雌雄イヌにメラトニンを 39 週間反復経口投与したときの薬物動態パラメーター

性別	投与量 (mg/kg/day)	1 日目				91 日目				投与量変更日 a,b)	273 日目			
		t_{max} (h)	C_{max} (ng/mL)	C_{8h} (ng/mL)	AUC_{0-8h} (ng･h/mL)	t_{max} (h)	C_{max} (ng/mL)	C_{8h} (ng/mL)	AUC_{0-8h} (ng･h/mL)	AUC_{0-8h} (ng･h/mL)	t_{max} (h)	C_{max} (ng/mL)	C_{8h} (ng/mL)	AUC_{0-8h} (ng･h/mL)
雄	15	0.38 ±0.14	4519 ±1652	0.2707 ±0.0462	4361 ±1653	0.31 ±0.13	4558 ±1721	0.6893 ±0.3394	5217 ±2732	該当しない	0.31 ±0.13	5698 ±2223	0.8850 ±0.4709	6076 ±3296
	75	0.44 ±0.13	56980 ±14840	17.83 ±20.09	110800 ±49400	0.88 ±0.25	29080 ±3690	128.0 ±148.5	72040 ±37160	該当しない	1.0 ±0.0	23670 ±40	69.19 ±70.75	62410 ±15580
	250 (150) a)	1.3 ±1.2	69240 ±13300	3485 ±3541	246600 ±84100	2.0 ±1.2	49990 ±8320	3983 ±3932	234500 ±55100	195500 a) ±15600	1.7 a) ±1.2	40620 a) ±3550	9403 a) ±12473	157600 a) ±46700
雌	15	0.50 ±0.35	5431 ±2551	1.005 ±0.744	7294 ±3598	0.50 ±0.35	4362 ±2761	1.846 ±1.577	6933 ±4634	該当しない	0.38 ±0.14	5861 ±2078	1.863 ±1.791	7788 ±4633
	75	0.88 ±0.25	59950 ±10610	26.39 ±20.94	120300 ±36700	0.63 ±0.25	30330 ±2230	29.28 ±45.94	60110 ±21260	該当しない	0.75 ±0.29	32680 ±9500	47.98 ±55.19	84870 ±29640
	250 (150) b)	1.3 ±1.2	74630 ±35930	6600 ±4658	275900 ±171700	1.4 ±1.1	49620 ±12450	4164 ±3732	208400 ±73100	158400 b) ±60800	0.81 b) ±0.38	35570 b) ±7350	954.4 b) ±972.8	126400 b) ±28700

平均値±標準偏差（n=4）
a：第 217 日以降、250 mg/kg を 150 mg/kg に減量した。
b：第 209 日以降、250 mg/kg を 150 mg/kg に減量した。

2.6.5.5 薬物動態試験：分布

2.6.5.5.1 定量的全身オートラジオグラフィー

＜添付資料 4.2.2.3-1＞

動物種／系統	白色ラット／Crl:CD(SD)、有色ラット／Iar:Long-Evans
性別（雄/雌）／週齢／動物数	雄／7 週齢／n=1
給餌	絶食
溶媒／投与形態	0.5 w/v% CMC 溶液／懸濁液
投与方法	経口投与
投与量	15 mg/5 mL/kg
投与液濃度	3 mg/0.45 MBq(12.2 μCi)/mL
放射性核種	^{14}C
定量対象物質	放射能
定量方法	定量的全身オートラジオグラフィー

[^{14}C]メラトニンを単回経口投与（15 mg/kg）したときの組織中放射能濃度（μg eq./g）

組織/臓器	白色ラット			有色ラット			有色／白色 比		
	0.25 h	1 h	24 h	0.25 h	1 h	24 h	0.25 h	1 h	24 h
血液	13.4(1.00)	2.62(1.00)	ND(NC)	14.6(1.00)	3.74(1.00)	ND(NC)	1.09	1.43	NC
大脳	4.67(0.35)	0.365(0.14)	ND(NC)	4.58(0.31)	0.323(0.09)	ND(NC)	0.98	0.88	NC
小脳	4.56(0.34)	0.378(0.14)	ND(NC)	4.81(0.33)	0.338(0.09)	ND(NC)	1.05	0.89	NC
下垂体	12.0(0.90)	1.16(0.44)	ND(NC)	10.0(0.68)	1.17(0.31)	ND(NC)	0.83	1.01	NC
延髄	4.95(0.37)	0.333(0.13)	ND(NC)	4.94(0.34)	0.332(0.09)	ND(NC)	1.00	1.00	NC
脊髄	4.77(0.36)	0.383(0.15)	ND(NC)	4.44(0.30)	0.352(0.09)	ND(NC)	0.93	0.92	NC
ブドウ膜	NA	NA	NA	30.9(2.12)	6.55(1.75)	1.02(NC)	NA	NA	NA
眼球	2.26(0.17)	0.736(0.28)	ND(NC)	1.67(0.11)	0.357(0.10)	BLQ(NC)	0.74	0.49	NC
ハーダー氏腺	12.4(0.93)	1.19(0.45)	ND(NC)	12.1(0.83)	1.50(0.40)	BLQ(NC)	0.98	1.26	NC
顎下腺	11.3(0.84)	1.12(0.43)	ND(NC)	11.2(0.77)	1.39(0.37)	ND(NC)	0.99	1.24	NC
甲状腺	11.8(0.88)	1.45(0.55)	ND(NC)	11.1(0.76)	1.69(0.45)	ND(NC)	0.94	1.17	NC

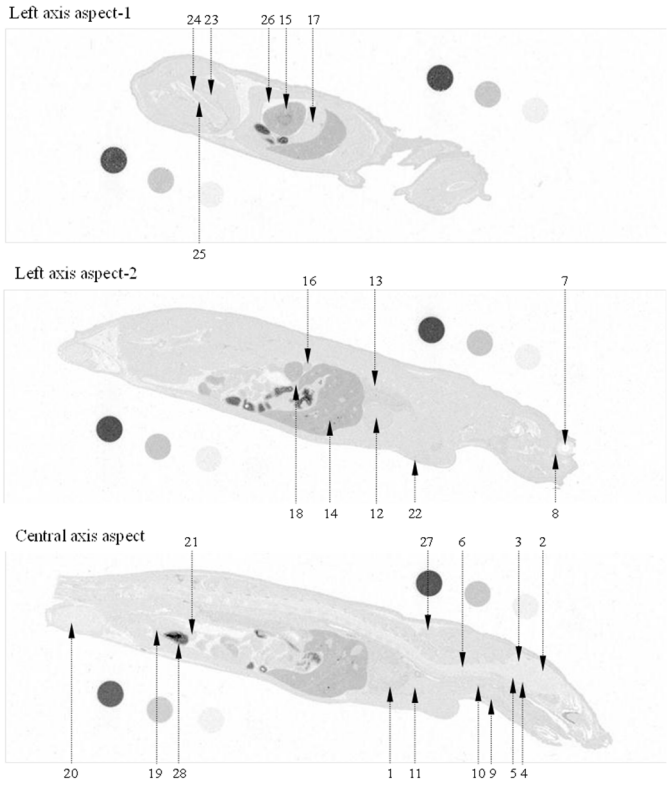
（次ページへ続く）

（前ページから続く）

組織/臓器	白色ラット			有色ラット			有色／白色 比		
	0.25 h	1 h	24 h	0.25 h	1 h	24 h	0.25 h	1 h	24 h
胸腺	8.45(0.63)	1.06(0.40)	ND(NC)	8.17(0.56)	1.09(0.29)	ND(NC)	0.97	1.03	NC
心臓	9.70(0.72)	1.13(0.43)	BLQ(NC)	11.1(0.76)	1.48(0.40)	BLQ(NC)	1.14	1.31	NC
肺	11.8(0.88)	2.06(0.79)	BLQ(NC)	14.5(0.99)	3.45(0.92)	BLQ(NC)	1.23	1.67	NC
肝臓	32.8(2.45)	6.18(2.36)	0.506(NC)	35.3(2.42)	11.3(3.02)	0.505(NC)	1.08	1.83	1.00
腎臓	37.1(2.77)	8.16(3.11)	0.308(NC)	33.8(2.32)	9.99(2.67)	0.341(NC)	0.91	1.22	1.11
副腎	16.0(1.19)	3.14(1.20)	0.544(NC)	18.6(1.27)	3.49(0.93)	0.713(NC)	1.16	1.11	1.31
脾臓	8.23(0.61)	1.03(0.39)	0.246(NC)	9.58(0.66)	1.14(0.30)	BLQ(NC)	1.16	1.11	NC
膵臓	12.7(0.95)	1.39(0.53)	BLQ(NC)	13.6(0.93)	1.85(0.49)	BLQ(NC)	1.07	1.33	NC
前立腺	9.12(0.68)	2.84(1.08)	ND(NC)	8.68(0.59)	1.61(0.43)	ND(NC)	0.95	0.57	NC
精巣	3.65(0.27)	1.43(0.55)	ND(NC)	4.60(0.32)	1.40(0.37)	ND(NC)	1.26	0.98	NC
精嚢	7.47(0.56)	1.18(0.45)	ND(NC)	6.94(0.48)	1.39(0.37)	ND(NC)	0.93	1.18	NC
皮膚（有色部）	NA	NA	NA	9.90(0.68)	3.02(0.81)	ND(NC)	NA	NA	NA
皮膚（非有色部）	8.09(0.60)	2.10(0.80)	ND(NC)	6.36(0.44)	2.75(0.74)	ND(NC)	0.79	1.31	NC
骨格筋	9.63(0.72)	0.891(0.34)	BLQ(NC)	9.30(0.64)	1.02(0.27)	BLQ(NC)	0.97	1.14	NC
大腿骨	1.69(0.13)	0.350(0.13)	BLQ(NC)	0.879(0.06)	0.339(0.09)	BLQ(NC)	0.52	0.97	NC
骨髄（大腿骨）	8.50(0.63)	1.25(0.48)	0.398(NC)	8.68(0.59)	1.40(0.37)	0.369(NC)	1.02	1.12	0.93
白色脂肪	1.60(0.12)	0.566(0.22)	BLQ(NC)	2.83(0.19)	0.446(0.12)	BLQ(NC)	1.77	0.79	NC
褐色脂肪	8.83(0.66)	1.32(0.50)	ND(NC)	7.42(0.51)	1.10(0.29)	ND(NC)	0.84	0.83	NC
膀胱	23.9(1.78)	29.7(11.34)	ND(NC)	10.5(0.72)	31.5(8.42)	ND(NC)	0.44	1.06	NC

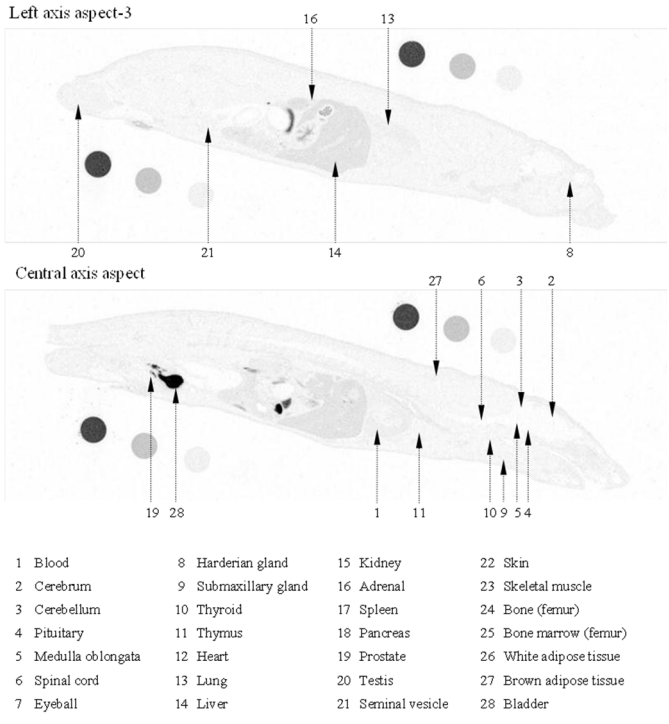
括弧内の数値：対血液比
BLQ：定量下限（0.242 μg eq./g）未満
ND：目視にて放射能が認められない
NC：算出しない
NA：該当しない

[^{14}C]メラトニンを単回経口投与（15 mg/kg）したときの全身ラジオルミノグラム



1 Blood	8 Harderian gland	15 Kidney	22 Skin
2 Cerebrum	9 Submaxillary gland	16 Adrenal	23 Skeletal muscle
3 Cerebellum	10 Thyroid	17 Spleen	24 Bone (femur)
4 Pituitary	11 Thymus	18 Pancreas	25 Bone marrow (femur)
5 Medulla oblongata	12 Heart	19 Prostate	26 White adipose tissue
6 Spinal cord	13 Lung	20 Testis	27 Brown adipose tissue
7 Eyeball	14 Liver	21 Seminal vesicle	28 Bladder

投与後 15 分



1 Blood	8 Harderian gland	15 Kidney	22 Skin
2 Cerebrum	9 Submaxillary gland	16 Adrenal	23 Skeletal muscle
3 Cerebellum	10 Thyroid	17 Spleen	24 Bone (femur)
4 Pituitary	11 Thymus	18 Pancreas	25 Bone marrow (femur)
5 Medulla oblongata	12 Heart	19 Prostate	26 White adipose tissue
6 Spinal cord	13 Lung	20 Testis	27 Brown adipose tissue
7 Eyeball	14 Liver	21 Seminal vesicle	28 Bladder

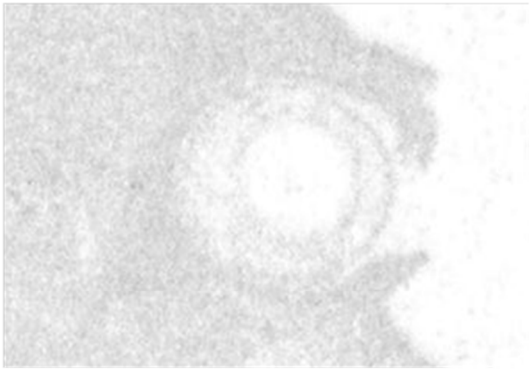
投与後 1 時間

円形の画像は放射能濃度測定用の標準血液試料

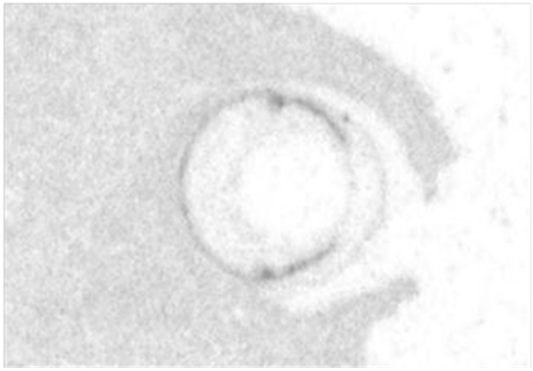
[^{14}C]メラトニンを白色及び有色ラットに単回経口投与（15 mg/kg）したときの眼球ラジオルミノグラム

左列：白色ラット　　右列：有色ラット

0.25 h (animal No. 01101)

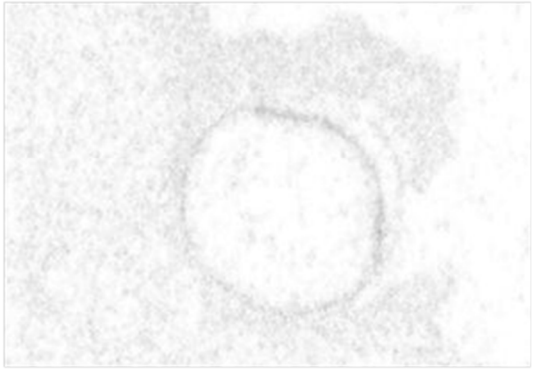


0.25 h (animal No. 04104)



1 h (animal No. 02102)

1 h (animal No. 05105)



24 h (Animal No. 03103)

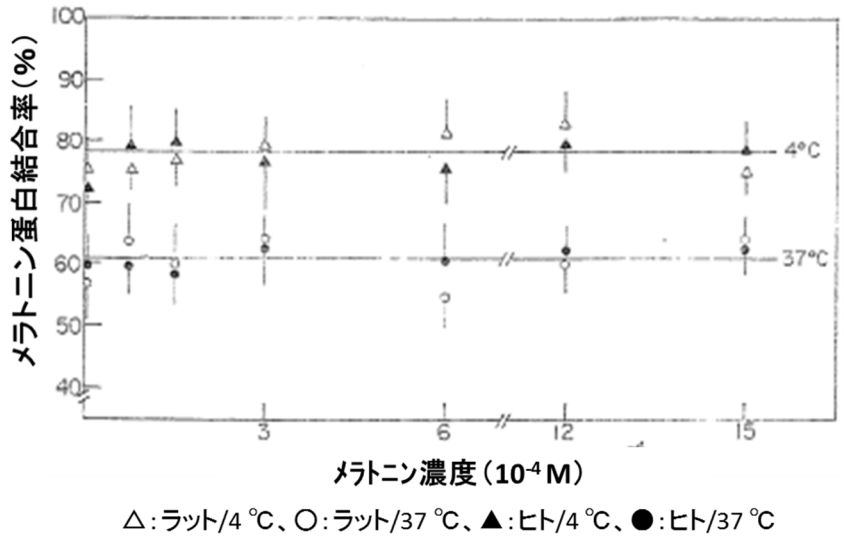
24 h (animal No. 06106)

2.6.5.6 薬物動態試験：たん白結合及び血球への移行

2.6.5.6.1 血漿たん白結合

＜添付資料 4.2.2.3-2（参考）＞

試験系	ラット血漿及びヒト血漿
試験濃度	8×10^5 dpm/1.80 nmol/418 ng ＋非標識メラトニン（最大 1.5 mM）
測定対象物質	放射能
核種	^3H
測定方法	液体シンチレーションカウンター
試験方法	平衡透析法：1 mL の血漿を 4 mL の 0.1 M リン酸緩衝液（pH 7.4、0.9 %NaCl）に対して 4 及び 37 ℃で 15 時間透析。



△：ラット/4 ℃、○：ラット/37 ℃、▲：ヒト/4 ℃、●：ヒト/37 ℃

・結合率に温度依存性がみられたが、ラットとヒトの間で種差はみられなかった。
・メラトニン濃度 1.5 mM まで濃度依存性は見られず、ほぼ一定した結合率であった。
・ラットとヒトをプールした結合率は、37 ℃で 60.7±4.8%、4 ℃で 77.8±4.3 %であった。

2.6.5.6.2 結合たん白の同定

＜添付資料 4.2.2.3-2（参考）＞

試験系	ヒト血漿たん白溶液	
試験濃度	8.1×10^5 dpm/1.82 nmol/423 ng/4 mL	
測定対象物質	放射能	
核種	^3H	
測定方法	液体シンチレーションカウンター	
試験方法	平衡透析法：1 mL のたん白溶液を 4 mL の 0.1 M リン酸緩衝液（pH 7.4、0.9 %NaCl）に対して 4 ℃で 15 時間透析。	
結合たん白	たん白濃度（w/v %）[a]	結合率（%）
ヒトアルブミン	4	60.6±3.5 [b]
ヒトαグロブリン	1	0
ヒトβグロブリン	1	0
ヒトγグロブリン	2	0
ヒトフィブリノゲン	0.5	0

a）ヒト血漿と近似した濃度を設定した。

b）平均値±標準誤差（n=4）

2.6.5.6.3 結合たん白の同定（α1酸性糖たん白）

＜添付資料 4.2.2.3-3（参考）＞

試験系	ヒト血清、ヒト血漿たん白溶液
試験濃度	1.84×10^5 dpm/mL（0.414 nmol/96 ng/mL）
測定対象物質	放射能
核種	^3H
測定方法	液体シンチレーションカウンター
試験方法	平衡透析

たん白結合率（%）

ヒト血清又はヒトたん白溶液	たん白濃度（μmol/L）		[^{3}H]メラトニン濃度（上段：μmol/L）（下段：ng/mL）[a)]			
	アルブミン	α1酸性糖たん白	0.0003 [d)]	0.0004 [d)]	0.9 [e)]	111
			0.0696	0.0928	197	25638
健康成人血清	696 [b)]	17.5 [b)]	－	53±1	53±3	41±2
癌患者血清	563 [b)]	39 [b)]	－	58±1	－	－
ヒトアルブミン溶液	696 [c)]	該当しない	32.3±1.2	－	－	－
α1酸性糖たん白	該当しない	17.5 [c)]	9.1±2.1	－	－	－
ヒトアルブミン/ヒトα1酸性糖たん白混合溶液	696 [c)]	17.5 [c)]	54.2±0.7	－	－	－

a：メラトニンの分子量を 232 として換算
b：測定値
c：設定値
d：内因性メラトニン濃度に相当するレベル
e：臨床第Ⅰ相試験における C_{max}（5 mg 投与時、男性：9.6 ng/mL、女性：11.0 ng/mL）を上回るレベル
－：測定していない

2.6.5.6.4 血球移行性

＜添付資料 4.2.2.3-2（参考）＞

試験系	ラット血液
試験濃度	1.84×10^5 dpm/mL（0.414 nmol/96 ng/mL）
測定対象物質	放射能
核種	^3H
測定方法	液体シンチレーションカウンター
試験方法	・ヘパリン処理したラット血液 2 mL に[^{3}H]メラトニンを添加し、37 ℃で所定時間インキュベーション。 ・インキュベーション後、遠心分離（900×g、15 分）して血漿及び血液を採取。 ・血漿中及び血球中放射能を測定。

ｲﾝｷｭﾍﾞｰｼｮﾝ時間（分）	血漿中[^{3}H]ﾒﾗﾄﾆﾝ濃度（(dpm/mL)*10^5）	血球中[^{3}H]ﾒﾗﾄﾆﾝ濃度（(dpm/mL)*10^5）	血漿容積（mL/血液 2 mL）	血漿中ﾒﾗﾄﾆﾝ回収率（%）	左に記載のデータを用いて申請者が計算した値			
					ﾍﾏﾄｸﾘｯﾄ値 a)	血液中[^{3}H]ﾒﾗﾄﾆﾝ濃度 b)（(dpm/mL)*10^5）	Rb 値 c)	血球移行率 d)（%）
15	2.68	0.88	1.12	82	0.44	1.89	0.70	20.5
30	2.59	1.06	1.08	79	0.46	1.89	0.73	25.9
60	2.34	1.30	1.13	72	0.44	1.89	0.81	30.0
90	2.50	1.14	1.09	77	0.46	1.88	0.75	27.6
					（平均値） 0.45	（平均値） 1.89	（平均値） 0.75	（平均値） 26.0

a：ﾍﾏﾄｸﾘｯﾄ値＝(2－血漿容積)/2
b：血液中[^{3}H]ﾒﾗﾄﾆﾝ濃度＝血球中[^{3}H]ﾒﾗﾄﾆﾝ濃度×ﾍﾏﾄｸﾘｯﾄ値＋血漿中[^{3}H]ﾒﾗﾄﾆﾝ濃度×(1－ﾍﾏﾄｸﾘｯﾄ値)
c：Rb 値(血液/血漿中濃度比)＝血液中[^{3}H]ﾒﾗﾄﾆﾝ濃度/血漿中[^{3}H]ﾒﾗﾄﾆﾝ濃度
d：血球移行率（%）＝[1－（(血漿中[^{3}H]ﾒﾗﾄﾆﾝ濃度/血液中[^{3}H]ﾒﾗﾄﾆﾝ濃度)×(1－ﾍﾏﾄｸﾘｯﾄ値)）]×100

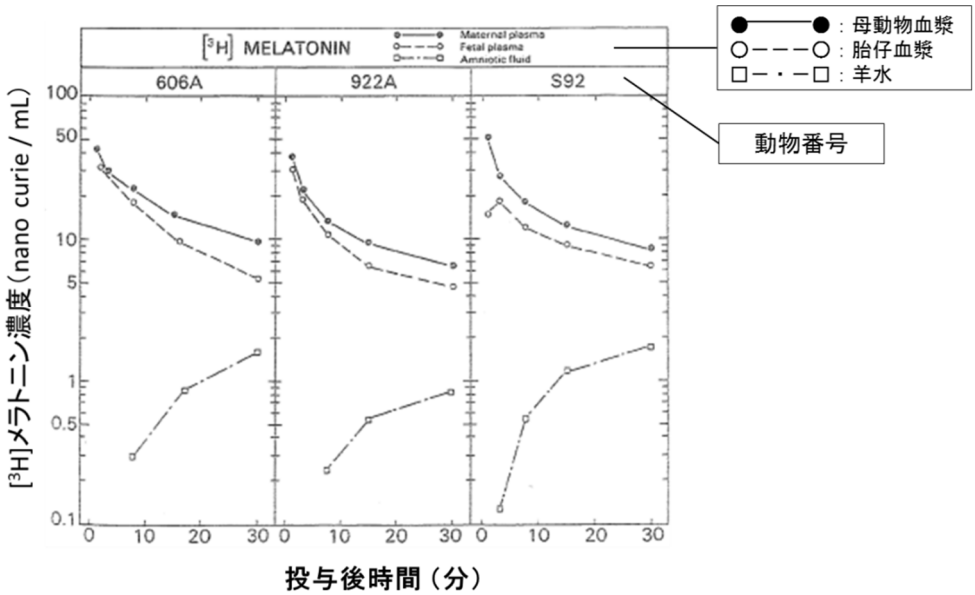
2.6.5.7 薬物動態試験：妊娠又は授乳動物における試験

2.6.5.7.1 胎盤通過性

＜添付資料 4.2.2.3-4（参考）＞

動物種	アカゲザル
妊娠日数／動物数	150～153 日／3 匹
溶媒／投与形態	生理食塩水／溶液
投与方法	静脈内投与
投与量	1.0 μg/150 μCi/サル
定量（対象）物質	・[^{3}H]メラトニン（クロロホルムで抽出された放射能） ・[^{3}H]メラトニン代謝物（クロロホルムで抽出されない（水相に残る）放射能）
定量法	液体シンチレーションカウンター
実験方法	・麻酔下に開腹し、子宮を露出。 ・子宮筋、脱落膜、絨毛膜を切開。 ・胎盤内の胎仔側血管に胎仔血液採取用カテーテルを装着。 ・この際、羊膜には触れない。 ・伏在静脈を介して下大静脈に母動物血液採取用カテーテルを装着。 ・子宮下部の前壁を通して羊水採取用カテーテルを装着。 ・1.0 μg/150 μCi/サルの[^{3}H]メラトニンを大静脈より投与。 ・カテーテルより所定時間に試料採取。

妊娠アカゲザルに[^{3}H]メラトニンを静脈内投与したときの、
母動物血漿、胎仔血漿及び羊水中[^{3}H]メラトニン濃度推移



胎仔血漿中濃度/母動物血漿中濃度（%）

投与後時間	動物番号		
	606A	922A	S92
1～3 分	84～90%		1 分：27% 3 分：63%
30 分	66±5%		

2.6.5.7.2 乳汁排泄

＜添付資料 4.2.2.5-1（参考）＞

動物種／系統	雌ラット／SD
授乳期間／動物数	8 日間／n=5
給餌	乳仔は 6 時間絶食
溶媒／投与形態	生理食塩水／溶液
投与方法	皮下注射
投与量	0.19 ng/20 μCi/回×4 回（20 分間隔）、計 0.76 ng/80 μCi/ラット
定量（対象）物質	・総放射能 ・[^{3}H]メラトニン（クロロホルムで抽出される放射能）
定量法	液体シンチレーションカウンター
実験方法	・授乳中の母ラット（B）から乳仔（b）を隔離し、乳仔（b）は絶食させた。 ・母ラット（B）には、別の母ラット（A）の乳仔（a）に授乳させた。 ・1 時間後に、母ラット(B)から乳仔(a)を引き離した。 ・母ラット(B)に、20 μCi /回の[^{3}H]メラトニンを 20 分間隔で 4 回、皮下注射（首筋）。 ・最後の注射から 30 分後に、絶食させた乳仔(b)を母ラット(B)と同居させ、授乳開始。 ・30 および 60 分後に、それぞれ 5 例の乳仔(b)から胃を摘出。 ・5 例中 2 例について胃内総放射能を測定。 ・5 例全例について胃内[^{3}H]メラトニンを測定

授乳中の母ラットに[^{3}H]メラトニンを投与した後の乳仔の胃内放射能

授乳開始後時間（h）	総放射能（nCi） a)	[^{3}H]メラトニン（nCi） b)	総放射能に対する[^{3}H]メラトニンの割合（%）
0.5	15.5、11.8	1.5±0.20	11
1.0	10.0、 5.7	1.0±0.05	13

a：5 例の乳仔のうち 2 例について胃内総放射能を測定し、個体別に表示した。
b：平均値±標準誤差（n=5）

2.6.5.8 薬物動態試験：代謝 in vivo

2.6.5.8.1 6-水酸化反応、脱アセチル化反応

＜添付資料 4.2.2.4-1（参考）、4.2.2.4-2（参考）＞

添付資料番号	4.2.2.4-1（参考）		4.2.2.4-2（参考）		
動物種	SD 雄ラット		ラット	ラット	ラット
被験物質	[acetyl-^{3}H]メラトニン 又は [2-^{14}C]メラトニン 又は [methoxy-^{14}C]メラトニン		[^{14}C]メラトニン	[^{14}C]-5-methoxy- トリプタミン	[^{14}C]-5-methoxy- インドール酢酸
投与量	10 μCi(^{3}H)又は 1 μCi(^{14}C) /rat		10 mg/rat	3 mg/rat	10 mg/rat
投与経路	静脈内		腹腔内	腹腔内	腹腔内
溶媒／投与形態	記載なし		水／水溶液	水／水溶液	水／水溶液
試料（採取期間）	尿（48 h）	糞（48 h）	尿（24 h）	尿（24 h）	尿（24 h）
放射能排泄率（% of dose）	60～70	15	70 [a)]	≧80	－
分析方法	PC [b)]	PC [b)]	PC [b)]	PC [b)]	PC [b)]
メラトニン（未変化体）	検出せず	検出せず	small amount	－	－
6-OH-MT	－	－	－	－	－
6-Sul-MT	70-80 % [c)]	－	55 % [c)]	－	－
6-Glu-MT	5 [c)]	－	30 % [c)]	－	－
5-methoxy-トリプタミン	－	－	－	2 % [c)]	－
5-methoxy-インドール酢酸	＜0.5 % of dose	－	2 % of dose [d)]	≧90 % [c)]	100 % [c)]
エールリッヒ反応陰性未知代謝物	12 % [c)]	－	15 % [c)]	－	－

a：5 mg/kg 投与の結果
b：ペーパークロマトグラフィー
c：尿中放射能に占める割合（%）
d：3 mg/kg 投与の結果
－：分析の対象外または結果の記載なし

2.6.5.8.2 インドールの開環

＜添付資料 4.2.2.4-3（参考）＞

動物種	ウサギ		SD 雄ラット		
被験物質	[acetyl-1-^{14}C]メラトニン		[acetyl-1-^{14}C]メラトニン		
投与量 又は 試験濃度	136,000 cpm/0.2 mL		1,000,000 cpm/64.5 nmol/rat		
投与経路	in vitro		大槽内		静脈内
溶媒／投与形態	リン酸カリウム緩衝液		記載なし		記載なし
試料（採取期間）	脳から精製した酵素	脳から精製した酵素＋精製 formamidase	脳（20、45 min）	尿（24 h）	尿（24 h）
放射能排泄率（% of dose）	該当しない	該当しない	該当しない	65	65
分析法	TLC [a)]	TLC [a)]	CC [b)]	CC [b)]	CC [b)]
メラトニン（未変化体）	－	－	検出	－	－
6-OH-MT	－	－	検出せず	－	－
AFMK [c)]	検出	検出せず	検出せず	記載なし	記載なし
AMK [d)]	検出	検出	検出	35 % [e)]	15 % [e)]

a：薄層クロマトグラフィー
b：カラムクロマトグラフィー
c：N-acetyl-N-formyl-5-methoxykynurenamine
d：N-acetyl-5-methoxykynurenamine
e：尿中放射能に占める割合
－：分析の対象外または結果の記載なし

2.6.5.8.3 5-脱メチル化

＜添付資料 4.2.2.4-4（参考）＞

動物種		Wistar 雌ラット					
投与経路		腹腔内					
溶媒／投与形態		エタノール/生食（0.25/1.0, v/v）					
被験物質		メラトニン	NAS	6-OH-MT	d-メラトニン [a)]		
投与量		20 mg/rat	20 mg/rat	5 mg/rat	1 mg/rat	10 mg/rat	50 mg/rat
分析試料（採取期間）		尿（18 h）	尿（18 h）	尿（18 h）	尿（18 h）	尿（18 h）	尿（18 h）
TLC [b)] 分析における検出位置	6-OH-MT	検出	検出 [c)]	検出	TLC は実施していない	TLC は実施していない	TLC は実施していない
	6-Sul-MT	検出	検出 [d)]	検出			
	6-Glu-MT	検出	検出 [e)]	検出			
前処理		・TLC にて展開後、6-Sul-MT に相当するスポットを抽出 ・トリフルオロ酢酸を用いて誘導体化 [f)]			・トリフルオロ酢酸を用いて尿試料を直接誘導体化 [f)]		
GC/MS [g)] 分析	6-OH-MT	検出	検出せず	検出	100%	100%	100%
	NAS	検出	検出	検出せず	30% [h,i)]	50% [h,i)]	60-80% [h,i)]

a：メラトニンの重水素置換体
b：薄層クロマトグラフィー
c：遊離の NAS と想定される
d：NAS の硫酸抱合体と想定される
e：NAS のグルクロン酸抱合体と推定される
f：誘導体化により抱合がはずれる
g：ガスクロマトグラフ質量分析計
h：6-OH-MT（重水素置換体）のピーク高を 100%としたときの NSC（重水素置換体）のピーク高（%、6-OH-MT と NAS の生成比を表す）
i：NAS の重水素置換体が検出されたことから、外因性メラトニンから NAS が生成することが確認された

2.6.5.9 薬物動態試験：代謝 in vitro

2.6.5.9.1 メラトニン代謝に関与するCYP分子種の同定－1

＜添付資料 4.2.2.4-5（参考）＞

試験系	CYP発現系ミクロソーム
方法	・CYP発現系ミクロソーム（2 mg/mL）にメラトニン10 μmol/Lを添加し、37 ℃、3時間インキュベートした。 ・反応液中に残存するメラトニンを定量し、メラトニン残存率を求めた。
定量法	LC/MS/MS

CYP発現系ミクロソームとインキュベートしたときのメラトニン残存率

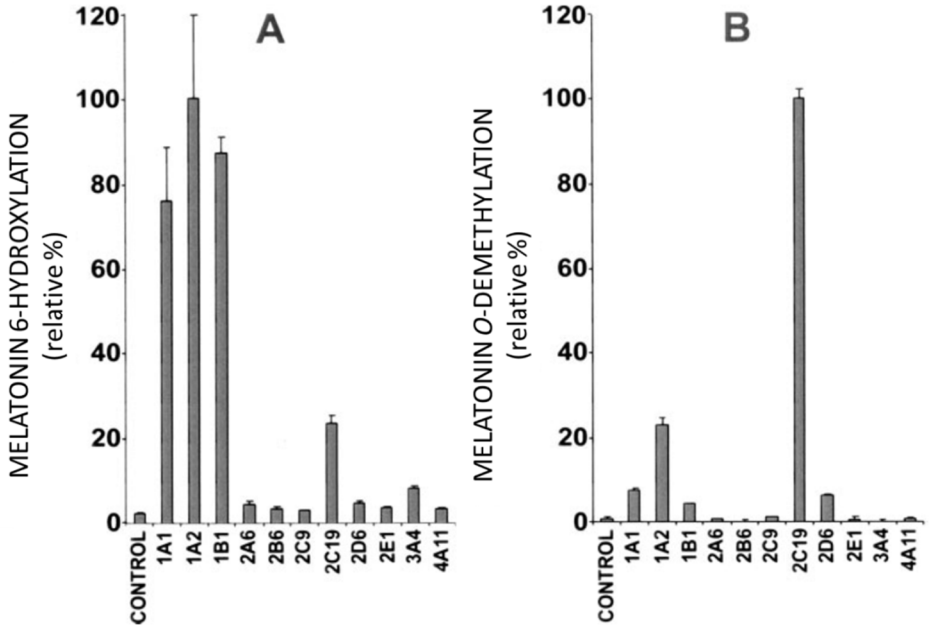
CYP分子種	メラトニン残存率（%）
CYP1A1	10
CYP1A2	8
CYP2A6	≧95
CYP2B6	≧95
CYP2C8	≧95
CYP2C9	≧95
CYP2C19	≧95
CYP2D6	≧95
CYP2E1	≧95
CYP3A4	≧95

2.6.5.9.2 メラトニン代謝に関与するCYP分子種の同定－2

＜添付資料4.2.2.4-6（参考）＞

試験系	CYP発現系ミクロソーム
方法	・CYP発現系ミクロソーム（2 pmol）にメラトニン10 μmol/Lを添加し、37 ℃、10分間インキュベートした。 ・反応液中に生成した6-水酸化メラトニン及びO-（5-）脱メチルメラトニンを定量した。
定量法	LC/MS/MS

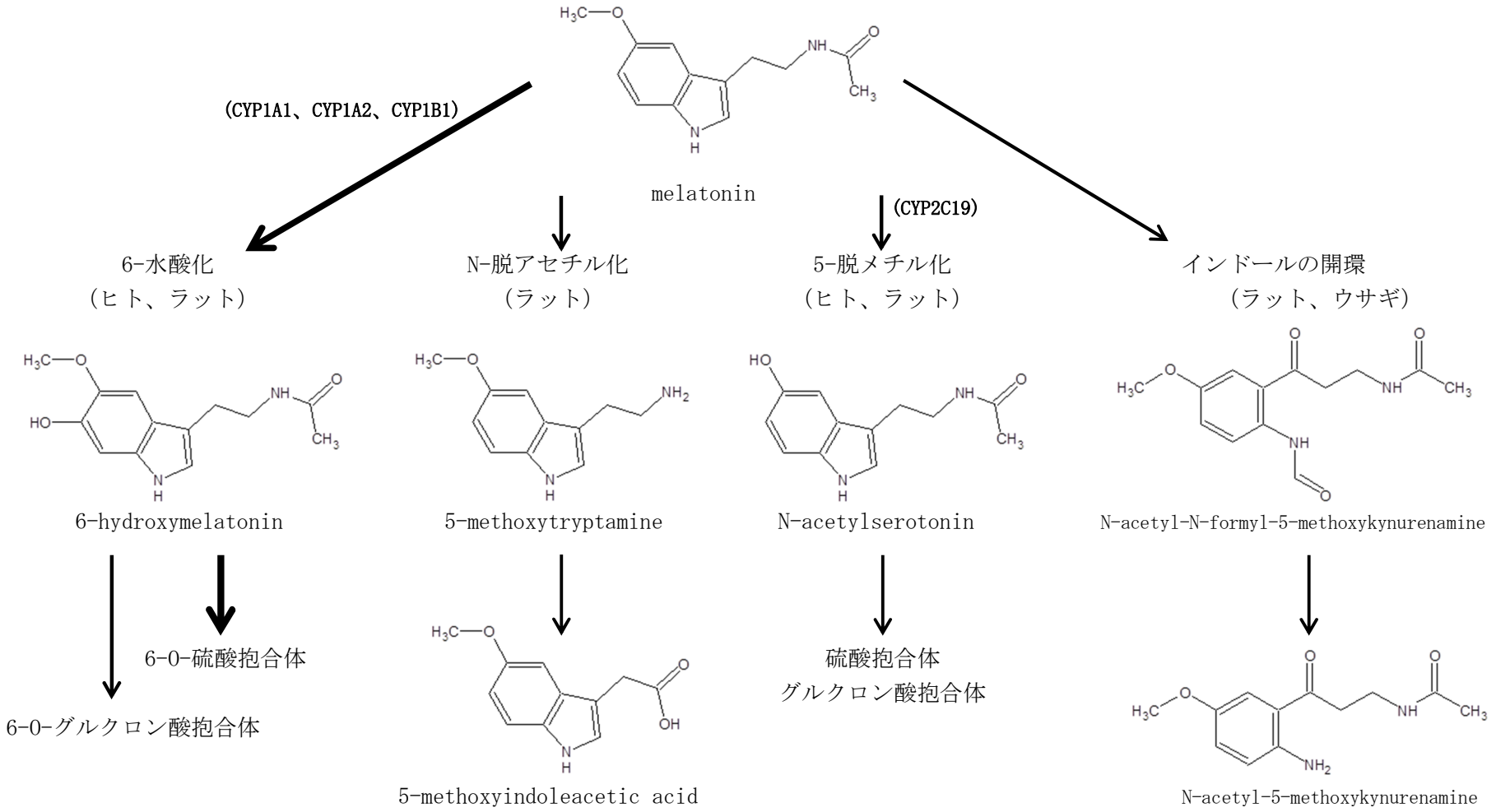
CYP発現系ミクロソームとインキュベートしたときの代謝物生成量（相対量）



A：6-水酸化メラトニンの生成量（相対量）
B：O-（5-）脱メチルメラトニン（N-アセチルセロトニンの別称）生成量（相対量）

2.6.5.10 薬物動態試験：推定代謝経路

＜添付資料 4.2.2.4-1（参考）、4.2.2.4-2（参考）、4.2.2.4-3（参考）、4.2.2.4-4（参考）、4.2.2.4-6（参考）＞



2.6.5.11 薬物動態試験：薬物代謝酵素の誘導／阻害

＜添付資料 4.2.3.2-1＞

動物種／系統／投与開始時週齢	ラット／Crl:CD(SD)／6 週齢
性別（雌/雄）／動物数	雌雄／各群 5 例
給餌	自由摂取
媒体／投与形態	0.5 w/v% CMC 溶液／懸濁液
投与方法／投与期間（投与回数）	経口投与／4 週間（28 回）反復投与
投与量	15、75、375 mg/kg
試料	肝ミクロソーム
測定対象（酵素活性）	UDP-グルクロン酸転移酵素
基質	p-ニトロフェノール

メラトニンをラットに 4 週間（28 回）反復投与したときの肝 UDP-グルクロン酸転移酵素活性

投与量 (mg/kg/day)	UDP-GT 活性(nmol/min/mg)	
	雄	雌
コントロール	15.86±1.59	6.50±0.78
15	20.90±5.01	9.58±2.25 a)
75	19.52±3.11	8.82±1.89
375	53.00±6.66 b)	31.08±4.65 b)

平均値±標準偏差（n=5）
a：$p<0.05$（Dunnett の多重比較検定）
b：$p<0.01$（Dunnett の多重比較検定）

2.6.5.12 薬物動態試験：排泄

2.6.5.12.1 尿糞中排泄

＜添付資料 4.2.2.4-1（参考）、4.2.2.4-2（参考）＞

添付資料番号		4.2.2.4-1（参考）	4.2.2.4-2（参考）
動物種		SD ラット	ラット
性別（雄/雌）		雄	記載なし
給餌		記載なし	記載なし
溶媒／投与形態		記載なし	水／水溶液
投与方法		静脈内	腹腔内
被験物質／投与量（動物数）		・[acetyl-^{3}H]-Melatonin／ 10 μCi/ラット（n=4） 又は ・[2-^{14}C]-Melatonin／ 1 μCi/ラット（n=2） 又は ・[methoxy-^{14}C]-Melatonin／ 1 μCi/ラット（n=2） 又は ・[acetyl-^{3}H]-Melatonin＋ [2-^{14}C]-Melatonin／ 10＋1 μCi/ラット（n=2）	[^{14}C]メラトニン／ 5 mg/kg（記載なし）
定量（対象）物質		放射能	放射能
核種		^{3}H、^{14}C	^{14}C
定量法		記載なし	記載なし
放射能の累積尿糞中排泄率（%）			
投与後時間		0～48 h	0～24 h
排泄経路	尿	60-70 [a)]	70
	糞	15 [a)]	20
	合計	75-85 [a)]	90

a：標識位置の異なるいずれの標識体を投与した場合でも、放射能の尿糞中排泄率に違いは認められなかった。

2.6.5.12.2 胆汁中排泄

＜添付資料 4.2.2.4-2（参考）＞

動物種	ウサギ
性別（雄/雌）／動物数	雌／n=1
給餌	絶食
溶媒／投与形態	水／水溶液
投与方法	腹腔内又は経口
投与量	7 mg/ウサギ
定量（対象）物質	放射能
核種	^{14}C
定量法	記載なし

累積排泄率（%）				
排泄経路	尿 a)	糞 b)	胆汁 c)	合計
投与後時間：0～1 h	12.4	-	0.5 (4) d)	12.9

a：投与後 1 時間までに排泄された尿及び投与後 1 時間に膀胱から回収した尿のプール
b：測定していない
c：投与後 1 時間に胆嚢から回収した胆汁
d：尿中排泄率に対する割合（%）

2.6.5.13 薬物動態試験：薬物相互作用

2.6.5.13.1 ヒト肝ミクロソームを用いたヒト CYP 及び UGT 分子種に対する阻害作用

＜添付資料 4.2.2.6-1＞

試験系	ヒト肝ミクロソーム：50 例（男性 31 例、女性 19 例）のプール
方　法	・可逆的阻害（Reversible inhibition、RI）の評価： 肝ミクロソーム（0.2 mg protein/mL）に基質及びメラトニンを加え、37 ℃、5 分間予備加温した後、 NADPH 生成系を添加して反応を開始し、37 ℃で所定時間インキュベーションした。 ・時間依存的阻害（Time-dependent inhibition、TDI）の評価： 肝ミクロソーム（0.2 mg protein/mL）にメラトニンを加え、37 ℃、5 分間予備加温した後、NADPH 産生系を添加した。 37 ℃で 30 分間プレインキュベーションした後、基質溶液を添加して反応を開始し、37 ℃で所定時間インキュベーションした。 ・反応液中に生成する代謝物濃度を LC/MS/MS 法にて測定した。

CYP 分子種	代謝反応	ｲﾝｷｭﾍﾞｰｼｮﾝ方法	残存活性（%）[a]					IC_{50}（μmol/L）
			メラトニン（μmol/L）			陽性対照		
			0.005	0.05	0.5	RI [b]	TDI [c]	
CYP1A2	Phenacetin O-deethylation	RI	93.2	95.5	97.2	12.2	82.4	＞0.5
		TDI	98.6	100.7	97.9	-	59.9	＞0.5
CYP2B6	Bupropion hydroxylation	RI	95.7	100.5	102.2	9.7	62.7	＞0.5
		TDI	98.5	100.8	101.5	-	42.0	＞0.5
CYP2C8	Paclitaxel 6α-hydroxylation	RI	100.0	100.0	100.0	10.8	77.4	＞0.5
		TDI	101.6	99.2	100.0	-	21.5	＞0.5
CYP2C9	Diclofenac 4'-hydroxylation	RI	102.3	104.7	102.5	10.4	57.9	＞0.5
		TDI	104.7	108.4	101.4	-	9.9	＞0.5

（次ページへ続く）

（前ページから続く）

CYP 分子種	代謝反応	ｲﾝｷｭﾍﾞｰｼｮﾝ方法	残存活性（%）					IC_{50}（μmol/L）
			メラトニン（μmol/L）			陽性対照		
			0.005	0.05	0.5	RI [b)]	TDI [c)]	
CYP2C19	(S)-Mephenytoin 4'-hydroxylation	RI	98.8	98.2	100.6	29.9	82.2	＞0.5
		TDI	100.6	101.3	100.0	-	42.8	＞0.5
CYP2D6	Bufuralol 1'-hydroxylation	RI	98.6	100.6	99.7	18.0	74.7	＞0.5
		TDI	98.8	101.6	100.0	-	31.0	＞0.5
CYP3A4	Midazolam 1'-hydroxylation	RI	99.2	102.5	102.5	6.2	76.7	＞0.5
		TDI	97.4	97.4	99.1	-	37.8	＞0.5
CYP3A4	Testosterone 6β-hydroxylation	RI	99.0	99.7	97.6	5.5	76.9	＞0.5
		TDI	97.0	98.9	99.3	-	36.9	＞0.5

-：実施していない。
a：残存活性は n=2 の平均値
b：可逆的阻害の陽性対照：
CYP1A2, α-naphthoflavone (0.2 μmol/L); CYP2B6, ticlopidine (1 μmol/L); CYP2C8, montelukast (1 μmol/L);
CYP2C9, sulfaphenazole (5 μmol/L); CYP2C19, tranylcypromine (25 μmol/L); CYP2D6, quinidine (1 μmol/L);
CYP3A4, ketoconazole (0.5 μmol/L)
c：時間依存的阻害の陽性対照：
CYP1A2, furafylline (0.3 μmol/L); CYP2B6, ticlopidine (0.1 μmol/L); CYP2C8, gemfibrozil 1-O-β-glucuronide (10 μmol/L);
CYP2C9, tienilic acid (1 μmol/L); CYP2C19, S-fluoxetine (10 μmol/L); CYP2D6, paroxetine (0.3 μmol/L);
CYP3A4, verapamil (10 μmol/L)

2.6.5.13.1 ヒト肝ミクロソームを用いたヒト CYP 及び UGT 分子種に対する阻害作用（続き）

試験系	ヒト肝ミクロソーム：50 例（男性 31 例、女性 19 例）のプール				
方　法	・肝ミクロソーム（0.2 mg protein/mL）に基質及びメラトニンを加え、37 ℃で所定時間インキュベーションした。 ・反応液中に生成する代謝物濃度を LC/MS/MS 法にて測定した。				
UGT 分子種	代謝反応	残存活性（%）[a)]			IC_{50}（μmol/L）
		メラトニン（μmol/L）			陽性対照（diclofenac）
		0.005	0.05	0.5	
UGT1A1	Estradiol 3β-glucuronidation	111.7	106.8	99.0	＜8.7 [b)]	＞0.5
UGT2B7	3'-Azido-3'-deoxythymidine β-D-glucuronidation	96.9	96.1	100.0	9.3 [c)]	＞0.5

a：残存活性は n=2 の平均値
b：陽性対照（diclofenac）の濃度：500 μmol/L
c：陽性対照（diclofenac）の濃度：200 μmol/L

2.6.5.13.2 薬物代謝酵素に対する誘導作用

＜添付資料 4.2.2.6-2＞

試験系	ヒト凍結肝細胞
方　法	・3 例のドナー（男性 1 例、女性 2 例）由来の肝細胞にメラトニン（0.005、0.05 及び 0.5 μmol/L）及び陽性対照を曝露した（n=2）。 ・CYP1A2、CYP2B6 及び CYP3A4 の mRNA 発現量をリアルタイム PCR 法により測定した（n=3）。 ・各 CYP 分子種の mRNA 測定値は、内部標準遺伝子（GAPDH）の mRNA 量を基準とする相対値として示した。 ・溶媒対照：DMSO ・陽性対照： 50 μmol/L Omeprazole（CYP1A2）、1000 μmol/L Phenobarbital（CYP2B6）、10 μmol/L Rifampicin（CYP3A4）

CYP 分子種	ロット番号	mRNA 測定値					溶媒対照に対する増加率（%）[a]				陽性対照に対する比率（%）[b]		
		溶媒対照	メラトニン（μmol/L）			陽性対照	メラトニン（μmol/L）			陽性対照	メラトニン（μmol/L）		
			0.005	0.05	0.5		0.005	0.05	0.5		0.005	0.05	0.5
CYP1A2	[redacted]	0.00202	0.00233	0.00225	0.00297	1.94	15.3	11.4	47.0	95939.6	0.0	0.0	0.0
	[redacted]	0.0114	0.0155	0.0174	0.0171	1.74	36.0	52.6	50.0	15163.2	0.2	0.3	0.3
	[redacted]	0.00738	0.0102	0.0125	0.0117	1.44	38.2	69.4	58.5	19412.2	0.2	0.4	0.3
CYP2B6	[redacted]	0.0283	0.0276	0.0263	0.0340	0.332	-2.5	-7.1	20.1	1073.1	-0.2	-0.7	1.9
	[redacted]	0.110	0.105	0.128	0.135	1.36	-4.5	16.4	22.7	1136.4	-0.4	1.4	2.0
	[redacted]	0.161	0.176	0.246	0.226	1.74	9.3	52.8	40.4	980.7	0.9	5.4	4.1
CYP3A4	[redacted]	0.0158	0.0211	0.0174	0.0245	0.757	33.5	10.1	55.1	4691.1	0.7	0.2	1.2
	[redacted]	0.0523	0.0633	0.0846	0.0691	0.766	21.0	61.8	32.1	1364.6	1.5	4.5	2.4
	[redacted]	0.0321	0.0431	0.0569	0.0446	0.940	34.3	77.3	38.9	2828.3	1.2	2.7	1.4

a：増加率（%）＝｛A（or C）/B-1｝×100

b：比率（%）＝（A-B）/（C-B）×100

A：メラトニン群の mRNA 測定値（n=2 の平均値）

B：溶媒対照群の mRNA 測定値（n=2 の平均値）

C：陽性対照群の mRNA 測定値（n=2 の平均値）

2.6.5.13.3 薬物トランスポーターに対する阻害作用

＜添付資料 4.2.2.6-3＞

試験系	ヒト P-gp 発現細胞（ABCB1 を含むベクターを導入した LLC-PK1 細胞）及びコントロール細胞（空ベクターを導入した LLC-PK1 細胞）
方　法	・ヒト P-gp 発現細胞及びコントロール細胞をトランスウェルに培養した。 ・被験物質を含む緩衝液を頂端膜側及び基底膜側に加えて約 1 時間プレインキュベーションした。 ・基質及び被験物質を含む緩衝液を一方（頂端膜側又は基底膜側）に加え、被験物質を含む緩衝液を他方に加えて輸送実験を開始した。 ・2 時間後に基質を加えていない側の緩衝液を採取した。 ・放射能濃度を測定し透過係数を算出した。 ・溶媒対照：DMSO、陽性対照：ベラパミル（30 μmol/L）

基質（濃度）	被験物質	濃度（μmol/L）	コントロール細胞			トランスポーター発現細胞			NFR	残存活性（%）	阻害率（%）
			透過係数（×10^{-6} cm/s）[a)]		FR	透過係数（×10^{-6} cm/s）[a)]		FR			
			A to B	B to A		A to B	B to A				
[^{3}H]標識ジゴキシン（0.1 μmol/L）	溶媒対照	−	2.42±0.19	4.33±0.19	1.79	0.702±0.187	14.5±1.1	20.7	11.6	100.0	−
	メラトニン	1	2.43±0.05	3.90±0.14	1.60	0.728±0.187	13.2±1.0	18.1	11.3	97.2	2.8
		3	2.54±0.06	4.10±0.29	1.61	0.685±0.095	13.4±0.4	19.6	12.2	105.7	-5.7
		10	2.53±0.06	4.08±0.12	1.61	0.794±0.091	14.2±0.7	17.9	11.1	95.3	4.7
		30	2.43±0.16	4.06±0.16	1.67	0.907±0.110	13.6±0.3	15.0	8.98	75.3	24.7
		100	2.51±0.12	3.93±0.09	1.57	0.813±0.061	12.8±1.0	15.7	10.0	84.9	15.1
	陽性対照	30	2.98±0.05	3.03±0.21	1.02	2.73±0.08	7.51±0.14	2.75	2.70	16.0	84.0
[^{14}C]標識マンニトール（10 μmol/L）	溶媒対照	−	0.735±0.021	0.882±0.037	−	1.23±0.17	1.12±0.07	−	−	−	−
	メラトニン	100	0.820±0.019	0.807±0.052	−	1.10±0.20	1.13±0.10	−	−	−	−

a：平均値±標準偏差（n=3）
A to B：頂端膜側から基底膜側 へ、B to A：基底膜側から頂端膜側へ
Flux ratio（FR）＝[B to A の透過係数（平均値）]/[A to B の透過係数（平均値）]
Net flux ratio（NFR）＝[トランスポーター発現細胞の FR]/[コントロール細胞の FR]
残存活性（%）＝（[被験物質存在下の NFR]－1）/（[溶媒対照の NFR]－1）×100
阻害率（%）＝100－残存活性（%）

2.6.5.13.3 薬物トランスポーターに対する阻害作用（続き）

＜添付資料 4.2.2.6-3＞

試験系	ヒト BCRP 発現細胞（ABCG2 を含むベクターを導入した MDCK 細胞）及びコントロール細胞（空ベクターを導入した MDCK 細胞）
方　法	・ヒト BCRP 発現細胞をトランスウェルに培養した。 ・被験物質を含む緩衝液を頂端膜側及び基底膜側に加えて約 1 時間プレインキュベーションした。 ・基質及び被験物質を含む緩衝液を一方（頂端膜側又は基底膜側）に加え、被験物質を含む緩衝液を他方に加えて輸送実験を開始した。 ・2 時間後に基質を加えていない側の緩衝液を採取した。 ・放射能濃度を測定し透過係数を算出した。 ・溶媒対照：DMSO、陽性対照：Ko143（0.1 μmol/L）

基質（濃度）	被験物質	濃度（μmol/L）	コントロール細胞			トランスポーター発現細胞			NFR	残存活性（%）	阻害率（%）
			透過係数（×10^{-6} cm/s）[a)]		FR	透過係数（×10^{-6} cm/s）[a)]		FR			
			A to B	B to A		A to B	B to A				
[^{3}H]標識プラゾシン（0.01μmol/L）	溶媒対照	−	15.5±0.1	20.2±0.8	1.30	4.78±0.58	58.5±2.6	12.2	9.38	100.0	−
	メラトニン	1	15.0±1.4	18.2±1.1	1.21	5.11±0.26	50.7±5.3	9.92	8.20	85.9	14.1
		3	15.7±0.9	19.0±0.3	1.21	5.02±0.38	52.3±2.1	10.4	8.60	90.7	9.3
		10	16.7±0.3	19.6±0.9	1.17	5.47±0.08	50.8±1.7	9.29	7.94	82.8	17.2
		30	16.6±0.3	21.7±1.3	1.31	5.56±0.01	53.5±1.4	9.62	7.34	75.7	24.3
		100	14.4±0.9	22.7±1.2	1.58	6.29±0.42	45.6±1.9	7.25	4.59	42.8	57.2
	陽性対照	0.1	16.5±0.5	18.8±1.0	1.14	14.8±0.7	22.8±0.9	1.54	1.35	4.2	95.8
[^{14}C]標識マンニトール（10 μmol/L）	溶媒対照	−	<0.177±NC	<0.0589±NC	−	<0.177±NC	<0.0589±NC	−	−	−	−
	メラトニン	100	<0.177±NC	<0.0589±NC	−	<0.177±NC	<0.0589±NC	−	−	−	−

a：平均値±標準偏差（n=3）
A to B：頂端膜側から基底膜側 へ、B to A：基底膜側から頂端膜側へ
Flux ratio（FR）＝[B to A の透過係数（平均値）]/[A to B の透過係数（平均値）]
Net flux ratio（NFR）＝[トランスポーター発現細胞の FR]/[コントロール細胞の FR]
残存活性（%）＝（[被験物質存在下の NFR]－1）/（[溶媒対照の NFR]－1）×100
阻害率（%）＝100－残存活性（%）
NC：計算していない

2.6.5.13.3 薬物トランスポーターに対する阻害作用（続き）

＜添付資料 4.2.2.6-3＞

試験系	ヒト OATP1B1 発現細胞（SLCO1B1 を含むベクターを導入した HEK293 細胞）及びコントロール細胞（空ベクターを導入した HEK293 細胞）
方　法	・ヒト OATP1B1 発現細胞及びコントロール細胞をウェルプレートに培養し、被験物質を含む緩衝液でプレインキュベーションした。 ・基質及び被験物質を含む緩衝液と置換し、インキュベーション（2 分間）した後に細胞を回収した。 ・回収した細胞の放射能とタンパク量を測定し、取込み量（pmol/mg protein）を算出した。 ・基質：[^{3}H]標識エストラジオール 17β-D-グルクロナイド（[^{3}H]E17G、0.05 μmol/L） ・溶媒対照：DMSO、陽性対照：リファンピシン（10 μmol/L）

基質（濃度）	被験物質	濃度	取込み量（pmol/mg protein）			残存活性（%）	阻害率（%）	UR
			OATP1B1 発現細胞 a)	コントロール細胞 a)	OATP1B1 依存的取込み			
[^{3}H]E17G（0.05 μmol/L）	溶媒対照	−	2.73 ± 0.03	0.0330 ± 0.0010	2.70	100.0	−	82.7
	メラトニン	3 nmol/L	2.91 ± 0.12	0.0343 ± 0.0015	2.88	106.7	-6.7	−
		10 nmol/L	2.53 ± 0.10	0.0364 ± 0.0047	2.49	92.2	7.8	−
		30 nmol/L	3.24 ± 0.08	0.0342 ± 0.0024	3.21	118.9	-18.9	−
		100 nmol/L	2.64 ± 0.06	0.0342 ± 0.0073	2.61	96.7	3.3	−
		300 nmol/L	2.69 ± 0.08	0.0459 ± 0.0177	2.64	97.8	2.2	−
	陽性対照	10 μmol/L	0.264 ± 0.010	0.0284 ± 0.0015	0.236	8.7	91.3	−

a：平均値±標準偏差（n=3）
OATP1B1 依存的取込み量＝[OATP1B1 発現細胞の取込み量（平均値）]－[コントロール細胞の取込み量（平均値）]
残存活性（%）＝[メラトニン又は溶媒対照の OATP1B1 依存的取込み量（平均値）]/[溶媒対照の OATP1B1 依存的取込み量（平均値）]×100
阻害率（%）＝100－[残存活性（%）]
UR＝[OATP1B1 発現細胞の取込み量（平均値）]/[コントロール細胞の取込み量（平均値）]（細胞の機能評価として溶媒対照についてのみ算出）

2.6.5.13.3 薬物トランスポーターに対する阻害作用（続き）

＜添付資料 4.2.2.6-3＞

試験系	ヒト OATP1B3 発現細胞（SLCO1B3 を含むベクターを導入した HEK293 細胞）及びコントロール細胞（空ベクターを導入した HEK293 細胞）
方　法	・ヒト OATP1B3 発現細胞及びコントロール細胞をウェルプレートに培養し、被験物質を含む緩衝液でプレインキュベーションした。 ・基質及び被験物質を含む緩衝液と置換し、インキュベーション（2 分間）した後に細胞を回収した。 ・回収した細胞の放射能とタンパク量を測定し、取込み量（pmol/mg protein）を算出した。 ・基質：[^{3}H]標識エストラジオール 17β-D-グルクロナイド（[^{3}H]E17G、0.05 μmol/L） ・溶媒対照：DMSO、陽性対照：リファンピシン（10 μmol/L）

基質（濃度）	被験物質	濃度	取込み量（pmol/mg protein）			残存活性（%）	阻害率（%）	UR
			OATP1B3 発現細胞 a)	コントロール細胞 a)	OATP1B3 依存的取込み			
[^{3}H]E17G（0.05 μmol/L）	溶媒対照	−	1.14 ± 0.11	0.0330 ± 0.0010	1.11	100.0	−	34.5
	メラトニン	3 nmol/L	1.09 ± 0.07	0.0343 ± 0.0015	1.06	95.5	4.5	−
		10 nmol/L	1.02 ± 0.04	0.0364 ± 0.0047	0.984	88.6	11.4	−
		30 nmol/L	1.04 ± 0.01	0.0342 ± 0.0024	1.01	91.0	9.0	−
		100 nmol/L	0.873 ± 0.109	0.0342 ± 0.0073	0.839	75.6	24.4	−
		300 nmol/L	0.968 ± 0.144	0.0459 ± 0.0177	0.922	83.1	16.9	−
	陽性対照	10 μmol/L	0.0755 ± 0.0025	0.0284 ± 0.0015	0.0471	4.2	95.8	−

a：平均値±標準偏差（n=3）
OATP1B3 依存的取込み量＝[OATP1B3 発現細胞の取込み量（平均値）]−[コントロール細胞の取込み量（平均値）]
残存活性（%）＝[メラトニン又は溶媒対照の OATP1B3 依存的取込み量（平均値）]/[溶媒対照の OATP1B3 依存的取込み量（平均値）]×100
阻害率（%）＝100−[残存活性（%）]
UR＝[OATP1B3 発現細胞の取込み量（平均値）]/[コントロール細胞の取込み量（平均値）]（細胞の機能評価として溶媒対照についてのみ算出）

2.6.5.13.3 薬物トランスポーターに対する阻害作用（続き）

＜添付資料 4.2.2.6-3＞

試験系	ヒト OAT1 発現細胞（SLC22A6 を含むベクターを導入した HEK293 細胞）及びコントロール細胞（空ベクターを導入した HEK293 細胞）
方　法	・ヒト OAT1 発現細胞及びコントロール細胞をウェルプレートに培養し、被験物質を含む緩衝液でプレインキュベーションした。 ・基質及び被験物質を含む緩衝液と置換し、インキュベーション（2 分間）した後に細胞を回収した。 ・回収した細胞の放射能とタンパク量を測定し、取込み量（pmol/mg protein）を算出した。 ・基質：[^{3}H]標識パラアミノ馬尿酸（[^{3}H]PAH、1 μmol/L） ・溶媒対照：DMSO、陽性対照：プロベネシド（100 μmol/L）

基質（濃度）	被験物質	濃度	取込み量（pmol/mg protein）			残存活性（%）	阻害率（%）	UR
			OAT1 発現細胞 a)	コントロール細胞 a)	OAT1 依存的取込み			
[^{3}H]PAH（1 μmol/L）	溶媒対照	-	40.4 ± 3.2	0.159 ± 0.002	40.2	100.0	-	254
	メラトニン	3 nmol/L	45.2 ± 1.5	0.164 ± 0.017	45.0	111.9	-11.9	-
		10 nmol/L	54.2 ± 3.3	0.172 ± 0.035	54.0	134.3	-34.3	-
		30 nmol/L	55.0 ± 2.9	0.200 ± 0.021	54.8	136.3	-36.3	-
		100 nmol/L	38.7 ± 1.0	0.150 ± 0.010	38.6	96.0	4.0	-
		300 nmol/L	42.2 ± 3.1	0.166 ± 0.015	42.0	104.5	-4.5	-
	陽性対照	100 μmol/L	4.37 ± 0.17	0.170 ± 0.010	4.20	10.4	89.6	-

a：平均値±標準偏差（n=3）
OAT1 依存的取込み量＝[OAT1 発現細胞の取込み量（平均値）]－[コントロール細胞の取込み量（平均値）]
残存活性（%）＝[メラトニン又は溶媒対照の OAT1 依存的取込み量（平均値）] /[溶媒対照の OAT1 依存的取込み量（平均値）]×100
阻害率（%）＝100－[残存活性（%）]
UR＝[OAT1 発現細胞の取込み量（平均値）]/［コントロール細胞の取込み量（平均値）］（細胞の機能評価として溶媒対照についてのみ算出）

2.6.5.13.3 薬物トランスポーターに対する阻害作用（続き）

＜添付資料 4.2.2.6-3＞

試験系	ヒト OAT3 発現細胞（SLC22A8 を含むベクターを導入した HEK293 細胞）及びコントロール細胞（空ベクターを導入した HEK293 細胞）
方　法	・ヒト OAT3 発現細胞及びコントロール細胞をウェルプレートに培養し、被験物質を含む緩衝液でプレインキュベーションした。 ・基質及び被験物質を含む緩衝液と置換し、インキュベーション（2 分間）した後に細胞を回収した。 ・回収した細胞の放射能とタンパク量を測定し、取込み量（pmol/mg protein）を算出した。 ・基質：[^{3}H]標識エストロン硫酸（[^{3}H]ES-3、0.01 μmol/L） ・溶媒対照：DMSO、陽性対照：プロベネシド（100 μmol/L）

基質（濃度）	被験物質	濃度	取込み量（pmol/mg protein）			残存活性（%）	阻害率（%）	UR
			OAT3 発現細胞 a)	コントロール細胞 a)	OAT3 依存的取込み			
[^{3}H]ES-3（0.01 μmol/L）	溶媒対照	−	0.390 ± 0.008	0.00634 ± 0.00033	0.384	100.0	−	61.5
	メラトニン	3 nmol/L	0.282 ± 0.008	0.00684 ± 0.00057	0.275	71.6	28.4	−
		10 nmol/L	0.288 ± 0.016	0.00580 ± 0.00078	0.282	73.4	26.6	−
		30 nmol/L	0.314 ± 0.008	0.00731 ± 0.00146	0.307	79.9	20.1	−
		100 nmol/L	0.291 ± 0.013	0.00645 ± 0.00020	0.285	74.2	25.8	−
		300 nmol/L	0.218 ± 0.010	0.00602 ± 0.00100	0.212	55.2	44.8	−
	陽性対照	100 μmol/L	0.0339 ± 0.0082	0.00636 ± 0.00027	0.0275	7.2	92.8	−

a：平均値±標準偏差（n=3）
OAT3 依存的取込み量＝[OAT3 発現細胞の取込み量（平均値）]−[コントロール細胞の取込み量（平均値）]
残存活性（%）＝[メラトニン又は溶媒対照の OAT3 依存的取込み量（平均値）] /[溶媒対照の OAT3 依存的取込み量（平均値）]×100
阻害率（%）＝100−[残存活性（%）]
UR＝[OAT3 発現細胞の取込み量（平均値）]/［コントロール細胞の取込み量（平均値）］（細胞の機能評価として溶媒対照についてのみ算出）

2.6.5.13.3 薬物トランスポーターに対する阻害作用（続き）

＜添付資料 4.2.2.6-3＞

試験系	ヒト OCT2 発現細胞（SLC22A2 を含むベクターを導入した HEK293 細胞）及びコントロール細胞（空ベクターを導入した HEK293 細胞）
方　法	・ヒト OCT2 発現細胞及びコントロール細胞をウェルプレートに培養し、被験物質を含む緩衝液でプレインキュベーションした。 ・基質及び被験物質を含む緩衝液と置換し、インキュベーション（2 分間）した後に細胞を回収した。 ・回収した細胞の放射能とタンパク量を測定し、取込み量（pmol/mg protein）を算出した。 ・基質：[^{14}C]標識メトホルミン（5 μmol/L） ・溶媒対照：DMSO、陽性対照：キニジン（300 μmol/L）

基質（濃度）	被験物質	濃度	取込み量（pmol/mg protein）			残存活性（%）	阻害率（%）	UR
			OCT2 発現細胞 a)	コントロール細胞 a)	OCT2 依存的取込み			
[^{14}C]標識メトホルミン（5 μmol/L）	溶媒対照	-	129 ± 7	5.08 ± 0.38	124	100.0	-	25.4
	メラトニン	3 nmol/L	128 ± 4	4.76 ± 0.46	123	99.2	0.8	-
		10 nmol/L	149 ± 4	4.62 ± 0.20	144	116.1	-16.1	-
		30 nmol/L	170 ± 8	3.62 ± 0.84	166	133.9	-33.9	-
		100 nmol/L	153 ± 16	2.83 ± 0.04	150	121.0	-21.0	-
		300 nmol/L	169 ± 37	3.33 ± 0.08	166	133.9	-33.9	-
	陽性対照	300 μmol/L	8.25 ± 0.60	0.828 ± 0.076	7.42	6.0	94.0	-

a：平均値±標準偏差（n=3）
OCT2 依存的取込み量＝[OCT2 発現細胞の取込み量（平均値）]－[コントロール細胞の取込み量（平均値）]
残存活性（%）＝[メラトニン又は溶媒対照の OCT2 依存的取込み量（平均値）] /[溶媒対照の OCT2 依存的取込み量（平均値）]×100
阻害率（%）＝100－[残存活性（%）]
UR＝[OCT2 発現細胞の取込み量（平均値）]/［コントロール細胞の取込み量（平均値）］（細胞の機能評価として溶媒対照についてのみ算出）

2.6.5.13.3 薬物トランスポーターに対する阻害作用（続き）

＜添付資料 4.2.2.6-3＞

試験系	ヒト MATE1 発現細胞（SLC47A1 を含むベクターを導入した HEK293 細胞）及びコントロール細胞（空ベクターを導入した HEK293 細胞）
方　法	・ヒト MATE1 発現細胞及びコントロール細胞をウェルプレートに培養し、被験物質を含む緩衝液でプレインキュベーションした。 ・基質及び被験物質を含む緩衝液と置換し、インキュベーション（5 分間）した後に細胞を回収した。 ・回収した細胞の放射能とタンパク量を測定し、取込み量（pmol/mg protein）を算出した。 ・基質：[^{14}C]標識メトホルミン（20 μmol/L） ・溶媒対照：DMSO、陽性対照：ピリメタミン（1 μmol/L）

基質（濃度）	被験物質	濃度	取込み量（pmol/mg protein）			残存活性（%）	阻害率（%）	UR
			MATE1 発現細胞 a)	コントロール細胞 a)	MATE1 依存的取込み			
[^{14}C]標識メトホルミン（20 μmol/L）	溶媒対照	-	325 ± 11	26.3 ± 1.2	299	100.0	-	12.4
	メラトニン	3 nmol/L	314 ± 8	25.2 ± 1.3	289	96.7	3.3	-
		10 nmol/L	336 ± 4	27.2 ± 1.2	309	103.3	-3.3	-
		30 nmol/L	282 ± 9	17.4 ± 2.1	265	88.6	11.4	-
		100 nmol/L	336 ± 40	24.4 ± 1.7	312	104.3	-4.3	-
		300 nmol/L	379 ± 4	25.6 ± 2.5	353	118.1	-18.1	-
	陽性対照	1 μmol/L	25.1 ± 2.0	7.29 ± 0.42	17.8	6.0	94.0	-

a：平均値±標準偏差（n=3）
MATE1 依存的取込み量＝[MATE1 発現細胞の取込み量（平均値）]－[コントロール細胞の取込み量（平均値）]
残存活性（%）＝[メラトニン又は溶媒対照の MATE1 依存的取込み量（平均値）] /[溶媒対照の MATE1 依存的取込み量（平均値）]×100
阻害率（%）＝100－[残存活性（%）]
UR＝[MATE1 発現細胞の取込み量（平均値）]/［コントロール細胞の取込み量（平均値）］（細胞の機能評価として溶媒対照についてのみ算出）

2.6.5.13.3 薬物トランスポーターに対する阻害作用（続き）

＜添付資料 4.2.2.6-3＞

試験系	ヒト MATE2-K 発現細胞（SLC47A2 を含むベクターを導入した HEK293 細胞）及びコントロール細胞（空ベクターを導入した HEK293 細胞）
方　法	・ヒト MATE2-K 発現細胞及びコントロール細胞をウェルプレートに培養し、被験物質を含む緩衝液でプレインキュベーションした。 ・基質及び被験物質を含む緩衝液と置換し、インキュベーション（2 分間）した後に細胞を回収した。 ・回収した細胞の放射能とタンパク量を測定し、取込み量（pmol/mg protein）を算出した。 ・基質：[^{14}C]標識メトホルミン（5 μmol/L） ・溶媒対照：DMSO、陽性対照：ピリメタミン（1 μmol/L）

基質（濃度）	被験物質	濃度	取込み量（pmol/mg protein）			残存活性（%）	阻害率（%）	UR
			MATE2-K 発現細胞 a)	コントロール細胞 a)	MATE2-K 依存的取込み			
[^{14}C]標識メトホルミン（5 μmol/L）	溶媒対照	-	46.0 ± 1.0	3.70 ± 0.18	42.3	100.0	-	12.4
	メラトニン	3 nmol/L	53.3 ± 4.7	3.66 ± 0.11	49.6	117.3	-17.3	-
		10 nmol/L	63.4 ± 1.4	2.72 ± 0.34	60.7	143.5	-43.5	-
		30 nmol/L	60.1 ± 2.5	3.69 ± 0.31	56.4	133.3	-33.3	-
		100 nmol/L	41.0 ± 1.0	3.11 ± 0.23	37.9	89.6	10.4	-
		300 nmol/L	44.0 ± 3.1	3.89 ± 0.34	40.1	94.8	5.2	-
	陽性対照	1 μmol/L	8.51 ± 0.46	1.21 ± 0.35	7.30	17.3	82.7	-

a：平均値±標準偏差（n=3）
MATE2-K 依存的取込み量＝[MATE2-K 発現細胞の取込み量（平均値）]－[コントロール細胞の取込み量（平均値）]
残存活性（%）＝[メラトニン又は溶媒対照の MATE2-K 依存的取込み量（平均値）]/[溶媒対照の MATE2-K 依存的取込み量（平均値）]×100
阻害率（%）＝100－[残存活性（%）]
UR＝[MATE2-K 発現細胞の取込み量（平均値）]/[コントロール細胞の取込み量（平均値）]（細胞の機能評価として溶媒対照についてのみ算出）

2.6.5.13.4 薬物トランスポーターによる輸送評価

＜添付資料 4.2.2.6-3＞

試験系	ヒト P-gp 発現細胞（ABCB1 を含むベクターを導入した LLC-PK1 細胞）及びコントロール細胞（空ベクターを導入した LLC-PK1 細胞）
方法	・ヒト P-gp 発現細胞をトランスウェルに培養し、被験物質（基質）を含む緩衝液を頂端膜側又は基底膜側の一方に加えた。 ・インキュベーション後、反対側の緩衝液を回収し、放射能濃度を測定して透過係数を算出した。 ・溶媒対照：DMSO、阻害剤：ベラパミル（30 μmol/L）

被験物質（基質）	濃度（μmol/L）	阻害剤	コントロール細胞			ヒト P-gp 発現細胞			NFR	残存活性（%）	阻害率（%）
			透過係数（×10^{-6} cm/s）[a)]		FR	透過係数（×10^{-6} cm/s）[a)]		FR			
			A to B	B to A		A to B	B to A				
[^{14}C]標識メラトニン	3	溶媒対照	33.8±0.2	32.1±0.5	0.950	33.5±0.8	38.4±0.6	1.15	1.21	100.0	-
		ベラパミル	33.6±0.3	35.0±1.5	1.04	34.9±0.3	38.9±2.4	1.11	1.07	33.3	66.7
	10	溶媒対照	32.5±0.6	33.1±0.2	1.02	32.9±0.6	36.8±2.1	1.12	1.10	-	-
[^{3}H]標識ジゴキシン	0.1	溶媒対照	1.88±0.20	5.16±0.43	2.74	0.395±0.018	13.6±1.0	34.4	12.6	100.0	-
		ベラパミル	2.86±0.07	3.41±0.05	1.19	2.63±0.06	6.84±0.31	2.60	2.18	10.2	89.8
[^{14}C]標識マンニトール	10	溶媒対照	1.30±0.05	1.13±0.05	-	1.13±0.09	1.38±0.03	-	-	-	-

a：平均値±標準偏差（n=3）
A to B：頂端膜側から基底膜側 へ
B to A：基底膜側から頂端膜側へ
Flux ratio（FR）＝[B to A の透過係数（平均値）]/[A to B の透過係数（平均値）]
Net flux ratio（NFR）＝[ヒト P-gp 発現細胞の FR]/[コントロール細胞の FR]
残存活性（%）＝（[阻害剤存在下の NFR]－1）/（[溶媒対照の NFR]－1）×100
阻害率（%）＝100－[残存活性（%）]

2.6.5.13.4 薬物トランスポーターによる輸送評価（続き）

＜添付資料 4.2.2.6-3＞

試験系	ヒト BCRP 発現細胞（ABCG2 を含むベクターを導入した MDCK 細胞）及びコントロール細胞（空ベクターを導入した MDCK 細胞）
方法	・ヒト BCRP 発現細胞をトランスウェルに培養し、被験物質（基質）を含む緩衝液を頂端膜側又は基底膜側の一方に加えた。 ・インキュベーション後、反対側の緩衝液を回収し、放射能濃度を測定して透過係数を算出した。 ・溶媒対照：DMSO、陽性対照：Ko143（0.1 μmol/L）

被験物質（基質）	濃度（μmol/L）	阻害剤	コントロール細胞			ヒト BCRP 発現細胞			NFR	残存活性（%）	阻害率（%）
			透過係数（$\times 10^{-6}$ cm/s）[a)]		FR	透過係数（$\times 10^{-6}$ cm/s）[a)]		FR			
			A to B	B to A		A to B	B to A				
[^{14}C]標識メラトニン	3	溶媒対照	23.3±0.5	22.6±2.0	0.970	24.4±1.0	36.2±3.1	1.48	1.53	100.0	-
		Ko143	22.7±0.7	22.0±1.1	0.969	27.9±0.7	25.5±1.8	0.914	0.943	-10.8	110.8
	10	溶媒対照	23.6±1.3	22.2±0.1	0.941	26.3±3.1	32.9±2.1	1.25	1.33	-	-
[^{3}H]標識プラゾシン	0.01	溶媒対照	21.5±1.0	20.8±0.7	0.967	5.31±0.01	55.7±1.0	10.5	10.9	100.0	-
		Ko143	19.8±2.1	20.4±1.4	1.03	19.2±3.6	22.6±2.1	1.18	1.15	1.5	98.5
[^{14}C]標識マンニトール	10	溶媒対照	0.309±0.073	0.131±0.039	-	0.244±0.057	0.126±0.044	-	-	-	-

a：平均値±標準偏差（n=3）
A to B：頂端膜側から基底膜側 へ
B to A：基底膜側から頂端膜側へ
Flux ratio（FR）＝[B to A の透過係数（平均値）]/[A to B の透過係数（平均値）]
Net flux ratio（NFR）＝[ヒト BCRP 発現細胞の FR]/[コントロール細胞の FR]
残存活性（%）＝（[阻害剤存在下の NFR]－1）/（[溶媒対照の NFR]－1）×100
阻害率（%）＝100－[残存活性（%）]

2.6.5.13.4 薬物トランスポーターによる輸送評価（続き）

＜添付資料 4.2.2.6-3＞

試験系	ヒト OATP1B1 発現細胞（SLCO1B1 を含むベクターを導入した HEK293 細胞）及びコントロール細胞（空ベクターを導入した HEK293 細胞）
方法	・ヒト OATP1B1 発現細胞及びコントロール細胞を培養し、被験物質（基質）を加えた緩衝液でインキュベーションの後、細胞を回収した。 ・回収した細胞の放射能とタンパク量を測定し、取込み量（pmol/mg protein）を算出した。 ・溶媒対照：DMSO、陽性対照：リファンピシン（10 μmol/L）

被験物質（基質）	濃度（μmol/L）	阻害剤	反応時間（min）	取込み量（pmol/mg protein）			残存活性（%）	阻害率（%）	UR
				OATP1B1 発現細胞 a)	コントロール細胞 a)	OATP1B1 依存的取込み			
[14C]標識メラトニン	7.5	溶媒対照	1	12.2 ± 1.0	10.0 ± 0.8	2.20	100.0	−	1.22
			2	10.7 ± 0.3	12.5 ± 1.0	0 b)	100.0	−	0.856
			5	9.08 ± 0.17	9.10 ± 0.65	0 b)	100.0	−	1.00
			10	8.38 ± 0.56	5.95 ± 0.22	2.43	100.0	−	1.41
		リファンピシン	1	7.64 ± 0.13	7.10 ± 0.32	0.540	24.5	75.5	−
			2	8.30 ± 0.69	9.28 ± 1.23	0 b)	NC	NC	−
			5	7.31 ± 0.18	7.44 ± 0.63	0 b)	NC	NC	−
			10	8.78 ± 1.10	8.84 ± 0.78	0 b)	0.0	100.0	−
	15	溶媒対照	1	21.3 ± 1.9	16.6 ± 1.3	4.70	−	−	1.28
			2	20.5 ± 1.9	24.7 ± 0.8	0 b)	−	−	0.830
			5	18.1 ± 1.6	18.1 ± 0.3	0 b)	−	−	1.00
			10	22.0 ± 0.7	18.0 ± 0.9	4.00	−	−	1.22
[3H]標識 E17G c)	0.05	溶媒対照	2	3.71 ± 0.06	0.0352 ± 0.0024	3.67	100.0	−	105
		リファンピシン	2	0.228 ± 0.006	0.0376 ± 0.0014	0.190	5.2	94.8	−

a：平均値±標準偏差（n=3）、b：マイナスになる場合は 0 と表示した、c：エストラジオール 17β-D-グルクロナイド
OATP1B1 依存的取込み量＝[OATP1B1 発現細胞の取込み量（平均値）]－[コントロール細胞の取込み量（平均値）]
残存活性（%）＝[メラトニン又は陽性対照の OATP1B1 依存的取込み量（平均値）]/[溶媒対照の OATP1B1 依存的取込み量（平均値）]×100
阻害率（%）＝100－[残存活性（%）]
UR＝[OATP1B1 発現細胞の取込み量（平均値）]/[コントロール細胞の取込み量（平均値）]（細胞の機能評価として溶媒対照についてのみ算出）

2.6.5.13.4 薬物トランスポーターによる輸送評価（続き）

＜添付資料 4.2.2.6-3＞

試験系	ヒト OATP1B3 発現細胞（SLCO1B3 を含むベクターを導入した HEK293 細胞）及びコントロール細胞（空ベクターを導入した HEK293 細胞）
方法	・ヒト OATP1B3 発現細胞及びコントロール細胞を培養し、被験物質（基質）を加えた緩衝液でインキュベーションの後、細胞を回収した。 ・回収した細胞の放射能とタンパク量を測定し、取込み量（pmol/mg protein）を算出した。 ・溶媒対照：DMSO、陽性対照：リファンピシン（10 μmol/L）

被験物質（基質）	濃度（μmol/L）	阻害剤	反応時間（min）	取込み量（pmol/mg protein）			残存活性（%）	阻害率（%）	UR
				OATP1B3 発現細胞 a)	コントロール細胞 a)	OATP1B3 依存的取込み			
[14C]標識メラトニン	7.5	溶媒対照	1	22.4 ± 0.6	10.0 ± 0.8	12.4	100.0	-	2.24
			2	25.2 ± 1.5	12.5 ± 1.0	12.7	100.0	-	2.02
			5	7.70 ± 0.59	9.10 ± 0.65	0 b)	100.0	-	0.846
			10	29.7 ± 0.8	5.95 ± 0.22	23.8	100.0	-	4.99
		リファンピシン	1	24.8 ± 2.0	7.10 ± 0.32	17.7	142.7	-42.7	-
			2	19.7 ± 0.7	9.28 ± 1.23	10.4	81.9	18.1	-
			5	8.87 ± 1.05	7.44 ± 0.63	1.43	NC	NC	-
			10	11.1 ± 1.5	8.84 ± 0.78	2.26	9.5	90.5	-
	15	溶媒対照	1	27.8 ± 2.7	16.6 ± 1.3	11.2	-	-	1.67
			2	55.5 ± 3.6	24.7 ± 0.8	30.8	-	-	2.25
			5	34.6 ± 6.1	18.1 ± 0.3	16.5	-	-	1.91
			10	37.8 ± 3.7	18.0 ± 0.9	19.8	-	-	2.10
[3H]標識 E17G c)	0.05	溶媒対照	2	1.04 ± 0.04	0.0352 ± 0.0024	1.00	100.0	-	29.5
		リファンピシン	2	0.0663 ± 0.0035	0.0376 ± 0.0014	0.0287	2.9	97.1	-

a：平均値±標準偏差（n=3）、b：マイナスになる場合は 0 と表示した、c：エストラジオール 17β-D-グルクロナイド
OATP1B3 依存的取込み量＝[OATP1B3 発現細胞の取込み量（平均値）]－[コントロール細胞の取込み量（平均値）]
残存活性（%）＝[メラトニン又は陽性対照の OATP1B1 依存的取込み量（平均値）]/[溶媒対照の OATP1B1 依存的取込み量（平均値）]×100
阻害率（%）＝100－[残存活性（%）]
UR＝[OATP1B1 発現細胞の取込み量（平均値）]/[コントロール細胞の取込み量（平均値）]（細胞の機能評価として溶媒対照についてのみ算出）

2.6.5.14 薬物動態試験：その他

該当する試験を実施していない。