

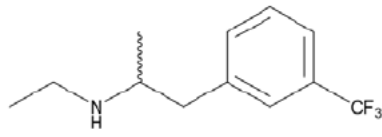
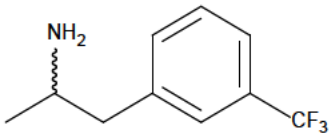
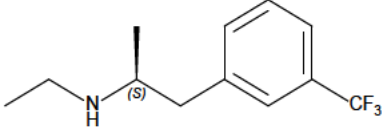
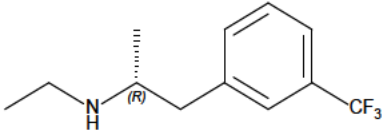
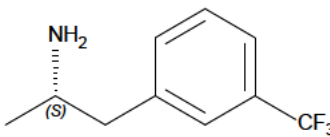
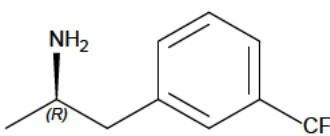
目次

2.6.1 緒言.....	4
2.6.1.1 参考文献	5

図目次

図 2.6.1-1 フェンフルラミン塩酸塩の構造	4
--------------------------------	---

関連化合物の一覧

General name	IUPAC name	Chemical structure	Origin
Fenfluramine: (±)-fenfluramine	(R,S)-N-Ethyl-1-[3-(trifluoromethyl)phenyl]propan-2-amine		Active ingredient
Norfenfluramine: (±)-norfenfluramine	1-[3-(Trifluoromethyl)phenyl]propan-2-amine		Active metabolite
Dexfenfluramine: d-fenfluramine	(S)-N-Ethyl-1-[3-(trifluoromethyl)phenyl]propan-2-amine		d-enantiomer of fenfluramine
Levofenfluramine: l-fenfluramine	(R)-N-Ethyl-1-[3-(trifluoromethyl)phenyl]propan-2-amine		l-enantiomer of fenfluramine
Nordexfenfluramine: d-norfenfluramine	(S)-1-[3-(Trifluoromethyl)phenyl]propan-2-amine		d-enantiomer of norfenfluramine
Norlevofenfluramine: l-norfenfluramine	(R)-1-[3-(Trifluoromethyl)-phenyl]propan-2-amine		l-enantiomer of norfenfluramine

略語・略号一覧

略語・略号	略していない表現（英語）	略していない表現（日本語）
CAS	Chemical Abstracts Service	化学情報検索サービス
CNS	central nervous system	中枢神経系
CYP	cytochrome P450	シトクロム P450
dex	dextrorotatory	右旋性
levo	levorotatory	左旋性
PMDA	Pharmaceuticals and Medical Devices Agency	医薬品医療機器総合機構
Redux [®]	dexfenfluramine (single enantiomer (+)-fenfluramine) approved in US	米国で承認された dexfenfluramine（フェンフルラミンの S-エナンチオマー）
SBA	Summary Basis of Approval (US)	米国新医薬品承認審査概要
t _{1/2}	terminal half life	終末相半減期
T _{max}	time to maximum (plasma) concentration	最高（血漿中）濃度到達時間
ZX008	fenfluramine hydrochloride oral solution	フェンフルラミン塩酸塩経口液剤

2.6.1.1 参考文献

Baumann MH, Bulling S, Benaderet TS, Saha K, Ayestas MA, Partilla JS, et al. Evidence for a role of transporter-mediated currents in the depletion of brain serotonin induced by serotonin transporter substrates. *Neuropsychopharmacology*. 2014;39(6):1355-1365.

Bever KA, Perry PJ. Dexfenfluramine hydrochloride: An anorexic agent. *Am J Health Syst Pharm*. 1997;54(18):2059-2072.

Marchant NC, Breen MA, Wallace D, et al. Comparative biodisposition and metabolism of ^{14}C -(±)-fenfluramine in mouse, rat, dog and man. *Xenobiotica*. 1992;22(11):1251-1266.

Pondimin® NDA 16-618: US FDA. SBA 153329A. 1970.

Redux® NDA 20-344: US FDA. SBA 144590A. 1996.

目次

2.6.2 薬理試験の概要文.....	7
2.6.2.1 まとめ	7
2.6.2.2 効力を裏付ける試験.....	11
2.6.2.2.1 <i>In vitro</i> 試験.....	12
2.6.2.2.1.1 受容体結合特性試験	12
2.6.2.2.1.2 Dexfenfluramine、levofenfluramine、nordexfenfluramine 及び norlevofenfluramine の受容体結合活性	16
2.6.2.2.1.3 受容体におけるフェンフルラミン及び norfenfluramine の機能活性.....	17
2.6.2.2.1.4 シグマ-1 受容体に対するフェンフルラミンの作用	19
2.6.2.2.1.5 <i>In vitro</i> BiP アッセイにおけるフェンフルラミンの正のモジュレーターとしての作用	20
2.6.2.2.1.6 ナトリウムチャネル電流 (IonChannelProfiler™) データの報告.....	22
2.6.2.2.2 <i>Ex vivo</i> 試験.....	22
2.6.2.2.2.1 てんかん様活動に対する作用	22
2.6.2.2.3 <i>In vivo</i> 試験.....	23
2.6.2.2.3.1 ゼブラフィッシュモデルに対する作用	23
2.6.2.2.3.2 マウス発作モデルに対する作用	28
2.6.2.2.3.3 ラット発作モデルに対する作用	29
2.6.2.2.3.4 発作モデルにおけるシグマ-1 受容体の作用	30
2.6.2.2.4 効力を裏付ける試験の結論.....	32
2.6.2.3 副次的薬理試験	33
2.6.2.3.1 プロラクチン及びコルチコステロン分泌に対する作用	33
2.6.2.4 安全性薬理試験	34
2.6.2.4.1 中枢及び末梢神経系.....	35
2.6.2.4.2 心血管系	36
2.6.2.4.3 呼吸器系	38
2.6.2.4.4 消化管及び泌尿生殖器系.....	38
2.6.2.5 薬力学的薬物相互作用試験.....	38
2.6.2.6 考察及び結論	40
2.6.2.7 図表	41
2.6.2.8 参考文献	42

表目次

表 2.6.2-1 放射性リガンドの受容体結合に対するフェンフルラミン及び norfenfluramine の阻害効果 ([XS-0691]試験)	13
---	----

表 2.6.2-2 (±)-フェンフルラミン及び(±)-norfenfluramine の受容体結合に対する K_i 値 ([XS-0691]試験)	16
表 2.6.2-3 Dexfenfluramine、levofenfluramine、nordexfenfluramine 及び norlevofenfluramine の受容体結合能の比較 ([XS-0715]試験)	17
表 2.6.2-4 脳組織中のフェンフルラミン濃度の計算値 ([100026029]試験)	18
表 2.6.2-5 動物モデルにおける発作との対応	30
表 2.6.2-6 発作及びてんかん発症におけるシグマ-1 受容体の役割とシグマ-1 受容体に対するフェンフルラミンの作用.....	32
表 2.6.2-7 フェンフルラミンによるプロラクチン及びコルチコステロン分泌に対するインダルピン前投与の効果 (平均値±標準誤差)	34

図目次

図 2.6.2-1 30 分間の培地培養後における BiP-シグマ 1 受容体複合体会合に対するフェンフルラミンの効果 ([AM354]試験)	19
図 2.6.2-2 PRE-084 誘発性の BiP-シグマ-1 受容体複合体の解離に対するフェンフルラミンの効果 (AM335 試験)	21
図 2.6.2-3a <i>scn1Lab-/-</i> 遺伝子変異を有するゼブラフィッシュ幼生においてシグマ-1 受容体の正のモジュレーターとしての作用 SOMCL-668 は自発運動の亢進を抑制した ...	26

関連化合物の一覧

General name	IUPAC name	Chemical structure	Origin
Fenfluramine: (±)-fenfluramine	(R,S)-N-Ethyl-1-[3-(trifluoromethyl)phenyl]propan-2-amine		Active ingredient
Norfenfluramine: (±)-norfenfluramine	1-[3-(trifluoromethyl)phenyl]propan-2-amine		Active metabolite
Dexfenfluramine: d-fenfluramine	(S)-N-Ethyl-1-[3-(trifluoromethyl)phenyl]propan-2-amine		d-enantiomer of fenfluramine
Levofenfluramine: l-fenfluramine	(R)-N-Ethyl-1-[3-(trifluoromethyl)phenyl]propan-2-amine		l-enantiomer of fenfluramine
Nordexfenfluramine: d-norfenfluramine	(S)-1-[3-(trifluoromethyl)phenyl]propan-2-amine		d-enantiomer of norfenfluramine
Norlevofenfluramine: l-norfenfluramine	(R)-1-[3-(trifluoromethyl)phenyl]propan-2-amine		l-enantiomer of norfenfluramine

略語・略号一覧

略語・略号	略していない表現（英語）	略していない表現（日本語）
α -MPT	alpha methyl-p-tyrosine	α -メチル-p-チロシン
4F 4PP	serotonin 5-HT _{2A} receptor antagonist 4-(4-fluorobenzoyl)-1-(4-phenylbutyl) piperidine oxalate	セロトニン 5-HT _{2A} 受容体アンタゴ ニスト
5-HT	5-hydroxytryptamine (serotonin)	セロトニン
5-HTP	5-hydroxytryptophan	5-ヒドロキシトリプトファン
5-MeO-DMT	5-methoxy-N,N-dimethyltryptamine	5-メトキシ-N,N-ジメチルトリプタ ミン
ANOVA	analysis of variance	分散分析
AR630	5-HT _{2C} agonist	5-HT _{2C} アゴニスト
ASM	Antiseizure Medication	抗痙攣薬
BD1047	Sigma-1 Receptor Antagonist: N-(2-(3,4- dichlorophenyl)ethyl)-N-methyl-2- (dimethylamino)ethylamine	シグマ-1 受容体アンタゴニスト：N- (2-(3,4-ジクロロフェニル)エチル)-N- メチル-2-(ジメチルアミノ)エチルア ミン
BIC	bicuculine	ビククリン
BID	twice a day	1 日 2 回
BiP	binding immunoglobulin protein	BiP（タンパク質）、分子シャペロン として機能
CD-COBS	strain of rats	ラット系統名
C _{max}	maximum plasma concentration	最高血中濃度
C _{max,ss}	Peak Exposure at Steady State	定常状態における最大曝露量
CYP	cytochrome P450	シトクロム P450
DOI	5-HT _{2A} receptor agonist 1-(2,5-dimethoxy-4-iodophenyl)-2- aminopropane	セロトニン 5-HT _{2A} 受容体アゴニス ト
E1R	sigma-1 receptor positive modulator (4R,5S)-2-(5-methyl-2-oxo-4-phenyl- pyrrolidin-1-yl)-acetamide	シグマ-1 受容体に対する正のモジュ レーター
EC ₅₀	half maximal effective concentration	50%有効濃度
ED ₅₀	median effective dose	50%有効量
EU	European Union	欧州連合
FDA	Food and Drug Administration (US)	米国食品医薬品局
GABA	gamma aminobutyric acid	γ -アミノ酪酸
GABAergic	gamma Aminobutyric Acid-ergic	γ -アミノ酪酸作動性
GLP	Good Laboratory Practice	医薬品の安全性に関する非臨床試験 の実施の基準

略語・略号	略していない表現（英語）	略していない表現（日本語）
GR 46611	5-HT1D Agonist 3-[3-(2-dimethylaminoethyl)-1H-indol-5-yl]-N-(4-methoxybenzyl)acrylamide	セロトニン 5-HT1D アゴニスト
GTC	Generalized Tonic-Clonic Seizure	全般性強直性間代性発作
GTS	Generalized Tonic Seizure	全般性強直性発作
hERG	human ether-à-go-go related gene	ヒト急速活性型遅延整流カリウムチャンネル遺伝子
IC ₅₀	half maximal inhibitory concentration	50%阻害濃度
ICH	International Council for Harmonisation	医薬品規制調和国際会議
ICV	Intracerebral Ventricular	脳室内
IP	Intraperitoneal	腹腔内
IV	Intravenous	静脈内
K _d	Dissociation Constant	解離定数
K _i	inhibition constant	阻害定数
MAO	monoamine oxidase	モノアミン酸化酵素
MES	Maximal Electroshock Seizure	最大電撃発作
MgSO ₄	magnesium sulfate	硫酸マグネシウム
NE-100	sigma-1 receptor antagonist 4-methoxy-3-(2-phenylethoxy)-N,N-dipropylbenzeneethanamine	シグマ-1 受容体アンタゴニスト
MR	Metabolite-to-Parent Ratio	未変化体に対する代謝物の濃度比
NDA	New Drug Application (US)	米国新薬承認申請
NMDA	N-methyl-D-aspartic acid	N-メチル-D-アスパラギン酸
pCA	para-chloroamphetamine	パラクロロアンフェタミン
pCPA	para-chlorophenylalanine	パラクロロフェニルアラニン
PD	Pharmacodynamic	薬力学
PK	Pharmacokinetic	薬物動態
PND	postnatal day	生後日数
PO	Orally	経口
Pondimin [®]	Fenfluramine Hydrochloride Approved in US	米国で承認されたフェンフルラミン塩酸塩
PRE-084	Sigma-1 Receptor Agonist 2-(4-morpholinyl)ethyl 1-phenylcyclohexanecarboxylate-1-carboxylate	シグマ-1 受容体アゴニスト
PTZ	pentylene-tetrazole	ペンチレンテトラゾール
QT	Time From the Start of Q Wave to the End of T Wave	Q 波開始から T 波終了までの時間
QTc	Corrected QT Interval	補正 QT 間隔
QTcF	QT Interval Using Fridericia's Formula	Fridericia 補正式で補正した QT 間隔

略語・略号	略していない表現（英語）	略していない表現（日本語）
Redux [®]	dexfenfluramine (single enantiomer (+)-fenfluramine) approved in US	米国で承認された dexfenfluramine (フェンフルラミンの d-エナンチオマー)
SBA	Summary Basis of Approval (US)	米国新医薬品承認審査概要
SC	Subcutaneous	皮下
SCN1A	sodium channel, voltage-gated, type 1 alpha subunit (gene)	電位依存性ナトリウムチャネル α サブユニット 1 型（遺伝子）
SE	Status Epilepticus	てんかん重積発作
SEM	standard error of the mean	標準誤差
SKF-10047	Sigma-1 Receptor Agonist	シグマ-1 受容体アゴニスト
SKF83959	Sigma-1 Receptor Positive Modulator	シグマ-1 受容体の正のモジュレーター
SOMCL-668	Sigma-1 Receptor Positive Modulator	シグマ-1 受容体の正のモジュレーター
SOP	standard operating procedure	標準操作手順書
SSRI	selective serotonin reuptake inhibitor	選択的セロトニン再取り込み阻害薬
STP	Stiripentol	スチリペントール
TdP	torsades de pointes	トルサード・ド・ポワンス
TP	interval from end of T wave to beginning of P wave	T 波の終わりから P 波の始まりまでの間隔
TQT	thorough QT/QTc	QT/QTc 評価
US	United States	米国
VPA	Valproate, Valproic Acid, Sodium Valproate	バルプロ酸、バルプロ酸ナトリウム
ZX008	fenfluramine hydrochloride oral solution	フェンフルラミン塩酸塩経口液剤

2.6.2 薬理試験の概要文

2.6.2.1 まとめ

本概要の薬理試験は、Zogenix 社が実施した試験、既報文献、並びに米国で肥満に対する治療薬として承認された **Pondimin®** [(±)-フェンフルラミン塩酸塩] 及び **Redux®** (dexfenfluramine) の米国新医薬品承認審査概要 (SBA) をもとに総合的に評価した。Zogenix 社が実施したフェンフルラミンの臨床試験及び公表文献の結果も参考資料として含める。本概要で用いたフェンフルラミンの文献検索方法については、[2.4.1]項に記載した。

既報文献及び／又は Zogenix 社が実施した試験で報告された薬理データにおいて、フェンフルラミンはセロトニンを放出させ、5-ヒドロキシトリプタミン (5-HT) 受容体である 5-HT1D、5-HT2A 及び 5-HT2C に対する作動性作用を示した。またシグマ-1 受容体に対する正のモジュレーターとして作用することにより発作活動を抑制することが示されている。フェンフルラミンの活性代謝物である **norfenfluramine** も 5-HT2A 及び 5-HT2C 受容体に対して作動性作用を示す。このような作用機序は現在抗痙攣薬 (ASM) として使用されている薬剤の作用機序とは異なっており、ドラベ症候群に対するフェンフルラミンの有効性が異なる理由もこの作用機序の違いによると考えられる。

既報文献及び **Pondimin** の米国製造販売承認申請において実施された安全性薬理試験では、中枢神経系 (CNS)、心血管系、呼吸器系、消化管及び泌尿生殖器系において、フェンフルラミンの有害な影響は認められなかった。フェンフルラミンは、非臨床モデルにおいて血漿中のプロラクチン及びコルチコステロン濃度を上昇させた。さらに、フェンフルラミンにはモノアミン酸化酵素 (MAO) -A 及び MAO-B を介した薬物相互作用を起こす可能性は認められていない。ドラベ症候群の治療に併用される ASM など、フェンフルラミンの薬力学的な臨床薬物相互作用試験の結果については、[2.7.2.3]項に記載している。

試験結果から、フェンフルラミンがセロトニン放出を促し (**Hekmatpanah 1990**)、生理学的に意味のある濃度のフェンフルラミン及び **norfenfluramine** が 5-HT2A、5-HT2B 及び 5-HT2C 受容体に対する作動性作用が示された (**Rothman 2000**)。受容体結合試験 ([XS-0691]試験) において、フェンフルラミンが 5-HT1A 受容体及びシグマ受容体 (非選択的) に結合することが明らかになった。機能アッセイ ([100026029]試験) では、フェンフルラミンはシグマ-1 受容体に対しては正のモジュレーターとして作用することが示された。さらに、*in vitro* 薬理試験においても、フェンフルラミンはシグマ-1 受容体に対する正のモジュレーターであることが確認された

([AM335]及び[AM354]試験)。受容体結合試験 ([XS-0715]試験) において、5-HT1A、シグマ-1 及びシグマ-2 受容体に対する結合能は、代謝物 **norfenfluramine** のエナンチオマーと比較してフェンフルラミンの両エナンチオマーの方が高いことが示された。これとは逆に、5-HT2A、5-HT2C 及び 5-HT2B 受容体に対しては、**norfenfluramine** のエナンチオマーの結合能の方が高かった。

In vitro 試験において、生理的に意味のある濃度のフェンフルラミン及び norfenfluramine は、8 種類のナトリウムチャネルいずれに対しても作用を及ぼさないことが明らかになった ([ZOG121515-1]試験)。

ドラベ症候群のゼブラフィッシュモデルを用いた *in vivo* 試験において、フェンフルラミンは発作活動を抑制した (Dinday 2015; Zhang 2015; Sourbron 2016; Sourbron 2017; Tiraboschi 2020 及び [ZX008-P1-001A]試験)。これらゼブラフィッシュモデルを用いた試験では、フェンフルラミンの抗てんかん活性には 5-HT1D、5-HT2A 及び 5-HT2C 受容体に対する作動性作用 (Sourbron 2016; Sourbron 2017)、シグマ-1 受容体に対する正のモジュレーターとしての作用 ([ZX008-P1-001A]試験) が関わっているものと考えられた。

マウスを用いた複数の試験でも、フェンフルラミンの抗発作活性が示された。発達性てんかん性脳症の 2 種類の変異マウスモデル、すなわち *Scn1a*^{+/−} ノックアウトマウス (ドラベ症候群モデル) 及び *Scn1a* (ゼブラフィッシュの電位依存性ナトリウムチャネル α サブユニット 1 型) 遺伝子に R1648H 変異を導入したノックインマウス (全般てんかん熱性けいれんプラスのモデル) でフェンフルラミンは抗発作活性を示した (Wong 2017)。これらのモデルでは 5-HT2A アゴニストも抗発作活性を示し、これはドラベ症候群におけるフェンフルラミンの発作抑制作用に 5-HT2A 受容体に対する作動性作用が関わっているという知見と一致する。Dexfenfluramine 及び dexnorfenfluramine はいずれも N メチル D アスパラギン酸 (NMDA) 受容体誘発性の発作の重症度を軽減した。この作用は 5-HT2A アンタゴニストにより阻害され (Rodríguez-Muñoz 2018)、このことから 5-HT2A 受容体に対する作動性作用が重要である可能性が示唆された。

ラット痙攣モデルでは、フェンフルラミンは最大電気ショック後の後肢伸展を阻害し (Buterbaugh 1978)、ペンチレンテトラゾール (PTZ) で誘発される発作を抑制した (Lazarova 1983a ; Lazarova 1983b)。

フェンフルラミンの薬理作用を裏付けるエビデンスは、提示した複数の試験から得られている。Hatini 2020 は、ドラベ症候群のマウスモデルにおける発作活動は 5-HT1D アゴニストによって抑制されたことから、ドラベ症候群の発作に 5-HT1D 受容体が関与していることと一致することを示した。シグマ-1 受容体に対する正のモジュレーターとしての作用は、マウス及びラットの複数のてんかんモデル (Guo 2015; Vavers 2017) 及びゼブラフィッシュのドラベ症候群モデルにおいて発作活動を抑制し、ドラベ症候群を含む複数の型のてんかんにはシグマ-1 受容体の修飾が関与することが支持された。これら試験の結果は、フェンフルラミンによるドラベ症候群の発作抑制作用には、5-HT1D 受容体に対する作動性作用及びシグマ-1 受容体に対する正のモジュレーター作用が関与するという仮説を裏付けるものである。

これらの *in vivo* データは全体として上述したフェンフルラミンの作用機序を支持するものである。

ドラベ症候群の治療薬として、フェンフルラミンの他に 2 種類の ASM、すなわちスチリペンツール [STP、米国、欧州連合 (EU) 及び日本] と cannabidiol (米国及び EU) が承認されている。バルプロ酸 (VPA)、トピラマート、クロバザム、ベンゾジアゼピン系及びゾニサミドな

ど、他の薬剤も臨床経験に基づいて処方されている。ベンゾジアゼピン系、トピラマート、クロバザム、VPA 及び STP は γ -アミノ酪酸 (GABA) の伝達を変化させ、トピラマート及び VPA はイオンチャネルにも作用する可能性がある。ゾニサミドもイオンチャネルに作用を及ぼすと考えられている (Löschner 2016)。STP は GABA の他にシトクロム P450 (CYP) 酵素を阻害することによっても作用し、この酵素によって代謝される他の ASM の濃度を間接的に増加させる (Patsalos 2016)。Cannabinoid の作用機序には CB1 受容体、GPR55 受容体及び TRPV1 チャネルが関与していると考えられている (Rosenberg 2017)。

これらとは異なり、フェンフルラミンは、薬理試験において、セロトニン放出活性、5-HT 受容体に対する直接の作用及びシグマ-1 受容体での正の調節作用を示した。現在ドラベ症候群の治療薬として承認されている又は広く使用されている ASM のうち、セロトニン作動性の機序又はシグマ-1 受容体に対する正のモジュレーターとしての作用により効果をもたらすものと考えられている薬剤は他にはない。このため、フェンフルラミンの作用機序は、ドラベ症候群の治療薬として使用されている他の ASM とは異なる新規作用機序を有すると考えられる。新たな治療選択肢、とりわけ新規作用機序を備え、薬物相互作用が限定的で、認知機能の増悪がない選択肢は、ドラベ症候群の患者やその介護者にとっての喫緊のアンメットメディカルニーズである。

さらに、フェンフルラミンは脳内でノルエピネフリンを放出させ、 β アドレナリン受容体に直接親和性を示すこと、また、dexfenfluramine 異性体は線条体のアセチルコリンを上昇させるが、levofenfluramine 異性体は上昇させないことが報告されている (Garattini 1978)。フェンフルラミンは、セロトニン作動性の作用機序を介して、間接的にドーパミンの放出も増加させると考えられ (Rothman 2009)、また norfenfluramine はムスカリン性 M_1 受容体と中程度の相互作用を示す ([XS-0691]試験)。フェンフルラミンは、ラットの血漿中のプロラクチン及びコルチコステロン濃度の投与量依存的な上昇を引き起こす (Van de Kar 1985)。フェンフルラミンはセロトニン作動性の作用機序を介してプロラクチン分泌を刺激すると考えられるが、コルチコステロン分泌はセロトニン作動性の作用機序を介さないと考えられる。フェンフルラミンの抗発作活性におけるこのような作用の意義は不明である。

安全性薬理試験では、ラット、ウサギ、ネコ、イヌ及び非ヒト霊長類 (アカゲザル) の中枢及び末梢神経系、イヌの心血管系、イヌの呼吸器系、並びにイヌの消化管及び泌尿生殖器系に対する影響について評価した。試験結果は、既報文献及び Zogenix 社が実施した非臨床試験によって得られ、フェンフルラミンの安全性薬理関連の影響に関する臨床データについては[2.7.4]項に記載した。

医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準 (GLP) に適合した幼若ラットの 10 週間投与毒性試験 ([9000406] 試験) において、機能観察総合評価、驚愕反射、自発運動量、並びに学習及び記憶などの神経行動学的評価を行った結果については[2.6.6.6.2.2]項に記載している。動物及びヒトの学習及び記憶の試験などの神経毒性の可能性に関連する文献情報については、[2.6.6.8.3.3]項に記載している。また、フェンフルラミンはレム睡眠を抑制し、深い睡眠から浅い徐波睡眠への移行を増加させる (Lewis 1971)。フェンフルラミンは、ラットにおいて同様の睡

眠への影響を示したが (Fornal 1983a ; Fornal 1983b)、ネコの睡眠時間を増加させ (Foxwell 1969)、サル (アカゲザル) の睡眠時間には影響を与えなかった (Tang 1971)。げっ歯類での作用機序に関する試験では、フェンフルラミン及び norfenfluramine の食欲抑制効果が 5-HT_{2C} 受容体を介することが示されている (Vickers 2001)。

イヌを用いた心血管系試験では、最大 10 mg/kg までの経口投与 (体表面積換算で 5.6 mg/kg のヒト投与量に相当) により、血圧、心拍数、心拍出量及び心筋収縮性が増加した (Franko 1965)。イヌを用いた 13 週間の試験では、フェンフルラミンを 10 mg/kg/日から 20 mg/kg/日まで増加させて経口投与すると、平均肺動脈圧が低下した (Redux® SBA 144590A 1996、p.405 及び 423)。GLP に適合したイヌの 43 週間反復投与毒性試験及び 28 日間回復性試験では、フェンフルラミン塩酸塩に関連した心電図パラメータの変化は認められなかった ([01127008]試験、[2.6.6.3.2.1]項)。

イヌでは、フェンフルラミン塩酸塩の単回投与により、呼吸、腸の運動性及び尿流量がわずかに減少し、その後増加するという二相性変化が認められた (Pondimin SBA 153329A 1970、p.71)。GLP に適合したイヌの 43 週間反復投与毒性試験及び 28 日間回復性試験では、フェンフルラミンの呼吸器系に対する影響は、いずれの投与量でも認められなかった ([01127008]試験)。

フェンフルラミンは、ラット脳の MAO (Kilpatrick 2001)、並びにラット脳ホモジネートの MAO-A 及び MAO-B (Leonardi 1994) に対して阻害効果を示さなかった。したがって、フェンフルラミンは MAO を介して他の薬剤と相互作用するとは考えられない。

フェンフルラミンが選択的セロトニン再取り込み阻害薬 (SSRI) と相互作用する可能性について、ラットの脳から調製したシナプトソームを用いて検討された (Hekmatpanah 1990)。シナプトソーム調製物をフェンフルラミンとインキュベートすると、セロトニンが放出された。一方、フェンフルラミン添加前にフルオキシセチンをプレインキュベートすることにより、フェンフルラミンによって引き起こされるセロトニンの放出を有意に阻害した。しかし、SSRI とフェンフルラミンの相互作用については臨床診療では認められていないことが、抗うつ薬の薬理作用の総説において報告されている (Richelson 1994)。

以上の *in vitro* 及び *in vivo* の試験結果より、フェンフルラミンの作用機序には少なくとも 3 つの要素、すなわち a) セロトニン放出作用、b) 5-HT_{1D}、5-HT_{2A} 及び 5-HT_{2C} 受容体に対する作動性作用、c) シグマ-1 受容体に対する正のモジュレーターとしての作用があることが示された。このような作用機序は、現在ドラベ症候群の治療薬として使用されている他の ASM の作用機序とは異なっており、ドラベ症候群に対するフェンフルラミンの有効性が異なる理由もこの作用機序の違いによると考えられる。

既報文献及び Pondimin® SBA 153329A 1970 又は Redux® SBA 144590A 1996 において実施された安全性薬理試験では、中枢神経系、心血管系、呼吸器系、消化管及び泌尿生殖器系において、フェンフルラミンの有害な影響は認められなかった。Zogenix 社において追加の安全性薬理試験は実施しなかったが、医薬品規制調和国際会議 (ICH) のガイドライン S7A/B に従い、Zogenix 社で実施した反復投与試験において安全性薬理評価を実施した。2.6.2.4 項に要約したようにフ

フェンフルラミンの循環器に対する非臨床安全性薬理データから QT 延長のリスクが認められていないこと、また[2.7.4]項で要約したように、小児及び成人患者の広範な臨床安全性データベースによっても裏付けられていることから、ICH S7A/B ガイダンスに含まれているヒト急速活性型遅延整流カリウムチャネル遺伝子 (hERG) アッセイは実施しなかった。また、健康成人を対象とした QT/QTc 評価 (TQT) 試験 ([ZX008-1603]試験) では、治療用量及び治療用量よりも高用量のいずれにおいてもフェンフルラミン塩酸塩経口液剤 (ZX008) は QTc 間隔に有意な影響を及ぼさないことが確認された。トルサード・ド・ポワンツ (TdP)、心室頻拍、心室細動、及び心臓突然死のリスクはない (詳細は[ZX008-1603]試験参照)。

フェンフルラミンは、非臨床モデルにおいて、血漿中のプロラクチン及びコルチコステロン濃度を上昇させるが、臨床との関連性は不明である。さらに、フェンフルラミンには MAO-A 及び MAO-B を介した薬物相互作用の可能性は認められないが、他のパスウェイを介した薬物相互作用が発生する可能性はある ([2.7.2]項)。

2.6.2.2 効力を裏付ける試験

In vitro 試験において、フェンフルラミンがセロトニン放出を促し (Hekmatpanah 1990)、生理学的に意味のある濃度のフェンフルラミン及び norfenfluramine が 5-HT_{2A}、5-HT_{2B} 及び 5-HT_{2C} 受容体に対して作動性作用を及ぼすことが示されている (Rothman 2000)。Cagnotto 1994 も、ラット脳由来の未精製シナプス膜調製液においてフェンフルラミンはマイクロモル以下の親和性でシグマ-1 受容体に結合することを示した。

Zogenix 社は、*in vitro* 受容体結合阻害試験を実施し、発作活動に関連する受容体及びイオンチャネルに対するフェンフルラミン及び norfenfluramine の結合特性を評価した ([XS-0691]試験)。さらに、フェンフルラミン及び norfenfluramine の両エナンチオマーの 12 種類の受容体及びイオンチャネルに対する結合能について、放射性リガンド結合アッセイを用いた受容体結合試験で評価した ([XS-0715]試験)。Zogenix 社は、受容体及びイオンチャネルの活性化を評価する機能アッセイも実施した ([100026029]試験、[ZOG121515-1]試験、[AM335]試験及び[AM354]試験；Martin 2020)。

さらに、複数の試験で、ラット嗅内皮質切片 (Gentsch 2000)、ドラベ症候群のゼブラフィッシュモデル (Zhang 2015；Sourbron 2016；Sourbron 2017；Dinday 2015；Tiraboschi 2020；[ZX008-P1-001A]試験)、てんかんのマウスモデル (Rodríguez-Muñoz 2018)、ドラベ症候群を含む発達性てんかん性脳症の 2 種類の変異マウスモデル (Wong 2017)、最大電撃けいれん (MES) 及び PTZ 誘発性発作モデルの 2 種類のてんかんラットモデル (Buterbaugh 1978；Lazarova 1983a；Lazarova 1983b) を用いて、発作活動の抑制におけるフェンフルラミンの有効性について検討されている。

2.6.2.2.1 *In vitro* 試験

2.6.2.2.1.1 受容体結合特性試験 ([XS-0691]試験、評価資料)

フェンフルラミン及び norfenfluramine の 47 種類の受容体及びイオンチャネルに対する結合能について、放射性リガンド結合試験で評価した。受容体及びイオンチャネルは、既報文献で報告されている発作活動との関連性に基づいて選択した。

フェンフルラミン及び norfenfluramine は、 1×10^{-6} 及び 1×10^{-5} mol/L の濃度で評価した。放射性リガンド結合阻害率 (%) で計算した、受容体及びイオンチャネルそれぞれへの結合能を、以下の表 2.6.2-1 に示す。阻害率 (%) は、被験物質の存在下での結合放射能を被験物質の非存在下での総結合放射能で割り、100 を掛けて算出した。

中等度以上の結合 (30%超の阻害率) を示した受容体及びイオンチャネルは、 β アドレナリン受容体 (非選択的)、 β_2 アドレナリン受容体、ムスカリン M_1 受容体、ナトリウムイオンチャネル (サブユニットに対して非選択的)、セロトニン 5-HT_{1A} 受容体及びシグマ受容体であり、5-HT_{1A} 及びシグマ受容体に対して強い競合阻害活性を示した。このアッセイでは、他のセロトニン受容体は評価していない。これら 6 種類の受容体の 50%阻害濃度 (IC_{50}) 値及び阻害定数 (K_i) 値を表 2.6.2-2 に示す。

表 2.6.2-1 放射性リガンドの受容体結合に対するフェンフルラミン及び norfenfluramine の阻害効果 (XS-0691 試験)

Assay System	Inhibition Ratio (%)**					
	Fenfluramine		Norfenfluramine		Positive Control	
	1×10 ⁻⁶ mol/L	1×10 ⁻⁵ mol/L	1×10 ⁻⁶ mol/L	1×10 ⁻⁵ mol/L	Inhibition Ratio (%)**	Compound (1×10 ⁻⁵ or 1×10 ⁻⁶ mol/L)***
Adenosine A ₁ (Human recombinant)	0.19	7.55	0.00	0.81	99.61	DPCPX
β-Adrenergic (Non-selective) (Rat brain)*	21.94	40.62	10.24	41.14	100.00	(±)-Propranolol
α _{1B} -Adrenergic (Human recombinant)	0.81	4.73	0.00	0.19	100.00	Prazosin
β ₁ -Adrenergic (Human recombinant)	0.54	7.54	0.45	11.56	100.00	(±)-Propranolol
β₂-Adrenergic (Human recombinant)*	2.39	32.59	6.62	35.41	100.00	(±)-Propranolol
Angiotensin AT ₁ (Human recombinant)	1.24	0.00	1.91	0.00	100.00	Angiotensin II human
Apelin APJ (Human recombinant)	1.01	3.23	2.17	3.48	99.38	Apelin-13
Benzodiazepine BZ (bovine cerebrum)	0.33	4.04	1.15	0.00	100.00	Diazepam
Bradykinin B ₁ (Human recombinant)	6.67	7.45	1.75	5.01	100.00	Lys-(des-Arg ⁹ , Leu ⁸)-Bradykinin
Bombesin BB ₁ (Human recombinant)	0.00	0.00	0.00	0.00	98.40	Bombesin
Calcitonin CALR (Rat brain)	0.00	0.00	2.69	2.68	100.00	Calcitonin human
Ca channel Type L, Benzothiazepine (Rat cerebral cortex)	0.00	0.00	0.00	0.00	99.77	(+)-cis-Diltiazem
Cannabinoid CB ₁ (Human recombinant)	2.92	0.00	0.00	0.00	100.00	(R)-(+)-WIN55,212-2
CGRP (Human recombinant)	0.00	0.00	0.00	0.00	100.00	CGRP human
Chemoattractant C3a (Human recombinant)	2.03	2.44	0.00	0.00	100.00	(Trp ⁶³ -Trp ⁶⁴)C3a (63-77)
Chemokine CCR ₁ (Human recombinant)	0.64	0.00	0.00	0.00	100.00	RANTES human
CCK A (Human recombinant)	0.00	19.27	0.00	0.00	96.40	CCK-8
CRF ₁ (Human recombinant)	3.23	2.37	0.04	0.00	90.60	Urocortin human
Cl channel (Rat brain)	0.81	1.36	1.62	5.85	95.74	Picrotoxin
Dopamine D ₁ (Human recombinant)	1.00	8.79	4.32	5.38	98.57	R(+)-SCH-23390

表 2.6.2-1 放射性リガンドの受容体結合に対するフェンフルラミン及び norfenfluramine の阻害効果 (XS-0691 試験) (続き)

Assay System	Inhibition Ratio (%)**					
	Fenfluramine		Norfenfluramine		Inhibition Ratio (%) for Positive control substance	
	1×10 ⁻⁶ mol/L	1×10 ⁻⁵ mol/L	1×10 ⁻⁶ mol/L	1×10 ⁻⁵ mol/L	Inhibition Ratio (%)**	Compound (1×10 ⁻⁵ or 1×10 ⁻⁶ mol/L)***
EGF (Human Non-recombinant)	0.00	0.00	0.44	0.00	96.99	rec EGF (Human)
GABA _A (Agonist site) (Rat cerebellum)	1.07	0.00	0.00	0.00	100.00	Muscimol
Galanin GAlR ₁ (Human receptor)	1.53	0.00	2.06	3.10	99.38	Galanin (Human)
Glucocorticoid (Human recombinant)	0.55	2.24	0.31	0.00	99.97	Dexamethasone
Glutamate (Non-selective) (Rat cerebral cortex)	3.09	11.53	1.85	7.67	100.00	L-Glutamic acid
Glycine Strychnine sensitive (Rat spinal cord)	0.00	0.00	6.63	0.02	100.00	Strychnine
Histamine H ₃ (Human recombinant)	4.22	5.45	0.00	0.00	100.00	(R)(-)-α-Methylhistamine
IP ₃ (Rat cerebellum)	4.89	1.76	1.57	0.00	99.82	IP3
K channel KATP (Rat brain)	9.99	1.97	6.78	6.50	100.00	Glybenclamide
Leukotriene D ₄ (Guinea pig lung)	2.71	0.64	4.60	4.24	98.49	Leukotriene D ₄
Muscarinic M₁ (Rat cerebral cortex)*	5.44	47.84	20.62	69.89	100.00	Atropine
Na channel (Rat brain)*	13.38	46.28	13.44	47.86	94.28	Dibucaine
Neurokinin NK ₁ (Human recombinant)	0.00	4.40	0.00	9.87	100.00	L-703,606
Neuropeptide FF NPFF ₁ (Human recombinant)	1.18	14.54	8.40	10.25	96.31	Neuropeptide SF human
Neuropeptide Y NPY ₁ [Human receptor (Non-recombinant)]	0.00	0.43	0.00	0.00	98.60	Neuropeptide Y human
Neurotensin NT ₁ (Human recombinant)	0.61	0.11	0.00	4.83	100.00	Neurotensin
Nicotinic [Human receptor (Non-recombinant)]	0.00	0.28	0.00	0.00	100.00	(±)-Epibatidine
Orexin OX ₁ (Human recombinant)	2.82	4.09	8.66	6.70	100.00	Orexin-A (Human)
PAF (Rabbit platelet)	1.18	2.81	2.38	3.25	100.00	PAF
Prokineticin PK1 (Human recombinant)	0.00	6.01	1.93	3.96	99.76	EG-VEGF

表 2.6.2-1 放射性リガンドの受容体結合に対するフェンフルラミン及び norfenfluramine の阻害効果 (XS-0691 試験) (続き)

Assay System	Inhibition Ratio (%)**					
	Fenfluramine		Norfenfluramine		Inhibition Ratio (%) for Positive Control Substance	
	1×10 ⁻⁶ mol/L	1×10 ⁻⁵ mol/L	1×10 ⁻⁶ mol/L	1×10 ⁻⁵ mol/L	Inhibition Ratio (%)**	Compound (1×10 ⁻⁵ or 1×10 ⁻⁶ mol/L)***
Prostanoid DP (Human recombinant)	4.12	0.00	3.90	0.00	98.12	Prostaglandin D ₂
Serotonin 5-HT1A (Rat cerebral cortex)*	47.49	96.86	42.25	88.74	100.00	Serotonin
Sigma Non-selective (Guinea pig brain)*	73.07	93.41	25.94	75.40	99.46	Haloperidol
Somatostatin SST1 (Human recombinant)	1.31	14.41	5.06	2.84	100.00	Somatostatin 28
Substance P (Guinea pig submaxillary)	9.98	10.53	0.00	7.72	97.97	Substance P
Vasopressin V1B (Human recombinant)	2.87	2.06	2.43	1.80	100.00	[Arg ⁸]-Vasopressin
Vasoactive intestinal polypeptide VIP 1 (Human recombinant)	2.73	0.00	5.27	13.47	100.00	VIP

Abbreviations: 5-HT = 5-Hydroxytryptamine; SOP = Standard Operating Procedure

*Compounds in **Bold**: Tested in functional assays shown in 表 2.6.2-2.

**Inhibition Ratio (%): Bound radioactivity in the presence of the test article divided by the total bound radioactivity in the absence of the test article and multiplied by 100.

***Concentration for each positive control was determined by the contract laboratory and specified in the SOP for each assay.

[XS-0691Table 1, 2]

表 2.6.2-2 (±)-フェンフルラミン及び(±)-norfenfluramine の受容体結合に対する Ki 値 (XS-069 試験)

Assay System	Substance	IC ₅₀ (mol/L)	Ki (mol/L)
β-Adrenergic (Non-selective) (Rat brain)	(±)-fenfluramine	2.76×10^{-5}	1.75×10^{-5}
	(±)-norfenfluramine	1.89×10^{-5}	1.20×10^{-5}
	(±)-Propranolol*	6.16×10^{-9}	3.90×10^{-9}
β ₂ -Adrenergic (Human recombinant)	(±)-fenfluramine	2.59×10^{-5}	1.26×10^{-5}
	(±)-norfenfluramine	1.80×10^{-5}	8.77×10^{-6}
	(±)-Propranolol*	1.05×10^{-9}	5.12×10^{-10}
Muscarinic M ₁ (Rat cerebral cortex)	(±)-fenfluramine	1.30×10^{-5}	1.13×10^{-5}
	(±)-norfenfluramine	4.32×10^{-6}	3.74×10^{-6}
	Atropine*	1.13×10^{-9}	9.80×10^{-10}
Na channel (Rat brain)	(±)-fenfluramine	7.62×10^{-6}	4.84×10^{-6}
	(±)-norfenfluramine	7.46×10^{-6}	4.74×10^{-6}
	Dibucaine*	1.88×10^{-7}	1.19×10^{-7}
Serotonin 5-HT _{1A} (Rat cerebral cortex)	(±)-fenfluramine	5.73×10^{-7}	3.27×10^{-7}
	(±)-norfenfluramine	1.18×10^{-6}	6.73×10^{-7}
	Serotonin*	1.77×10^{-9}	1.01×10^{-9}
Sigma Non-selective (Guinea pig brain)	(±)-fenfluramine	2.92×10^{-7}	2.66×10^{-7}
	(±)-norfenfluramine	3.21×10^{-6}	2.92×10^{-6}
	Haloperidol*	1.44×10^{-9}	1.31×10^{-9}

Abbreviations: 5-HT = 5-Hydroxytryptamine; Kd = Dissociation Constant; Ki = Inhibition Constant, (IC₅₀)/[1+(L/Kd)];IC₅₀ = Half Maximal Inhibitory Concentration; Na = Sodium

*Positive control

[XS-0691 Table 3, 4, 5, 6, 7, 8]

2.6.2.2.1.2 Dexfenfluramine、levofenfluramine、nordexfenfluramine 及び norlevofenfluramine の受容体結合活性 ([XS-0715]試験、評価資料)

(±)-フェンフルラミン及び(±)-norfenfluramine の結合及び機能活性を示す 2.6.2.2.1.1 項 (XS-0691 試験) 及び 2.6.2.2.1.3 項 ([100026029]試験) の結果に基づいて選択した 12 種類の受容体及びイオンチャネルに対する、フェンフルラミン及び norfenfluramine のエナンチオマーの結合能について、放射性リガンド結合試験で評価した。フェンフルラミン及び norfenfluramine のエナンチオマーは、 1×10^{-6} 及び 1×10^{-5} mol/L の濃度で評価し、陽性対照と比較した。さらに、これら受容体及びイオンチャネルに対する Ki 値を求め、表 2.6.2-3 に示した。

表 2.6.2-3 Dexfenfluramine、levofenfluramine、nordexfenfluramine 及び norlevofenfluramine の受容体結合能の比較 (XS-0715 試験)

Receptor	Ki (mol/L)			
	Dexfenfluramine	Levofenfluramine	Nordexfenfluramine	Norlevofenfluramine
β-Adrenergic (Non-selective) Rat brain	1.61×10^{-5}	1.36×10^{-5}	9.76×10^{-6}	8.48×10^{-6}
β ₂ -Adrenergic Human recombinant	8.84×10^{-6}	1.40×10^{-5}	8.60×10^{-6}	5.56×10^{-6}
Muscarinic M ₁ Rat cerebral cortex	8.30×10^{-6}	1.15×10^{-5}	3.27×10^{-6}	4.00×10^{-6}
Na channel Rat brain	5.76×10^{-6}	9.71×10^{-6}	5.37×10^{-6}	3.04×10^{-6}
5-HT _{1A} Rat cerebral cortex	7.11×10^{-7}	4.02×10^{-7}	1.14×10^{-6}	4.09×10^{-7}
5-HT _{2A} Human recombinant	4.21×10^{-6}	1.70×10^{-6}	2.74×10^{-6}	1.67×10^{-6}
5-HT _{2B} Human recombinant	4.63×10^{-6}	1.44×10^{-6}	2.42×10^{-7}	1.20×10^{-6}
5-HT _{2C} Human recombinant	2.91×10^{-6}	1.29×10^{-6}	3.56×10^{-7}	3.80×10^{-7}
5-HT ₇ Human recombinant	7.10×10^{-6}	3.70×10^{-6}	1.50×10^{-6}	1.80×10^{-6}
Sigma (not selective for S1 or S2) Guinea pig brain	1.63×10^{-7}	3.51×10^{-7}	1.80×10^{-6}	2.30×10^{-6}
Sigma-1 Guinea pig brain	1.09×10^{-7}	5.02×10^{-7}	2.61×10^{-6}	4.60×10^{-6}
Sigma-2 Guinea pig brain	4.31×10^{-7}	8.00×10^{-7}	2.98×10^{-6}	3.21×10^{-6}

Abbreviations: 5-HT = 5-Hydroxytryptamine; Kd = Dissociation Constant; Ki = Inhibition Constant, (IC₅₀)/[1+(L/Kd)];
 IC₅₀ = Half Maximal Inhibitory Concentration
 [XS-0715Table 15]

全般的に、 1×10^{-6} 及び 1×10^{-5} mol/L 濃度のフェンフルラミン及び norfenfluramine のエナンチオマー間の結合能の違いは、12 種類の受容体及びイオンチャネルでは認められなかったが、フェンフルラミンの両エナンチオマーは、代謝物である norfenfluramine の両エナンチオマーと比べて、5-HT_{1A}、シグマ-1 及びシグマ-2 受容体により強力に結合することが示された。一方、norfenfluramine の両エナンチオマーは、5-HT_{2C} 受容体及び 5-HT_{2B} 受容体に対してより強力に結合することが示された。

2.6.2.2.1.3 受容体におけるフェンフルラミン及び norfenfluramine の機能活性 ([100026029]試験、評価資料)

2.6.2.2.1.1 項の受容体結合アッセイ ([XS-0691]試験) でフェンフルラミンの標的候補として特定した β₁ アドレナリン受容体、β₂ アドレナリン受容体、ムスカリン M₁ 受容体、5-HT_{1A} 受容体及び非特異的シグマ受容体に対する、(±)-フェンフルラミン、(±)-norfenfluramine 及びそれらのエナンチオマーのアゴニスト及びアンタゴニスト活性について評価した。

モルモット輸精管組織を用いた単収縮 (twitch contraction) アッセイによって、非特異的シグマ受容体に対するアゴニスト活性及びアンタゴニスト活性を評価した (100026029 試験)。フェンフルラミン及びそのエナンチオマー単独では、単収縮 (twitch contraction) アッセイによってアゴニスト活性及びアンタゴニスト活性を示さなかった。しかし、単収縮 (twitch contraction) アッセイにおいてアゴニストである(+) SKF-10047 存在下では、フェンフルラミン及びそのエナンチオマーはアゴニストである(+) SKF-10047 の作用を高めることを示した。アッセイでは、フェンフルラミンの最高臨床用量 (0.8 mg/kg/日) を投与した後に予測される脳内濃度範囲内である約 5 $\mu\text{mol/L}$ の濃度で正のモジュレーターとしての作用が認められた (表 2.6.2-2)。

Norfenfluramine のラセミ体及びエナンチオマーも、10 $\mu\text{mol/L}$ 未満の濃度で、(+) SKF-10047 の作用を増強した。ゼブラフィッシュのドラベ症候群モデルを用いた *in vivo* 試験において、シグマ-2 受容体リガンドが発作活動に影響を与えないことが示されているため (Sourbron 2017)、この作用はシグマ-1 受容体に特異的なものである。検討した最高用量 (10 $\mu\text{mol/L}$) において、norfenfluramine 及びそのエナンチオマーは(+) SKF-10047 の活性を抑制した。このことは、シグマ-1 受容体に対する norfenfluramine 及びそのエナンチオマーの作用は、ベル型で二相性の用量-反応曲線で表されることを示唆している。このような特徴はシグマ-1 受容体リガンドでは一般的なものである (Rousseaux 2016; Martin 2020)。

細胞・核アッセイを用いて、 β_1 アドレナリン受容体、 β_2 アドレナリン受容体、5-HT_{1A} 受容体及びムスカリン M₁ 受容体での機能活性を評価した。

被験化合物のいずれも、検討した受容体に対してアゴニスト活性を示さなかった。アンタゴニスト活性は、 β_2 アドレナリン受容体及びムスカリン M₁ 受容体で認められた。(±)-フェンフルラミン及びその両エナンチオマーは、49~64 $\mu\text{mol/L}$ の濃度範囲で β_2 アドレナリン受容体のアンタゴニスト活性を示した。Dexfenfluramine は、83 $\mu\text{mol/L}$ の濃度でムスカリン M₁ 受容体のアンタゴニスト活性を示した。(±)-norfenfluramine 及び levonorfenfluramine は、67~70 $\mu\text{mol/L}$ の濃度範囲で β_2 アドレナリン受容体のアンタゴニスト活性を示し、levonorfenfluramine は、95 $\mu\text{mol/L}$ の濃度でムスカリン M₁ 受容体のアンタゴニスト活性を示した。levonorfenfluramine は、95 $\mu\text{mol/L}$ の濃度でムスカリン M₁ 受容体のアンタゴニスト活性を示した。最高臨床用量 (0.8 mg/kg) を投与後の定常状態におけるフェンフルラミンの最大脳内濃度範囲は、2~8 $\mu\text{mol/L}$ と推定される (表 2.6.2-4)。受容体拮抗作用に必要な濃度は、最高臨床用量 (0.8 mg/kg) の脳内濃度よりもはるかに高い (すなわち、49~95 $\mu\text{mol/L}$ の濃度範囲) ため、フェンフルラミンがこれらの受容体を介して抗てんかん効果を発揮する可能性は低いと考えられる。

表 2.6.2-4 脳組織中のフェンフルラミン濃度の計算値 (100026029 試験)

Item	$\mu\text{mol/L}$	Data Source
C _{max} in plasma	0.254	Predicted fenfluramine concentration at C _{max} 58.75 $\mu\text{g/L}$ divide by molar mass 231.26 g/mol to convert the unit to $\mu\text{mol/L}$ from $\mu\text{g/L}$
Unbound drug in plasma	0.127	50% bound in plasma protein binding assay Study Report [XS-0688]
Estimated brain concentration (15×, 40× or 60× plasma concentration)	2 to 8	Spinelli 1988 Caccia 1982

Item	$\mu\text{mol/L}$	Data Source
		Clausing 1997

Abbreviation: C_{max} = Maximum Plasma Concentration

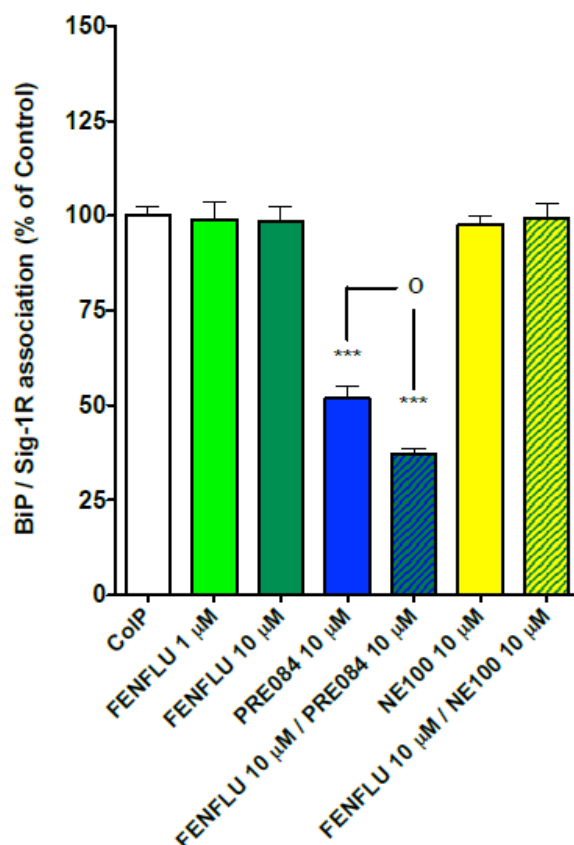
2.6.2.2.1.4 シグマ-1 受容体に対するフェンフルラミンの作用 ([AM354]試験、評価資料)

結合免疫グロブリンタンパク質 (BiP) アッセイにより、フェンフルラミンのシグマ-1 受容体に対する作用を評価した。静止状態では、BiP はシグマ-1 受容体と複合体を形成している。アゴニストがシグマ-1 受容体に結合すると、受容体は BiP から解離し、細胞内の別の場所に移動する。したがって、被験化合物の存在下で解離が増加すること（すなわち、BiP とシグマ-1 受容体複合体の会合の減少）は、被験化合物の受容体に対する活性を意味する。ゼブラフィッシュのドラベ症候群モデルを用いた *in vivo* 試験において、シグマ-2 受容体リガンドが発作活動に影響を与えないことが示されているため (Sourbron 2017)、シグマ-2 受容体については検討しなかった。

これらの試験により、フェンフルラミン単独では BiP-シグマ-1 受容体複合体の会合作用がなくフェンフルラミンはシグマ-1 受容体のアゴニストとして作用しないことが示された。

一方、PRE-084 単独投与で認められたシグマ-1 受容体の活性化作用 (BiP-シグマ-1 受容体複合体の会合の減少) は、PRE-084 とフェンフルラミン (10 $\mu\text{mol/L}$) の併用投与により増強 (さらなる会合の減少) された (図 2.6.2-1 参照)。

図 2.6.2-1 30 分間の培地培養後における BiP-シグマ 1 受容体複合体会合に対するフェンフルラミンの効果 (AM354 試験)



Selected Abbreviations:

CoIP: Control Group that Shows Co-Immunoprecipitation in Absence of Fenfluramine, PRE-084, or NE-100; Doses are Expressed in Micromolar; n=6 per condition. Error bar represents SEM.

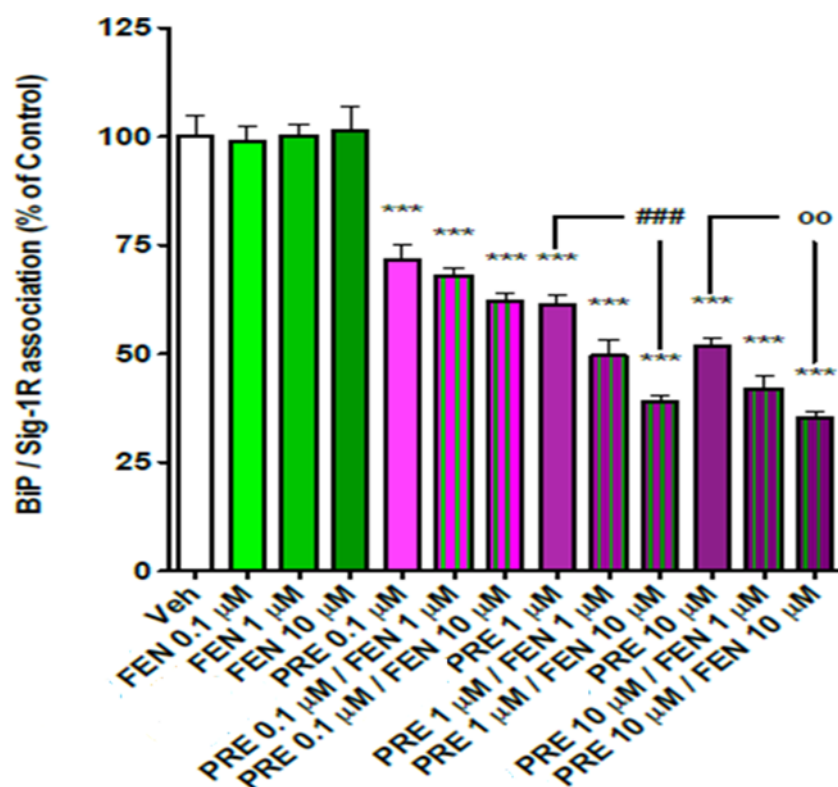
Dunnett's Test: *** $p \leq 0.0001$ vs CoIP-treated group; $p \leq 0.05$ vs fenfluramine 10 μM group.

[AM354 Figure 1]

2.6.2.2.1.5 *In vitro* BiP アッセイにおけるフェンフルラミンの正のモジュレーターとしての作用 ([AM335]試験、評価資料)

BiP アッセイにより、フェンフルラミンがシグマ-1 受容体に対して正のモジュレーターとして作用することを確認した。正のモジュレーターの作用としては、単独では作用を示さないが、アゴニストと併用するとそのアゴニストの活性を増強する。したがって、アゴニストと被験物質の併用下で BiP-シグマ-1 受容体複合体の解離が増加することは、被験化合物が正のモジュレーターであることを示している。図 2.6.2-2 に示すように、フェンフルラミンは単独では、BiP-シグマ-1 受容体複合体の解離に影響しなかった。一方、シグマ-1 受容体アゴニストである PRE-084 は、BiP-シグマ-1 受容体の解離を濃度依存的に有意に増加させた。フェンフルラミンを PRE-084 と併用すると、PRE-084 の効果が有意に増加した。これらの結果は、フェンフルラミンは、単独ではシグマ-1 受容体に対してアゴニストとして作用しないが、アゴニストの存在下では正のモジュレーターとして作用して、その活性を増強することを示している。フェンフルラミンは 1 及び 10 $\mu\text{mol/L}$ の濃度で正のモジュレーターとしての作用を示しており、これはフェンフルラミン塩酸塩経口液剤 (ZX008) の最高臨床用量 (0.8 mg/kg) を投与した時に予測されるフェンフルラミンの脳内濃度である 2~8 $\mu\text{mol/L}$ の濃度範囲である (2.6.2.2.1.3 項、表 2.6.2-4 参照)。

図 2.6.2-2 PRE-084 誘発性の BiP-シグマ-1 受容体複合体の解離に対するフェンフルラミンの効果 (AM335 試験)



Selected Abbreviations:

Doses are expressed in micromolar; n=6 per condition. Error bar represents SEM.

One-way ANOVA followed by Dunnett multiple comparison test: *** $p \leq 0.0001$ vs Vehicle; ### $p \leq 0.0001$ vs. PRE-084 1 μM;

^{oo} $p \leq 0.01$ vs PRE-084 10 μM.

[AM335 Figure 3]

2.6.2.2.1.6 ナトリウムチャンネル電流 (IonChannelProfiler™) データの報告 ([\[ZOG121515-1\]](#)試験、評価資料)

(±)-フェンフルラミン及び(±)-norfenfluramine、並びに対応する dex 異性体及び levo 異性体の hNav1.1、hNav1.2、hNav1.3、hNav1.4、hNav1.5、hNav1.6、hNav1.7 及び hNav1.8 の 8 種類のナトリウムチャンネル電流に対する IC₅₀ 値を、0.37~30 µmol/L 濃度範囲の 5 濃度で、20-パルスプロトコルを用いて測定した。Levofenfluramine、(±)-norfenfluramine 及びそのエナンチオマーは、hNav1.5 チャンネルの活性のみを変化させ、IC₅₀ 値は 21.9~39.2 µmol/L の濃度範囲であった。ZX008 の最高臨床用量に基づいて予測されるフェンフルラミンの脳内濃度は、2~8 µmol/L の濃度範囲である (2.6.2.2.1.3 項、表 2.6.2-4 参照)。Fenfluramine 及び norfenfluramine の脳内分布については、[\[2.6.4.4.1\]](#)項に記載した。したがって、これらの結果は、levofenfluramine 及び norfenfluramine が *in vitro* で Nav1.5 に影響を与えるものの、チャンネル阻害に必要な濃度は、最高臨床用量に基づいて予測される脳内濃度よりも 1 桁高く、フェンフルラミン及び norfenfluramine は、ナトリウムイオンチャンネル電流に関して臨床において関連する影響を及ぼさないと考えられる。

2.6.2.2.2 Ex vivo 試験

てんかん様活動に対する作用文献：[Gentsch 2000](#)

ラット嗅内皮質のてんかん様活動に対するフェンフルラミンの効果を検討した ([Gentsch 2000](#))。嗅内皮質は、海馬への入力構造体の一つであり、側頭葉てんかんに関与し、5-HT1A、5-HT1D、5-HT1E、5-HT2A、5-HT3 及び 5-HT6 などの受容体を高密度に発現する縫線核からセロトニン作動性投射を受ける ([Lei 2012](#))。著者らは、200 µmol/L~1 mmol/L の濃度範囲のフェンフルラミンを Wistar ラットの 43 の水平脳切片（嗅内皮質、鉤状回及び海馬体を含む）に添加した。細胞外記録技術を用い、人工脳脊髄液から硫酸マグネシウム (MgSO₄) を除外することによって誘発されるてんかん様活動を測定した。その結果、フェンフルラミンは、500 µmol/L 以上の濃度で、嗅内皮質のてんかん様活動を阻害した。5-HT 取り込み阻害薬であるパロキセチンを 50 µmol/L の濃度で 20 分間反応後、フェンフルラミンを添加すると、フェンフルラミンの抗発作活性は抑制された。フェンフルラミンの抗発作活性は、5-HT1A 受容体阻害薬 WAY100635 を添加することによっても抑制された。著者らは、フェンフルラミンの抗てんかん効果は、5-HT1A 受容体を活性化する末端からのセロトニンの放出によって引き起こされると提言した。しかし、この試験に用いられたフェンフルラミンの濃度は、ドラベ症候群患者に投与される最高用量での濃度をはるかに超えている。

2.6.2.2.3 *In vivo* 試験

2.6.2.2.3.1 ゼブラフィッシュモデルに対する作用

文献：Zhang 2015 ; Dinday 2015; Sourbron 2016; Sourbron 2017; Tiraboschi 2020 ; Catarino 2011 ; Martin 2021 ; [ZX008-P1-001A]試験

複数の研究グループが実施したドラベ症候群のゼブラフィッシュモデルを用いた研究 (Zhang 2015; Dinday 2015; Sourbron 2016; Sourbron 2017; Tiraboschi 2020) において、フェンフルラミンはてんかん様活動及び自発運動の亢進を抑制することが示された。これらゼブラフィッシュモデルは、*SCN1A* 遺伝子を改変することにより、その機能を欠失させて作製された。ドラベ症候群患者の約 80%は *SCN1A* 遺伝子にこの変異を有している (Catarino 2011)。ゼブラフィッシュモデルは、既知のてんかん関連遺伝子の約 85%を含み、ASM によって抑制可能な発作様の自発運動及びてんかん様活動を示す (Sourbron 2016) ことから、てんかんの研究に使用される。神経細胞サブタイプ (GABA 作動性、グルタミン酸作動性、ドーパミン作動性、ノルエピネフリン作動性及びアセチルコリン作動性) もゼブラフィッシュと哺乳類の間に高度に保存されている (Sourbron 2016)。したがって、ゼブラフィッシュモデルはフェンフルラミンの抗発作活性を担う作用機序の試験に適していると考えられる。

Zhang 2015 は、フェンフルラミンの発作活動阻害活性について、ドラベ症候群のゼブラフィッシュモデルを用いて検討した。ゼブラフィッシュモデルは、*SCN1A* のゼブラフィッシュオルソログである *scn1lab* を標的とするモルホリノアンチセンスオリゴマーを用いて作製された。アンチセンス配列を用いて *scn1lab* をノックダウンしたゼブラフィッシュ幼生は、自発運動の亢進、痙攣性及び発作様行動、体位障害、並びに反復性痙攣を示し、また、前脳脳波測定でてんかん様活動電位が認められた。ドラベ症候群のマウスモデル及び患者所見と同様に、温熱負荷に感受性であった。

幼生は自由に泳がせ、さまざまな濃度のカルバマゼピン、トピラマート、STP、VPA、クロバザム及びフェンフルラミンに曝露した。その結果、通常発作を悪化させるカルバマゼピンは、無作用又は自発運動のわずかな増加を示した。トピラマート、STP、VPA、クロバザム及びフェンフルラミンはすべて自発運動を低下させた。フェンフルラミン (50 µmol/L) 及び VPA

(100 µmol/L) については、前脳でのてんかん様活動に対する作用についても検討した。溶媒対照の曝露では、12 例の幼生中 10 例がてんかん様活動を示したが、フェンフルラミン又は VPA の曝露では 30 例の幼生中 1 例のみがてんかん様活動を示した。フェンフルラミン及び VPA は、ヒトの熱性発作モデルであるゼブラフィッシュの温熱刺激誘発性の異常も抑制した。

Tiraboschi 2020 は、*scn1lab* 遺伝子の両コピーに機能喪失変異 (*scn1Lab^{mut/mut}*) を有するドラベ症候群のゼブラフィッシュモデルを用いて、てんかん原性獲得期および反復発作が見られる時期の神経細胞の脱落を評価した。また、フェンフルラミンの抗てんかん活性及び疾患修飾活性の可能性を、特徴がよく解明されているベンゾジアゼピン系薬剤の ASM であるジアゼパムと比較し、評価した。さらに、行動解析及び脳波測定によって痙攣及びてんかん様放電を評価し、続いて 1 細胞 RNA Seq 解析、遺伝子導入によりレポーター遺伝子標識した γ-アミノ酪酸

(GABA) 作動性神経細胞の形態計測解析及び薬理学的プロファイリングを行った。

scn1Lab^{mut/mut} ゼブラフィッシュ幼生の痙攣及びてんかん様活動の頻度は野生型のゼブラフィッシュと比較して有意に増加した。また、*scn1Lab^{mut/mut}* 幼生では、野生型と比較し、GABA 作動性神経細胞の樹状突起形成及び細胞数の有意な減少と活性化アストロサイトの異常な増殖が示唆された。*scn1lab^{mut/mut}* 幼生における痙攣及びてんかん様活動の頻度は、フェンフルラミン及びジアゼパムいずれの処置でも減少した。しかし、樹状突起の減少は、フェンフルラミン処置により改善されたが、ジアゼパム処置では改善されなかった。また、フェンフルラミン処置は放射状グリアが多く存在する視蓋における細胞増殖マーカーの増加を野生型と同程度まで抑制した。この観察結果から、フェンフルラミンは痙攣及びてんかん様活動の抑制とは別に、有益な疾患修飾活性ももたらしことが示唆される。これらのデータは、ドラベ症候群の動物モデルにおけるフェンフルラミンの抗てんかん効果及び疾患修飾活性の可能性を示すものである。

[Dinday 2015](#) は、*scn1Lab* 遺伝子にホモ接合型変異 (*scn1Lab^{-/-}*) を有するドラベ症候群のゼブラフィッシュモデルを用いて、約 1000 の化合物ライブラリをスクリーニングした。化合物はすべて 100 $\mu\text{mol/L}$ の濃度で検討された。AED のスクリーニングの第 1 段階として自発運動の追跡測定を行い、スクリーニングの第 2 段階として脳波活動の測定を行った。検討した化合物のうち、ジメタジオンが自発運動及び electrographic seizure を抑制した。追加でフェンフルラミン及びフペルジン A の 2 化合物について、別々に、自発運動評価及び脳波活動の測定を行った。フェンフルラミンは、100~500 $\mu\text{mol/L}$ の濃度で自発運動を抑制し、500 $\mu\text{mol/L}$ の濃度で対照と同程度まで electrographic seizure を抑制した。フペルジン A は、検討したいずれの濃度においても自発運動及び electrographic seizure を変化させなかった

[Sourbron 2016](#) 及び ZX008-P1-001A 試験でも、ホモ接合型 *scn1Lab^{-/-}* 遺伝子変異を有するドラベ症候群のゼブラフィッシュモデルを用いたことが報告されている。幼生の自発運動の自動化評価を行い、フェンフルラミン、シグマ-1 受容体の正のモジュレーター、並びに選択的な 5-HT1D、5-HT1E、5-HT2A、5-HT2C 及び 5-HT7 アゴニスト (いずれも個別に投与) が、受精後 7 日の遺伝子変異を有するゼブラフィッシュで観察された自発運動の亢進を有意に低下させることを示した。遺伝子変異を有するゼブラフィッシュ幼生の前脳で局所場電位測定を行っててんかん様事象を評価し、フェンフルラミン、シグマ-1 受容体の正のモジュレーターとして並びに 5-HT1D、5-HT2A 及び 5-HT2C アゴニストすべてがてんかん様事象の頻度及び持続時間を抑制することを確認した。これらのデータは、ドラベ症候群モデルにおいてフェンフルラミンがてんかん様活動を抑制することを示しており、またこの作用の一部は、シグマ-1 受容体に対する正のモジュレーターとしての作用、並びに 5-HT1D、5-HT2A 及び 5-HT2C 受容体の活性化を介するものである可能性を示唆している。

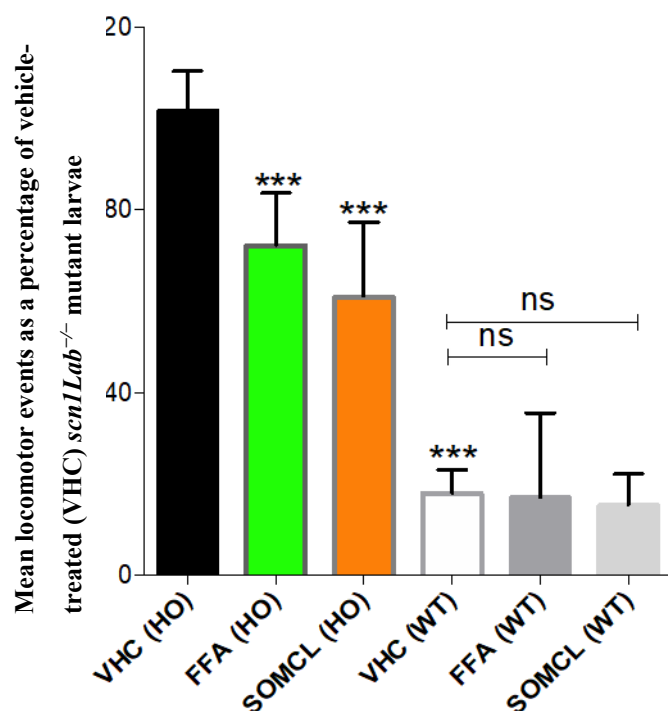
[Sourbron 2017](#) は、この試験を進展させ、ホモ接合型 *scn1Lab^{-/-}* 遺伝子変異を有するドラベ症候群のゼブラフィッシュモデルにおいて、フェンフルラミンによる痙攣及びてんかん様活動の障害は、5-HT1D 及び 5-HT2C の受容体アンタゴニストによって抑制されることを明らかにした。フェンフルラミンによる痙攣及びてんかん様活動の障害は 5-HT2A 受容体アンタゴニストによっても抑制される傾向が見られたが、統計学的に有意ではなかった。この結果は、フェンフルラミ

ンによる抗発作活性及び抗てんかん活性は、5-HT1D 及び 5-HT2C 受容体に対する部分的な作動性作用を介するものであることを示している。

Sourbron 2017 の同モデルでは、シグマ-1 受容体アンタゴニストの NE-100 はてんかん様活動を低下させ、シグマ-1 受容体アゴニストの PRE-084 はてんかん様活動に対して様々な作用を示しており、一貫した観察結果が得られなかった。しかし、2.6.2.2.1.3 項でも記述したように、シグマ-1 受容体リガンドの特徴はベル型で二相性の用量-反応曲線を示す (Rousseaux 2016)。ベル型の用量-反応曲線に関与する機序はよく理解されていないため、シグマ-1 受容体リガンドのアゴニスト又はアンタゴニストとしての作用について相矛盾する結果が報告されている。Sourbron 2017 が報告した一貫していない観察結果を解明するため、*scn1Lab*^{-/-}遺伝子変異を有するゼブラフィッシュを用いて、シグマ-1 受容体の正のモジュレーターとしての作用 (SOMCL-668) がてんかん様活動に及ぼす影響の有無を直接評価する試験を実施した ([ZX008-P1-001A]試験)。

図 2.6.2-3 に示すように、*scn1Lab*^{-/-}遺伝子変異を有するゼブラフィッシュの前脳で局所場電位測定を行ったところ、SOMCL-668 は自発運動の亢進及びてんかん様事象の頻度を有意に抑制した。この結果は、ドラベ症候群のゼブラフィッシュモデルにおいてシグマ-1 受容体の正のモジュレーターとしての作用が抗てんかん活性をもたらすことを示している。このことは、ドラベ症候群に対するフェンフルラミンの効果は、部分的には、シグマ-1 受容体に対する正のモジュレーターとしての作用を介するものであるとの知見と一致する (Martin 2021)。

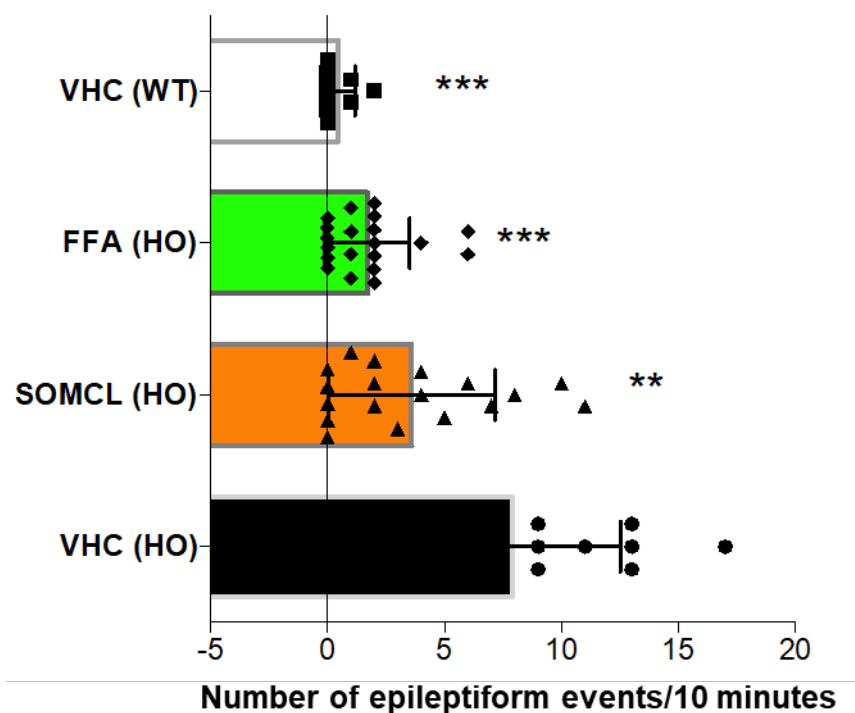
図 2.6.2-3a *scn1Lab*^{-/-}遺伝子変異を有するゼブラフィッシュ幼生においてシグマ-1 受容体の正のモジュレーターとしての作用 SOMCL-668 は自発運動の亢進を抑制した



Locomotor Activity. Treatment with SOMCL-668 (SOMCL) or racemic fenfluramine (FFA) decreases the hyperlocomotor activity of 7 dpf *scn1Lab*^{-/-} mutants (HO), but not wild-type (*scn1Lab*^{+/+}, WT). Locomotor activity was normalized against VHC-treated *scn1Lab*^{-/-} mutant larvae and is displayed as percentage \pm standard deviation (SD). N = 30 to 60 zebrafish larvae for all experimental groups.

Within the homozygous *scn1Lab*^{-/-} groups (indicated by “HO”), the statistical significance of the FFA (HO) and SOMCL (HO) treatment groups are compared to the vehicle-treated (VHC HO) group. For the vehicle-treated wild-type (VHC WT) group, the statistical significance is likewise compared to the vehicle-treated homozygous *scn1Lab*^{-/-} group. For the wild-type (*scn1Lab*^{+/+}) treatment groups, the statistical significance of the FFA (WT) and SOMCL (WT) groups are compared to the vehicle-treated wild-type group (VHC WT) group. Statistical significance by ANOVA followed by Dunnett multiple comparison test is represented by asterisks: **p* < 0.05, ***p* < 0.01, and ****p* < 0.001. “No statistical difference” is left blank or is shown by “ns.”

図 2.6.2-3b *scn1Lab*^{-/-}遺伝子変異を有するゼブラフィッシュ幼生においてシグマ-1 受容体の正のモジュレーターとしての作用 SOMCL-668 は自発運動の亢進を抑制した



Epileptiform Events. Treatment with SOMCL-668 (SOMCL) or racemic fenfluramine (FFA) reduces the epileptiform brain activity of 7 dpf *scn1Lab*^{-/-} mutants (HO). All data points are shown. The bars represent the mean number of epileptiform events (during 10 minutes of recording) of homozygous *scn1Lab*^{-/-} mutants (HO) or wild-type *scn1Lab*^{+/+} (WT) treated with vehicle (VHC) or SOMCL or FFA. The error bars indicate standard deviation (SD). N = 9 to 20 zebrafish larvae for all experimental conditions. Within the homozygous *scn1Lab*^{-/-} groups (indicated by “HO”), the statistical significance of the FFA (HO) and SOMCL (HO) and VHC (HO) treatment groups are compared to the vehicle-treated wild-type group (VHC WT) group. Statistical significance by Mann-Whitney U-test is represented by asterisks: **p* < 0.05, ***p* < 0.01, and ****p* < 0.001.

ドラベ症候群のゼブラフィッシュモデルを用いた研究を総合すると、ゼブラフィッシュで観察される自発運動の亢進、てんかん様事象の頻度及び樹状突起形成がフェンフルラミンにより抑制されることが明らかとなった。さらに薬理試験では、発達性てんかん性脳症の動物モデルで認められるフェンフルラミンの活性は、5-HT1D、5-HT2A 及び 5-HT2C 受容体に対する作動性作用、並びにシグマ-1 受容体に対する正のモジュレーターとしての作用と一致することが示された。

2.6.2.2.3.2 マウス発作モデルに対する作用

文献：Wong 2017；Rodríguez-Muñoz 2018；Hatini 2020；Martin 2020

Wong 2017 は、PTZ 誘発性発作に対するフェンフルラミン及び 5-HT_{2A} 受容体アゴニストである DOI の活性を評価した。発達性てんかん性脳症の 2 種類の *SCN1A* 変異マウスモデル、すなわち *Scn1a*^{+/-}ノックアウトマウス（ドラベ症候群のモデル）及び R1648H 変異を有するヒト *SCN1A* 遺伝子を導入したノックインマウス（全般てんかん熱性けいれんプラスのモデル）において発作を誘発した。

いずれの変異マウスにおいてもフェンフルラミンにより PTZ 誘発性強直性間代性初回発作までの潜時が延長した。5-HT_{2A} 受容体アゴニスト DOI の試験においても PTZ 誘発性発作に対する抵抗性が増し、双方の *SCN1A* 変異マウスで 6 Hz 誘発性発作及び MES という 2 種類の発作誘発指標に対する有効性が示された。

Wong 2017 による試験の結果、PTZ チャレンジアッセイでのドラベ症候群のマウスモデルにおけるフェンフルラミンの抗発作活性が明らかになった。フェンフルラミンは 5-HT_{2A} 受容体に対する結合能を有しており、フェンフルラミンによる発作抑制は、部分的に 5-HT_{2A} 受容体を介しているとした Sourbron 2016 の知見を裏付けるものでもある。

Rodríguez-Muñoz 2018 は、CD-1 マウスを用いて、NMDA 誘発性発作に対する dexfenfluramine 及び nordexfenfluramine の阻害効果を検討した。発作は、モルヒネを脳室内投与し、24 時間後に NMDA を脳室内投与することにより、6~9 匹のマウス群に誘発した。モルヒネ投与は、発作を誘発するために必要な NMDA の投与量を少なくする目的で、マウスをプライミングするために行った。Dexfenfluramine 及び nordexfenfluramine は、NMDA 投与の 30 分前にそれぞれ 3 nmol を脳室内投与した。モルヒネと NMDA の投与により、強迫性立ち上がり、自発運動の亢進、間代性痙攣、強直性発作及び死亡が誘発された。Dexfenfluramine 及び nordexfenfluramine は、発作潜時を延長し、発症期間を短縮し、NMDA 誘発性の死亡を予防した。また、セロトニン 5-HT_{2A} 受容体アンタゴニストである 4F 4PP (3 nmol) の脳室内投与により、dexfenfluramine 及び nordexfenfluramine の NMDA 誘発性発作に対する抑制効果は、部分的に阻害された。以上の結果より、dexfenfluramine 及び nordexfenfluramine は、部分的に 5-HT_{2A} 受容体を介して NMDA 誘発性発作を抑制することが示された。

Hatini 2020 は、5-HT_{1D} 受容体アゴニストである GR 46611 を用いて、ドラベ症候群のマウスモデルの発作閾値及び生存期間に対する 5-HT_{1D} 受容体の関与を検討した。生後 18±1 日齢 (PND) のドラベ症候群マウスにおいて温熱刺激により発作を誘発した。PND 21 に GR 46611 を投与し、その 20 分後に温熱誘発性発作の閾値を評価した。GR 46611 により、温熱誘発性発作の閾値は有意に上昇し、発作の重症度は抑制された。ドラベ症候群マウスに PND18~32 まで GR 46611 1 mg/kg を毎日腹腔内投与したところ、溶媒を投与した対照マウスと比較して、生存期間が有意に延長した。これらの結果は、5-HT_{1D} 受容体アゴニストを介して、温熱刺激誘発性発作の閾値は上昇し、発作の重症度は低下し、生存期間は延長することを示すものである。この

試験ではフェンフルラミンの作用は検討されていないが、これらの結果から、ドラベ症候群に対して 5-HT_{1D} 受容体アゴニストは有益である可能性が示された。

Martin 2020 は、シグマ-1 受容体依存性の学習及び記憶モデルにおけるフェンフルラミンの作用を評価した。この *in vivo* マウスモデルにおいてジゾシルピンで学習障害を誘発し、自発的交替行動試験及びステップスルー型受動的回避反応試験を行ってフェンフルラミンを評価した。この 2 種類の試験における行動はシグマ-1 により変化することから、シグマ-1 受容体に対する化合物の作用を評価するモデルとして使用されている (Maurice 1994)。自発的交替行動試験及び受動的回避反応試験いずれにおいても、ジゾシルピン誘発性学習障害に対するシグマ-1 受容体アゴニスト PRE-084 の改善作用は、低用量のフェンフルラミン (0.3 及び 1.0 mg/kg) により有意に強化された。また、両試験においてフェンフルラミンと PRE-084 を併用したときの作用は、シグマ-1 受容体アンタゴニストの NE-100 によっていずれも阻害され、シグマ-1 受容体が関与する薬理作用が確認された。この結果は、フェンフルラミンが *in vivo* でシグマ-1 受容体に対する正のモジュレーターとして作用することを確認するものである。

2.6.2.2.3.3 ラット発作モデルに対する作用

文献 : Buterbaugh 1978 ; Lazarova 1983a ; Lazarova 1983b

Buterbaugh 1978 は、雄性 Sprague-Dawley (SD) ラット (各群 n = 6~8) に、薬剤無処理で最大電気ショック刺激を与え、発作発射の拡散の指標と解釈される強直性後肢屈曲伸展反応に応答する伸筋ラットと後肢伸展を発作として示さない非伸筋ラットを選別後、試験した。後肢伸展は、フェンフルラミン、5-HTP、フルオキセチン、5-MeO-DMT、シプロヘプタジン及びメチセルジドによって阻害されたが、レセルピン、pCA、pCPA、又は α -MPT によっては阻害されなかった。セロトニンを枯渇させる pCPA で伸筋ラットを前処理することにより、フェンフルラミン、pCA、フルオキセチン及びシプロヘプタジンの後肢伸展阻害効力は完全に無効にされた。これらの結果は、フェンフルラミンはセロトニンを介して作用し、最大電気ショック刺激に起因する発作の後肢伸展の阻害に一翼を担うことを示している。

Lazarova 1983a は、PTZ 誘発性発作に対する dexfenfluramine 及びクロニジンの保護効力を比較した。PTZ 誘発性発作は、雄性 SD 系 (CD-COBS) ラットに 90 mg/kg の PTZ を皮下投与して誘発した。PTZ の投与量は、動物の約 50%が強直性又は間代性発作を示し、PTZ 誘発性発作の増強及び減少が評価できるように選択された。ラット (各群 n \geq 15) には、PTZ 投与 30 分前に、クロニジン塩酸塩 (0.01、0.1、0.5 若しくは 1.0 mg/kg) 又は dexfenfluramine 塩酸塩 (5 mg/kg) を腹腔内投与した。対照群には生理食塩水を等液量投与した。初回痙攣までの潜時、強直性発作、全般性間代性発作及び 1 時間以内の死亡率などのパラメータを評価した。クロニジンは 0.5 mg/kg の投与量で、初回痙攣までの潜時を有意に延長し、PTZ 誘発性の強直性発作及び死亡率を抑制したが、0.01 及び 0.1 mg/kg の投与量では、これらの作用は認められなかった。クロニジンは 1.0 mg/kg の投与量で、0.5 mg/kg の投与量と類似した効果を示したが、強直性発作を抑制しなかった。一方、dexfenfluramine は初回痙攣までの潜時を変化させなかったが、強直性発作を

有意に抑制し、PTZ 誘発性の死亡を完全に阻害した。クロニジン及びフェンフルラミンの類似性より、セロトニンが PTZ 誘発性発作の抑制に関与していることが示唆された。

[Lazarova 1983b](#) は、PTZ (90 mg/kg) をラットに皮下投与して誘発した発作に対する、VPA (2-プロピルペンタン酸) 及び dexfenfluramine の抗痙攣効果を検討した。ラット (各群 $n \geq 15$) に、PTZ 誘発性発作の 30 分前に、(a) dexfenfluramine 1.25 mg/kg、(b) VPA 75 mg/kg、又は (c) dexfenfluramine 1.25 mg/kg 及び VPA 75 mg/kg の両方を腹腔内投与した。VPA も dexfenfluramine も単独では、初回痙攣までの潜時、強直性発作を示すラットの割合、間代性発作を示すラットの割合及び 1 時間以内に死亡するラットの割合を変化させなかった。しかし、VPA 及び dexfenfluramine を併用投与すると、PTZ 誘発性の強直性発作は抑制された。著者らは、両薬剤が協調して GABA 及びセロトニンなどの経路を活性化して、強直性発作を抑制する可能性を示唆している。しかし、両薬剤の間の薬力学的又は薬物動態学的相互作用を裏付ける、さらなる文献は見つからなかった。

2.6.2.2.3.4 発作モデルにおけるシグマ-1 受容体の作用

文献 : [Guo 2015](#) ; [Vavers 2017](#)

マウスのシグマ-1 受容体遺伝子を欠失させると、痙攣誘発性化学物質である PTZ 及びピククリン (BIC) 誘発性発作の閾値が低下する。特に、シグマ-1R^{-/-}マウスでは、より少ない PTZ 及び BIC で強直性発作が発現する ([Vavers 2021](#))。この結果は、正常レベルの神経興奮を維持するには、シグマ-1 受容体の機能が必要であることを示している。

シグマ-1 受容体の正のモジュレーターとしての作用については、ドラベ症候群のゼブラフィッシュモデルにおける発作抑制作用 (2.6.2.2.3.1 項) の他に、4 種類のでんかん動物モデルにおいても抗発作活性が示されている。抑制される発作の型は、強直性発作、間代性発作、ミオクロヌス発作及び全般性強直性間代性発作 (GTC) である。試験で用いたげっ歯類モデル、各モデルの発作の型、対応する臨床での発作及びドラベ症候群患者における当該型の発作の有無を表 2.6.2-5 に示す。これら動物モデルで観察される発作型のほとんどがドラベ症候群患者でも認められる。

表 2.6.2-5 動物モデルにおける発作との対応

Animal model	Animal seizure phenotype ^{a, b}	Clinical seizure correlate ^{a, b}	Clinical seizure correlate present in Dravet syndrome ^c
MES	Tonic extension of forelimbs and hind limbs, followed by all-limb clonus	GTCs	Yes
PTZ	Myoclonic jerks followed by unilateral forelimbs and bilateral clonus, vibrissae twitching	Generalized myoclonic, clonic, GTCs, and spike-wave seizures	Yes
Kainate SE	Clonic seizures followed by body clonus, death	Focal seizures with complex symptomatology and secondary generalization from the limbic focus	Yes, but less common
BIC	Forelimb clonus followed by tonic seizures of the full body	GTCs	Yes

Abbreviations: BIC = Bicuculline; GTC = Generalized Tonic-Clonic Seizure; MES = Maximal Electroshock Seizure; PTZ = Pentylenetetrazol; SE = Status Epilepticus

^aBarker-Haliski 2020

^bLöschner 2011

^cDravet 2011

Guo 2015 は、3 種類のてんかんモデルを用いてシグマ-1 の正のモジュレーターである SKF83959 及び SOMCL-668 が及ぼす作用を評価した。最初のマウス MES モデルでは全般性強直性発作 (GTS) 誘発の閾値を評価した。電気ショック誘発性の GTS に対して有効な薬剤の多くは、ヒトの部分発作及び強直性間代性発作にも有効である。MES 試験の前に SKF83959 又は SOMCL-668 を投与すると、GTS の閾値は有意に上昇した。

2 つ目のマウスてんかんモデルでは、PTZ 誘発性発作に対する SKF83959 及び SOMCL-668 の作用を評価した。PTZ 誘発性発作は抗発作薬の評価に広く使用されている。PTZ 誘発性発作を抑制する薬剤は、ヒトの間代性発作に対して有効であることが明らかになっている。PTZ による発作誘発前に SKF83959 又は SOMCL-668 を投与すると、間代性発作及び GTC までの潜時が延長し、発作スコアが低下し、生存期間が延長し、死亡率が低下した (Guo 2015)。

3 つ目のマウスてんかんモデルでは、カイニン酸の腹腔内投与により誘発したてんかん重積 (SE) に対する SKF83959 及び SOMCL-668 の作用を評価した。診療ではてんかん重積に対して集中治療が必要となることが多く、また従来の ASM には抵抗性の例も多い。このモデルも、予測通り、広く使用されている抗てんかん薬である VPA には抵抗性であった。VPA での結果とは対照的に、SKF83959 又は SOMCL-668 の投与後に発作までの潜時の延長、発作持続時間の短縮、発作の平均的重症度の改善及び死亡率の低下が認められた (Guo 2015)。

上述のモデルにおける SKF83959 及び SOMCL-668 の活性がシグマ-1 受容体に媒介されるものであったことを確認するため、シグマ-1 受容体アンタゴニスト BD1047 の存在下で SKF83959 及び SOMCL-668 の抗発作活性を評価した。3 つの発作モデルいずれにおいても、シグマ-1 受容体アンタゴニストの存在下において SKF83959 及び SOMCL-668 両方の効果が消失したことから、抗発作活性はシグマ-1 受容体との相互作用に媒介されることが確認された (Guo 2015)。

GABA アンタゴニストの PTZ 及び BIC により誘発した強直性間代性発作に対してシグマ-1 受容体の正のモジュレーターである E1R が及ぼす作用を評価した。PTZ による発作誘発前に E1R を投与したところ、PTZ 誘発性強直性間代性発作の閾値が用量依存性に有意に上昇した。同様に、BIC による発作誘発前に E1R を投与しても、BIC 誘発性強直性間代性発作の閾値は有意に上昇した。シグマ-1 受容体が E1R の活性を媒介することを確認するため、シグマ-1 受容体アンタゴニスト NE-100 の存在下で E1R の抗発作活性を評価した。シグマ-1 受容体アンタゴニストの存在下では PTZ 誘発性発作に対する E1R の効果は消失し、E1R の抗発作活性はシグマ-1 受容体の活性に媒介されるものであることが示された (Vavere 2017)。

以上のような *in vivo* での結果から、各種発作モデルにおいてシグマ-1 受容体の正のモジュレーターとしての作用は有意な抗発作活性を示し、ドラベ症候群において重要な各型の発作を抑制することが明らかになった。

てんかんモデルにおけるシグマ-1 受容体の役割を表 2.6.2-6 にまとめる。結合試験、受容体機能アッセイ及び *in vivo* モデルの結果を総合すると、フェンフルラミンが発作を抑制する機序の一部にシグマ-1 受容体に対する正のモジュレーターとしての作用があることが示唆される。

結論として、添付文書にフェンフルラミンのセロトニン作動性作用とシグマ-1 受容体を介した作用機序の両方を記載することにより、フェンフルラミンの有効性及び安全性に関してより正確な情報を提供できるものとする（表 2.6.2-6）。

表 2.6.2-6 発作及びてんかん発症におけるシグマ-1 受容体の役割とシグマ-1 受容体に対するフェンフルラミンの作用

Model	Molecular Mechanism and Results	Reference or Study Report
Dravet syndrome zebrafish model	Inhibition of epileptiform activity by administration of the sigma-1 receptor positive modulator SOMCL-668.	[ZX008-P1-001A]
Sigma-1 receptor genetic deletion and seizure threshold	Mice genetically deleted of sigma-1 receptor have increased susceptibility (reduced threshold) to the chemo-convulsant agents PTZ and BIC.	Vavers 2021
MES model in mice	Inhibition of seizure activity by administration of the sigma-1 receptor positive modulators SKF83959 or SOMCL-668. Antiseizure activity of SKF83959 and SOMCL-668 blocked by the sigma-1 receptor antagonist BD1047.	Guo 2015
PTZ-induced seizure model in mice	Inhibition of seizure activity by administration of the sigma-1 receptor positive modulators SKF83959 or SOMCL-668. Antiseizure activity of SKF83959 and SOMCL-668 blocked by the sigma-1 receptor antagonist BD1047.	Guo 2015
Kainate acid-induced SE model in mice	Inhibition of seizure activity by administration of the sigma-1 receptor positive modulators SKF83959 or SOMCL-668. Antiseizure activity of SKF83959 and SOMCL-668 blocked by the sigma-1 receptor antagonist BD1047.	Guo 2015
PTZ- and BIC-induced seizure models in mice	Inhibition of seizure activity by administration of the sigma-1 receptor positive modulator E1R. Antiseizure activity of E1R blocked by the sigma-1 receptor antagonist BD1047.	Vavers 2017

Abbreviations: BIC = Bicuculline; MES = Maximal Electroshock Seizure; PTZ = Pentylenetetrazol; SE = Status Epilepticus

2.6.2.2.4 効力を裏付ける試験の結論

効力を裏付ける試験から得た総合的データから、フェンフルラミンはセロトニンを放出させ、5-HT1D、5-HT2A 及び 5-HT2C 受容体に対して作動性作用を及ぼし、またシグマ-1 受容体に対して正のモジュレーターとして作用することにより、発作を抑制することが示唆される。フェンフルラミンの活性代謝物である norfenfluramine も 5-HT2A 及び 5-HT2C 受容体に対して作動性作用を及ぼすことが示された。

申請するフェンフルラミンの作用機序は、現在ドラベ症候群の治療薬として日本や世界の他の国で使用されている ASM のものとは大きく異なっている。現在ドラベ症候群の治療薬として承認されている又は広く使用されている ASM のうち、セロトニン作動性の機序又はシグマ-1 受容体に対する正のモジュレーターとしての作用により効果をもたらす薬剤は他にはない（Löscher 2016; Rosenberg 2017）。

ドラベ症候群患者の多くは、多剤療法を受けているにも関わらず、発達や日常生活機能に支障を来す難治性の発作を引き続き発症し、現在使用できる薬剤で頻発する有害事象を経験する患者も多い。さらに、ドラベ症候群患者では転倒、損傷及び認知障害が頻繁に認められ、生活の質が制限される。

以上のようなデータから、とりわけ新規作用機序を備え、薬物相互作用が限定的で、認知機能の増悪がない選択肢は、ドラベ症候群の患者やその介護者にとっての喫緊のアンメットメディカルニーズである。フェンフルラミンは、ドラベ症候群の治療薬として使用されている他のASMとは異なる新規の作用機序を有しており、新たな治療選択肢として期待される。

2.6.2.3 副次的薬理試験

フェンフルラミンの薬理作用に関連した影響の多くについては、2.6.2.4 項の安全性薬理試験に記載した。

フェンフルラミンは脳内でノルエピネフリンを放出し、 β アドレナリン受容体に直接親和性を示す。一方、dexfenfluramine 異性体は線条体のアセチルコリンを上昇させるが、levofenfluramine 異性体は上昇させない (Garattini 1978)。フェンフルラミンは、セロトニン作動性の作用機序を介して、間接的にドーパミンの放出を増加させると考えられている (Rothman 2009)。

Norfenfluramine はムスカリン性 M_1 受容体と中程度の相互作用を示す ([XS-0691]試験)。

ラットのプロラクチン（主に脳下垂体前葉のプロラクチン分泌細胞から分泌されるホルモン）及びコルチコステロン（副腎皮質ホルモン）に対するフェンフルラミンの副次的薬理作用について、2.6.2.3.1 項に記載した。

2.6.2.3.1 プロラクチン及びコルチコステロン分泌に対する作用

文献：Van de Kar 1985

フェンフルラミンは、ラットの血漿中プロラクチン及びコルチコステロン濃度の投与量依存的な上昇を引き起こした。フェンフルラミンの腹腔内投与 30 分後に血漿中プロラクチン濃度は最大の上昇を示したが、コルチコステロン濃度は投与 2 時間後に最大の上昇を示した。フェンフルラミン (5 mg/kg) の腹腔内投与 30 分前に、ラットにセロトニン再取り込み阻害薬であるインダルピン (10 mg/kg) を腹腔内投与して前処理すると、表 2.6.2-7 に示すように、インダルピンは血漿中プロラクチン濃度に対するフェンフルラミンの効果を阻害したが、血漿中コルチコステロン濃度には影響しなかった。さらに、視床下部のセロトニン含有量を増加させる L-トリプトファン (100 mg/kg) を腹腔内投与して前処理すると、血漿中プロラクチン濃度に対する最大下投与量のフェンフルラミン (2 mg/kg) の腹腔内投与の効果を増強したが、コルチコステロン濃度には影響しなかった。

これらの結果は、フェンフルラミンが、セロトニン作動性機序を介してプロラクチン分泌を刺激するが、コルチコステロンに対する効果はセロトニンによって仲介されないことを示してい

る。血漿中のプロラクチン及びコルチコステロン濃度の変化と、臨床症状との関連は不明である。

表 2.6.2-7 フェンフルラミンによるプロラクチン及びコルチコステロン分泌に対するインダルピン前投与の効果（平均値±標準誤差）

	Prolactin (ng/mL)		Corticosterone (µg/mL)	
	Saline	Indalpine	Saline	Indalpine
Saline	3.9 ± 1.0	10.5 ± 3.9	0.009 ± 0.002	0.017 ± 0.001
Fenfluramine	79.1 ± 15.7 ^a	35.9 ± 8.8 ^{a,b}	0.032 ± 0.006 ^a	0.033 ± 0.004 ^a

Abbreviations: ANOVA = Analysis of Variance; SEM = Standard Error of the Mean

^aSignificant difference from the corresponding saline group ($p < 0.05$; ANOVA and Duncan's multiple-range test).

^bSignificant difference from the corresponding indalpine-pretreated group ($p < 0.05$; ANOVA and Duncan's multiple-range test).

2.6.2.4 安全性薬理試験

ICH S7A/B ガイダンスで規定されている安全性薬理試験については、毒性試験において安全性薬理のエンドポイントは評価しており、これらのデータをもって非臨床安全性薬理データは十分に得られていると考えている。また、臨床試験でも安全性に関する問題は認められていない。

CNS、心血管系及び呼吸器機能に対するフェンフルラミンの作用は Zogenix 社が実施した非臨床試験にて評価している。既発表文献中の安全性薬理試験又は [Pondimin](#) [(±)-フェンフルラミン塩酸塩] 及び [Redux](#) (dexfenfluramine) に関する SBA において報告された安全性薬理試験において、CNS、心血管系、呼吸器系、消化器系及び泌尿生殖器系に対するフェンフルラミンの有害な作用は認められなかった。

したがって、非臨床安全性薬理試験を追加する必要はないと考えられた。フェンフルラミンの非臨床安全性薬理試験結果については本項に記載しており、さらにこれらの結果は[\[2.7.4\]](#)項に要約したように、小児及び成人患者の広範な臨床安全性データベースによって裏付けられていることから、ICH S7A/B ガイダンスに含まれる hERG アッセイについては、実施しなかった。

フェンフルラミンによる QT/QTc 間隔延長及び催不整脈リスクは確認されていない。Zogenix 社は健康成人を対象とする TQT 試験 ([\[ZX008-1603\]](#)試験) を実施した。この試験では、フェンフルラミン（別名フィンテブラ及び ZX008）による QT 間隔延長のリスクは認められなかった。したがって、TdP、心室性頻脈、心室細動及び心臓突然死のリスクはないと考えられた。

健康成人を対象とした ZX008-1603 試験では、健康成人に治療用量 [30 mg/日、15 mg を 1 日 2 回 (BID)] 及び治療用量を超える用量 (120 mg/日、60 mg BID) の ZX008 を反復経口投与したときの Fridericia 法により心拍数で補正した QT 間隔 (QTcF) への影響を評価した。

ZX008 15 mg 及び 60 mg の反復投与時の定常状態におけるフェンフルラミンの総曝露量

($AUC_{\tau,ss}$) 及び最高血中濃度 ($C_{max,ss}$) の幾何平均値を比較した結果、ZX008 60 mg BID 投与群が ZX008 15 mg BID 投与群の約 5.2 倍の高値を示した。Norfenfluramine の $AUC_{\tau,ss}$ 及び $C_{max,ss}$ の幾何平均値は、ZX008 60 mg 投与群が ZX008 15 mg 投与群の約 4.2 倍の高値を示した。

Norfenfluramine とフェンフルラミンで比較した総曝露量及び最高濃度の未変化体に対する代謝物の濃度比 (MR) ($MR AUC_{\tau,ss}$ 及び $MR C_{max,ss}$) は両投与群で同程度であった。

この試験では、治療用量及び治療用量を超える用量のいずれにおいても、ZX008 の反復投与で QTcF 間隔は延長しなかったことから、ZX008 による QTc 間隔への有意な影響は認められなかった。また、フェンフルラミン及び norfenfluramine の曝露量と QTcF との関連性も認められなかった。この試験の対象の健康成人では、治療用量である 15 mg BID と治療用量を超える用量である 60 mg BID のいずれにおいても、ZX008 投与で良好な忍容性が認められた。

QT/QTc 間隔延長の潜在的可能性がないという結論は、Zogenix 社がドラベ症候群患者から得たフェンフルラミンの臨床データからも支持されている。この臨床データにより、フェンフルラミンの心血管系への安全性は十分に確立されている (試験[1]、試験[2]及び試験[3])。Zogenix 社は、3 試験で QT/QTc 間隔延長及び不整脈 [TdP、心停止、突然死、心室性不整脈 (心室性頻脈、心室細動など)] の発生状況を検討した。これらの試験では QT/QTc 間隔延長又は不整脈は確認されなかった。これらの試験結果を ZX008 の申請で提出する予定である。3 試験の QT/QTc 間隔データのカテゴリカル解析の結果は[ZX008-1603]試験に記載した。

ZX008 は、成人の肥満症の治療を目的とする食欲抑制剤として過去に広範に使用されているため、その安全性プロファイルの特徴は十分に明らかにされている ([Physicians' Desk Reference 1998](#))。今回の ZX008 のプログラムで検討している用量 (最高用量は STP 非併用下で 30 mg/日、STP 併用下で 20 mg/日) は、成人の肥満症に対して過去に処方された用量 (60~120 mg/日) よりも低い用量 (1/4~1/2) である。

フェンフルラミンが成人の肥満症の治療を目的として高用量で処方されたという経緯に基づき、米国 FDA の助言の下、プログラム全体を通して綿密かつ前向きな心臓モニタリングを実施した。そのため、ドラベ症候群患者を対象とした ZX008 の臨床試験では、心エコーによるモニタリングに加えて、定期的な心電図検査も実施した。二重盲検無作為化臨床試験期間では、スクリーニング、無作為化、6 週目及び試験終了の各時点で心電図検査を実施した。非盲検延長試験では、3 ヶ月間隔で心エコー検査を実施した。心電図データの解析では、TdP、心停止、突然死又は心室性不整脈 (心室性頻脈、心室細動) などの不整脈の徴候は確認されなかった。

これらの結果に基づき、TdP、心室性頻脈、心室細動及び心臓突然死のリスクはないと考えられる (詳細は[2.7.2.2.1.5]項[2.7.4.4.8.4]項参照)。

2.6.2.4.1 中枢及び末梢神経系

文献 : ([\[9000406\]試験、評価資料](#)) ; [Pondimin® SBA 153329A 1970](#) ; [Fornal 1983a](#) ; [Fornal 1983b](#) ; [Lewis 1971](#) ; [Foxwell 1969](#) ; [Tang 1971](#) ; [Vickers 2001](#)

幼若ラットを用いた、フェンフルラミン塩酸塩の 10 週間強制投与 GLP 毒性試験 (9000406 試験) の機能観察総合評価、驚愕反射、自発運動量、並びに学習及び記憶を含む神経行動学的評価結果について、[\[2.6.6.2.2\]](#)項に記載した。フェンフルラミン塩酸塩投与動物すべてに体温の低下、フェンフルラミン塩酸塩を投与したすべての雄に自発運動量の低下、20 mg/kg/日を投与し

た雄にアリーナでの立ち上がり行動回数の低下、並びに 9 及び 20 mg/kg/日を投与した雌雄に学習及び記憶の水迷路試験のパフォーマンスにおけるエラー数の増加などの神経行動学的能力に変化が認められた。これらの所見は、3.5 mg/kg/日以上を投与した雌雄におけるフェンフルラミンの過剰な薬理作用を示しており、回復期間の終了時に認められた所見は、効果の持続に起因すると考えられた。神経病理学的影響は認められておらず、これらの機能差は有害とはみなされなかった。

動物及びヒトにおける学習及び記憶の研究を含む神経毒性の可能性に関するデータの評価を [2.6.6.8.3.3]項に要約する。

Pondimin®の米国での医薬品の製造販売承認申請において実施された試験で、フェンフルラミンは、ネコにおいて、視床下部などの皮質下中枢に明らかな変化を伴わない皮質脳波の抑制を示した。フェンフルラミンは、イヌ及びラットにおいて鎮静効果を示したが、ウサギでは軽度の刺激効果を誘発した (Pondimin SBA 153329A 1970, p.70)。

フェンフルラミンは、ヒトにおいてレム睡眠を抑制し、深い睡眠から浅い徐波睡眠への移行を増加させた (Lewis 1971)。フェンフルラミンは、ラットにおいて同様の睡眠への影響を示したが (Fornal 1983a ; Fornal 1983b)、ネコの睡眠時間を増加させ (Foxwell 1969)、アカゲザルの睡眠時間には影響しなかった (Tang 1971)。

食欲抑制は、フェンフルラミンにおいて最もよく知られており研究されている薬理効果である。フェンフルラミン及び dexfenfluramine はいずれも、FDA が承認した食欲抑制剤であったが、心臓弁膜症との関連が原因で 1997 年に販売中止となった。既報文献における発現機序試験は、主にげっ歯類を用い、食欲抑制の発現機序の特定に集中した。試験では、フェンフルラミン及び norfenfluramine の食欲抑制効果が 5-HT_{2C} 受容体によって仲介されることが示された (Vickers 2001)。

2.6.2.4.2 心血管系

文献 : Redux® SBA 144590A 1996 ; Franko 1965 ; [01127008]試験

心毒性に関する文献情報については、弁膜症の発現機序に特に重点を置いて、[2.6.6.8.1]項に記載した。

動物及びヒトにおけるフェンフルラミン誘発性肺動脈高血圧症についての文献情報は、[2.6.6.8.2]項に記載した。

フェンフルラミンはイヌを用いた 13 週間の試験で評価され、その要約が Redux SBA (144590A 1996, p.405 及び 423) に記載されている。雌雄ビーグル犬 (各群、雄 n = 3、雌 n = 3) にフェンフルラミンの 10 mg/kg を 2 日間投与した後、1 日おきに 2 mg/kg 増量し、最大 20 mg/kg

(10 mg/kg 及び 20 mg/kg の投与量は、体表面積換算 (換算係数 1.8) は FDA 2005 で、それぞれ 5.6 及び 11.1 mg/kg のヒト投与量に相当する) まで漸増投与した。平均血圧、心拍出量、全末梢血管抵抗、肺末梢血管抵抗、1 回拍出量、心拍数、右心房圧及び血液ガスを測定した。雄の平

均肺動脈圧は、統計学的に有意に 12%減少した。雄では他のパラメータに有意な変化が認められず、雌では全く認められなかった。

心血管系に対するフェンフルラミンの影響は、[Franko 1965](#) によっても検討されている。雑種成犬（雌雄動物数は報告されていない）をフェノバルビタール（125 mg/kg を静脈内投与）で麻酔し、イヌ数匹（投与群数は報告されていない）に、フェンフルラミンの 1、2、4 若しくは 8 mg/kg を静脈内単回投与、又は 6 分おきに 2 mg/kg を合計 8 回静脈内反復投与した。さらに別のイヌに、フェンフルラミンの 5 又は 10 mg/kg を単回経口投与した後、心電図及び頸動脈血圧を測定した。心拍数はタコグラフで測定し、収縮力は心筋力トランスデューサーで測定し、上行大動脈からの心拍出量は電磁流量計で測定した。麻酔下のイヌのデータと比較するため、覚醒下のイヌの動脈圧も閉塞カフを使用して尾の付け根で測定した。血圧は、オシロスコープを使用して測定及び記録した。

フェンフルラミンの 1、2 又は 4 mg/kg を静脈内投与後、動脈圧には、短時間の降圧応答及びそれに続く長時間の大きな昇圧応答の二相性の変化が認められた。降圧期は投与量の増加とともに延長したが、いずれの投与量においても昇圧応答ほどの延長は認められなかった。フェンフルラミンの 2 mg/kg を 6 分おきに 8 回静脈内投与により、降圧期への影響は認められなかったが、昇圧応答は投与ごとに減少した。フェンフルラミンの経口投与後、投与量 5 mg/kg では血圧に変化は認められなかったが、投与量 10 mg/kg では、降圧応答には変化は認められなかったが昇圧応答は投与後 10 分で増加が認められた。昇圧応答は投与後 4 時間で溶媒対照と同程度まで低下した ([Franko 1965](#))。

フェンフルラミンの 8 mg/kg を静脈内投与後、降圧期間の心拍数は溶媒対照に比較して 4%減少したが、昇圧期間の心拍数は溶媒対照に比較して 16%増加した。5 mg/kg の経口投与によって、心拍数は変化しなかった。10 mg/kg の経口投与によって、溶媒対照を 23%上回る心拍数の最大増加が認められた。4 mg/kg 超の投与量の静脈内投与では、心機能に別の変化である TP 間隔（T 波の終わりから P 波の始まりまでの間隔）の短縮が認められた。心室収縮力及び大動脈流量は、投与量に関連して動脈圧とともに変化した。フェンフルラミンは、全末梢血管抵抗を増加させた ([Franko 1965](#))。

フェンフルラミンの 4 mg/kg を静脈内投与した覚醒下のイヌの動脈圧も 60 分間で平均 28%上昇した ([Franko 1965](#))。

GLP に適合したイヌ 43 週間反復投与毒性試験及び 28 日間回復性試験では、50/25 mg/kg/日の経口投与量までフェンフルラミン塩酸塩に関連した心電図パラメータ変化は認められなかった（01127008 試験、[\[2.6.6.3.2.1\]](#)項）。最高用量の 25mg/kg/日は、体表面積に基づくヒト用量の 13.5mg/kg/日に相当し、最高臨床用量の 0.8mg/kg/日のフェンフルラミン塩酸塩に対する安全係数は、フェンフルラミンで約 6 倍、norfenfluramine で約 34 倍であった。

以上の結果をまとめると、イヌ 43 週間 GLP 長期反復投与毒性試験では、心電図パラメータに変化は認められず、ZX008 の最高臨床用量に対する安全係数体表面積換算(換算係数 1.8, [FDA 2005](#))は、フェンフルラミンで約 6 倍、norfenfluramine で約 34 倍であった。[Franko 1965](#) の試験結果で

は、フェンフルラミンが血圧、心拍数、心筋収縮、心拍出量及び末梢血管抵抗を投与量依存的に増加させることが示されたが、5 mg/kg の経口投与では、血圧及び心臓への影響は認められていない。この 5 mg/kg の投与量は、体表面積換算(換算係数 1.8, [FDA 2005](#))で、2.7 mg/kg のヒト投与量に相当するため、フェンフルラミン塩酸塩の最高臨床用量 0.8 mg/kg/日に対する安全係数は、フェンフルラミンで等倍未満、norfenfluramine で 5 倍未満となる。

2.6.2.4.3 呼吸器系

文献：[Annerbrink 2010](#)；[\[01127008\]](#)試験；[Pondimin® SBA 153329A 1970](#)

[Annerbrink 2010](#) は、ラットの呼吸に対するセロトニン再取り込み阻害薬の効果を評価する試験を実施した。雄性 Wistar ラット 20 (各群 n = 10) に、生理食塩液又は dexfenfluramine の 5 mg/kg を単回腹腔内投与した。呼吸数 (回/分)、1 回換気量 (mL/呼吸) 及び分時換気量 (mL/分) は、プレチスモグラフで測定した。Dexfenfluramine は呼吸数を減少させ、1 回換気量を増加させたが、分時換気量に影響は認められなかった。5 mg/kg の投与量は、体表面積換算で、0.8 mg/kg のヒト投与量に相当し、フェンフルラミン塩酸塩の最高臨床用量に相当する。

GLP に適合したイヌ 43 週間反復投与毒性試験及び 28 日間回復性試験では、雌雄いずれの投与量においても、フェンフルラミン塩酸塩に関連した呼吸器系への有害な影響が示唆される一般状態の明らかな変化は認められなかった。浅速呼吸がフェンフルラミン塩酸塩 30/20 mg/kg/日を投与した雌及びフェンフルラミン塩酸塩 50/25 mg/kg/日を投与した雌雄に認められたが、有害な作用とは判断されず、回復期間中に完全に消失した ([01127008 試験](#)、[\[2.6.6.3.2.1\]](#)項)。

イヌでは、フェンフルラミンの単回投与 (1~10 mg/kg を静脈内投与又は 5~10 mg/kg を経口投与) により、呼吸数がわずかに減少し、その後、投与後の時間の経過とともに増加した。この変化は、有害とは判断されなかった。5 及び 10 mg/kg の経口投与量は、体表面積換算で、それぞれ 2.7 及び 5.6 mg/kg のヒト投与量に相当する ([Pondimin SBA 153329A 1970, p. 71](#))。

2.6.2.4.4 消化管及び泌尿生殖器系

文献：[Pondimin® SBA 153329A 1970](#)

フェンフルラミンの他の器官への影響に関する臨床安全性データについては、[\[2.7.4\]](#)項で詳しく説明している。

イヌでは、フェンフルラミン塩酸塩の単回投与 (1~10 mg/kg を静脈内投与又は 5~10 mg/kg を経口投与) により、腸の運動性及び尿流量がわずかに減少し、その後増加するという二相的な変化がみられたが、この変化は、有害とは判断されなかった ([Pondimin SBA 153329A 1970, p.71](#))。5 及び 10 mg/kg の経口投与量は、体表面積換算で、それぞれ 2.7 及び 5.6 mg/kg のヒト投与量に相当する。フェンフルラミン塩酸塩の最高臨床用量 0.8 mg/kg に対するフェンフルラミン及び norfenfluramine の安全係数は、5 mg/kg/日でそれぞれ等倍未満及び 5 倍未満、10 mg/kg/日でそれぞれ 2 倍未満及び 13 倍未満となる。

2.6.2.5 薬力学的薬物相互作用試験

文献：[Kilpatrick 2001](#)；[Leonardi 1994](#)；[Hekmatpanah 1990](#)；[Grottick 2015](#)

ドラベ症候群の治療に使用される標準的な ASM には、VPA、クロバザム、トピラマート、並びに STP のクロバザム及び VPA との併用投与などがある。これらの ASM は、GABA の伝達を変化させ、VPA 及びトピラマートは、イオンチャネルにも作用する可能性がある。スチリペントールは、CYP 酵素を阻害することによって作用し、これらの酵素によって代謝される他の ASM 濃度を間接的に上昇させる (Patsalos 2016)。

ドラベ症候群の治療のために併用して使用される ASM など、他の薬剤とフェンフルラミンの臨床薬力学的薬物相互作用については、[2.7.2.3]項に記載している。

フェンフルラミンが MAO を介して他の薬剤と相互作用する可能性については、Kilpatrick 2001 及び Leonardi 1994 によって検討された。フェンフルラミンは、ラット脳中の MAO (Kilpatrick 2001)、並びにラット脳ホモジネート中の MAO-A 及び MAO-B (Leonardi 1994) に対して阻害効果を示さなかった。したがって、フェンフルラミンは MAO への作用を介して他の薬剤と相互作用するとは考えられない。

フェンフルラミンが SSRI と相互作用する可能性については、ラット脳から得たシナプトソーム調製物を用いて、Hekmatpanah 1990 によって検討された。シナプトソーム調製物をフェンフルラミンとインキュベートすると 50%有効濃度 (EC₅₀) = 310 nmol/L でセロトニンが放出され、溶媒対照と比較して 16%のセロトニンがシナプトソームに残留した。一方、10⁻⁶ mol/L の濃度のフルオキセチンをシナプトソームとインキュベートした後にフェンフルラミンを添加すると、フェンフルラミン誘発性のセロトニン放出は阻害された。しかし、Richelson 1994 は、抗うつ薬の薬理作用の総説において、SSRI とフェンフルラミンの相互作用は臨床診療では認められていないと報告している。

Dexfenfluramine は、ラットの摂餌量に対してフェンテルミンと相互作用することが報告されている (Grottick 2015)。この試験では、雄性 SD ラットに、dexfenfluramine、lorcaserin (5-HT_{2C} アゴニスト)、フェンテルミン (アドレナリンアゴニスト) 又は AR630 (5-HT_{2C} アゴニスト) を経口投与した。ラットは投与後 30 分間食物を自由摂餌とし、摂餌期間終了時 (投与から 60 分後) に摂餌量を測定し、血液及び脳組織を採取して、lorcaserin、AR630、フェンテルミン、dexfenfluramine 及び dexfenfluramine の主な代謝物である nordexfenfluramine の濃度を測定した。フェンテルミンの摂餌量に対する 50%有効量 (ED₅₀) は、dexfenfluramine 又は AR630 と併用投与すると、相加効果によって予測される以上に低下した。この試験結果によって、フェンテルミンが dexfenfluramine 及び AR630 と相乗的に相互作用することが示唆された。Dexfenfluramine の代謝物である nordexfenfluramine の血中濃度については、dexfenfluramine を単独投与した場合と、フェンテルミンと併用投与した場合に差異は認められなかった。しかし、単独投与又は併用投与した薬物の脳内濃度については、AR630 及び dexfenfluramine のいずれもフェンテルミンと併用投与すると、フェンテルミン単独投与と比べてフェンテルミンの脳内濃度を上昇させた。一方、lorcaserin は、フェンテルミンの脳内濃度を変化させなかった。以上の結果より、dexfenfluramine は、フェンテルミン脳内濃度を上昇させて、摂餌量の抑制に対して相乗効果を示すと考えられた。

2.6.2.6 考察及び結論

フェンフルラミンはシナプスにおけるセロトニン放出を増加させることが明らかになっている (Hekmatpanah 1990)。Rothman 2000 は *in vitro* アッセイを実施して、フェンフルラミン及び norfenfluramine は 5-HT_{2A}、5-HT_{2B} 及び 5-HT_{2C} 受容体に対して作動性作用を及ぼすことを示した。*In vitro* 試験 ([XS-0691]試験、[XS-0715]試験及び[100026029]試験) 及び *in vivo* 試験 ([ZX008-P1-001A]試験; Sourbron 2016; Sourbron 2017; Rodríguez-Muñoz 2018) のデータから、フェンフルラミンは 5-HT_{1D}、5-HT_{2A} 及び 5-HT_{2C} 受容体を介して作用し、ドラベ症候群のゼブラフィッシュモデル及びマウスの NMDA 発作モデルの発作を減少させることが示された。また、5-HT_{1D} 受容体のアゴニスト活性は、ドラベ症候群のマウスモデルにおいて発作を減少させることが示されている。セロトニン受容体での活性に加えて、*in vitro* 試験 ([AM354]試験、[AM335]試験、[XS-0691]試験及び[XS-0715]試験)、並びに *in vivo* 試験 (Martin 2020; [100026029]試験及び[ZX008-P1-001A]試験) において、フェンフルラミンがシグマ-1 受容体に対する正のモジュレーターとしても作用することが示された。フェンフルラミンがシグマ-1 受容体に対して正のモジュレーターとして作用するという新規作用機序により抗発作活性を有するという所見は、他のシグマ-1 リガンドがげっ歯類モデルにおいて抗発作活性を有することを示す研究 (Guo 2015; Vavers 2017) 及びドラベ症候群のゼブラフィッシュモデル (ZX008-P1-001A 試験) でも示されている。これらのデータを総合すると、フェンフルラミンがセロトニン作動性作用とシグマ-1 受容体に対する正のモジュレーターとしての作用を併せ持つ新規の作用機序を有することが明らかとなった。ベルギーの非盲検試験 (Ceulemans 2012; Ceulemans 2015; Schoonjans 2017) で確認されたフェンフルラミンの有効性及びその継続期間は、フェンフルラミンが現在ドラベ症候群の治療に用いられている ASM とは異なる作用機序を介する可能性を示唆するものである。

発作活動の抑制に加えて、フェンフルラミンは食欲抑制から活動及び睡眠パターンの変化に至るまで、さまざまな薬理作用を示す。血漿中プロラクチン及びコルチコステロン濃度の投与量依存的な上昇 (Van de Kar 1985) は、その一例である。

ICH S7A/B ガイダンスは、独立した安全性薬理試験又は反復投与試験の中でコアバッテリーに対する評価を規定している。CNS、心血管系及び呼吸器機能に対するフェンフルラミンの作用を評価した。既発表文献中の安全性薬理試験又は Pondimin [(±)-フェンフルラミン塩酸塩] 及び Redux (dexfenfluramine) に関する US NDA SBA において報告された安全性薬理試験において、CNS、心血管系、呼吸器系、消化器系及び泌尿生殖器系に対するフェンフルラミンの有害な作用は認められなかった。また、Zogenix 社の反復投与慢性毒性試験では、各器官系の評価を実施した。GLP に適合したイヌ 43 週間反復投与毒性試験及び 28 日間回復性試験では、50/25 mg/kg/日の経口投与量までフェンフルラミン塩酸塩に関連した心電図パラメータ変化は認められなかった ([01127008]試験、[2.6.6.3.2.1]項)。非臨床安全性薬理試験のデータは、[2.7.4]項に要約したように、小児及び成人患者において利用可能な広範な臨床安全性データベースによって裏付けされている。さらに、健康成人を対象とした TQT 試験 ([ZX008-1603]試験) では、治療用量でも治療用量より高用量でも、QTc 延長に対する ZX008 の有意な効果は認められなかった。

フェンフルラミンには、ラット脳の MAO に対する阻害効果は認められず、この酵素を利用する薬剤とフェンフルラミンは相互作用しないと考えられるが、フェンフルラミンは他の機序を介してこれらの薬剤と相互作用する可能性はある ([2.7.2.3]項参照)。

結論として、*in vitro* 試験及び *in vivo* 試験いずれの結果からも、フェンフルラミンが、セロトニントランスポーターを介したセロトニン放出作用、セロトニン受容体作動性作用及びシグマ-1 受容体に対する正のモジュレーターとしての作用といった新規の作用機序を介して、発作活動を抑制することが示唆された。

Zogenix 社が実施し、完了している非臨床試験及び臨床試験からは、ドラベ症候群患者の治療としての長期にわたる ZX008 連日経口投与の良好な安全性プロファイルが得られている。さらに申請予定の臨床最高用量である 0.8 mg/kg/日（最大用量は 30 mg/日）での ZX008 に関して実施したベネフィット・リスク解析の結果は、非臨床安全性試験の結果からも裏付けられている。

2.6.2.7 図表

図表はいずれも本文中に示した。

2.6.2.8 参考文献

- Annerbrink K, Olsson M, Hedner J, Eriksson E. Acute and chronic treatment with serotonin reuptake inhibitors exert opposite effects on respiration in rats: possible implications for panic disorder. *J Psychopharmacol*. 2010;24(12):1793-1801.
- Barker-Haliski M, White HS. Validated animal models for antiseizure drug (ASD) discovery: Advantages and potential pitfalls in ASD screening. *Neuropharmacology*. 2020;167:107750.
- Buterbaugh GG. Effect of drugs modifying central serotonergic function on the response of extensor and nonextensor rats to maximal electroshock. *Life Sci*. 1978;23(24):2393-2404.
- Caccia S, Ballabio M, Guiso G, Rocchetti M, Garattini S. Species differences in the kinetics and metabolism of fenfluramine isomers. *Arch Int Pharmacodyn Ther*. 1982;258(1):15-28.
- Cagnotto A, Bastone A, Mennini T. [3H](+)-pentazocine binding to rat brain $\delta 1$ receptors. *Eur J Pharmacol*. 1994;266:131-138.
- Catarino CB, Liu JYW, Liagkouras I, et al. Dravet syndrome as epileptic encephalopathy: evidence from long-term course and neuropathology. *Brain*. 2011;134(Pt 10):2982-3010.
- Ceulemans B, Boel M, Leyssens K, et al. Successful use of fenfluramine as an add-on treatment for Dravet syndrome. *Epilepsia*. 2012;53(7):1131-1139.
- Ceulemans B, Schoonjans A, Marchau F, Paelinck B, Lagae L. Five-year follow-up of Fenfluramine as add-on treatment in Dravet syndrome. Paper presented at: The European Paediatric Neurology Series; 27-30 May 2015; Vienna, Austria.
- Clausing P, Rushing LG, Newport GD, Bowyer JF. Determination of D-fenfluramine, D-norfenfluramine and fluoxetine in plasma, brain tissue and brain microdialysate using high-performance liquid chromatography after precolumn derivatization with dansyl chloride. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*. 1997;692(2): 419-426.
- Dinday MT, Baraban SC. Large-scale phenotype-based antiepileptic drug screening in a zebrafish model of Dravet syndrome. *eNeuro*. 2015;2(4):ENEURO.0068-15.2015.
- Dravet C. The core Dravet syndrome phenotype. *Epilepsia*. 2011;52(Suppl 2):3-9.
- FDA. Guidance for Industry. Estimating the Maximum Safety Starting Dose in Initial Clinical Trials for Therapeutics in Adult Healthy Volunteers, 2005.
- Fornal C, Radulovacki M. Sleep suppressant action of fenfluramine in rats. I. Relation to postsynaptic serotonergic stimulation. *J Pharmacol Exp Ther*. 1983a;225(3):667-674.
- Fornal C, Radulovacki M. Sleep suppressant action of fenfluramine in rats. II. Evidence against the involvement of presynaptic serotonergic mechanism. *J Pharmacol Exp Ther*. 1983b;225(3):675-681.
- Foxwell MH, Funderburk WH, Ward JW. Studies on the site of action of a new anorectic agent, fenfluramine. *J Pharmacol Exp Ther*. 1969;165(1):60-70.
- Franko BV, Honkomp LJ, Ward JW. Cardiovascular and autonomic effects of fenfluramine hydrochloride. *J Pharm Pharmacol*. 1965;17:222-226.
- Garattini S. Importance of serotonin for explaining the action of some anorectic agents. In: Bray GA, ed. *Recent Advances in Obesity Research: Vol. II*. Newman; 1978:433-441.
-

Gentsch K, Heinemann U, Schmitz B, Behr J. Fenfluramine blocks low-Mg²⁺-induced epileptiform activity in rat entorhinal cortex. *Epilepsia*. 2000;41(8):925-928.

Grottick AJ, Whelan K, Sanabria EK, et al. Investigating interactions between phentermine, dexfenfluramine, and 5-HT_{2C} agonists, on food intake in the rat. *Psychopharmacology (Berl)*. 2015;232(11):1973-1982.

Guo L, Chen Y, Zhao R, et al. Allosteric modulation of sigma-1 receptors elicits anti-seizure activities. *Br J Pharmacol*. 2015;172(16):4052-4065.

Hatini PG, Commons KG. A 5-HT_{1D}-receptor agonist protects Dravet syndrome mice from seizure and early death. *Eur J Neurosci*. 2020;52(10):4370-4374.

Hekmatpanah CR, Peroutka SJ. 5-hydroxytryptamine uptake blockers attenuate the 5-hydroxytryptamine-releasing effect of 3,4-methylenedioxymethamphetamine and related agents. *Eur J Pharmacol*. 1990;177(1-2):95-98.

Kilpatrick IC, Traut M, Heal DJ. Monoamine oxidase inhibition is unlikely to be relevant to the risks associated with phentermine and fenfluramine: a comparison with their abilities to evoke monoamine release. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2001;25(10):1454-1458.

Lazarova M, Bendotti C, Samanin R. Studies on the role of serotonin in different regions of the rat central nervous system on pentylentetrazol-induced seizures and the effect of di-*n*-propylacetate. *Naunyn Schiedebergs Arch Pharmacol*. 1983b;322(2):147-152.

Lazarova M, Samanin R. Serotonin mediation of the protective effect of clonidine against pentylentetrazol-induced seizures in rats. *Life Sci*. 1983a;32(20):2343-2348.

Lei S. Serotonergic modulation of neural activities in the entorhinal cortex. *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol*. 2012;4(4):201-210.

Leonardi ET, Azmitia EC. MDMA (ecstasy) inhibition of MAO type A and type B: comparisons with fenfluramine and fluoxetine (Prozac). *Neuropsychopharmacology*. 1994;10(4):231-238.

Lewis SA, Oswald I, Dunleavy DLF. Chronic fenfluramine administration: some cerebral effects. *Br Med J*. 1971;3(5766):67-70.

Löschner W. Critical review of current animal models of seizures and epilepsy used in the discovery and development of new antiepileptic drugs. *Seizure*. 2011;20(5):359-368.

Löschner W, Gillard M, Sands Z, et al. Synaptic vesicle glycoprotein 2A ligands in the treatment of epilepsy and beyond. *CNS Drugs*. 2016;30:1055-1077.

Martin P, de Witte P, Maurice T, et al. Fenfluramine acts as a positive modulator of sigma-1 receptors. *Epilepsy Behav*. 2020;105:106989.

Martin P, Reeder T, Sourbron J, et al. An Emerging Role for Sigma-1 Receptors in the Treatment of Developmental and Epileptic Encephalopathies. *Int J Mol Sci*. 2021 Aug 5;22(16):8416

Maurice T, Hiramatsu M, Itoh J, et al. Behavioral evidence for a modulating role of sigma ligands in memory processes. I. Attenuation of dizocilpine (MK-801)-induced amnesia. *Brain Res*. 1994;647(1):44-56.

Patsalos PN. *Antiepileptic Drug Interactions A clinical Guide*. Third Edition. Springer 2016.

Physicians' Desk Reference. 52nd Ed. PDR Network; 1998.

Pondimin® NDA 16-618. US FDA SBA 153329A. 1970.

Redux® NDA 20-344. US FDA SBA 144590A. 1996.

Richelson E. Pharmacology of antidepressants – characteristics of the ideal drug. *Mayo Clin Proc.* 1994;69(11):1069-1081.

Rodríguez-Muñoz M, Sánchez-Blázquez P, Garzón J. Fenfluramine diminishes NMDA receptor-mediated seizures via its mixed activity at serotonin 5HT_{2A} and type 1 sigma receptors. *Oncotarget.* 2018;9(34):23373-23389.

Rousseaux CG, Greene SF. Sigma receptors [σ R]: biology in normal and diseased states. *J Recept Signal Transduct Res.* 2016;36(4):327-388.

Rosenberg EC, Patra PH, Whalley BJ. Therapeutic effects of cannabinoids in animal models of seizures, epilepsy, epileptogenesis, and epilepsy-related neuroprotection. *Epilepsy Behav.* 2017;70(Pt B):319-327.

Rothman RB, Baumann MH, Savage JE, et al. Evidence for possible involvement of 5-HT_{2B} receptors in the cardiac valvulopathy associated with fenfluramine and other serotonergic medications. *Circulation.* 2000;102:2836-2841.

Rothman RB, Baumann MH. Serotonergic drugs and valvular heart disease. *Expert Opin Drug Saf.* 2009;8(3):317-329.

Schoonjans A, Paelinck BP, Marchau F, et al. Low-dose fenfluramine significantly reduces seizure frequency in Dravet syndrome: a prospective study of a new cohort of patients. *Eur J Neurol.* 2017;24(2):309-314.

Sourbron J, Schneider H, Kecskés A, et al. Serotonergic modulation as effective treatment for Dravet syndrome in a zebrafish mutant model. *ACS Chem Neurosci.* 2016;7(5):588-598.

Sourbron J, Smolders I-, de Witte P, Lagae L. Pharmacological analysis of the anti-epileptic mechanisms of fenfluramine in *scn1a* mutant zebrafish. *Front Pharmacol.* 2017;8:191.

Spinelli R, Fracasso C, Guiso G, Garattini S, Caccia S. Disposition of (–)-fenfluramine and its active metabolite, (–)-norfenfluramine in rat: a single dose-proportionality study. *Xenobiotica.* 1988;18(5):573-584.

Tang AH, Kirch JD. Appetite suppression and central nervous system stimulation in the rhesus monkey. *Psychopharmacologia.* 1971;21(2):139-146.

Tiraboschi E, Martina S, van der Ent W, et al. New insights into the early mechanisms of epileptogenesis in a zebrafish model of Dravet syndrome. *Epilepsia.* 2020;61(3):549-560.

Van de Kar LD, Urban JH, Richardson KD, Bethea CL. Pharmacological studies on the serotonergic and nonserotonin-mediated stimulation of prolactin and corticosterone secretion by fenfluramine. Effects of pretreatment with fluoxetine, indalpine, PCPA, and L-tryptophan. *Neuroendocrinology.* 1985;41(4):283-288.

Vavars E, Svalbe B, Lauberte L, et al. The activity of selective sigma-1 receptor ligands in seizure models *in vivo*. *Behav Brain Res.* 2017;328:13-18.

Vavars E, Zvejniece B, Stelfa G, et al. Genetic inactivation of the sigma-1 chaperone protein results in decreased expression of the R2 subunit of the GABA-B receptor and increased susceptibility to seizures. *Neurobiol Dis.* 2021;150:105244.

Vickers SP, Dourish CT, Kennett GA. Evidence that hypophagia induced by *d*-fenfluramine and *d*-norfenfluramine in the rat is mediated by 5-HT_{2C} receptors. *Neuropharmacology*. 2001;41(2):200-209.

Wong JC, Murnane KS, Blough BE, Escayg A. Evaluating the therapeutic potential of serotonin modulators in *scn1a*-derived epilepsy. *FASEB J*. 2017;31(suppl 1):813.7

Zhang Y, Kecskés A, Copmans D, et al. Pharmacological characterization of an antisense knockdown zebrafish model of Dravet syndrome: inhibition of epileptic seizures by the serotonin agonist fenfluramine. *PLoS One*. 2015;10(5):e0125898.

目次

2.6.3	薬理試験概要表.....	2
2.6.3.1	薬理試験：一覧表.....	2
2.6.3.2	効力を裏付ける試験.....	4
2.6.3.2.1	受容体結合特性試験.....	4
2.6.3.2.2	Dexfenfluramine、levofenfluramine、nordexfenfluramine 及び norlevofenfluramine の受容体結合活性.....	8
2.6.3.2.3	受容体におけるフェンフルラミン及び norfenfluramine の機能活性.....	9
2.6.3.2.4	シグマ-1 受容体アゴニスト PRE-84 に対するフェンフルラミンの調節作用	10
2.6.3.2.5	シグマ-1 受容体に対するフェンフルラミンのアゴニスト／アンタゴニスト作用	11
2.6.3.2.6	ナトリウムチャネル電流に対する作用.....	12
2.6.3.2.7	ドラベ症候群ゼブラフィッシュモデルに対する作用.....	15
2.6.3.3	副次的薬理試験	18
2.6.3.4	安全性薬理試験	19
2.6.3.4.1	中枢及び末梢神経系.....	19
2.6.3.4.2	心血管系	21
2.6.3.5	薬力学的薬物相互作用試験.....	22
2.6.3.6	参考文献	23

2.6.3 薬理試験概要表

2.6.3.1 薬理試験：一覧表

Overview			Test Article: Fenfluramine and Norfenfluramine	
Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Study Number
Primary Pharmacodynamics (Section [2.6.2.2])				
Competitive inhibition assay for receptor binding of fenfluramine and norfenfluramine	Recombinant receptors	In vitro	Sekisui Medical Co., Ltd. Naka-gun, Ibaraki, Japan	[XS-0691] (評価資料)
Effects of (+)-fenfluramine, (–)-fenfluramine, (+)-norfenfluramine, and (–)-norfenfluramine on various receptors	Rat brain, cerebral cortex; guinea pig brain; human recombinant	In vitro	Sekisui Medical Co., Ltd. Naka-gun, Ibaraki, Japan	[XS-0715] (評価資料)
Functional assays for agonist and antagonist activity of fenfluramine and norfenfluramine	Recombinant receptors	In vitro	Eurofins Cerep Celle-L'Evescault, France	[100026029] (評価資料)
Characterization of agonist/antagonist properties of fenfluramine and lorcaserin on sigma-1 receptor	CHO cells	In vitro	Amylgen Montferrier-sur-Lez, France	[AM354] (評価資料)
Characterization of positive modulation of the sigma-1 receptor by fenfluramine hydrochloride in vitro	CHO cells	In vitro	Amylgen Montferrier-sur-Lez, France	[AM335] (評価資料)
Functional assays for agonist and antagonist activity of fenfluramine and norfenfluramine in the sodium channel	Voltage-gated sodium channels hNa _v 1.1 through hNa _v 1.8	In vitro	Eurofins Pharma Bioanalytics Services US Inc. St. Charles, Missouri, USA	[ZOG121515-1] (評価資料)
Fenfluramine: A Positive Modulator of the Sigma-1 Receptor in a Dravet Model of Zebrafish	Wild-type and homozygous scn1Lab ^{-/-} mutant zebrafish larvae	Addition to media	Zogenix, Inc. Emeryville, California, USA	[ZX008-P1-001A] (評価資料)
Secondary Pharmacodynamics (Section [2.6.2.3])				
Competitive inhibition assay for receptor binding of fenfluramine and norfenfluramine	Recombinant receptors	In vitro	Sekisui Medical Co., Ltd. Naka-gun, Ibaraki, Japan	[XS-0691] (評価資料)
Safety Pharmacology (Section [2.6.2.4])				
Central Nervous System (CNS)	Juvenile rats	Oral	Charles River Laboratories Senneville, Québec, Canada	[9000406] (評価資料)

Overview			Test Article: Fenfluramine and Norfenfluramine	
Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Study Number
Cardiovascular, Respiratory (clinical observations only)	Beagle dogs	Oral	Charles River Laboratories Ashland, Ohio, USA	[01127008] (評価資料)
Pharmacodynamic Drug Interactions (Section [2.6.2.5])				
No studies performed	Not applicable	Not applicable	Not applicable	Not applicable

Abbreviations: CNS = Central Nervous System; hNav1.1 = Type I Voltage-Gated Sodium Channel; hNav1.8 = Type VIII Voltage-Gated Sodium Channel

2.6.3.2 効力を裏付ける試験

2.6.3.2.1 受容体結合特性試験

Overview				Test Article: Fenfluramine and Norfenfluramine	
Test System	Method of Admin.	Concentration (mol/L)	Assay Replication	Noteworthy Findings	Study Number
Radioligand binding assay Human recombinant receptors, rat brain, rat cerebral cortex, rat cerebellum, bovine cerebrum, rat spinal cord, guinea pig lung, rabbit platelet, guinea pig brain, guinea pig submaxillary	In vitro	1×10^{-6} and 1×10^{-5}	Duplicate	Moderate to strong binding (defined as an inhibition ratio greater than 30%) of fenfluramine and norfenfluramine were found for 6 receptors.	[XS-0691] (評価資料)

Abbreviation: Admin. = Administration

表 2.6.3.2-1 放射性リガンドの受容体結合に対するフェンフルラミン及び norfenfluramine の阻害効果 (XS-0691 試験)

Assay System	Inhibition Ratio (%)**					
	Fenfluramine		Norfenfluramine		Positive Control	
	1×10^{-6} mol/L	1×10^{-5} mol/L	1×10^{-6} mol/L	1×10^{-5} mol/L	Inhibition Ratio (%)**	Compound (1×10^{-5} or 1×10^{-6} mol/L)***
Adenosine A ₁ (Human recombinant)	0.19	7.55	0.00	0.81	99.61	DPCPX
β-Adrenergic (Nonselective) (Rat brain)*	21.94	40.62	10.24	41.14	100.00	(±)-Propranolol
α _{1B} -Adrenergic (Human recombinant)	0.81	4.73	0.00	0.19	100.00	Prazosin
β ₁ -Adrenergic (Human recombinant)	0.54	7.54	0.45	11.56	100.00	(±)-Propranolol
β₂-Adrenergic (Human recombinant)*	2.39	32.59	6.62	35.41	100.00	(±)-Propranolol
Angiotensin AT ₁ (Human recombinant)	1.24	0.00	1.91	0.00	100.00	Angiotensin II human
Apelin APJ (Human recombinant)	1.01	3.23	2.17	3.48	99.38	Apelin-13
Benzodiazepine BZ (bovine cerebrum)	0.33	4.04	1.15	0.00	100.00	Diazepam
Bradykinin B ₁ (Human recombinant)	6.67	7.45	1.75	5.01	100.00	Lys-(des-Arg ⁹ , Leu ⁸)-Bradykinin
Bombesin BB ₁ (Human recombinant)	0.00	0.00	0.00	0.00	98.40	Bombesin
Calcitonin CALR (Rat brain)	0.00	0.00	2.69	2.68	100.00	Calcitonin human
Ca channel Type L, Benzothiazepine (Rat cerebral cortex)	0.00	0.00	0.00	0.00	99.77	(+)-cis-Diltiazem

Assay System	Inhibition Ratio (%)**					
	Fenfluramine		Norfenfluramine		Positive Control	
	1×10 ⁻⁶ mol/L	1×10 ⁻⁵ mol/L	1×10 ⁻⁶ mol/L	1×10 ⁻⁵ mol/L	Inhibition Ratio (%)**	Compound (1×10 ⁻⁵ or 1×10 ⁻⁶ mol/L)***
Cannabinoid CB ₁ (Human recombinant)	2.92	0.00	0.00	0.00	100.00	(R)-(+)-WIN55,212-2
CGRP (Human recombinant)	0.00	0.00	0.00	0.00	100.00	CGRP human
Chemoattractant C3a (Human recombinant)	2.03	2.44	0.00	0.00	100.00	(Trp ⁶³ -Trp ⁶⁴)C3a (63-77)
Chemokine CCR ₁ (Human recombinant)	0.64	0.00	0.00	0.00	100.00	RANTES human
CCK A (Human recombinant)	0.00	19.27	0.00	0.00	96.40	CCK-8
CRF ₁ (Human recombinant)	3.23	2.37	0.04	0.00	90.60	Urocortin human
Cl channel (Rat brain)	0.81	1.36	1.62	5.85	95.74	Picrotoxin
Dopamine D ₁ (Human recombinant)	1.00	8.79	4.32	5.38	98.57	R(+)-SCH-23390
EGF (Human Nonrecombinant)	0.00	0.00	0.44	0.00	96.99	rec EGF (Human)
GABA _A (Agonist Site) (Rat cerebellum)	1.07	0.00	0.00	0.00	100.00	Muscimol
Galanin GAlR ₁ (Human receptor)	1.53	0.00	2.06	3.10	99.38	Galanin (Human)
Glucocorticoid (Human recombinant)	0.55	2.24	0.31	0.00	99.97	Dexamethasone
Glutamate (Nonselective) (Rat cerebral cortex)	3.09	11.53	1.85	7.67	100.00	L-Glutamic acid
Glycine Strychnine sensitive (Rat spinal cord)	0.00	0.00	6.63	0.02	100.00	Strychnine
Histamine H ₃ (Human recombinant)	4.22	5.45	0.00	0.00	100.00	(R)(-)-α-Methylhistamine
IP ₃ (Rat cerebellum)	4.89	1.76	1.57	0.00	99.82	IP3
K channel KATP (Rat brain)	9.99	1.97	6.78	6.50	100.00	Glybenclamide
Leukotriene D ₄ (Guinea pig lung)	2.71	0.64	4.60	4.24	98.49	Leukotriene D ₄
Muscarinic M₁ (Rat cerebral cortex)*	5.44	47.84	20.62	69.89	100.00	Atropine
Na channel (Rat brain)*	13.38	46.28	13.44	47.86	94.28	Dibucaine
Neurokinin NK ₁ (Human recombinant)	0.00	4.40	0.00	9.87	100.00	L-703,606
Neuropeptide FF NPFF ₁ (Human recombinant)	1.18	14.54	8.40	10.25	96.31	Neuropeptide SF human
Neuropeptide Y NPY ₁ [Human receptor (Nonrecombinant)]	0.00	0.43	0.00	0.00	98.60	Neuropeptide Y human
Neurotensin NT ₁ (Human recombinant)	0.61	0.11	0.00	4.83	100.00	Neurotensin
Nicotinic [Human receptor (Nonrecombinant)]	0.00	0.28	0.00	0.00	100.00	(±)-Epibatidine

Assay System	Inhibition Ratio (%)**					
	Fenfluramine		Norfenfluramine		Positive Control	
	1×10 ⁻⁶ mol/L	1×10 ⁻⁵ mol/L	1×10 ⁻⁶ mol/L	1×10 ⁻⁵ mol/L	Inhibition Ratio (%)**	Compound (1×10 ⁻⁵ or 1×10 ⁻⁶ mol/L)***
Orexin OX ₁ (Human recombinant)	2.82	4.09	8.66	6.70	100.00	Orexin-A (Human)
PAF (Rabbit platelet)	1.18	2.81	2.38	3.25	100.00	PAF
Prokineticin PK1 (Human recombinant)	0.00	6.01	1.93	3.96	99.76	EG-VEGF
Prostanoid DP (Human recombinant)	4.12	0.00	3.90	0.00	98.12	Prostaglandin D ₂
Serotonin 5-HT_{1A} (Rat cerebral cortex)*	47.49	96.86	42.25	88.74	100.00	Serotonin
Sigma Nonselective (Guinea pig brain)*	73.07	93.41	25.94	75.40	99.46	Haloperidol
Somatostatin SST1 (Human recombinant)	1.31	14.41	5.06	2.84	100.00	Somatostatin 28
Substance P (Guinea pig submaxillary)	9.98	10.53	0.00	7.72	97.97	Substance P
Vasopressin V1B (Human recombinant)	2.87	2.06	2.43	1.80	100.00	[Arg ⁸]-Vasopressin
Vasoactive intestinal polypeptide VIP 1 (Human recombinant)	2.73	0.00	5.27	13.47	100.00	VIP

Abbreviations: 5-HT = 5-Hydroxytryptamine; SOP = Standard Operating Procedure

*Compounds in **Bold**: Tested in functional assays shown in 表 2.6.3.2-2.

**Inhibition Ratio (%): Bound radioactivity in the presence of the test article divided by the total bound radioactivity in the absence of the test article and multiplied by 100.

***Concentration for each positive control was determined by the contract laboratory and specified in the SOP for each assay.

[XS-0691 Table 1, 2]

表 2.6.3.2-2 (±)-フェンフルラミン及び(±)-norfenfluramine の受容体結合に対する Ki 値 (XS-0691 試験)

Assay System	Substance	IC ₅₀ (mol/L)	Ki (mol/L)
β-Adrenergic (Nonselective) (Rat brain)	(±)-fenfluramine	2.76×10 ⁻⁵	1.75×10 ⁻⁵
	(±)-norfenfluramine	1.89×10 ⁻⁵	1.20×10 ⁻⁵
	(±)-Propranolol*	6.16×10 ⁻⁹	3.90×10 ⁻⁹
β ₂ -Adrenergic (Human recombinant)	(±)-fenfluramine	2.59×10 ⁻⁵	1.26×10 ⁻⁵
	(±)-norfenfluramine	1.80×10 ⁻⁵	8.77×10 ⁻⁶
	(±)-Propranolol*	1.05×10 ⁻⁹	5.12×10 ⁻¹⁰
Muscarinic M ₁ (Rat cerebral cortex)	(±)-fenfluramine	1.30×10 ⁻⁵	1.13×10 ⁻⁵
	(±)-norfenfluramine	4.32×10 ⁻⁶	3.74×10 ⁻⁶
	Atropine*	1.13×10 ⁻⁹	9.80×10 ⁻¹⁰

Assay System	Substance	IC ₅₀ (mol/L)	Ki (mol/L)
Na channel (Rat brain)	(±)-fenfluramine	7.62×10^{-6}	4.84×10^{-6}
	(±)-norfenfluramine	7.46×10^{-6}	4.74×10^{-6}
	Dibucaine*	1.88×10^{-7}	1.19×10^{-7}
Serotonin 5-HT _{1A} (Rat cerebral cortex)	(±)-fenfluramine	5.73×10^{-7}	3.27×10^{-7}
	(±)-norfenfluramine	1.18×10^{-6}	6.73×10^{-7}
	Serotonin*	1.77×10^{-9}	1.01×10^{-9}
Sigma Nonselective (Guinea pig brain)	(±)-fenfluramine	2.92×10^{-7}	2.66×10^{-7}
	(±)-norfenfluramine	3.21×10^{-6}	2.92×10^{-6}
	Haloperidol*	1.44×10^{-9}	1.31×10^{-9}

Abbreviations: 5-HT = 5-Hydroxytryptamine; K_d = Dissociation Constant; K_i = Inhibitory Constant, (IC₅₀)/[1+(L/K_d)]; IC₅₀ = Half Maximal Inhibitory Concentration; Na = Sodium

*Positive control

[XS-0691 Table 3, 4, 5, 6, 7, 8]

2.6.3.2.2 Dexfenfluramine、levofenfluramine、nordexfenfluramine 及び norlevofenfluramine の受容体結合活性

Overview				Test Article: Fenfluramine and Norfenfluramine		
Type of Study	Test System	Method of Admin.	Concentration (mol/L)	Assay Replication	Noteworthy Findings	Study Number
In vitro receptor binding 12 receptors and ion channels	Rat brain, cerebral cortex; guinea pig brain; human recombinant	In vitro	1×10^{-6} and 1×10^{-5}	Duplicate	<ul style="list-style-type: none"> No enantiomer differences in binding potency. Enantiomers of fenfluramine bind more potently to the 5-HT_{1A}, sigma-1, and sigma-2 receptors than the enantiomers of norfenfluramine. Enantiomers of norfenfluramine bind more potently to the 5-HT_{2C} and 5-HT_{2B} receptors. 	[XS-0715] (評価資料)

Abbreviations: Admin. = Administration; 5-HT = 5-Hydroxytryptamine

表 2.6.3.2.2-1 Dexfenfluramine、levofenfluramine、nordexfenfluramine 及び norlevofenfluramine の受容体結合能の比較 (XS-0715 試験)

Receptor	Ki (mol/L)			
	Dexfenfluramine	Levofenfluramine	Nordexfenfluramine	Norlevofenfluramine
β-Adrenergic (Nonselective) Rat brain	1.61×10^{-5}	1.36×10^{-5}	9.76×10^{-6}	8.48×10^{-6}
β ₂ -Adrenergic Human recombinant	8.84×10^{-6}	1.40×10^{-5}	8.60×10^{-6}	5.56×10^{-6}
Muscarinic M ₁ Rat cerebral cortex	8.30×10^{-6}	1.15×10^{-5}	3.27×10^{-6}	4.00×10^{-6}
Na channel Rat brain	5.76×10^{-6}	9.71×10^{-6}	5.37×10^{-6}	3.04×10^{-6}
5-HT _{1A} Rat cerebral cortex	7.11×10^{-7}	4.02×10^{-7}	1.14×10^{-6}	4.09×10^{-7}
5-HT _{2A} Human recombinant	4.21×10^{-6}	1.70×10^{-6}	2.74×10^{-6}	1.67×10^{-6}
5-HT _{2B} Human recombinant	4.63×10^{-6}	1.44×10^{-6}	2.42×10^{-7}	1.20×10^{-6}
5-HT _{2C} Human recombinant	2.91×10^{-6}	1.29×10^{-6}	3.56×10^{-7}	3.80×10^{-7}
5-HT ₇ Human recombinant	7.10×10^{-6}	3.70×10^{-6}	1.50×10^{-6}	1.80×10^{-6}
Sigma (not selective for S ₁ or S ₂) Guinea pig brain	1.63×10^{-7}	3.51×10^{-7}	1.80×10^{-6}	2.30×10^{-6}
Sigma-1 Guinea pig brain	1.09×10^{-7}	5.02×10^{-7}	2.61×10^{-6}	4.60×10^{-6}
Sigma-2 Guinea pig brain	4.31×10^{-7}	8.00×10^{-7}	2.98×10^{-6}	3.21×10^{-6}

Abbreviations: 5-HT = 5-Hydroxytryptamine; K_d = Dissociation Constant; K_i = Inhibitory Constant, (IC₅₀)/[1+(L/K_d)]; IC₅₀ = Half Maximal Inhibitory Concentration
[XS-0715 Table 15]

2.6.3.2.3 受容体におけるフェンフルラミン及び norfenfluramine の機能活性

Overview			Test Article: Fenfluramine and Norfenfluramine	
Method of Admin.	Concentration (mol/L)	Assay Replication	Noteworthy Findings	Study Number
In vitro	β_1 -, β_2 -, and β_3 -adrenergic and muscarinic M_1 : 1×10^{-4} to 1×10^{-8} 5-HT _{1A} : 1×10^{-5} to 1×10^{-9} Sigma ^a : 1×10^{-5} to 3×10^{-9}	1 agonist and 1 antagonist assay per receptor	No agonist activities found for any of the compounds at any of the receptors tested.	[100026029] (評価資料)

Abbreviations: 5-HT = 5-Hydroxytryptamine; Admin. = Administration

^aSigma assay was not specific to sigma-1 or sigma-2 receptors.

表 2.6.3.2.3-1 受容体におけるフェンフルラミン及び norfenfluramine の機能活性 (100026029 試験)

Assay	IC ₅₀ (mol/L)	K _B (mol/L)
Compound racemic fenfluramine		
$\beta_2(h)$ (antagonist effect)	4.9×10^{-5}	8.2×10^{-6}
Compound (+) fenfluramine		
$\beta_2(h)$ (antagonist effect)	6.4×10^{-5}	1.1×10^{-5}
$M_1(h)$ (antagonist effect)	8.3×10^{-5}	9.8×10^{-6}
Compound (-) fenfluramine		
$\beta_2(h)$ (antagonist effect)	5.6×10^{-5}	9.4×10^{-6}
Compound racemic norfenfluramine		
$\beta_2(h)$ (antagonist effect)	6.7×10^{-5}	1.1×10^{-5}
Compound (-) norfenfluramine		
$\beta_2(h)$ (antagonist effect)	7.0×10^{-5}	1.2×10^{-5}
$M_1(h)$ (antagonist effect)	9.5×10^{-5}	1.1×10^{-5}

Abbreviations: (h) = Human; IC₅₀ = Half Maximal Inhibitory Concentration; K_B = Apparent Dissociation Constant

[100026029 Table 5.3.1, 5.3.2, 5.3.3, 5.3.4, 5.3.5]

表 2.6.3.2.3-2 脳組織中のフェンフルラミン濃度の計算値 (100026029 試験)

Item	$\mu\text{mol/L}$	Data Source
C _{max} in plasma	0.254	Predicted fenfluramine concentration at C _{max} 58.75 $\mu\text{g/L}$; divide by molar mass 231.26 g/mol to convert the unit to $\mu\text{mol/L}$ from $\mu\text{g/L}$
Unbound drug in plasma	0.127	50% bound in plasma protein binding assay Study Report [XS-0688]
Estimated brain concentration (15 \times , 40 \times , or 60 \times plasma concentration)	2 to 8	Spinelli 1988 Caccia 1982 Clausing 1997

Abbreviation: C_{max} = Maximum Plasma Concentration

2.6.3.2.4 シグマ-1 受容体アゴニスト PRE-84 に対するフェンフルラミンの調節作用
([AM335]試験)

Overview				Test Article: Fenfluramine and Norfenfluramine		
Type of Study	Test System	Method of Admin.	Concentration (mol/L)	Assay Replication	Noteworthy Findings	Study Number
In vitro positive modulation BiP assay	CHO cells	In vitro	0.1, 1, and 10×10 ⁻⁶	1 assay per test condition	Fenfluramine acted as a positive modulator of sigma-1 receptor at 1 and 10 μmol/L.	[AM335] (評価資料)

Abbreviations: Admin. = Administration; BiP = Binding Immunoglobulin Protein; CHO = Chinese Hamster Ovary

2.6.3.2.5 シグマ-1 受容体に対するフェンフルラミンのアゴニスト／アンタゴニスト作用
([AM354]試験)

Overview				Test Article: Fenfluramine and Norfenfluramine		
Type of Study	Test System	Method of Admin.	Concentration (mol/L)	Assay Replication	Noteworthy Findings	Study Number
In vitro agonist and antagonist assays	CHO cells	In vitro	1 and 10×10 ⁻⁶	1 assay per test condition	Fenfluramine had no activity as an agonist or antagonist at the sigma-1 receptor at 1 or 10 µmol/L.	[AM354] (評価資料)

Abbreviations: Admin. = Administration; CHO = Chinese Hamster Ovary

2.6.3.2.6 ナトリウムチャネル電流に対する作用 ([ZOG121515-1]試験)

Overview				Test Article: Fenfluramine and Norfenfluramine		
Type of Study	Test System	Method of Admin.	Concentration (mol/L)	Assay Replication	Noteworthy Findings	Study Number
In vitro agonist and antagonist assays	Voltage-gated sodium channels hNa _v 1.1 through hNa _v 1.8	In vitro	0.37 to 30×10 ⁻⁶	1 assay per sodium channel; “Ion Channel Profiler” patch clamp assay	<ul style="list-style-type: none"> Fenfluramine had no effect on any sodium channel. Levofenfluramine, racemic norfenfluramine and its enantiomers altered activity only at the hNa_v1.5 at IC₅₀ ranging 21.9 to 39.2 μmol/L. The maximum concentration of fenfluramine in the brain at steady state at the highest clinical dose is estimated to be 2 to 8 μmol/L and therefore the IC₅₀ findings are much higher than the clinically relevant concentration. 	[ZOG121515-1] (評価資料)

Abbreviations: Admin. = Administration; hNa_v1.1 = Type I Voltage-Gated Sodium Channel; hNa_v1.5 = Type V Voltage-Gated Sodium Channel (Cardiac Voltage-Gated Sodium Channel); hNa_v1.8 = Type VIII Voltage-Gated Sodium Channel; IC₅₀ = Half Maximal Inhibitory Concentration

表 2.6.3.2.6-1 ナトリウムチャネル電流に対する作用 hNav1.1 (ZOG121515-1 試験)

Compound	Estimated IC ₅₀ (μmol/L)	
	P1	P20
racemic fenfluramine	>30	>30
(+)fenfluramine	>30	>30
(-)fenfluramine	>30	>30
racemic norfenfluramine	>30	>30
(+)norfenfluramine	>30	>30
(-)norfenfluramine	>30	>30
Tetracaine	66.5	2.1

Abbreviations: IC₅₀ = Half Maximal Inhibitory Concentration; hNav1.1 = Type I Voltage-Gated Sodium Channel;
P1 = pulse 1; P20 = pulse 20

表 2.6.3.2.6-2 ナトリウムチャネル電流に対する作用 hNav1.2 (ZOG121515-1 試験)

Compound	Estimated IC ₅₀ (μmol/L)	
	P1	P20
racemic fenfluramine	>30	>30
(+)fenfluramine	>30	>30
(-)fenfluramine	>30	>30
racemic norfenfluramine	>30	>30
(+)norfenfluramine	>30	>30
(-)norfenfluramine	>30	>30
Lidocaine	669.3	313.2

Abbreviations: IC₅₀ = Half Maximal Inhibitory Concentration; hNav1.2 = Type II Voltage-Gated Sodium Channel;
P1 = pulse 1; P20 = pulse 20

表 2.6.3.2.6-3 ナトリウムチャネル電流に対する作用 hNav1.3 (ZOG121515-1 試験)

Compound	Estimated IC ₅₀ (μmol/L)	
	P1	P20
racemic fenfluramine	>30	>30
(+)fenfluramine	>30	>30
(-)fenfluramine	>30	>30
racemic norfenfluramine	>30	>30
(+)norfenfluramine	>30	>30
(-)norfenfluramine	>30	>30
Lidocaine	1020.0	387.5

Abbreviations: IC₅₀ = Half Maximal Inhibitory Concentration; hNav1.3 = Type III Voltage-Gated Sodium Channel;
P1 = pulse 1; P20 = pulse 20

表 2.6.3.2.6-4 ナトリウムチャネル電流に対する作用 hNav1.4 (ZOG121515-1 試験)

Compound	Estimated IC ₅₀ (μmol/L)	
	P1	P20
racemic fenfluramine	>30	>30
(+)fenfluramine	>30	>30
(-)fenfluramine	>30	>30
racemic norfenfluramine	>30	>30
(+)norfenfluramine	>30	>30
(-)norfenfluramine	>30	>30
Lidocaine	840.5	177.7

Abbreviations: IC₅₀ = Half Maximal Inhibitory Concentration; hNav1.4 = Type IV Voltage-Gated Sodium Channel;
P1 = pulse 1; P20 = pulse 20

表 2.6.3.2.6-5 ナトリウムチャネル電流に対する作用 hNav1.5 (ZOG121515-1 試験)

Compound	Estimated IC ₅₀ (μmol/L)	
	P1	P20
racemic fenfluramine	>30	>30
(+)fenfluramine	>30	>30
(-)fenfluramine	>30	35.5
racemic norfenfluramine	>30	21.9
(+)norfenfluramine	>30	27.4
(-)norfenfluramine	>30	39.2
Lidocaine	177.6	32.5

Abbreviations: IC₅₀ = Half Maximal Inhibitory Concentration; hNav1.5 = Type V Voltage-Gated Sodium Channel (Cardiac Voltage-Gated Sodium Channel); P1 = pulse 1; P20 = pulse 20

表 2.6.3.2.6-6 ナトリウムチャネル電流に対する作用 hNav1.6 (ZOG121515-1 試験)

Compound	Estimated IC ₅₀ (μmol/L)	
	P1	P20
racemic fenfluramine	>30	>30
(+)fenfluramine	>30	>30
(-)fenfluramine	>30	>30
racemic norfenfluramine	>30	>30
(+)norfenfluramine	>30	>30
(-)norfenfluramine	>30	>30
Lidocaine	1102.0	326.2

Abbreviations: IC₅₀ = Half Maximal Inhibitory Concentration; hNav1.6 = Type VI Voltage-Gated Sodium Channel;
P1 = pulse 1; P20 = pulse 20

表 2.6.3.2.6-7 ナトリウムチャネル電流に対する作用 hNav1.7 (ZOG121515-1 試験)

Compound	Estimated IC ₅₀ (μmol/L)	
	P1	P20
racemic fenfluramine	>30	>30
(+)fenfluramine	>30	>30
(-)fenfluramine	>30	>30
racemic norfenfluramine	>30	>30
(+)norfenfluramine	>30	>30
(-)norfenfluramine	>30	>30
Lidocaine	264.3	95.7

Abbreviations: IC₅₀ = Half Maximal Inhibitory Concentration; hNav1.7 = Type VII Voltage-Gated Sodium Channel;
P1 = pulse 1; P20 = pulse 20

表 2.6.3.2.6-8 ナトリウムチャネル電流に対する作用 hNav1.8 (ZOG121515-1 試験)

Compound	Estimated IC ₅₀ (μmol/L)	
	P1	P20
racemic fenfluramine	>30	>30
(+)fenfluramine	>30	>30
(-)fenfluramine	>30	>30
racemic norfenfluramine	>30	>30
(+)norfenfluramine	>30	>30
(-)norfenfluramine	>30	>30
A803467	48.9nM	26.8nM

Abbreviations: IC₅₀ = Half Maximal Inhibitory Concentration; hNav1.8 = Type VIII Voltage-Gated Sodium Channel;
P1 = pulse 1; P20 = pulse 20

[ZOG121515-1 Table hNav1.1, hNav1.2, hNav1.3, hNav1.4, hNav1.5, hNav1.6, hNav1.7 及び hNav1.8]

2.6.3.2.7 ドラベ症候群ゼブラフィッシュモデルに対する作用 ([ZX008-P1-001A]試験)

Overview				Test Article: Fenfluramine	
Test System	Method of Admin.	Concentration (mol/L)	Assay Replication	Noteworthy Findings	Study Number
Wild-type and homozygous scn1Lab ^{-/-} mutant zebrafish larvae	Addition to media	25	Duplicate	Previous work demonstrated that fenfluramine positively modulates the sigma-1 receptor. This work shows that a positive modulator of the sigma-1 receptor, SOMCL-668, reduces the hyperlocomotor phenotype and the frequency of epileptiform activity in a zebrafish model of Dravet syndrome. Collectively, these findings suggest that positive modulation of the sigma-1 receptor is part of fenfluramine's mechanism of reducing seizures.	[ZX008-P1-001A] (評価資料)

Abbreviations: Admin. = Administration

表 2.6.3.2.7-1 自発運動量 (ZX008-P1-001A 試験)

Integration interval (Seconds)	VHC (HO)				Integration interval (Seconds)	VHC (WT)		
	Experiment 1	Experiment 2	Experiment 3	total MEAN for normalization of other groups		Experiment 1	Experiment 2	Experiment 3
100	8516.6	4583.8	4582.8		100	424.2	1673.0	558.0
200	4526.2	4792.6	5687.2		200	546.8	883.8	380.2
300	3850.4	3625.8	4905.0		300	1228.6	489.0	420.4
400	3768.8	2906.8	4778.4		400	822.8	609.8	587.8
500	4663.2	3966.8	5113.4		500	365.8	914.2	556.2
600	3997.8	3892.6	5808.4		600	708.8	695.4	746.6
MEAN	4887.2	3961.4	5145.9	4664.8	MEAN	682.8	877.5	541.5
% compared to first VHC (HO)	100.0	81.1	105.3		% to VHC (HO) MEAN	14.6	18.8	11.6
% mean	95.5				% mean	15.0		
SD	10.4				SD	3.0		

Integration interval (Seconds)	SOMCL (HO)			SOMCL (WT)		
	Experiment 1	Experiment 2	Experiment 3	Experiment 1	Experiment 2	Experiment 3
100	2787.2	2556.0	3723.8	599.4	319.6	1349.4
200	1302.4	3255.2	3357.2	365.8	443.8	2035.6
300	2294.0	3198.2	2630.2	323.2	399.4	881.6
400	734.4	3436.6	2561.8	473.4	178.8	764.6
500	988.0	3439.8	3836.6	2034.4	204.0	806.2
600	2575.8	5031.8	3524.6	298.8	609.6	958.0
MEAN	1780.3	3486.3	3272.4	682.5	359.2	1132.6
% to VHC (HO) MEAN	38.2	74.7	70.2	14.0	7.7	24.3
% mean	61.0			15.3		
SD	16.3			6.8		

Integration interval (Seconds)	FFA (HO)			FFA (WT)		
	Experiment 1	Experiment 2	Experiment 3	Experiment 1	Experiment 2	Experiment 3
100	4374.8	5351.6	5386.0	3483.0	14.8	67.6
200	5270.6	6849.8	5682.6	4095.4	0.0	316.8
300	5679.6	7673.6	9777.6	3082.8	0.0	314.4
400	4057.2	6824.6	6612.0	3710.6	0.0	1055.8
500	6243.4	8744.6	6814.6	4020.2	569.4	230.8
	3978.8	8640.6	4688.0	4003.8	0.0	1586.4
MEAN	4934.1	7347.5	6493.5	3732.6	97.4	595.3
% to VHC (HO) MEAN	56.9	84.7	74.8	43.0	1.1	6.9
% mean	72.1			17.0		
SD	11.5			18.5		

Abbreviations: FFA = Fenfluramine; HO = Homozygous *scn1Lab^{-/-}* Groups; SD = Standard Deviation;
 SOMCL = SOMCL-668 (positive modulator of sigma 1 receptor); VHC = Vehicle; WT = Wild-type
 [ZX008-P1-001A Figure 1]

表 2.6.3.2.7-2 てんかん様活動 (ZX008-P1-001A 試験)

Number of animals recorded:	9	16	18	20
Mean number of epileptiform events per 10 minutes:	0.44	7.88	3.61	1.70
Standard deviation:	0.73	4.66	3.55	1.81
Genotype of animals:	WT	HO	HO	HO
Treatment administered to animals:	Vehicle	Vehicle	SOMCL-668	FFA
Epileptiform events recorded:	0	9	0	0
	0	11	11	2
	0	1	2	6
	1	13	2	4
	0	5	0	0
	0	2	0	1
	1	6	5	2
	0	17	8	1
	2	6	1	1
		9	0	0
		4	2	2
		9	4	2
		13	7	2
		13	4	2
		2	6	0
		6	10	0
			0	6
			3	0
				2
				1

Abbreviations: FFA = Fenfluramine; HO = Homozygous *scn1Lab^{-/-}* Groups; WT = Wild-type

[4.2.1.1 Figure 2]

2.6.3.3 副次的薬理試験 ([XS-0691]試験)

Overview				Test Article: Fenfluramine and Norfenfluramine		
Type of Study	Test System	Method of Admin.	Concentration (mol/L)	Assay Replication	Noteworthy Findings	Study Number
Competitive inhibition assay for receptor binding of fenfluramine and norfenfluramine	Recombinant receptors	In vitro	1×10^{-6} and 1×10^{-5}	Duplicate	Norfenfluramine had a modest interaction at muscarinic M ₁ receptors.	[XS-0691] (評価資料)

Abbreviation: Admin. = Administration

表 2.6.3.3-1 ムスカリン性 M₁ (ラット大脳皮質) 受容体結合に対する IC₅₀ 値と Ki 値 (XS-0691 試験)

Assay System	Substance	IC ₅₀ (mol/L)	Ki (mol/L)
Muscarinic M ₁ (Rat cerebral cortex)	(±)-fenfluramine	1.30×10^{-5}	1.13×10^{-5}
	(±)-norfenfluramine	4.32×10^{-6}	3.74×10^{-6}
	Atropine*	1.13×10^{-9}	9.80×10^{-10}

Abbreviations: IC₅₀ = Half Maximal Inhibitory Concentration; Kd = Dissociation Constant; Ki = Inhibitory Constant, (IC₅₀)/[1+(L/Kd)]

*Positive control

[XS-0691 Table 5]

文献において実施された試験については、[2.6.2.3]項に記載した。

2.6.3.4 安全性薬理試験

2.6.3.4.1 中枢及び末梢神経系

表 2.6.3.4-1 幼若アルビノラットを用いたフェンフルラミン塩酸塩の 10 週間強制経口投与毒性試験及び 4 週間回復性試験 ([9000406]試験)

A 10-Week Oral Gavage Toxicity Study of Fenfluramine Hydrochloride in the Juvenile Albino Rats with a 4-week Recovery Period								
Test Article: Fenfluramine Hydrochloride								
Species/Strain: Rat/Sprague Dawley ■■■:CD(SD)			Duration of Dosing: PND 7 to 76		Study No. : [9000406]（評価資料）			
Initial Age: 7 days postnatal at the start of dosing			Duration of Postdose: PND 77 to 105		Vehicle/Formulation: Fenfluramine hydrochloride in UPW			
Date of First Dose: ■■■■ 20■■■			Method of Administration: Oral gavage		GLP Compliance: Yes			
Special Features: Toxicokinetics								
NOAEL: 9 mg/kg/day								
Noteworthy Findings: ≥9 mg/kg/day: Reduced body weight, decreased bone size. 20 mg/kg/day: Decreased brain size.								
Dose (mg/kg)	0 (Control)		3.5		9		20	
Number of Animals/Sex/Group	M	F	M	F	M	F	M	F
Main + Recovery:	10 + 10	10 + 10	10 + 10	10 + 10	10 + 10	10 + 10	10 + 10	10 + 10
Neurobehavioral/Reproductive:	16	16	16	16	16	16	16	16
Noteworthy Findings								
Functional Observation Battery								
Rearing in the arena (PNDs 56 to 62)	14.1	11.5	11.3	12.3	7.8	13.3	7.5 D	12.7
Body Temperature (°C)								
PND 58	38.7	38.8	38.2 D	38.8	38.2 D	38.6	38.1 E	38.3 B
PND 91	38.6	38.9	38.2	38.6	38.1 A	38.4 B	38.1 B	38.3 C
Motor Activity ^a								
Ambulation (PND 58)	233.7	207.1	163.8 A	202.2	171.9	174.8	146.4 A	166.8
Ambulation (PND 91)	254.5	243.0	179.3 B	174.1 B	176.8 B	140.8 C	143.6 C	164.3 C

Dose (mg/kg)	0 (Control)		3.5		9		20	
Number of Animals/Sex/Group	M	F	M	F	M	F	M	F
Main + Recovery:	10 + 10	10 + 10	10 + 10	10 + 10	10 + 10	10 + 10	10 + 10	10 + 10
Neurobehavioral/Reproductive:	16	16	16	16	15-16	16	15-16	15-16
Water Maze (PNDs 56 to 69)								
Number of errors								
Path B								
Trial 1	19.5	18.5	18.4	24.0	20.6	22.7	25.3 D	24.6
Trial 2	7.7	8.2	8.9	13.6	13.4	9.9	13.7	13.8
Trial 3	3.0	4.4	9.5 E	8.7	11.6 E	7.4	11.5 F	11.6
Trial 4	1.4	1.3	5.0	4.5	5.5	2.8	8.1 D	5.0 D
Trial 5	0.9	0.3	1.3	3.0	3.9	1.3	4.1 D	4.1 D
Trial 6	0.1	0.7	0.1	0.6	2.0	0.5	2.7 D	1.0

Abbreviations: F = Females; M = Males; NOAEL = No-Observed-Adverse-Effect Level; PND = Postnatal Day; UPW = Ultrapure Water

Significantly different from control group (Group 1) value: A – $p \leq 0.05$, B – $p \leq 0.01$, C – $p \leq 0.001$ (Dunnett); D – $p \leq 0.05$, E – $p \leq 0.01$, F – $p \leq 0.001$ (Dunnett)

^aLeast squares means are shown.

2.6.3.4.2 心血管系

表 2.6.3.4-2 ビーグル犬を用いたフェンフルタミン塩酸塩の 43 週間強制経口投与試験及び 28 日間回復性試験 ([01127008]試験)

Overview				Test Article: Fenfluramine Hydrochloride			
Organ Systems Evaluated	Species/ Strain	Method of Admin.	Doses (mg/kg/day)*	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	GLP Compliance	Study Number
Cardiovascular and Respiratory (clinical observations only)	Dog/ Beagle	Oral	0, 2.5, 5, 10, 20/15 ^a , 30/20 ^a , or 50/25 ^a , 43 weeks	0, 20/15, 30/20, 50/25 (M:6, F:6), 2.5, 5, 10 (M:4, F:4)	<ul style="list-style-type: none"> No abnormalities in rhythm or waveform morphology were found at any dose level based on comparison of pre- and postdose electrocardiographic recordings. No fenfluramine hydrochloriderelated clinical signs suggesting adverse effects on the respiratory system were found at any fenfluramine hydrochloride dose level. 	Yes	[01127008] (評価資料)

Abbreviations: Admin. = Administration; F = Females; GLP = Good Laboratory Practice; M = Males

^aAll animals in Groups 5, 6, and 7 were given a dosing holiday starting on Day 2 after having been dosed on Day 1 at dose levels of 20, 30, and 50 mg/kg/day, respectively. Dosing for animals in Groups 5, 6, and 7 resumed on Day 6 at a dosage level of 10 mg/kg/day and continued until Day 14. Dosing for animals in Groups 5, 6, and 7 escalated to 15 mg/kg/day beginning on Day 15 and continued until Day 21. Animals in Group 5 continued to be dosed at 15 mg/kg/day on Day 22 and for the remainder of the dosing period. Dosing for animals in Groups 6 and 7 escalated to 20 mg/kg/day on Day 22 and continued until Day 28. Animals in Group 6 continued to be dosed at 20 mg/kg/day on Day 29 and for the remainder of the dosing period. Dosing for animals in Group 7 escalated to 25 mg/kg/day on Day 29 and for the remainder of the dosing period.

*Fenfluramine Hydrochloride

2.6.3.5 薬力学的薬物相互作用試験

文献において実施された試験については、[\[2.6.2.5\]](#)項に記載した。

2.6.3.6 参考文献

Caccia S, Ballabio M, Guiso G, Rocchetti M, Garattini S. Species differences in the kinetics and metabolism of fenfluramine isomers. *Arch Int Pharmacodyn Ther*. 1982;258(1):15-28.

Clausing P, Rushing LG, Newport GD, Bowyer JF. Determination of D-fenfluramine, D-norfenfluramine and fluoxetine in plasma, brain tissue and brain microdialysate using high-performance liquid chromatography after precolumn derivatization with dansyl chloride. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*. 1997;692(2):419-426.

Spinelli R, Fracasso C, Guiso G, Garattini S, Caccia S. Disposition of (–)-fenfluramine and its active metabolite, (–)-norfenfluramine in rat: a single dose-proportionality study. *Xenobiotica*. 1988;18(5):573-584.