目次

2. CTD の概要 2
2.6 非臨床試験の概要文及び概要表 2
2.6.1 緒言 2
2.6.1.1 医薬品の構造及び薬理学的特性 2
2.6.1.2 効能・効果 2
2.6.1.3 用法・用量 2

2. CTD の概要

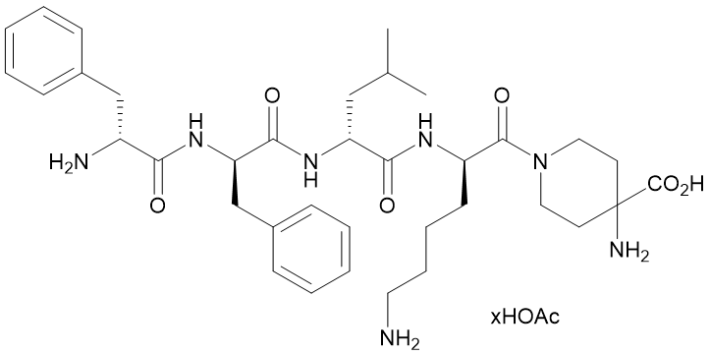
2.6 非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.1 緒言

2.6.1.1 医薬品の構造及び薬理学的特性

ジフェリケファリン酢酸塩は、2 分子の D-フェニルアラニンと、1 分子ずつの D-ロイシン並びに D-リシンの合計 4 個のアミノ酸とピペリジンからなるテトラペプチドである。ジフェリケファリン酢酸塩の構造式を図 2.6.1.1- 1 に示す。ジフェリケファリン酢酸塩は、κ オピオイド受容体に選択的に作用するフルアゴニストであり、主に末梢性に働くことで、抗掻痒の効果が期待できる。また、ジフェリケファリン酢酸塩は、各種の掻痒モデルにおいて抗掻痒作用を示すとともに、各種の炎症モデルにおいても、抗炎症作用を示したことから、抗掻痒効果とともに抗炎症効果も期待できる。

図 2.6.1.1- 1　構造式



2.6.1.2 効能・効果

血液透析患者における掻痒症の改善（既存治療で効果不十分な場合に限る）

2.6.1.3 用法・用量

通常、成人にはジフェリケファリンとして 0.5 μg/kg を週 3 回、透析終了時の返血時に透析回路静脈側に注入する。

目次

略号一覧 2
2. CTD の概要 4
2.6 非臨床試験の概要文及び概要表 4
2.6.2 薬理試験の概要文 4
2.6.2.1 まとめ 4
2.6.2.2 効力を裏付ける試験 7
2.6.2.3 副次的薬理試験 20
2.6.2.4 安全性薬理試験 30
2.6.2.5 薬力学的薬物相互作用試験 47
2.6.2.6 考察及び結論 48
2.6.2.7 図表 53

略号一覧

略号	説明
ANOVA	analysis of variance：分散分析
BBB	blood-brain barrier：血液脳関門
bpm	beat per minute：1 分間の拍動回数
cAMP	cyclic adenosine monophosphate：環状アデノシン 1 リン酸
CFA	complete Freund’s adjuvant：完全フロインドアジュバント
CHO	chinese hamster ovary：チャイニーズハムスターの卵巣
C_{max}	maximum observed plasma concentration：最高血漿中濃度
CPM	counts per minute：1 分間あたりの計測数
DBTC	dibutyltin dichloride：ジブチルスズジクロライド
EC_{50}	50％ effective concentration：50%効果濃度
ECG	electrocardiogram：心電図
ED_{50}	50％ effective dose：50%有効用量、50%阻害用量、50%抑制用量
ELISA	Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay：酵素結合免疫吸着検定法
FOB	functional observational battery：機能観察総合評価
GI	gastrointestinal：胃腸の
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
G-CSF	granulocyte colony-stimulating factor：顆粒球コロニー形成刺激因子
GM-CSF	granulocyte-macrophage colony-stimulating factor：顆粒球マクロファージコロニー刺激因子
GNTI	5’-guanidinonaltrindole：5’-グアニジノナルトリンドール
hDOR	human delta-(δ) opioid receptor：ヒトデルタオピオイド受容体
HEK	human embryonic kidney：ヒト胎児腎
hERG	human ether-à-go-go-related gene：ヒト ether-à-go-go 関連遺伝子
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid：ヒドロキシエチルピペラジンエタンスルホン酸
hKOR	human kappa-(κ) opioid receptor：ヒトカッパオピオイド受容体
hMOR	human mu-(μ) opioid receptor：ヒトミューオピオイド受容体
IBU	ibuprofen：イブプロフェン
IFNγ	interferon γ：インターフェロンガンマ
IL	interleukin：インターロイキン
ip	intraperitoneal：腹腔内
iv	intravenous：静脈内
K_d	dissociation constant：解離定数

略号	説明
Ki	inhibition constant：阻害定数
K_{off}	dissociation rate constant：解離速度定数
k_{on}	association rate constant：結合速度定数
KOR	kappa-(κ) opioid receptor：カッパオピオイド受容体
L5/L6	5th lumbar vertebra / 6th lumbar vertebra：第 5 腰椎/第 6 腰椎
LPS	lipopolysaccharide：リポ多糖類
MCP	monocyte chemoattractant protein：単球走化性タンパク質
MIP	macrophage inflammatory protein：マクロファージ炎症性タンパク質
mKOR	mouse kappa-(κ) opioid receptor：マウスカッパオピオイド受容体
MOR	mu-(μ) opioid receptor：ミューオピオイド受容体
MPE	maximum possible effect：最大可能効果
NM	naloxone methiodide：ナロキソンメチオジド
Nor-BNI	nor-binaltorphimine：ノルビナルトルフィミン
NS	no significant difference：有意差なし
NSAID	nonsteroidal anti-inflammatory drug：非ステロイド性抗炎症薬
PR	心電図の PR 間隔
QRS	心電図の QRS 間隔
QT	心電図の QT 間隔
QTc	心拍数で補正した QT 間隔：補正 QT 間隔
RANCOVA	repeated measures analysis of covariance：反復測定共分散分析
RGA	reporter gene assay：レポーター遺伝子アッセイ
sc	subcutaneous：皮下
SNL	spinal nerve ligation：脊髄神経結紮
$t_{1/2}$	binding half-life：結合半減期
TNF	tumor necrosis factor：腫瘍壊死因子

2. CTD の概要

2.6 非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.2 薬理試験の概要文

2.6.2.1 まとめ

2.6.2.1.1 効力を裏付ける試験

非臨床薬理試験にはジフェリケファリン酢酸塩（米国開発コード名：CR845、国内開発コード名：MR13A9。以下、ジフェリケファリンと表記。投与量及び *in vitro* の設定濃度は、遊離塩基として表記した。）を用いた。*in vitro* 試験において、バインディングアッセイでは、ジフェリケファリンは、ヒト κ オピオイド受容体に対して選択的で高い親和性（阻害定数（Ki）＝0.32 nmol/L）を示した。ヒト μ 及び δ オピオイド受容体へのリガンド結合に対する阻害率は、10000 nmol/L の濃度で 15%未満であった。受容体機能活性では、κ オピオイド受容体に対して最大作用活性を示し、マウス κ オピオイド受容体に対する EC_{50} は 0.048 nmol/L であり、ヒト κ オピオイド受容体に対する EC_{50} は 0.16 nmol/L であった。ジフェリケファリンは、κ オピオイド受容体特異的な作用をもつフルアゴニストであることが示された。ヒト κ オピオイド受容体を用いたバインディングキネティクスにおいて、ジフェリケファリンの解離定数（K_d）は 0.14 nmol/L であり半減期（$t_{1/2}$）は 92 分であった。ジフェリケファリンは、バインディングアッセイにおいて、10 μmol/L の濃度で、κ オピオイド受容体以外の受容体、トランスポーター及びイオンチャネルへのリガンド結合並びに酵素活性に対して 30%以上の阻害を示さなかった。

ジフェリケファリンは、ヒトマクロファージを LPS 及び IFNγ で刺激した際の TNFα、IL-1β、IL-6、IL-8 及び G-CSF の放出を有意に抑制した。この作用は選択的 κ オピオイド受容体拮抗薬であるノルビナルトルフィミン（nor-BNI）により阻害されたことから、ジフェリケファリンの抗炎症作用は免疫細胞上の κ オピオイド受容体活性を介することが示唆された。

in vivo 試験において、ジフェリケファリン（iv）は、マウスを用いたヒスタミン、サブスタンス P、Compound 48/80 及び 5’-Guanidinonaltrindole（GNTI）誘発掻痒モデルにおいて、用量依存的に抗掻痒作用を示し、その ED_{50} は、それぞれ 0.018、0.32、0.077 及び 0.053 mg/kg であった。また、マウスを用いたサブスタンス P 誘発掻痒モデルにおいて、ジフェリケファリン（0.3 mg/kg iv）の抗掻痒作用は、投与後 12 時間持続した。ジフェリケファリンの抗掻痒作用は、nor-BNI によって用量依存的に拮抗されたことから、その作用は、κ オピオイド受容体を介していることが示された。

ジフェリケファリン（sc）は、マウスを用いた LPS により誘発された TNFα、IL-1β、IL-2、MIP-1β 及び IL-12（p40/p70）の放出を 10 mg/kg で有意に減少させた。また、ジフェリケファリン（iv）は、ラットカラゲニン誘発足浮腫モデルにおける足浮腫を 0.3 mg/kg 以上で有意に減少させた。これらのことから、ジフェリケファリンは、抗炎症作用を有することが示された。

2.6.2.1.2 副次的薬理試験

ジフェリケファリン（iv）は、マウスを用いた酢酸ライジング試験において、用量依存的にライジング反応を抑制し、その ED_{50} は 0.07 mg/kg であった。このジフェリケファリン（0.3 mg/kg iv）の抑制作用は、投与後 18 時間持続した。また、ジフェリケファリン（ip）は、ラットを用いたジブチルスズジクロライド（DBTC）誘発慢性膵炎モデルにおける腹部痛覚過敏を用量依存的に抑制し、その ED_{50} は 0.03 mg/kg であった。ジフェリケファリンの鎮痛作用は、nor-BNI 及び非選択的な末梢性オピオイド受容体拮抗薬のナロキソンメチオジドによって拮抗されたことから、DBTC 誘発慢性膵炎の腹部痛覚過敏に対するジフェリケファリンの鎮痛作用は、末梢性 κ オピオイド受容体を介していることが示唆された。

また、ジフェリケファリン（iv）は、ラットを用いた神経因性疼痛モデル（SNL モデル）において用量依存的にアロディニアを抑制し、その ED_{50} は 0.31 mg/kg であった。この作用は、nor-BNI の足蹠皮下投与により拮抗されたことから、ジフェリケファリンは末梢の κ オピオイド受容体に作用し、神経因性疼痛を抑制することが示唆された。同モデルにおいて、ジフェリケファリン（1 mg/kg iv）の 7 日間反復投与においても鎮痛作用が示され、耐性を引き起こしにくいことが示唆された。

ジフェリケファリン（iv）は、ラットを用いたカラゲニン誘発痛覚過敏モデルにおいて用量依存的に鎮痛作用を示し、その ED_{50} は 0.33 mg/kg であった。また、ジフェリケファリン（iv）は、ラット完全フロインドアジュバント誘発炎症性疼痛モデルにおいて用量依存的に痛覚過敏を減弱させ、その ED_{50} は 0.07 mg/kg であった。これらのことから、ジフェリケファリンは、鎮痛作用を有することが示された。

2.6.2.1.3 安全性薬理試験

中枢神経系では、ラットを用いた機能観察総合評価において、ジフェリケファリン（1、5 及び 25 mg/kg iv）の全用量で、すべての機能評価（中枢神経活動性及び覚醒、自律神経系機能、感覚運動機能及び神経筋機能）に活動性の低下による影響が認められた。これらの影響は、用量依存性はなく、一過性であり、投与後 24 時間には概ね消失し、48 時間には回復した。観察された症状は、κ オピオイド受容体アゴニストの薬理学的な作用に由来すると考えられた。

また、ジフェリケファリン（iv）は、マウスを用いた自発運動量及びロータロッド試験において、0.3 mg/kg 以上で自発運動量の抑制及び 1 mg/kg 以上で運動協調性への影響が認められ、ラットを用いたロータロッド試験では、3 mg/kg 以上で運動協調性に影響が認められた。さらに、マウスを用いた睡眠増強試験では、0.3 mg/kg 以上でペントバルビタールによる睡眠作用の増強が認められ、ラットを用いた脳波測定試験では、0.1 mg/kg 以上で睡眠-覚醒周期への影響が認められた。

心血管系では、hERG チャネル発現細胞におけるカリウム電流に対するジフェリケファリンの阻害は、1000 μmol/L の高濃度においても 7.2%であった。サルを用いた覚醒下テレメトリー試験では、ジフェリケファリン（0.25、1 及び 4 mg/kg iv）の全用量で、血圧の低下（最

大 43%）が認められ、用量に依存しない心拍数の低下も認められた。心電図パラメータに影響は認められなかった。

呼吸系では、ラットにおいて、ジフェリケファリン（1、5 及び 25 mg/kg iv）の全用量で、呼吸数減少及びそれに伴う代償的な一回換気量の軽微な増加が認められたが、分時換気量は維持された。

胃腸管系では、ジフェリケファリン（iv）により、ラットを用いた腸管輸送能及び胃排出能試験において、1 mg/kg 以上でわずかな腸管輸送能の抑制が認められたが、胃排出能に対しては 10 mg/kg においても影響は認められなかった。また、ラット術後イレウスモデルを用いた腸管輸送能及び胃排出能試験では、3 mg/kg においても腸管輸送能及び胃排出能に影響は認められなかった。

2.6.2.1.4 薬力学的薬物相互作用試験

該当試験なし

2.6.2.2 効力を裏付ける試験

2.6.2.2.1 *in vitro* 試験

2.6.2.2.1.1 ヒトオピオイド受容体選択性

・・・・・・・・・**添付資料 4.2.1.1-1 参照**

添付資料 4.2.1.1-2 参照

ヒトκオピオイド受容体（hKOR）、μオピオイド受容体（hMOR）及びδオピオイド受容体（hDOR）に対してバインディングアッセイを行い、受容体の選択性について検討した。

ジフェリケファリンは 10 μmol/L の濃度において、hKOR へのリガンド結合を選択的に阻害した。また、Ki は、0.32 nmol/L であったことから、ジフェリケファリンは、hKOR に高い親和性を示した（表 2.6.2.2.1.1- 1 参照）。

表 2.6.2.2.1.1- 1　ジフェリケファリンの hKOR、hMOR 及び hDOR に対する特異的結合

受容体	リガンド結合に対する阻害率 (%) (ジフェリケファリン 10 μmol/L)	Ki (nmol/L)
hKOR	95	0.32
hMOR	14	--
hDOR	<10	--

データは平均値（n=2）を示す。

--：実施していない

2.6.2.2.1.2 マウス及びヒトオピオイド受容体アゴニスト作用

・・・・・・・・・**添付資料 4.2.1.1-3 参照**

マウスκオピオイド受容体（mKOR）の受容体機能活性は、cAMP アッセイを用いて評価した。マウス R1G1 細胞を用い、フォルスコリン共存下でジフェリケファリンによる cAMP の産生に及ぼす影響を LANCE™ immuno assay kit を用いて測定した。

また、ヒトκ、μ及びδオピオイド受容体の受容体機能活性は、各受容体を発現させた HEK293 細胞を用いて、ルシフェラーゼレポーター遺伝子アッセイ（Reporter gene assay；RGA）で評価した。対照物質は、KOR アゴニストである FE200666 を用いた。cAMP アッセイ及びレポーターアッセイから得られた値より、EC_{50}（nmol/L）及び最大可能効果に対する割合（percent of maximum possible effect；%MPE）を%Efficacy（%）として算出した。

mKOR に対するジフェリケファリンの%Efficacy は 96%、EC_{50} は 0.048 nmol/L であった。また、hKOR に対するジフェリケファリンの%Efficacy は 99%、EC_{50} は 0.16 nmol/L であり、hMOR 及び hDOR に対しては 10000 nmol/L まで作用活性を示さなかったことから、ジフェリケファリンは、KOR 特異的な作用をもつフルアゴニストであることが示された（表 2.6.2.2.1.2- 1 参照）。

表 2.6.2.2.1.2- 1　ジフェリケファリンの mKOR、hKOR、hMOR 及び hDOR に対するアゴニスト作用

受容体（アッセイ法）	EC_{50} (nmol/L)	%Efficacy	N
mKOR (cAMP)	0.048	96	3
hKOR (RGA)	0.16	99	4
hMOR (RGA)	>10,000	0	1
hDOR (RGA)	>10,000	0	1

2.6.2.2.1.3 バインディングキネティクス

・・・・・・・・・添付資料 4.2.1.1-4 参照

バインディングキネティクスは、CHO 細胞膜に発現させた hKOR に対する 1 nmol/L [^{3}H]-ジフェリケファリンの結合量を、シンチレーション近接アッセイ法により定量した。結合率は、1 分間あたりの計測数（Count per minute；CPM）を測定することで評価し、解離率は[^{3}H]-ジフェリケファリンと細胞膜を 100 分間インキュベートした後に、10 µmol/L のナロキソンを反応させた際の CPM を測定することにより評価した。さらに得られた値より、薬物-受容体間の結合速度定数（k_{on}）、解離速度定数（k_{off}）、解離定数（K_d）及び半減期（$t_{1/2}$）を算出した。

CHO 細胞膜に発現させた hKOR と[^{3}H]-ジフェリケファリンを用いたバインディングキネティクス解析の結果から、ジフェリケファリンの k_{on}、k_{off}、K_d 及び $t_{1/2}$ はそれぞれ、5.4×10^7/min･mol/L、0.0075/min、0.14 nmol/L 及び 92 分であった。

2.6.2.2.1.4 オピオイド以外の受容体、酵素、イオンチャネル及びトランスポーターへの作用

・・・・・・・・・添付資料 4.2.1.1-1 参照
添付資料 4.2.1.1-2 参照
添付資料 4.2.1.1-5 参照
添付資料 4.2.1.1-6 参照
添付資料 4.2.1.1-7 参照

各種受容体、トランスポーター及びイオンチャネルについてバインディングアッセイを、各種酵素について酵素アッセイを行い、特異的結合に対する阻害を検討した。

ジフェリケファリンは、10 µmol/L の濃度では、オピオイド以外の受容体、トランスポーター及びイオンチャネルへのリガンド結合並びに酵素活性に対して 30%以上の阻害は示さなかった（表 2.6.2.2.1.4- 1 参照）。

表 2.6.2.2.1.4- 1　ジフェリケファリンの各種受容体、酵素、イオンチャネル及びトランスポーターに対する特異的結合

受容体 [動物種]	リガンド結合に対する阻害率 (%) (10 µmol/L)	受容体 [動物種]	リガンド結合に対する阻害率 (%) (10 µmol/L)
Adenosine 1 (A_1) [ヒト]	15	Histamine 1 (H_1) [ヒト]	-----
Adenosine 2A (A_2) [ヒト]	-----	Histamine 2 (H_2) [ヒト]	-----
Adenosine 3 (A_3) [ヒト]	10	Histamine 3 (H_3) [ヒト]	-----
Alpha-adrenergic 1 (α_1) [ラット]	12	Interleukin-1 (IL-1) [マウス]	-----
Alpha-adrenergic 1B (α_{1B}) [ヒト]	-----	Interleukin-6 (IL-6) [ヒト]	-----
Alpha-adrenergic 1D (α_{1D}) [ヒト]	-----	Melanocortin 4 (MC_4) [ヒト]	-----
Alpha-adrenergic 2 (α_2) [ラット]	-----	Melatonin 1 (MT_1) [ヒト]	-----
Alpha-adrenergic 2B (α_{2B}) [ヒト]	-----	Muscarinic acetylcholine 1 (M_1) [ヒト]	10
Alpha-adrenergic 2C (α_{2C}) [ヒト]	-----	Muscarinic acetylcholine 2 (M_2) [ヒト]	11
Androgen (AR) [ヒト]	-----	Muscarinic acetylcholine 3 (M_3) [ヒト]	13
Angiotensin II type 1 (AT_1) [ヒト]	-----	Muscarinic acetylcholine 4 (M_4) [ヒト]	-----
Angiotensin II type 2 (AT_2) [ヒト]	-----	Muscarinic acetylcholine 5 (M_5) [ヒト]	-----
Beta-adrenergic 1 (β_1) [ヒト]	-----	Neurokinin 1 (NK_1) [ヒト]	-----
Beta-adrenergic 2 (β_2) [ヒト]	-----	Neurokinin 2 (NK_2) [ヒト]	23
Beta-adrenergic 3 (β_3) [ヒト]	-----	Neurokinin 3 (NK_3) [ヒト]	-----
Benzodiazepine (中枢性) [ラット]	-----	Neuropeptide Y1 (NPY1) [ヒト]	-----
Benzodiazepine (末梢性) [ラット]	-----	Neuropeptide Y2 (NPY2) [ヒト]	-----
Bombesin [ラット]	-----	Neurotensin (NTSR1) [ヒト]	-----
Bradykinin 1 (B_1) [ヒト]	13	Nicotinic acetylcholine [ヒト]	-----
Bradykinin 2 (B_2) [ヒト]	-----	Opioid receptor like, type 1 (ORL1) [ヒト]	-----
Cannabinoid 1 (CB_1) [ヒト]	-----	Pituitary adenylate cyclase-activating peptide (PAC_1) [ヒト]	-----
Cannabinoid 2 (CB_2) [ヒト]	-----	PCP [ラット]	-----
CCR1 [ヒト]	-----	PDGF [マウス]	14
CCR2B [ヒト]	-----	PPARγ [ヒト]	-----
CCR5 [ヒト]	-----	Prostanoid, PGE_2 (EP_2) [ヒト]	-----
CGRP [ヒト]	-----	Prostanoid, PGE_4 (EP_4) [ヒト]	-----
Cholecystokinin A (CCK1) [ヒト]	-----	Prostanoid, PGH_2/TXA_2 (TP) [ヒト]	-----
Cholecystokinin B (CCK2) [ヒト]	-----	Prostanoid, PGI_2 (IP) [ヒト]	-----
CXCR2(IL-8B) [ヒト]	-----	Purinergic (P2Y) [ラット]	-----
Dopamine 1 (D_1) [ヒト]	-----	Serotonin 1A ($5HT_{1A}$) [ヒト]	-----

データは平均値（n=2）を示す。-----：阻害率 10%未満

表 2.6.2.2.1.4- 1　ジフェリケファリンの各種受容体、酵素、イオンチャネル及びトランスポーターに対する特異的結合（続き）

受容体 [動物種]	リガンド結合に対する阻害率 (%) (10 μmol/L)	受容体 [動物種]	リガンド結合に対する阻害率 (%) (10 μmol/L)
Dopamine 2 (D_{2S}) [ヒト]	-----	Serotonin 1B ($5HT_{1B}$) [ラット]	-----
Dopamine 3 (D_3) [ヒト]	-----	Serotonin 2A ($5HT_{2A}$) [ヒト]	-----
Dopamine 4 ($D_{4.4}$) [ヒト]	-----	Serotonin 2B ($5HT_{2B}$) [ヒト]	-----
Dopamine 5 (D_5) [ヒト]	-----	Serotonin 2C ($5HT_{2C}$) [ヒト]	-----
Endothelin A (ET_A) [ヒト]	-----	Serotonin 3 ($5HT_3$) [ヒト]	-----
Endothelin B (ET_B) [ヒト]	-----	Serotonin 5A ($5HT_{5A}$) [ヒト]	-----
Estrogen (ER) [ヒト]	-----	Serotonin 6 ($5HT_6$) [ヒト]	-----
GABA [ラット]	-----	Serotonin 7 ($5HT_7$) [ヒト]	-----
GABA B [ラット]	-----	Sigma [ラット]	-----
Gabapentin [ラット]	-----	Sigma 1 [ヒト]	-----
Galanin 1 ($GALR_1$) [ヒト]	-----	Sigma 2 [ヒト]	-----
Galanin 2 ($GALR_2$) [ヒト]	-----	Somatostatin (SST) [マウス]	-----
Glucocorticoid (GR) [ヒト]	-----	Thyroid hormone (TH) [ラット]	-----
Glutamate, AMPA [ラット]	-----	Tumor necrosis factor alpha (TNFα) [ヒト]	-----
Glutamate, Kainate [ラット]	-----	Vasoactive intestinal peptide ($VPAC_1$) [ヒト]	-----
Glutamate, NMDA, Agonism [ラット]	-----	Vasopressin (V_{1a}) [ヒト]	-----
Glutamate, NMDA, Polyamine [ラット]	21		
酵素 [動物種]	**活性に対する阻害率 (%) (10 μmol/L)**	**酵素 [動物種]**	**活性に対する阻害率 (%) (10 μmol/L)**
Cyclooxygenase (COX-2) [ヒト]	-----	MAPK1 (ERK2) [ヒト]	-----
Fatty acid amide hydrolase (FAAH) [ラット]	10	MAPK11 (p38β) [ヒト]	-----
Nitric oxide synthase, neuronal (nNOS) [ラット]	-----	Phospholipase A_2 (PLA_2-II) [ヘビ]	-----
IKKβ (IKK-2) [ヒト]	-----		
イオンチャネル [動物種]	**リガンド結合に対する阻害率 (%) (10 μmol/L)**	**イオンチャネル [動物種]**	**リガンド結合に対する阻害率 (%) (10 μmol/L)**
Calcium, verapamil, L-type [ラット]	-----	Potassium, α-dendrotoxin (Kv) [ラット]	-----
Calcium, dihydropyridine, L-type [ラット]	-----	Potassium, ATP (K_{ATP}) [ラット]	-----
Calcium, diltiazem, L-type [ヒト]	-----	Purinergic, α,β-MeATP (P2X) [ラット]	18
Calcium, ω-conotoxin, N-type [ラット]	-----	Sodium, site 1 (Nav) [ラット]	-----
Chloride, picrotoxin ($GABA_A$) [ラット]	-----	Sodium, site 2 (Nav) [ラット]	11
Glycine, strychnine (GlyR) [ラット]	-----	Vanilloid (TRPV1) [ラット]	-----
Potassium, apamin (SK_{Ca}) [ラット]	-----		
トランスポーター [動物種]	**リガンド結合に対する阻害率 (%) (10 μmol/L)**	**トランスポーター [動物種]**	**リガンド結合に対する阻害率 (%) (10 μmol/L)**
Dopamine (DA) [ヒト]	18	Serotonin (SERT) [ヒト]	-----
GABA [ラット]	-----	Vesicular Monoamine (VMAT) [ヒト]	11
Norepinephrine (NE) [ヒト]	-----		

データは平均値（n=2）を示す。-----：阻害率 10%未満

2.6.2.2.1.5 ヒト単球由来マクロファージにおけるサイトカイン放出に対する作用

・・・・・・・・・添付資料 4.2.1.1-8 参照

ヒト末梢静脈血（N=1、白色人種、女性）から単球を単離し、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子によりマクロファージに分化させた細胞にジフェリケファリン（2、10 及び 50 nmol/L）あるいは IL-10（10 ng/mL）を 4 時間処置後、リポ多糖（LPS、1 μg/mL）及び IFNγ（10 ng/mL）を 18 時間処置した。培養液中の IL-1β、IL-6、IL-8、TNFα 及び G-CSF の濃度は、Luminex 100 システムを用いて測定した。

ジフェリケファリンは、ヒトマクロファージを LPS 及び IFNγ で刺激した際の IL-1β、IL-6、IL-8、TNFα 及び G-CSF の放出を有意に抑制した（表 2.6.2.2.1.5- 1 参照）。この作用は選択的 κ オピオイド受容体拮抗薬であるノルビナルトルフィミン（nor-BNI）により阻害されたことから、ジフェリケファリンの抗炎症作用は免疫細胞上の κ オピオイド受容体活性を介することが示唆された。

表 2.6.2.2.1.5- 1　LPS/IFNγ刺激によるサイトカイン遊離に対するジフェリケファリン（CR845）の作用

サイトカイン		無処置	CR845 (2 nmol/L)	CR845 (10 nmol/L)	CR845 (50 nmol/L)	CR845 (50 nmol/L) + nor-BNI (10 nmol/L)	IL-10 (10 ng/mL)	nor-BNI (10 nmol/L)
	LPS/IFNγ 刺激なし	LPS/IFNγ 刺激あり						
IL-1β	1.6 (0.0)	75.4 (7.6)	30.8 ** (2.2)	45.3 ** (1.1)	21.5 ** (2.4)	66.7 ## (2.3)	2.1 ¶¶ (1.1)	39.9 (1.1)
IL-6	63.8 (1.2)	677.7 (96.4)	461.7 * (25.5)	398.0 (108.4)	563.7 (53.9)	812.2 ## (23.7)	138.6 ¶ (3.3)	803.9 (0.6)
IL-8	255.3 (99.6)	1457.1 (111.7)	1045.4 * (64.2)	664.6 ** (107.8)	1211.3 (56.7)	1405.9 §∬ (36.1)	371.7 ¶¶ (5.8)	1595.1 (13.3)
TNFα	628.2 (182.6)	7928.9 (108.0)	5558.1 *** (243.1)	4044.2 *** (350.6)	6603.4 ** (235.6)	9599.9 ## (128.4)	3241.4 ¶¶ (280.6)	7185.6 (174.8)
G-CSF	730.0 (21.1)	5230.4 (109.5)	1304.2 *** (296.2)	2210.6 *** (24.9)	1047.0 *** (121.9)	3881.7 ## (82.2)	1032.3 ¶¶ (21.4)	1214.3 (29.9)

データは平均値（標準誤差）（pg/mL、n=3）を示す。

* p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001 vs. LPS/IFNγ alone

p<0.001 vs. LPS/ IFNγ + CR845 at 2 nmol/L, 10 nmol/L and 50 nmol/L

§ p<0.05 vs. LPS/IFNγ + CR845 at 50 nmol/L

∬ p<0.01 vs. LPS/ IFNγ + CR845 at 2 nmol/L or 10 nmol/L

¶ p<0.005, ¶¶ p<0.001 vs. LPS/IFNγ alone

(ANOVA and two-tailed t-test)

2.6.2.2.2 *in vivo* 試験

2.6.2.2.1 抗掻痒作用

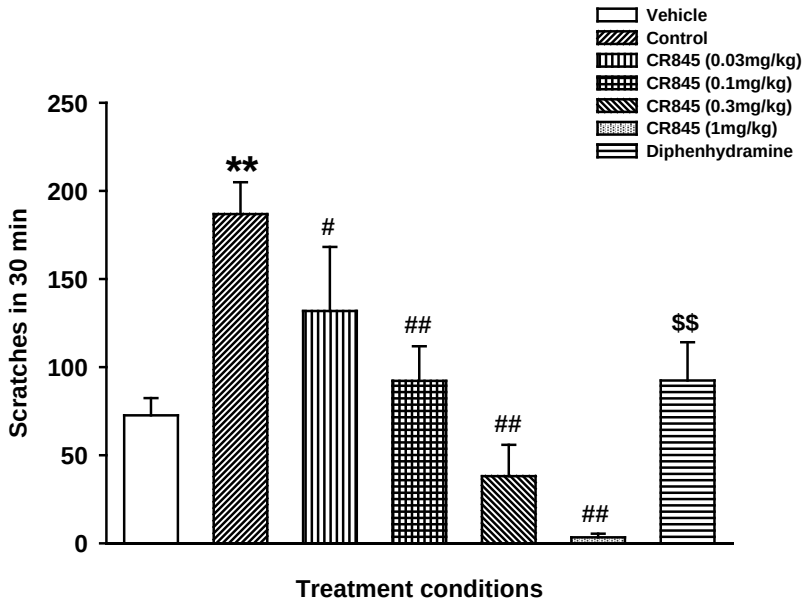
2.6.2.2.1.1 マウスを用いたヒスタミン誘発掻痒モデルに対するジフェリケファリンの作用

・・・・・・・・・添付資料 4.2.1.1-9 参照

雄性マウス（ICR、6 週齢、31～37 g）を各群 10 匹用い、ジフェリケファリン（0.03、0.1、0.3 及び 1 mg/kg）及び溶媒（生理食塩液）を 5 mL/kg の容量で静脈内投与、ジフェンヒドラミン塩酸塩（20 mg/kg）を 10 mL/kg の容量で腹腔内投与した。ジフェリケファリンではその 15 分後に、ジフェンヒドラミン塩酸塩ではその 30 分後にヒスタミン（2 nmol/μL、50 μL/site）を頸背部に皮内投与した。その後、30 分間、後肢で頸部を引っ掻く行動の回数を測定した。ジフェリケファリン投与による平均引っ掻き回数の相対値を算出し、50%有効用量（ED_{50}）を算出した。

ヒスタミンをマウス頸背部に皮内投与した直後からの 30 分間の引っ掻き回数は、有意に増加した。ジフェリケファリンの投与により引っ掻き回数は、用量依存的に減少し、0.03 mg/kg 以上の用量で有意な減少を示した（図 2.6.2.2.1.1- 1 参照）。ジフェリケファリンの ED_{50} は、0.018 mg/kg（-0.24～0.17；95%信頼区間）であった。また、陽性対照であるジフェンヒドラミン塩酸塩も引っ掻き回数を有意に減少させた。

図 2.6.2.2.1.1- 1　ヒスタミン誘発掻痒行動に対するジフェリケファリン（CR845）の抗掻痒作用



データは平均値＋標準誤差（n=10）を示す。
** p<0.01 vs. Vehicle (Student's t-test)
# p<0.05, ## p<0.01 vs. Control (Shirley-Williams' test)
$$ p<0.01 vs. Control (Student's t-test)

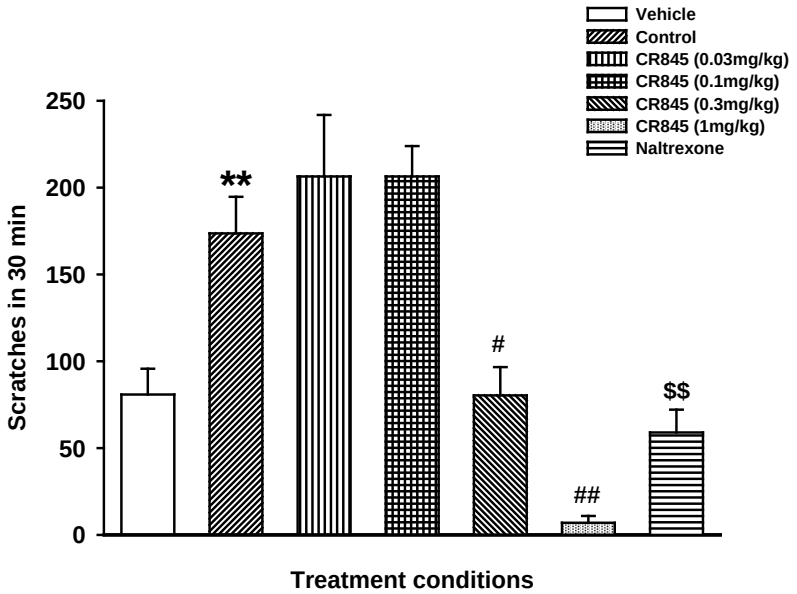
2.6.2.2.2.1.2 マウスを用いたサブスタンス P 誘発掻痒モデルに対するジフェリケファリンの作用

・・・・・・・・・**添付資料 4.2.1.1-10 参照**

雄性マウス（ICR、6 週齢、31～38 g）を各群 10 匹用い、ジフェリケファリン（0.03、0.1、0.3 及び 1 mg/kg）及び溶媒（生理食塩液）を 5 mL/kg の容量で静脈内投与、ナルトレキソン塩酸塩（10 mg/kg）を 10 mL/kg の容量で皮下投与した。ジフェリケファリンではその 15 分後に、ナルトレキソン塩酸塩ではその 30 分後にサブスタンス P（2 nmol/μL、50 μL/site）を頸背部に皮内投与した。その後、30 分間、後肢で頸部を引っ掻く行動の回数を測定した。ジフェリケファリン投与による平均引っ掻き回数の相対値を算出し、50%有効用量（ED_{50}）を算出した。

サブスタンス P をマウス頸背部に皮内投与した直後からの 30 分間の引っ掻き回数は、有意に増加した。ジフェリケファリンの投与により引っ掻き回数は、用量依存的に減少し、0.3 mg/kg 以上の用量で有意な減少を示した（図 2.6.2.2.2.1.2- 1 参照）。ジフェリケファリンの ED_{50} は、0.32 mg/kg（0.22～0.44；95%信頼区間）であった。また、陽性対照であるナルトレキソン塩酸塩も引っ掻き回数を有意に減少させた。

図 2.6.2.2.2.1.2- 1　サブスタンス P 誘発掻痒行動に対するジフェリケファリン（CR845）の抗掻痒作用



データは平均値＋標準誤差（n=10）を示す。
** p<0.01 vs. Vehicle (Student's t-test)
# p<0.05, ## p<0.01 vs. Control (Shirley-Williams' test)
$$ p<0.01 vs. Control (Student's t-test)

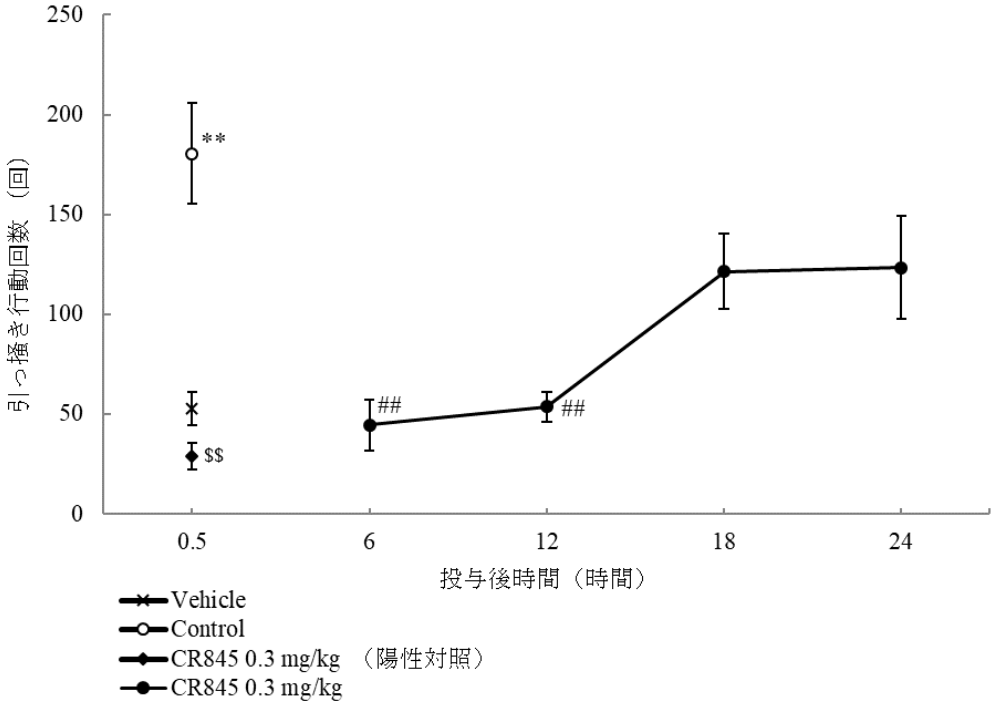
2.6.2.2.2.1.3 マウスサブスタンス P 誘発掻痒モデルを用いたジフェリケファリンの抗掻痒作用の持続時間

・・・・・・・・・添付資料 4.2.1.1-11 参照

雄性マウス（ICR、5 週齢、27～33 g）を各群 10 匹用い、ジフェリケファリン（0.3 mg/kg）及び溶媒（生理食塩液）を 5 mL/kg の容量で静脈内投与した。投与後 0.5、6、12、18 及び 24 時間にサブスタンス P（5 nmol/μL、50 μL/site）を頸背部に皮内投与し、投与直後から 30 分間、後肢で頸部を引っ掻く行動の回数を測定した。

生理食塩液の投与後 0.5 時間にサブスタンス P を投与すると引っ掻き回数は有意に増加した。それに対して、ジフェリケファリンは投与後 0.5、6 及び 12 時間において有意に引っ掻き回数を抑制した（図 2.6.2.2.2.1.3- 1 参照）。ジフェリケファリンの抗掻痒作用は、少なくとも 12 時間持続することが示された。

図 2.6.2.2.2.1.3- 1　サブスタンス P 誘発掻痒行動に対するジフェリケファリン（CR845）の抗掻痒作用持続時間



データは平均値±標準誤差（n=10）を示す。
** p<0.01 vs. Vehicle (Welch's t-test)
$$ p<0.01 vs. Control (Welch's t-test)
p<0.01 vs. Control (Steel test)

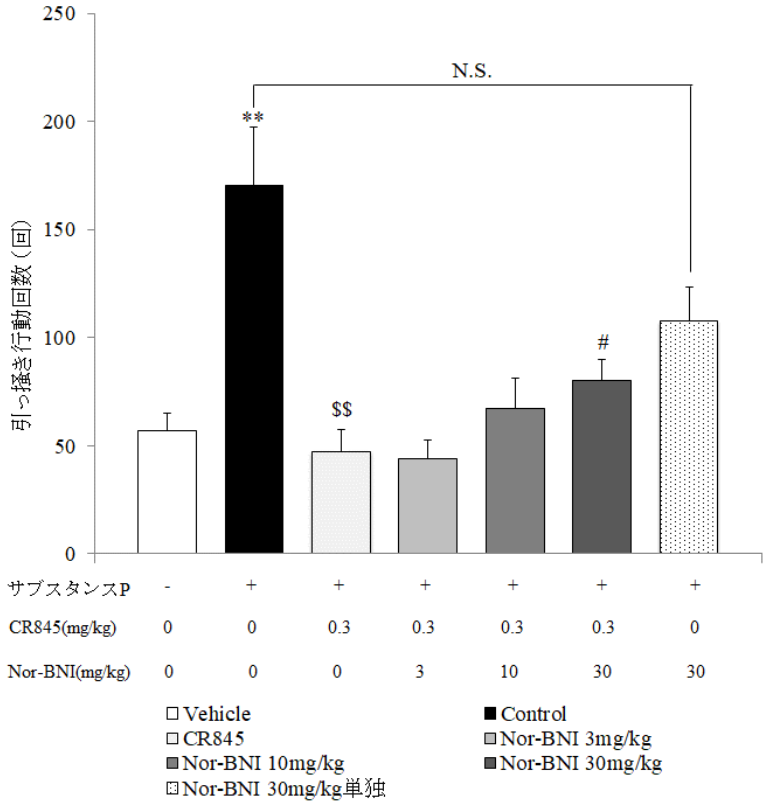
2.6.2.2.2.1.4 マウスサブスタンス P 誘発掻痒モデルを用いたジフェリケファリンの抗掻痒作用に対する κ オピオイド受容体拮抗薬の影響

・・・・・・・・・添付資料 4.2.1.1-12 参照

雄性マウス（ICR、5 週齢、25～33 g）を各群 10 匹用い、選択的 κ オピオイド受容体拮抗薬のノルビナルトルフィミン（Nor-BNI、3、10 及び 30 mg/kg）及び溶媒（生理食塩液）を 10 mL/kg の容量で皮下投与した。投与後 24 時間にジフェリケファリン（0.3 mg/kg）及び溶媒（生理食塩液）を 5 mL/kg の容量で静脈内投与し、その 30 分後にサブスタンス P（5 nmol/μL、50 μL/site）を頸背部に皮内投与し、投与直後から 30 分間、後肢で頸部を引っ掻く行動の回数を測定した。

ジフェリケファリン 0.3 mg/kg はサブスタンス P により誘発された引っ掻き回数の増加を有意に抑制した。これに対して、Nor-BNI は、ジフェリケファリンの引っ掻き回数抑制作用を用量依存的に拮抗し、30 mg/kg で有意に拮抗作用を示した（図 2.6.2.2.2.1.4- 1 参照）。なお、Nor-BNI 30 mg/kg の単独投与では、サブスタンス P により誘発される引っ掻き行動に影響しなかった。以上の結果から、ジフェリケファリンの抗掻痒作用は κ オピオイド受容体を介することが示された。

図 2.6.2.2.2.1.4- 1　ジフェリケファリン（CR845）の抗掻痒作用に対するノルビナルトルフィミンの拮抗作用



データは平均値＋標準誤差（n=10）を示す。
** $p<0.01$ vs. Vehicle (Welch's *t*-test)　　# $p<0.025$ vs. CR845 (Williams test)
$$ $p<0.01$ vs. Control (Welch's *t*-test)　　N.S. No significant difference (*t*-test)

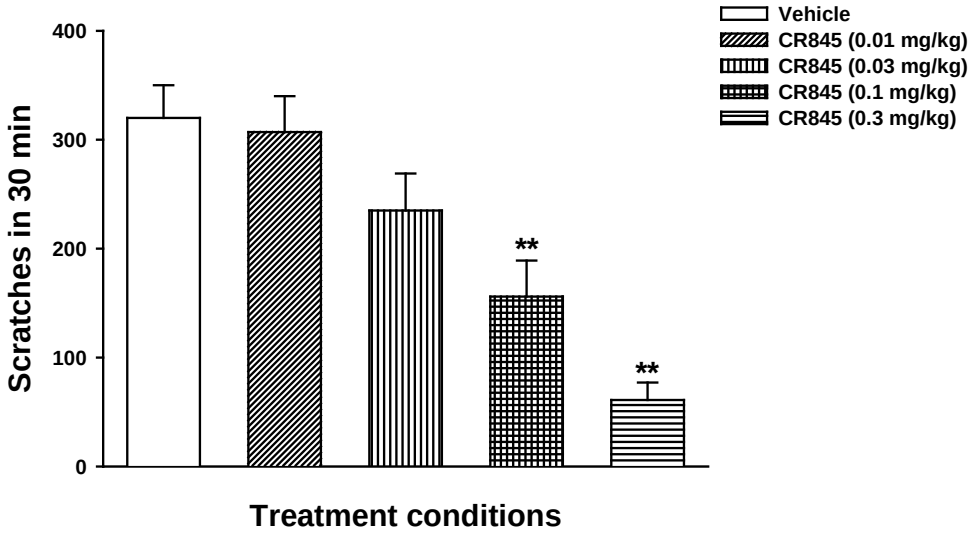
2.6.2.2.2.1.5 マウスを用いた Compound48/80 及び GNTI 誘発掻痒モデルに対するジフェリケファリンの作用

・・・・・・・・・添付資料 4.2.1.1-13 参照

雄性マウス（Swiss Webster、25～30 g）を各群 10～11 匹用い、ジフェリケファリン（0.01、0.03、0.1 及び 0.3 mg/kg）及び溶媒（生理食塩液）を静脈内投与した。その 15 分後に、肥満細胞刺激により掻痒を生じる Compound 48/80（0.5 μg/μL、100 μL/animal）及びκオピオイド受容体阻害により掻痒を生じる 5'-Guanidinonaltrindole（GNTI）（0.3 mg/kg、10 mL/kg）を生理食塩液に溶解し、頸背部に皮下投与した。その後、30 分間、後肢で頸部を引っ掻く行動の回数を測定した。ジフェリケファリン投与による平均引っ掻き回数の阻害率を算出し、50%阻害用量（ED_{50}）を直線回帰分析により算出した。

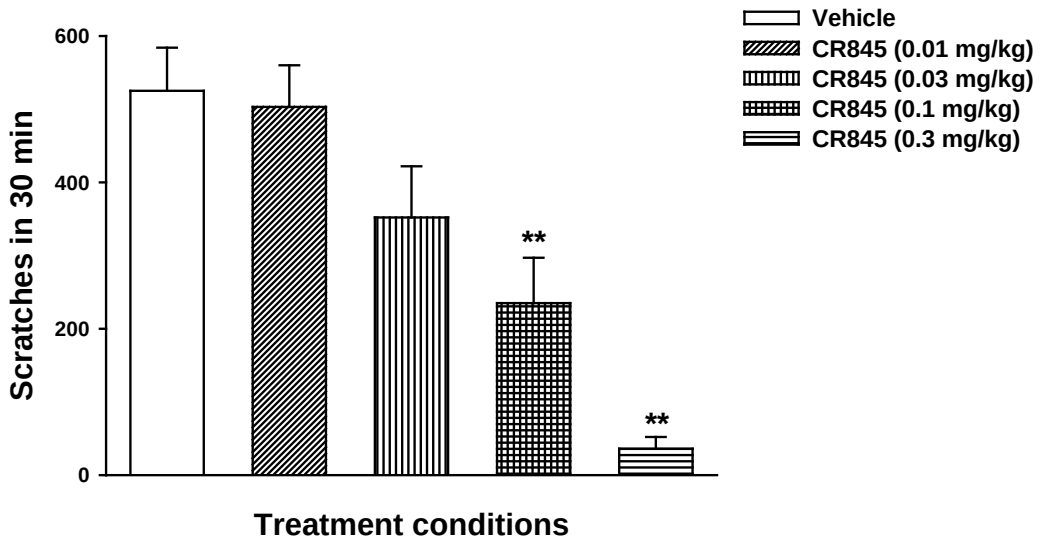
Compound 48/80 又は GNTI 投与後 5 分以内に引っ掻き行動が観察された。各掻痒モデルにおいてジフェリケファリンは、用量依存的な抗掻痒作用を示した（図 2.6.2.2.2.1.5- 1、図 2.6.2.2.2.1.5- 2 参照）。ジフェリケファリンの ED_{50} は Compound 48/80 で 0.077 mg/kg（0.035～0.24；95%信頼区間）であり、GNTI で 0.053 mg/kg（0.021～0.13；95%信頼区間）であった。

図 2.6.2.2.2.1.5- 1　Compound 48/80 誘発掻痒行動に対するジフェリケファリン（CR845）の抗掻痒作用



データは平均値＋標準誤差（n=10）を示す。
** p<0.01 vs. Vehicle (One-way ANOVA followed by Newman-Keuls test)

図 2.6.2.2.2.1.5- 2　GNTI 誘発掻痒行動に対するジフェリケファリン（CR845）の抗掻痒作用



データは平均値＋標準誤差（n=10-11）を示す。
** p<0.01 vs. Vehicle (One-way ANOVA followed by Newman-Keuls test)

2.6.2.2.2.2 抗炎症作用

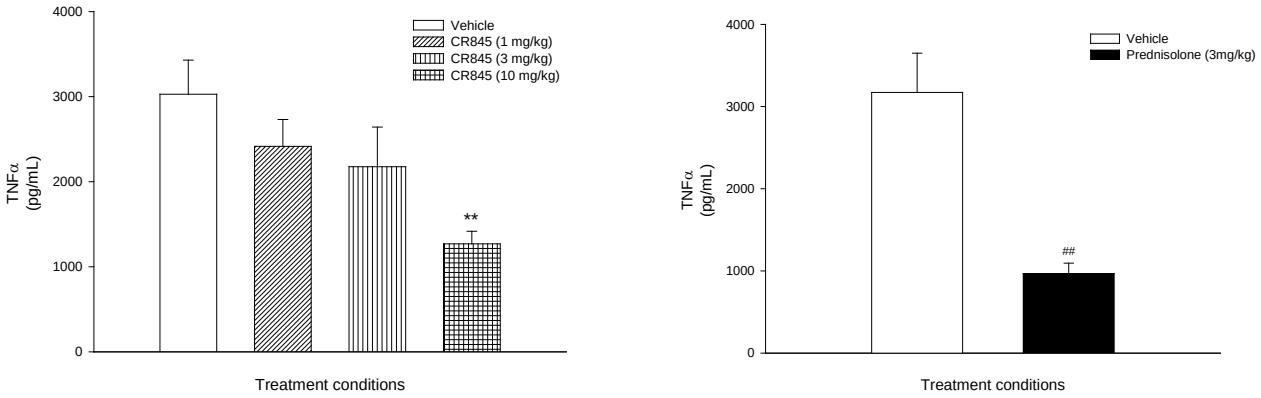
2.6.2.2.2.2.1 マウスを用いたLPSにより誘発されたサイトカインの放出に対するジフェリケファリンの作用

・・・・・・・・・添付資料 4.2.1.1-14 参照

雌性マウス（Balb/c、体重 18～22 g）を各群 8 匹用い、ジフェリケファリン（1、3 及び 10 mg/kg）及びその溶媒（生理食塩液）は、10 mL/kg の容量で皮下投与し、プレドニゾロン（3 mg/kg）及びその溶媒（クレモフォール EL：エタノール：生理食塩液 1：1：18 混合液）は、10 mL/kg の容量で腹腔内投与した。各薬物投与後 30 分にリポ多糖（LPS、1 mg/kg）を 10 mL/kg の容量で腹腔内投与した。LPS 投与後 2 時間に心臓採血し、血清を回収した。血清中の TNFα の濃度は ELISA により測定し、また、GM-CSF、IL-1α、IL-1β、IL-2、IL-4、IL-6、IL-10、IL-12（p40/p70）、MCP-1、MIP-1α、MIP-1β 及び TNFα の濃度は Luminex システムを用いて測定した。

ジフェリケファリンは、用量依存的に TNFα の放出を減少させ、10 mg/kg で溶媒群に比べ有意に減少させた（図 2.6.2.2.2.2.1- 1 参照）。また、ジフェリケファリン 10 mg/kg では、IL-1β、IL-2、MIP-1β 及び IL-12（p40/p70）の放出も有意に減少させた（表 2.6.2.2.2.2.1-1 参照）。プレドニゾロン 3 mg/kg は、TNFα、IL-1β、IL-2、MIP-1β、IL-12（p40/P70）、MIP-1α、IL-1α、IL-4 及び IL-10 の放出を有意に減少させた。ジフェリケファリンは抗炎症作用を示すことが確認された。

図 2.6.2.2.2.2.1- 1　LPS 刺激による TNFα遊離に対するジフェリケファリン（CR845）の作用



データは平均値+標準誤差（n=8）を示す。
** p<0.01 vs. Vehicle (One-way ANOVA followed by Dunnett test)
p<0.01 vs. Vehicle (unpaired t-test)

表 2.6.2.2.2.2.1- 1　LPS 刺激によるサイトカイン遊離に対するジフェリケファリンの作用

サイトカイン	プレドニゾロン **(3 mg/kg)** 阻害率 (%)	ジフェリケファリン **(10 mg/kg)** 阻害率 (%)
TNFα	64*	47*
IL-1β	39*	26*
IL-2	24*	23*
MIP-1β	19*	19*
IL-12 (p40/p70)	45*	23*
MIP-1α	35*	19
IL-1α	50*	-37
IL-4	41*	21
IL-10	59*	26
IL-6	-2	-10
MCP-1	-14	-11
GM-CSF	10	7

データは平均値（n=8）を示す。

* p<0.05 vs. Vehicle (unpaired t-test)

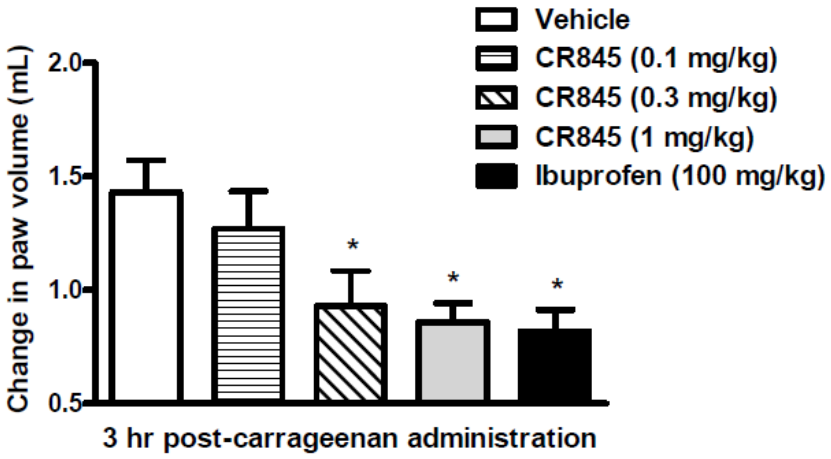
2.6.2.2.2.2.2 ラットを用いたカラゲニン誘発足浮腫モデルに対するジフェリケファリンの抗炎症作用

・・・・・・・・・**添付資料 4.2.1.1-15 参照**

雄性ラット（SD、体重 200～250 g）を各群 6 匹用い、ジフェリケファリン（0.1、0.3 及び 1 mg/kg）及び溶媒（生理食塩液）は 1 mL/kg の容量で静脈内投与し、イブプロフェン（100 mg/kg）は 1 mL/kg の容量で皮下投与した。各薬物投与後 30 分に左後肢足蹠皮下へ 2%カラゲニンを 0.1 mL 投与することにより浮腫を誘発させ、その 3 時間後にプレシスモメーターを用いて後肢体積を測定した。炎症側の後肢の体積と非炎症側の後肢の体積の差を体積変化量とした。

ジフェリケファリンは、カラゲニン投与後 3 時間における足浮腫を用量依存的に減少させ、0.3 mg/kg 以上の用量で有意な減少を示した（図 2.6.2.2.2.2.2- 1 参照）。ジフェリケファリン 1 mg/kg での作用は、イブプロフェン 100 mg/kg と同程度であった。ジフェリケファリンは抗炎症作用を示すことが確認された。

図 2.6.2.2.2.2.2- 1　ラットカラゲニン誘発足浮腫に対するジフェリケファリン（CR845）の作用



データは平均値＋標準誤差（n=6）を示す。
* p<0.05 vs. Vehicle (one-way ANOVA followed by Dunnett test)

2.6.2.3 副次的薬理試験

2.6.2.3.1 抗侵害作用

2.6.2.3.1.1 侵害受容性疼痛モデルに対する抗侵害作用

2.6.2.3.1.1.1 マウス酢酸ライジング法を用いたジフェリケファリンの鎮痛作用

・・・・・・・・・添付資料 4.2.1.2-1 参照

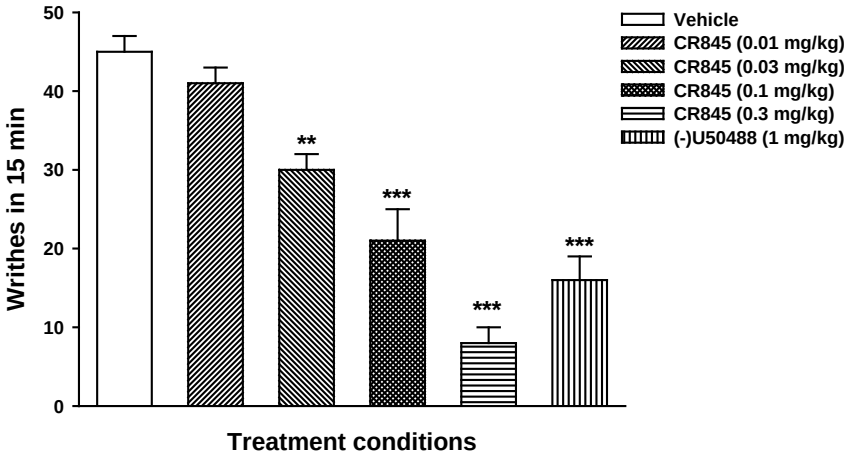
雄性マウス（ICR、20～25 g）を各群 8 匹用い、ジフェリケファリン（0.01、0.03、0.1 及び 0.3 mg/kg）、(-)U50488H（陽性対照、1 mg/kg）及び溶媒（蒸留水）を 10 mL/kg の容量で静脈内投与した。各薬物投与後 15 分に酢酸（0.6%、10 mL/kg）を腹腔内投与し疼痛行動（ライジング）を誘発させ、酢酸投与直後から 15 分間、ライジングの回数を測定した。

50%有効用量（ED_{50}）は、以下より算出した%MPE を用いて、直線回帰分析により算出した。

%MPE=（溶媒群のライジング回数 - 被験物質投与群のライジング回数）/（溶媒群のライジング回数）×100

ジフェリケファリンは、用量依存的にライジング反応を抑制し、0.03 mg/kg 以上では、溶媒群に比べ有意な抑制を示した（図 2.6.2.3.1.1.1- 1 参照）。ジフェリケファリン静脈内投与による ED_{50} は 0.07 mg/kg（0.06～0.1；95%信頼区間）であった。また、陽性対照である(-)U50488H も溶媒群に比べライジング行動の有意な減少を示した。

図 2.6.2.3.1.1.1- 1　マウス酢酸ライジング反応に対するジフェリケファリン（CR845）の作用



データは平均値＋標準誤差（n=8）を示す。
** p<0.01, *** p<0.001 vs. Vehicle (one-way ANOVA followed by Dunnett test)

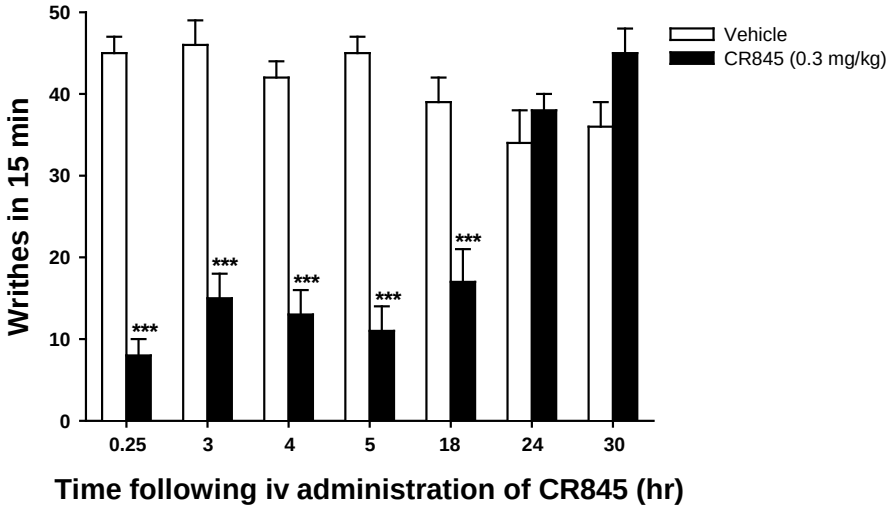
2.6.2.3.1.1.2 マウス酢酸ライジング法を用いたジフェリケファリンの鎮痛作用の持続性

・・・・・・・・・添付資料 4.2.1.2-2 参照

雄性マウス（ICR、20～25 g）を各群 8 匹用い、ジフェリケファリン（0.3 mg/kg）及び溶媒（蒸留水）を 10 mL/kg の容量で酢酸投与 15 分前、3、4、5、18、24 又は 30 時間前に静脈内投与した。酢酸（0.6%、10 mL/kg）を腹腔内投与し疼痛行動（ライジング）を誘発させ、酢酸投与直後から 15 分間、ライジングの回数を測定した。

ジフェリケファリンは、投与後 18 時間まで酢酸ライジング反応を有意に抑制した（図 2.6.2.3.1.1.2- 1 参照）。ジフェリケファリンの鎮痛作用は、長時間持続することが示された。

図 2.6.2.3.1.1.2- 1　マウス酢酸ライジング反応に対するジフェリケファリン（CR845）の鎮痛作用持続性



データは平均値＋標準誤差（n=8）を示す。
*** p<0.001 vs Vehicle (two-way ANOVA followed by Bonferroni test)

2.6.2.3.1.1.3 ラット慢性膵炎モデルを用いたジフェリケファリンの鎮痛作用

・・・・・・・・・添付資料 4.2.1.2.-3 参照

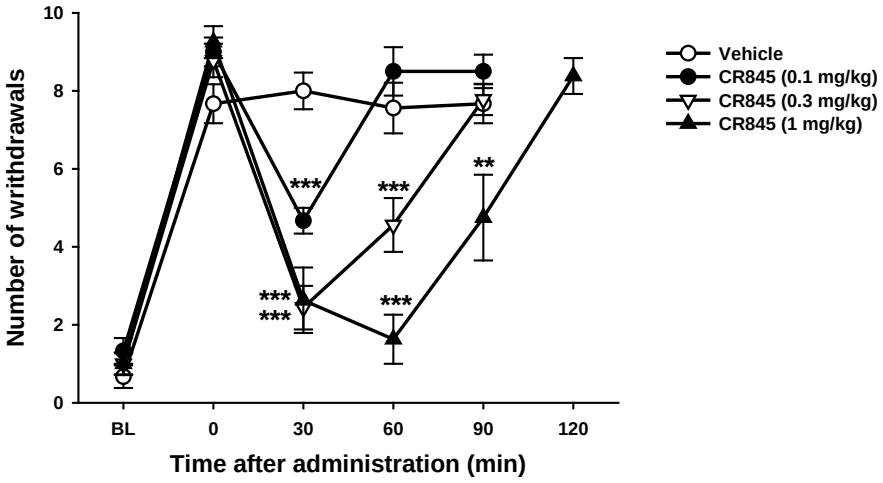
雄性ラット（SD、200～250 g）に、イソフルラン麻酔下でジブチルスズジクロライド（DBTC）（8 mg/kg ; 溶媒は 100%エタノール）の静脈内投与により慢性膵炎を誘発させた。膵炎の痛みは、4 g の von Frey filament で腹部を刺激（10 秒に 1 回合計 10 回）し、腹部を激しく引っ込める、腹部を舐める又は全身を引っ込める行動を腹部痛覚過敏として評価した。DBTC 投与後 6 日に痛覚過敏の認められた個体を各群 6～9 匹（ナプロキセンは各群 3～6 匹）用い、ジフェリケファリン（0.1、0.3 及び 1 mg/kg）及び溶媒（生理食塩液）は 1 mL/kg の容量で腹腔内投与し、ナプロキセン（陽性対照、30 mg/kg）及び溶媒

（生理食塩液）は、5 mL/kg の容量で経口投与した。各薬物投与後、疼痛測定を 30 分ごとに投与後 120 分まで行った（ナプロキセンは投与後 180 分）。なお、50%有効用量（ED_{50}）は、以下より算出した%MPE を用いて、直線回帰分析により算出した。

%MPE=（各測定時点における疼痛反応の回数 - DBTC 投与後（各薬物投与前）の疼痛反応を示した回数）/（DBTC 投与前の疼痛反応を示した回数 - DBTC 投与後（各薬物投与前）の疼痛反応を示した回数）×100

ジフェリケファリンは、DBTC 誘発慢性膵炎の腹部痛覚過敏を用量依存的に有意に抑制した（図 2.6.2.3.1.1.3- 1 参照）。ジフェリケファリン投与後 30 分における ED_{50} は 0.03 mg/kg（0.006～0.14 ; 95%信頼区間）であった。また、ナプロキセン 30 mg/kg の経口投与により、DBTC 誘発慢性膵炎による腹部痛覚過敏を有意に抑制した。

図 2.6.2.3.1.1.3- 1　ラット DBTC 誘発膵炎モデルに対するジフェリケファリン（CR845）の鎮痛作用



データは平均値±標準誤差（n=6-9）を示す。
** p<0.01, *** p<0.001 vs. Vehicle (two-way ANOVA, followed by Bonferroni test)

2.6.2.3.1.1.4 ラット慢性膵炎モデルを用いたジフェリケファリンの鎮痛作用に対するノルビナルトルフィミン及びナロキソンメチオジドによる拮抗作用

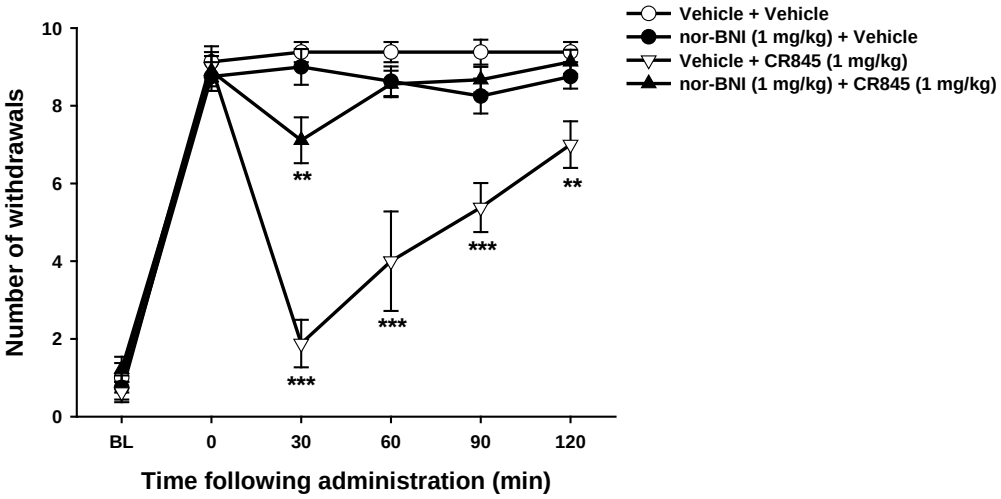
・・・・・・・・・添付資料 4.2.1.2-4 参照

雄性ラット（SD、200～250 g）にイソフルラン麻酔下でジブチルスズジクロライド（DBTC）（8 mg/kg ; 溶媒は 100%エタノール）の静脈内投与により慢性膵炎を誘発した。膵炎の痛みは、4 g の von Frey filament で腹部を刺激（10 秒に 1 回合計 10 回）し、腹部を激しく引っ込める、腹部を舐める又は全身を引っ込める行動を腹部痛覚過敏として評価した。DBTC 投与後 6 日に痛覚過敏の認められた個体を各群 6～9 匹用い、ジフェリケファリン（1 mg/kg）及び溶媒（生理食塩液）を 1 mL/kg の容量で腹腔内投与した。なお、

選択的なκオピオイド受容体拮抗薬のノルビナルトルフィミン（nor-BNI）及び非選択的な末梢性オピオイド受容体拮抗薬のナロキソンメチオジド（NM）を生理食塩液に溶解し、ジフェリケファリン又はその溶媒投与 30 分前にそれぞれ 1 及び 10 mg/kg を 1 mL/kg の容量で腹腔内投与した。各薬物投与後、疼痛測定を 30 分ごとに 120 分まで行った。

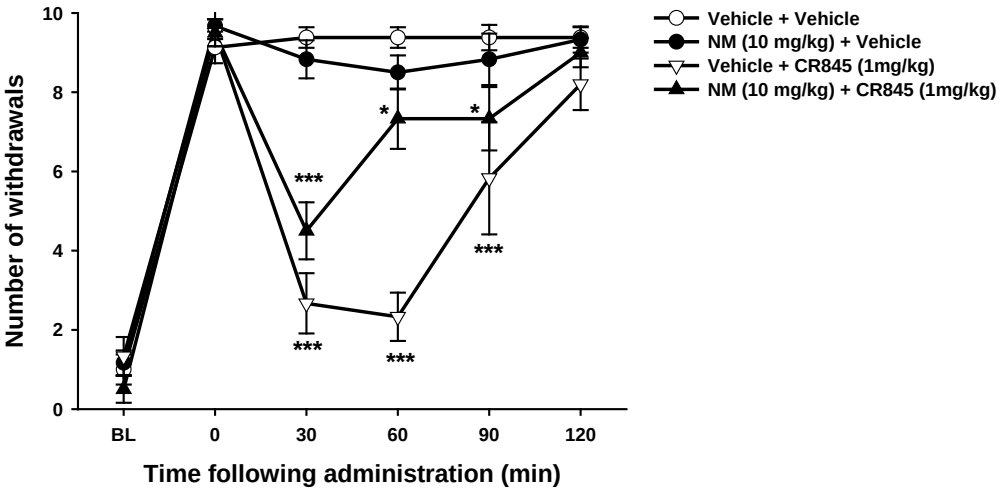
ジフェリケファリンは、DBTC 誘発慢性膵炎の腹部痛覚過敏を有意に抑制した。選択的なκオピオイド受容体拮抗薬の nor-BNI 及び非選択的な末梢性オピオイド受容体拮抗薬の NM はジフェリケファリンの鎮痛作用に対して拮抗作用を示した（図 2.6.2.3.1.1.4-1、図 2.6.2.3.1.1.4- 2 参照）。以上のことから、DBTC 誘発慢性膵炎の腹部痛覚過敏に対するジフェリケファリンの鎮痛作用は、末梢性κオピオイド受容体を介していることが示唆された。

図 2.6.2.3.1.1.4- 1　ジフェリケファリン（CR845）の鎮痛作用に対する選択的なκオピオイド受容体拮抗薬のノルビナルトルフィミンの拮抗作用



データは平均値±標準誤差（n=8-9）を示す。
** p<0.01, *** p<0.001 vs. Vehicle + Vehicle (two-way ANOVA followed by Bonferroni test)

図 2.6.2.3.1.1.4- 2　ジフェリケファリン（CR845）の鎮痛作用に対する末梢性オピオイド受容体拮抗薬ナロキソンメチオジドの拮抗作用



データは平均値±標準誤差（n=6-8）を示す。
* p<0.05, *** p<0.001 vs. Vehicle + Vehicle (two-way ANOVA followed by Bonferroni test)

2.6.2.3.1.2 神経因性疼痛モデルに対する抗侵害作用

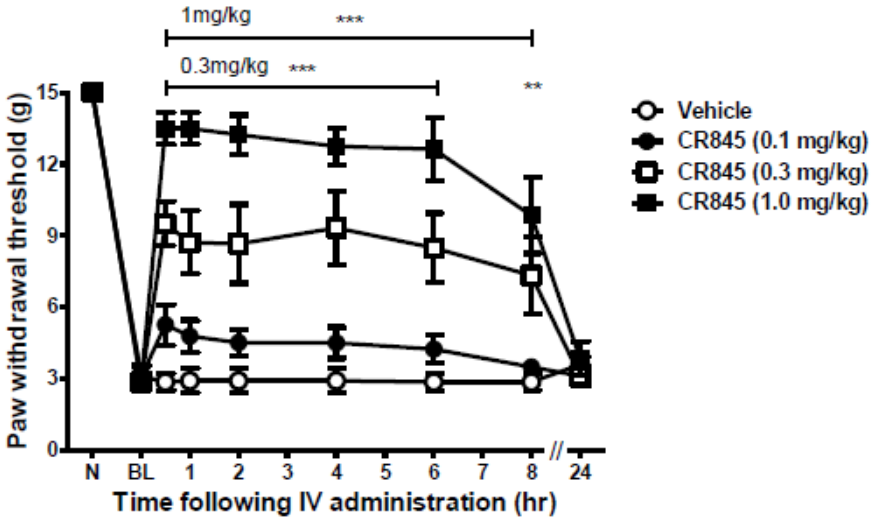
2.6.2.3.1.2.1 ラット神経因性疼痛モデルを用いたジフェリケファリンの鎮痛作用

・・・・・・・・・添付資料 4.2.1.2-5 参照

雄性ラット（SD、体重 250～300 g）をイソフルラン麻酔下で L5 左横突起を除去し、L5 及び L6 脊髄神経を 6-0 絹糸により結紮し、神経因性疼痛モデル（L5/L6 SNL モデル（脊髄神経結紮モデル））を作製し、22 日後に実験に用いた。疼痛反応は、測定の少なくとも 20 分前に底がメッシュの試験箱にラットを移動し、フィラメント（0.4、0.7、1.2、2.0、3.6、5.5、8.5 及び 15 g）を用いて、逃避反応を引き起こす閾値を測定することで評価した（up down 法）。これら神経因性疼痛モデル動物を各群 6 匹用い、ジフェリケファリン（0.1、0.3 及び 1 mg/kg）及び溶媒（生理食塩液）を 1 mL/kg の容量で静脈内投与した。疼痛測定は、モデル作製前、ジフェリケファリン投与前及びジフェリケファリン投与後 0.5、1、2、4、6、8 及び 24 時間に実施した。

ジフェリケファリンは、用量依存的にアロディニアを抑制した（図 2.6.2.3.1.2.1- 1 参照）。ジフェリケファリン 0.3 及び 1 mg/kg では、投与後 8 時間まで有意に抑制した。ジフェリケファリン 0.1 mg/kg は、投与後 30 分に軽微な抑制がみられた。ジフェリケファリン投与後 24 時間では、いずれの用量についても投与前値と同程度であった。また、50%有効用量は 0.31 mg/kg（0.24～0.42；95%信頼区間）であった。

図 2.6.2.3.1.2.1- 1　ラット神経因性疼痛モデルを用いたジフェリケファリン（CR845）の鎮痛作用



データは平均値±標準誤差（n=6）を示す。
** p<0.01,*** p<0.001 vs Vehicle (two-way ANOVA followed by Bonferroni test)

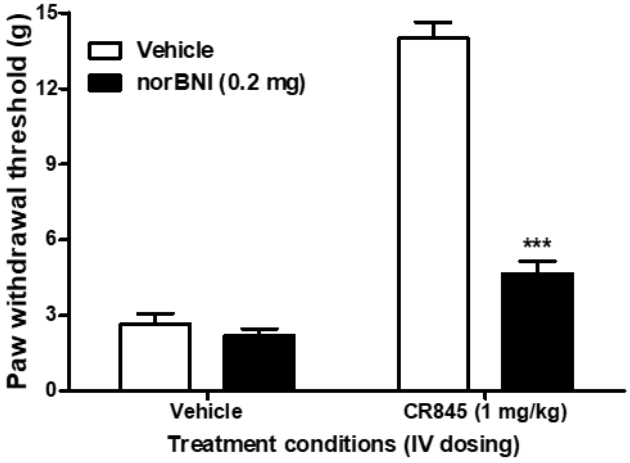
2.6.2.3.1.2.2 ラット神経因性疼痛モデルを用いたジフェリケファリンの鎮痛作用に対する nor-BNI の影響

・・・・・・・・・添付資料 4.2.1.2-5 参照

雄性ラット（SD、体重 250～300 g）を用いて、2.6.2.3.1.2.1 項の方法で L5/L6 SNL モデルを作製し、14 日後に実験に用いた。この SNL モデルを各群 6 匹とし、ノルビナルトルフィミン（nor-BNI、0.2 mg）又は溶媒（生理食塩液）を足蹠皮下に 0.1 mL の容量で投与し、その 15 分後にジフェリケファリン（1 mg/kg）又は溶媒（生理食塩液）を 1 mL/kg の容量で静脈内投与した。疼痛測定は、2.6.2.3.1.2.1 項の方法を用いて、モデル作製前、溶媒又はジフェリケファリン投与前及び投与後 1 時間に実施した。

溶媒又は nor-BNI を足蹠皮下投与した溶媒群の疼痛閾値は、それぞれ 2.6±0.5 g 又は 2.2±0.3 g であったのに対し、溶媒又は nor-BNI を足蹠皮下投与したジフェリケファリン群の疼痛閾値は、それぞれ 14±0.7 g 又は 4.6±0.6 g であった（図 2.6.2.3.1.2.2- 1 参照）。疼痛は、ジフェリケファリンにより抑制され、その作用は選択的な κ オピオイド受容体拮抗薬である nor-BNI により有意に阻害されたことから、ジフェリケファリンは末梢の κ オピオイド受容体に作用し、神経因性疼痛を抑制することが示唆された。

図 2.6.2.3.1.2.2- 1　ラット神経因性疼痛モデルを用いたジフェリケファリン（CR845）の鎮痛作用に対する nor-BNI の影響



データは平均値＋標準誤差（n=6）を示す。
*** p<0.001 vs. Vehicle (two-way ANOVA followed by Bonferroni test)

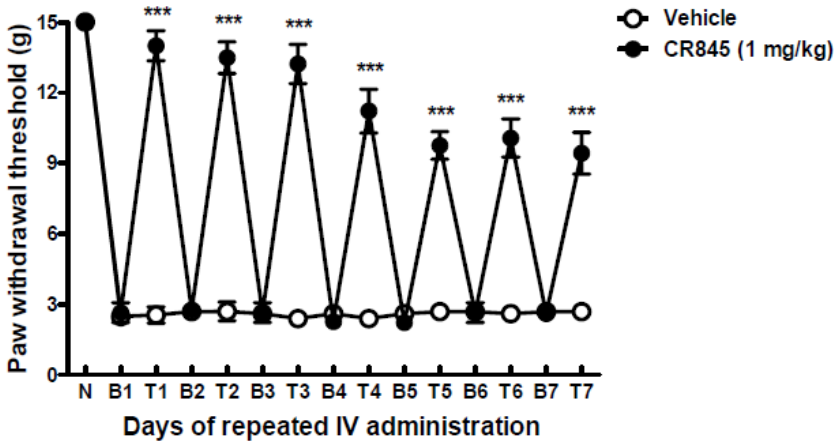
2.6.2.3.1.2.3 ラット神経因性疼痛モデルを用いたジフェリケファリン反復投与による鎮痛作用

・・・・・・・・・添付資料 4.2.1.2-5 参照

雄性ラット（SD、体重 250～300 g）を用いて、2.6.2.3.1.2.1 項の方法で L5/L6 SNL モデルを作製し、19 日後に実験に用いた。この SNL モデルを各群 6 匹とし、ジフェリケファリン（1 mg/kg）又は溶媒（生理食塩液）を 1 mL/kg の容量で 7 日間反復静脈内投与した。疼痛測定は、2.6.2.3.1.2.1 項の方法を用いて、モデル作製前（N）、各投与日のジフェリケファリン投与前（B1～B7）及び投与後 1 時間（T1～T7）に実施した。

ジフェリケファリンは、各投与日の投与後 1 時間において疼痛閾値を有意に上昇させ、反復投与による疼痛閾値の低下はわずかであった（図 2.6.2.3.1.2.3- 1 参照）。ジフェリケファリンは、耐性を引き起こしにくいことが示唆された。

図 2.6.2.3.1.2.3- 1　ラット神経因性疼痛モデルを用いたジフェリケファリン（CR845）反復投与による鎮痛作用



データは平均値±標準誤差（n=6）を示す。
*** p<0.001 vs Vehicle (two-way ANOVA followed by Bonferroni post-test)

2.6.2.3.1.3 急性及び慢性炎症痛モデルに対する抗侵害作用

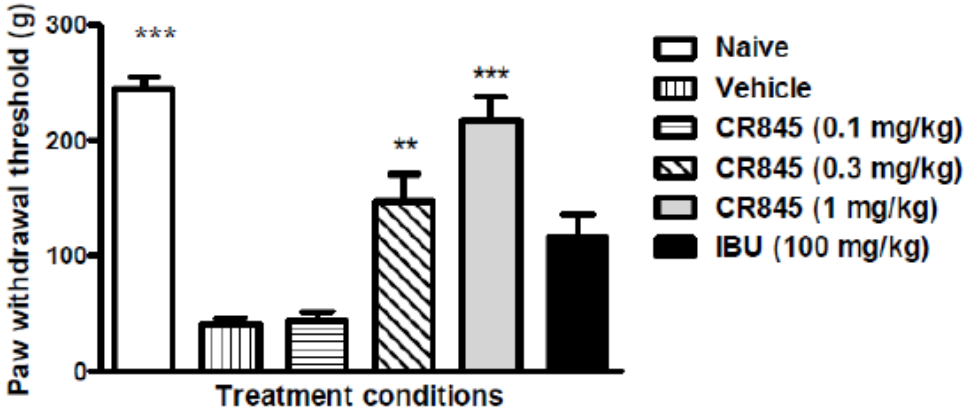
2.6.2.3.1.3.1 ラットカラゲニン誘発痛覚過敏モデルを用いたジフェリケファリンの鎮痛作用

・・・・・・・・・**添付資料 4.2.1.1-15 参照**

雄性ラット（SD、体重 200～250 g）を用いて、左後肢足蹠皮下に 2%カラゲニンを 0.1 mL 投与することにより、痛覚過敏を誘発させた。疼痛測定はランダルセリット法を用いて行い、ラットの後肢の足蹠に、機械的な力を段階的に加え、ラットが反応（逃避、もがき又は発声）した時点を閾値（g）とした。この痛覚過敏モデル動物を各群 8 匹用い、カラゲニン投与後 2 時間にジフェリケファリン（0.1、0.3 及び 1 mg/kg）及び溶媒（生理食塩液）は、1 mL/kg の容量で静脈内投与し、イブプロフェン（IBU）（100 mg/kg）は 1 mL/kg の容量で皮下投与した。各薬物の投与後 1 時間及び 3 時間（カラゲニン投与後 3 時間及び 5 時間）の閾値を測定した。なお、組織損傷を防ぐために測定の最大値を 400 g とした。

ジフェリケファリンは、投与後 1 時間（カラゲニン投与後 3 時間）の閾値を用量依存的に上昇させ（図 2.6.2.3.1.3.1- 1 参照）、その閾値の増加は投与後 3 時間（カラゲニン投与後 5 時間）でも維持していた。投与後 1 時間の 50%有効用量は 0.33 mg/kg（0.24～0.45；95%信頼区間）であった。ジフェリケファリン 0.3 mg/kg とイブプロフェン 100 mg/kg は、同程度の作用であった。ジフェリケファリン 0.3 及び 1 mg/kg では対側の足蹠の閾値も有意に上昇させた。

図 2.6.2.3.1.3.1- 1　カラゲニン誘発痛覚過敏モデルに対するジフェリケファリン（CR845）の鎮痛作用（投与後 1 時間）



データは平均値＋標準誤差（n=8）を示す。
** p<0.01, *** p<0.001 vs. Vehicle (one-way ANOVA followed by Dunnett test)

2.6.2.3.1.3.2 ラット完全フロインドアジュバント（CFA）誘発炎症性疼痛モデルを用いたジフェリケファリンの鎮痛作用

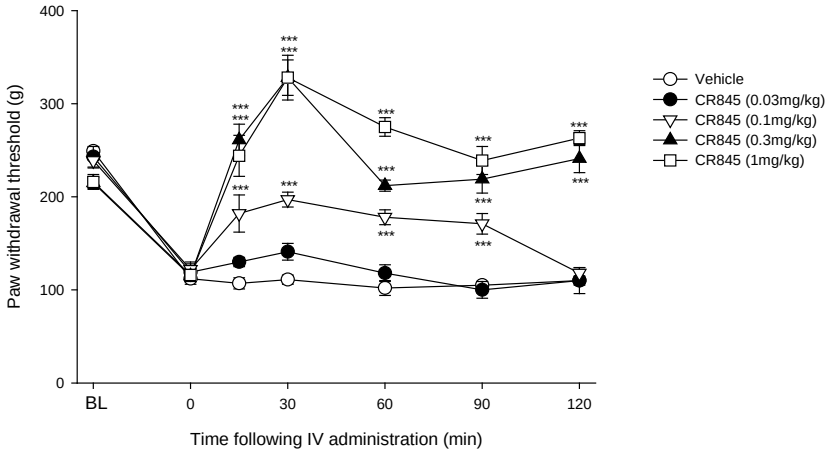
・・・・・・・・・添付資料 4.2.1.2-6 参照

雄性ラット（SD、体重 200～250 g）を用いて、イソフルラン麻酔下で、右外頸静脈にカテーテルを留置した。カテーテル留置後 5 日に CFA（*M. tubeculousis* 1 mg/mL）50 µL を左後肢足蹠に皮下投与し、局所的に炎症を誘発させた。疼痛測定は、ランダルセリット法を用いて行い、後肢足蹠の第 3 と第 4 中足の間に、機械的な力を段階的に加え、ラットが反応（逃避、もがき又は発声）した時点を閾値（g）として評価した。この炎症性疼痛モデル動物を各群 6～8 匹（ナプロキセンは 11 匹）用い、CFA 投与後 24 時間に、ジフェリケファリン（0.03、0.1、0.3 及び 1 mg/kg）及び溶媒（生理食塩液）は 1 mL/kg の容量で静脈内投与し、ナプロキセン（10 mg/kg）は 1 mL/kg の容量で腹腔内投与した。各薬物投与後 15 分、30 分、60 分、90 分及び 120 分に閾値を測定した。なお、組織損傷を防ぐために測定の最大値を 390 g とした。

ジフェリケファリンは、用量依存的に CFA 誘発炎症性疼痛による痛覚過敏を減弱させ、閾値を投与前の値以上に上昇させた（図 2.6.2.3.1.3.2- 1 参照）。ジフェリケファリン 0.1 mg/kg において鎮痛作用は投与後 90 分までみられ、0.3 mg/kg 以上においては投与後 120 分までみられた。投与後 30 分のジフェリケファリンの 50%有効用量は 0.07 mg/kg（0.06～0.09 ; 95%信頼区間）であった。また、ジフェリケファリンは、対側の足蹠においても用量依存的に閾値を上昇させ、0.3 mg/kg 以上において投与後 15 分で有意になり、投与後 120 分まで持続した。ナプロキセンは、CFA 誘発炎症性疼痛による痛覚過敏を減弱さ

せ、投与後 30 分で有意になり、投与後 90 分まで持続した。また、対側の足蹠においても同様の結果が得られた。

図 2.6.2.3.1.3.2- 1　CFA 誘発疼痛モデルに対するジフェリケファリン（CR845）の鎮痛作用（CFA 投与足側）



データは平均値±標準誤差（n=6-8）を示す。
*** p<0.001 vs. Vehicle (two-way ANOVA followed by Bonferroni test)

2.6.2.4 安全性薬理試験

2.6.2.4.1 中枢神経系

2.6.2.4.1.1 ラット中枢神経系に対する作用

・・・・・・・・・添付資料 4.2.1.3-1 参照

雄性（7～10 週齢、263～315 g）及び雌性（7～15 週齢、221～275 g）ラット（CD（SD）IGS BR）を各群 20 匹（雌雄各 10 匹）用い、ジフェリケファリン（1、5 及び 25 mg/kg）及び溶媒（生理食塩液）を 1 mL/kg の容量で静脈内投与した。投与前、投与後 2 及び 24 時間に機能観察総合評価（FOB）法に基づいて、それぞれ±15 分以内で観察を行った。また、投与後 48 時間にも症状観察を行った。

ジフェリケファリン各投与群の雌雄ラットともに、投与後 2 時間でホームケージ観察及びオープンフィールド観察において、活動性の低下、姿勢の変化（うずくまり、円背位、挙尾及び壁又は前肢に対する寄りかかり）及び探索的な立ち上がり行動の減少が観察された。探索的な立ち上がり行動を含む観察されたほとんどの症状は投与後 24 時間に正常に回復し、投与後 48 時間の観察では異常は認められなかった（表 2.6.2.4.1.1-1 参照）。眼瞼閉鎖、瞳孔反応（縮瞳）、流涙及び排尿の増加が投与後 2 時間に観察されたが、投与後 24 時間には回復傾向を示した（表 2.6.2.4.1.1-2 参照）。流涎、立毛は観察されず、呼吸及び排便に影響はみられなかった。接近反応、触覚反応及び驚愕反応に対して、投与後 2 時間にジフェリケファリン全投与群で用量非依存的に、全く反応しない又はわずかに反応する動物が認められたが、投与後 24 時間までには正常の範囲内に回復した。テールフリック反応に対しては、投与後 2 時間に反応潜時が最大付近まで延長し、ジフェリケファリン 1 mg/kg 投与群の雌を除いて、全投与群で統計学的に有意であった。投与後 24 時間においても反応潜時の延長は減弱したものの持続し、ジフェリケファリン 25 mg/kg 投与群の雄のみ統計学的に有意であった（表 2.6.2.4.1.1-3 参照）。ジフェリケファリン全投与群で身体的緊張の低下、軽度から重篤な歩行障害及び平面又は空中での正向反射にわずかな影響が認められたが、前後肢の握力及び着地開脚への影響はみられなかった（表 2.6.2.4.1.1-4 参照）。直腸温は、ジフェリケファリンの投与後 2 時間に低下し、全投与群の雌及びジフェリケファリン 1 mg/kg 投与群の雄で統計学的に有意であった。投与後 24 時間までに正常の範囲内に回復した。体重は、投与後 24 及び 48 時間にジフェリケファリン 5 mg/kg 投与群の雄及び 25 mg/kg 投与群の雌雄で有意に低下した。以上の結果、ジフェリケファリンは、全投与群において鎮静作用を引き起こし、この作用は投与後 2 時間で顕著であり、その後、程度は減弱したものの投与後 24 時間まで持続した。なお、投与後 48 時間までには消失した。この作用はすべての動物に対し同程度に広く観察されが、用量依存性はなかった。観察された鎮静作用は、κ オピオイド受容体アゴニストの薬理学的な作用に由来すると考えられた。

表 2.6.2.4.1.1- 1　ジフェリケファリン投与後の中枢神経系の活動性及び覚醒変化の合計発生率

観察項目	1 日目（投与後 2 時間の FOB 評価）				2 日目（投与後 24 時間の FOB 評価）			
	溶媒	1 mg/kg	5 mg/kg	25 mg/kg	溶媒	1 mg/kg	5 mg/kg	25 mg/kg
ホームケージ活動性	↓2/20	↑1/20 ↓14/20	↑1/20 ↓10/20	↓13/20	↑1/20	↓3/20	↓5/20	↓5/20
活動性/覚醒（オープンフィールド）	0/20	↑1/20 ↓4/20	↑1/20 ↓2/20	↑1/20 ↓4/20	↓8/20	0/20	↑2/20	↓1/19[b]
体姿勢[a]	0/20	6/20	9/20	7/20	0/20	0/20	1/20	0/20
外観	0/20	1/20	0/20	0/20	0/20	1/20	6/20	8/20
立ち上がり（平均/性別）	6M 8F	2M 4F	1M 3F	1M 2F	3M 4F	4M 6F	6M 6F	5M 4F

↑＝増加、↓＝減少
a：体姿勢はホームケージ又はオープンフィールドのいずれかで変化が観察された。
b：データが 1 匹分記録されていなかったため、合計 19 匹で評価した。

表 2.6.2.4.1.1- 2　ジフェリケファリン投与後の自律神経系機能変化の合計発生率

観察項目	1 日目（投与後 2 時間の FOB 評価）				2 日目（投与後 24 時間の FOB 評価）			
	溶媒	1 mg/kg	5 mg/kg	25 mg/kg	溶媒	1 mg/kg	5 mg/kg	25 mg/kg
眼瞼閉鎖状態[a]	0/20	14/20	10/20	7/20	0/20	1/20	4/20	4/20
瞳孔反射/直径	0/20	8/20 縮瞳	4/20 縮瞳	3/20 縮瞳	0/20	0/20	2/20 縮瞳	0/20
流涙	0/20	3/20	2/20	6/20	0/20	1/20	1/20	2/20
排尿	10/20	17/20	15/20	16/20	5/20	13/20	10/20	11/20

a：眼瞼閉鎖はわずかな下垂から半眼閉鎖として観察された。

表 2.6.2.4.1.1- 3　ジフェリケファリン投与後の感覚運動機能変化の合計発生率

観察項目	1 日目（投与後 2 時間の FOB 評価）				2 日目（投与後 24 時間の FOB 評価）			
	溶媒	1 mg/kg	5 mg/kg	25 mg/kg	溶媒	1 mg/kg	5 mg/kg	25 mg/kg
接近反応 [a]	0/20	↓11/20	↓7/20	↓8/20	0/20	↑1/20 ↓2/20	0/20	↓1/20
触覚反応 [a]	0/20	↓11/20	↓9/20	↓15/20	0/20	↓2/20	↓1/20	↓2/20
驚愕反応 [a]	↑3/20	↑1/20 ↓8/20	↓5/20	↓7/20	0/20	↑2/20	0/20	↓1/20
テールフリック反応潜時 （秒、平均/性別）	12.07M 11.61F	18.15M[b] 17.24F	19.49M[b] 19.80F[b]	19.32M[b] 19.22F[b]	11.42M 10.58F	15.28M 11.87F	10.38M 14.41F	18.50M[b] 12.04F

↑＝増加、↓＝減少
a：ジフェリケファリン投与後の接近、触覚又は驚愕反応に対する反応の減少は、わずかに反応又は反応なしとして観察された。反応の増加は、正常よりも活発又は過剰な反応として観察された。
b：テールフリック反応潜時の延長は雄及び雌の両方で同様であった。1 日目の群 2～4（1、5 及び 25mg/kg）の雄及び群 3 及び 4（5 及び 25mg/kg）の雌、2 日目の群 4（25mg/kg）の雄において痛み刺激に対し統計学的に有意な延長が認められた。

表 2.6.2.4.1.1- 4　ジフェリケファリン投与後の神経筋機能変化の合計発生率

観察項目	1 日目（投与後 2 時間の FOB 評価）				2 日目（投与後 24 時間の FOB 評価）			
	溶媒	1 mg/kg	5 mg/kg	25 mg/kg	溶媒	1 mg/kg	5 mg/kg	25 mg/kg
身体的緊張	0/20	↓8/20	↓7/20	↓7/20	0/20	0/20	↓2/20	↑1/20 ↓3/20
歩行異常	0/20	19/20	20/20	20/20	1/20	10/20	17/20	16/20
歩行障害 （軽度～重度）	なし	軽度 ～重度	軽度 ～中程度	軽度 ～中程度	軽度	軽度 ～中程度	軽度 ～中程度	軽度 ～中程度
平面正向反射 [a]	0/20	11/20	10/20	9/20	1/20	4/20	6/19[b]	9/20
空中正向反射 [a]	0/20	15/20	14/20	15/20	2/20	1/20	9/19[b]	10/20

↑＝増加、↓＝減少
a：軽度の平面正向反射及び空中正向反射の影響がすべての測定ポイントで観察された。
b：データが 1 匹分記録されていなかったため、合計 19 匹で評価した。

2.6.2.4.1.2 マウス自発運動に対する作用

・・・・・・・・・添付資料 4.2.1.3-2 参照

雄性マウス（ICR、6 週齢、29～37 g）を各群 8 匹用い、ジフェリケファリン（0.03、0.1、0.3、1 及び 3 mg/kg）及び溶媒（生理食塩液）を、5 mL/kg の容量で静脈内投与した。薬物投与後 60 分間の自発運動量は自発運動量測定装置を用いて測定した。

投与後 60 分間の自発運動量は、用量依存的に抑制され、0.3 mg/kg 以上の用量で溶媒群と比較し、有意に抑制された（表 2.6.2.4.1.2- 1 参照）。ジフェリケファリンの 50%抑制用量（ED_{50}）は 0.4683 mg/kg（0.1761～1.245；95%信頼区間）であった。

表 2.6.2.4.1.2- 1　マウスにおけるジフェリケファリン投与後の自発運動量

被験物質	自発運動量 (counts / 60 分間)	ED_{50} (95% 信頼区間)
溶媒（生理食塩液）	11521.6±786.2	0.4683 mg/kg (0.1761 ～1.245)
0.03 mg/kg	9054.8±1026.6	
0.1 mg/kg	9135. 6±1032.1	
0.3 mg/kg	7992.1±691.9*	
1 mg/kg	4125.6±615.7**	
3 mg/kg	3580.4±1365.0**	

データは平均値 ± 標準誤差 (n=8) を示す。

*, **： $p<0.05$ and $p<0.01$ vs. Vehicle (Dunnett's test)

2.6.2.4.1.3 マウスロータロッド試験

・・・・・・・・・添付資料 4.2.1.3-3 参照

雄性マウス（ICR、6 週齢、29～36 g）をロータロッド装置に 3 分間維持できるように予備訓練を行い実験に用いた。各群 6 匹とし、ジフェリケファリン（0.1、0.3、1、3 及び 10 mg/kg）及び溶媒（生理食塩液）を、5 mL/kg の容量で静脈内投与した。ロータロッド装置を用いて、投与前及び各薬物投与後 0.25、0.5、1、1.5 及び 3 時間にロータロッド滞留時間を測定し、その滞留時間を運動協調性に対する影響の指標とした。

運動協調性は、ジフェリケファリンの投与により用量依存的に影響が認められ、1 mg/kg では投与後 1.5 時間まで、3 及び 10 mg/kg では投与後 3 時間まで有意に影響が認められた

（表 2.6.2.4.1.3- 1 参照）。ジフェリケファリンの 50%阻害用量（ED_{50}）は投与後 0.5 時間で 0.6337 mg/kg（0.4404～0.9119；95%信頼区間）、投与後 1 時間で 0.7446 mg/kg（0.4533～1.2231；95%信頼区間）であった。

表 2.6.2.4.1.3- 1　マウスにおけるジフェリケファリン投与後のロータロッド滞留時間

被験物質	ロータロッド滞留時間 (秒)						ED_{50} (95% 信頼区間)	
	投与前	投与終了後の時間 (時)					投与終了後の時間 (時)	
		0.25	0.5	1	1.5	3	0.5	1
溶媒 (生理食塩液)	180.0±0.0	180.0±0.0	180.0±0.0	180.0±0.0	174.8±5.2	158.5±21.5	0.6337 mg/kg (0.4404 ～ 0.9119)	0.7446 mg/kg (0.4533 ～ 1.2231)
0.1 mg/kg	180.0±0.0	180.0±0.0	180.0±0.0	176.0±4.0	158.7±20.2	153.3±16.9		
0.3 mg/kg	180.0±0.0	164.5±15.5	149.2±22.0	144.3±20.2	153.8±26.2	130.5±31.6		
1 mg/kg	180.0±0.0	81.3±21.4*	47.0±25.7**	63.8±29.8*	41.8±7.9*	65.5±24.6		
3 mg/kg	180.0±0.0	54.5±23.4**	28.7±9.4**	39.7±23.5**	25.0±10.9*	17.8±7.6*		
10 mg/kg	180.0±0.0	14.2±4.3**	11.8±5.4**	9.3±3.3**	11.5±5.5*	14.3±5.7*		

データは平均値 ± 標準誤差 (n=6) を示す。

*, ** : $p<0.05$ and $p<0.01$ vs. Vehicle (Steel's test)

2.6.2.4.1.4 ラットロータロッド試験

・・・・・・・・・添付資料 4.2.1.3-4 参照

雄性ラット（CD（SD）、8～11 週齢、254～438 g）をロータロッド装置に 1 分間維持できるように予備訓練を行い実験に用いた。各群 6 匹とし、ジフェリケファリン（0.3、1、3、10 及び 30 mg/kg）及び溶媒（生理食塩液）を、1 mL/kg の容量で静脈内投与した。各薬物投与後 5、15、30、60、90、180 及び 360 分にロータロッド装置を用いて、運動協調性を測定した。運動協調性に対する影響は、それぞれの群で 1 分間に 1 回以上ロータロッドから落下した動物の割合を指標とした。

ジフェリケファリン 0.3 及び 1 mg/kg では、ジフェリケファリン 0.3 mg/kg で投与後 60 分に 1 例落下した以外、投与後 5～360 分で運動協調性に影響は認められなかった。なお、落下した 1 例は、偶発的であり被験物質との関連性はないと考えられた。ジフェリケファリン 3 及び 10 mg/kg では、投与後 90 分まで運動協調性に影響が認められたが、投与後 180 及び 360 分には影響は認められなかった。ジフェリケファリン 30 mg/kg では、投与後 360 分まで運動協調性に影響が認められた（表 2.6.2.4.1.4- 1 参照）。以上のことから、ジフェリ

ケファリン 0.3 及び 1 mg/kg では運動協調性に影響を与えず、ジフェリケファリンは 3、10 及び 30 mg/kg で運動協調性に影響を示すことが明らかとなった。

表 2.6.2.4.1.4- 1　ジフェリケファリン投与後の運動協調性への影響率

群番号 (n=6)	静脈内投与 (1mL/kg)	用量 (mg/kg)	投与後運動協調性への影響を示した動物の割合 (%)						
			5 分	15 分	30 分	60 分	90 分	180 分	360 分
1	溶媒	0	0	0	0	0	0	0	0
2	ジフェリケファリン	0.3	0	0	0	17[a]	0	0	0
3		1	0	0	0	0	0	0	0
4		3	33	67	67	67	33	0	0
5		10	33	67	50	50	17	0	0
6		30	100	100	100	67	50	17	17

a：1 匹の動物が落下したが、偶発的であり、被験物質との関連性はないと考えられた。

2.6.2.4.1.5 マウス睡眠に対する作用

・・・・・・・・・添付資料 4.2.1.3-5 参照

雄性マウス（ICR、6 週齢、31g～37 g）を各群 8 匹用い、ジフェリケファリン（0.03、0.1、0.3、1 及び 3 mg/kg）及び溶媒（生理食塩液）を 5 mL/kg の容量で静脈内投与し、5 分後にペントバルビタール（40 mg/kg）を腹腔内に投与した。正向反射の消失時間を指標として、ジフェリケファリンのペントバルビタールによる睡眠時間に与える影響を測定した。

ペントバルビタールによる睡眠時間は、ジフェリケファリンにより用量依存的に延長し、0.3 mg/kg 以上の用量で溶媒投与群と比較し、有意に延長した（表 2.6.2.4.1.5- 1 参照）。

表 2.6.2.4.1.5- 1　マウスにおけるジフェリケファリン投与後の睡眠時間

被験物質	睡眠時間（分）
溶媒（生理食塩液）	22.3±2.5
0.03 mg/kg	20.4±3.1
0.1 mg/kg	32.8±2.8
0.3 mg/kg	33.5±3.2*
1 mg/kg	40.8±2.2**
3 mg/kg	50.9±4.0**

データは平均値 ± 標準誤差 (n=8) を示す。

*, ** : $p<0.05$ and $p<0.01$ vs. Vehicle (Dunnett's test)

2.6.2.4.1.6 ラット脳波を用いた睡眠-覚醒周期に対する影響

・・・・・・・・・添付資料 4.2.1.3-6 参照

雄性ラット（SD、10～11 週齢、328～373 g）をケタミン及びキシラジンの混合麻酔下で脳波測定用として皮質前頭葉に単極電極、海馬に双極電極、嗅脳付近に基準電極を、筋電図測定用としてリード線を頸部に埋め込んだ。手術後 5 日以上の回復期間を設け、安定した波形が得られた個体を各群 6 匹用い、ジフェリケファリン（0.1、0.3 及び 1 mg/kg）及び溶媒（生理食塩液）を 2 mL/kg の容量で静脈内投与、メタンフェタミン塩酸塩（陽性対照、4 mg/kg）を 2 mL/kg の容量で皮下投与した。各薬物投与後 6 時間まで覚醒下及び無拘束下で連続的に自発脳波を測定した。取得した脳波から、睡眠-覚醒周期（睡眠段階、徐波睡眠期、睡眠潜時及び入眠潜時）を解析した。睡眠潜時及び入眠潜時が求められない例についてはその値を測定終了時の最大値（360 分）とした。

睡眠段階の分類：覚醒期、安静期、徐波軽睡眠期、徐波深睡眠期及び速波睡眠期

徐波睡眠期　　：安静期、徐波軽睡眠期及び徐波深睡眠期の合計

睡眠潜時　　：安静期、徐波軽睡眠期、徐波深睡眠期が 40 秒以上連続して出現するまでの時間及び速波睡眠期が 20 秒以上出現するまでの時間

入眠潜時　　：安静期、徐波軽睡眠期、徐波深睡眠期又は速波睡眠期が連続で合計 120 秒以上持続する睡眠期が出現するまでの潜時

自発脳波においてジフェリケファリン 0.1、0.3 及び 1 mg/kg で異常波形は認められなかった。睡眠-覚醒周期の占有率（6 時間合計）において、ジフェリケファリン 0.3 mg/kg では、覚醒期及び安静期の増加、徐波軽睡眠期及び徐波深睡眠期の減少が認められた。ジフェリケファリン 1 mg/kg では、覚醒期の増加、徐波軽睡眠期、徐波深睡眠期及び徐波睡眠期の減少が認められた。また、ジフェリケファリン 0.1、0.3 及び 1 mg/kg では、速波睡眠期は認められなかった。睡眠潜時はジフェリケファリン 0.3 mg/kg では徐波深睡眠期の延長、ジフェリケファリン 1 mg/kg では徐波軽睡眠期、徐波深睡眠期の延長が認められ、入眠潜時は、ジフェリケファリン 1 mg/kg で延長が認められた（表 2.6.2.4.1.6- 1～2 参照）。

メタンフェタミン塩酸塩では、自発脳波において異常波形は認められず、睡眠-覚醒周期の占有率においては覚醒期の増加、安静期、徐波軽睡眠期、徐波深睡眠期、徐波睡眠期及び速波睡眠期の減少が認められた。睡眠潜時は、安静期、徐波軽睡眠期、徐波深睡眠期及び速波睡眠期の延長が認められ、入眠潜時の延長も認められた。

表 2.6.2.4.1.6- 1　ラットにおけるジフェリケファリン投与後の睡眠-覚醒周期の占有率（6 時間合計）

被験物質	睡眠-覚醒周期の占有率（%）					
	覚醒期	安静期	徐波 軽睡眠期	徐波 深睡眠期	徐波 睡眠期	速波 睡眠期
溶媒 （生理食塩液）	25.6 ± 1.0	16.0 ± 1.1	37.4 ± 1.6	12.4 ± 1.6	65.8 ± 2.1	8.7 ± 1.4
0.1 mg/kg	32.1 ± 5.2	16.9 ± 2.3	37.6 ± 4.0	13.5 ± 3.0	67.9 ± 5.2	0.0 ± 0.0†
0.3 mg/kg	49.1 ± 5.4*	23.9 ± 1.9*	23.4 ± 4.7*	3.6 ± 1.6*	50.9 ± 5.4	0.0 ± 0.0†
1 mg/kg	60.4 ± 6.3*	20.9 ± 2.9	17.8 ± 3.9**	0.9 ± 0.8**	39.6 ± 6.3**	0.0 ± 0.0†
メタンフェタミン 塩酸塩	74.3 ± 3.4##	4.8 ± 1.0##	12.5 ± 2.5##	7.1 ± 1.1#	24.4 ± 3.0##	1.3 ± 0.5##

データは平均値 ± 標準誤差 (n=6) を示す。

*, ** : p<0.05 and p<0.01 vs. Vehicle (Dunnett's test or Steel test)

#, ## : p<0.05 and p<0.01 vs. Vehicle (Student's t -test or Aspin-Welch's t -test)

†：溶媒群と明らかな差があるものの、分散性が無く（標準誤差が 0）、統計学的解析ができない場合は、影響ありとした。

表 2.6.2.4.1.6- 2　ラットにおけるジフェリケファリン投与後の潜時

被験物質	潜時（分）				
	安静期	徐波 軽睡眠期	徐波 深睡眠期	速波 睡眠期	睡眠期
溶媒 （生理食塩液）	19.8 ± 5.3	21.3 ± 3.2	34.2 ± 6.4	53.3 ± 9.6	20.4 ± 3.4
0.1 mg/kg	20.7 ± 9.4	34.3 ± 12.5	86.6 ± 31.8	360.0 ± 0.0†	26.9 ± 11.6
0.3 mg/kg	20.4 ± 4.1	52.4 ± 15.2	238.5 ± 42.4*	360.0 ± 0.0†	40.6 ± 12.9
1 mg/kg	34.0 ± 9.6	124.7 ± 32.7*	335.1 ± 17.2**	360.0 ± 0.0†	113.5 ± 36.3*
メタンフェタミン 塩酸塩	251.3 ± 11.0##	268.7 ± 10.9##	272.2 ± 10.3##	311.0 ± 18.7##	256.5 ± 10.9##

データは平均値 ± 標準誤差 (n=6) を示す。

*, ** : p<0.05 and p<0.01 vs. Vehicle (Dunnett's test or Steel test)

: p<0.01 vs. Vehicle (Student's t -test or Aspin-Welch's t -test)

†：溶媒群と明らかな差があるものの、分散性が無く（標準誤差が 0）、統計学的解析ができない場合は、影響ありとした。

2.6.2.4.2 心血管系

2.6.2.4.2.1 hERG チャネルに対する作用

・・・・・・・・・添付資料 4.2.1.3-7 参照

hERG チャネルを発現させた HEK293 細胞を各群 3～4 細胞用い、パッチクランプ法を用いて、ジフェリケファリン（10、100 及び 1000 μmol/L）、テルフェナジン（陽性対照、60 nmol/L）及び HEPES 緩衝生理食塩液（陰性対照）を適用したときの hERG 電流を測定した。

保持電位は-80 mV に設定し、試験パルスは、脱分極パルス+20 mV（1 s）、再分極パルス -80 mV（-0.5 V/s）を、5 秒毎に与えた。各薬物の適用前後の hERG 電流を測定し、電流測定終了時に、E-4031（500 nmol/L）を適用した。

各薬物の適用前後の定常状態からそれぞれの濃度の抑制率（%）を算出した。

ジフェリケファリンは、hERG 電流を 10 μmol/L で 0.6±0.2%、100 μmol/L で 0.6±0.1%、1000 μmol/L で 7.2±0.7%抑制した。陰性対照は、0.3±0.1%の抑制であった。ジフェリケファリン 1000 μmol/L での hERG 電流の抑制は、陰性対照に対して有意であった（表 2.6.2.4.2.1- 1 参照）。IC_{50} は 1000 μmol/L 以上と推定された。なお、テルフェナジン（60 nmol/L）の抑制率は、83.0±0.9%であった。

表 2.6.2.4.2.1- 1　hERG チャネルに対するジフェリケファリンの抑制率

濃度（μmol/L）	平均（%）	標準誤差（%）	N
0	0.3	0.1	3
10	0.6	0.2	3
100	0.6	0.1	3
1000	7.2*	0.7	4

* $p<0.05$ vs. Vehicle (Dunnet's multiple comparison test)

2.6.2.4.2.2 カニクイザルを用いた心血管系に対する作用

・・・・・・・・・添付資料 4.2.1.3-8 参照

覚醒下の雄性サル（カニクイ、体重 4.4～6.5 kg）を 4 匹用いた。サルには、あらかじめテレメトリー装置と血管アクセスポートを埋め込み、薬物投与 12 時間前から投与後約 24 時間までジャケットを装着させ、その間 2 mL/hr の速度で生理食塩液を持続静脈内投与した。ジフェリケファリン（0.25、1 及び 4 mg/kg）及び溶媒（生理食塩液）を 1 mL/kg の容量で静脈内投与した。投与は、7 日間の休薬期間を設け、ジフェリケファリンの用量を順次増加させ投与した。ベースラインを投与 2 時間前から測定し、投与後約 24 時間まで収縮期血圧、拡張期血圧、平均血圧、心拍数、体温及び心電図（第 2 誘導）を測定した。心電図から、PR、QRS、QT 及び QTc（Bazett's）間隔を算出した。

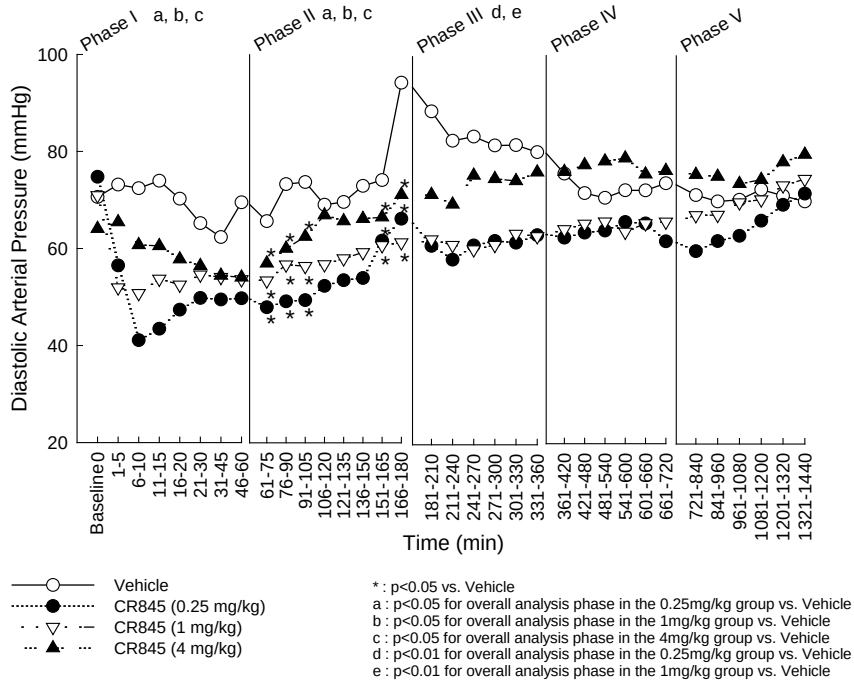
血圧（収縮期、拡張期及び平均）は、ジフェリケファリン 0.25 mg/kg 以上の投与により低下した。ジフェリケファリン 0.25 mg/kg では、投与後約 10 分に血圧の最大の低下（約 41～43%）がみられ、回復は緩やかであり、18～20 時間持続した。ジフェリケファリン 4 mg/kg では、投与後 30～60 分に血圧の低下（約 13～22%）がみられ、投与後 4～7 時間で溶媒群と同程度まで回復した（図 2.6.2.4.2.2- 1～3 参照）。

心拍数は、ジフェリケファリン 0.25 mg/kg 以上の投与により、投与後 15 分間に約 30～50 bpm 増加し、その後、溶媒群と同様に徐々に減少した。0.25 mg/kg では投与後 3～24 時間、1 mg/kg では投与後 1～24 時間、4 mg/kg では投与後 1～6 時間に溶媒群に比べ減少した。ジフェリケファリン 4 mg/kg の投与後 18～22 時間の心拍数も減少したが、正常範囲内であった（図 2.6.2.4.2.2- 4 参照）。

心電図は、PR 間隔及び QRS 間隔ではジフェリケファリン 4 mg/kg までの投与により変化はみられなかった。QT 間隔の有意な延長が 1 及び 4 mg/kg の投与でみられたが、心拍数の減少に起因する生理学的な変化と考えられた。QTc 間隔は、溶媒群と比較してジフェリケファリン各投与群で、投与後 45 分までに有意な延長がみられたが、その平均変化率は、10%の範囲内であり、観察された QTc 間隔のすべてが正常範囲内であることから、ジフェリケファリンは、QTc 間隔に影響しないと考えられた（図 2.6.2.4.2.2- 5 参照）。体温の変化は、正常範囲内であった（図 2.6.2.4.2.2- 6 参照）。

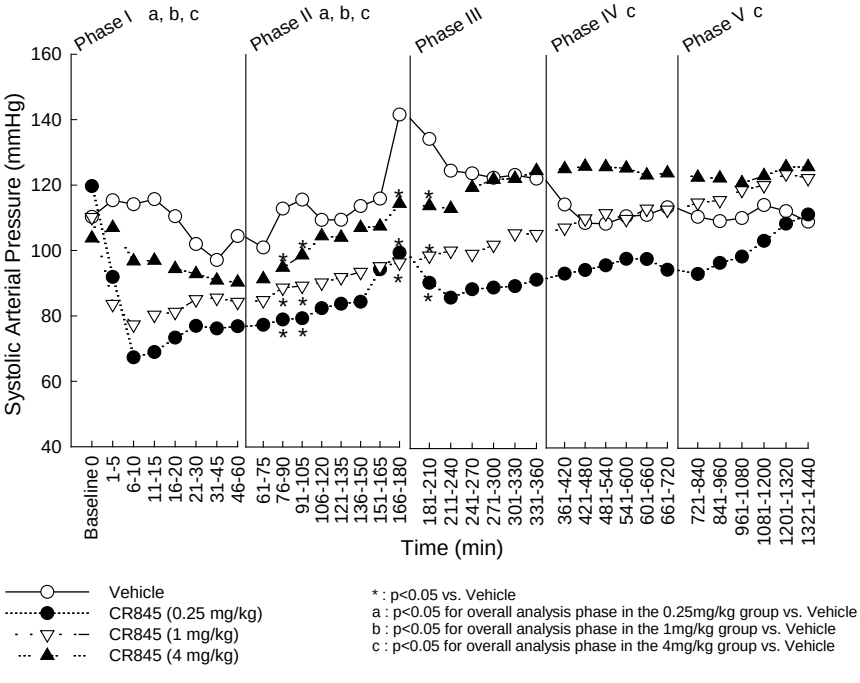
なお、すべてのジフェリケファリン投与群において、ほとんどの動物で嗜眠又は円背位がみられた。嘔吐が、ジフェリケファリン 0.25、1 及び 4 mg/kg でそれぞれ 1 例、2 例及び 3 例にみられた。瀕死又は死亡はみられなかった。軟便が、ジフェリケファリン 0.25 及び 4 mg/kg でそれぞれ 3 例及び 1 例にみられた。流涎が、ジフェリケファリン 1 及び 4 mg/kg でそれぞれ 1 例及び 4 例（全例）にみられた。観察された症状は、ジフェリケファリン投与群のいずれの群でも同程度であったが、症状の持続時間は、ジフェリケファリンの用量に依存して延長した。また、体重の変化はみられなかった。

図 2.6.2.4.2.2- 1　拡張期血圧



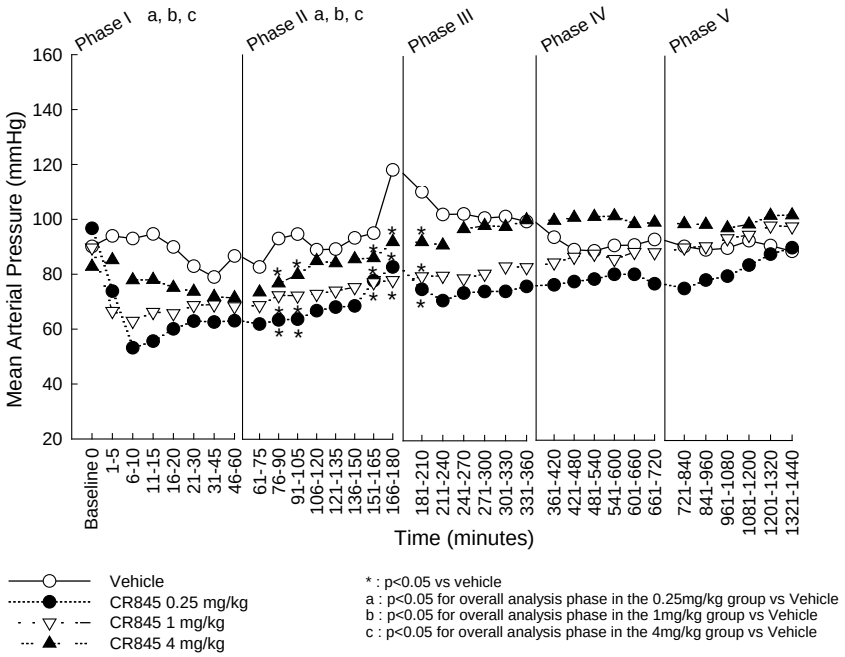
CR845はジフェリケファリンを示す。
データは最小二乗平均値（n=4）を示す。
各ポイントは、区間ごとに反復測定共分散分析（RANCOVA）を用いて解析した。

図 2.6.2.4.2.2- 2　収縮期血圧



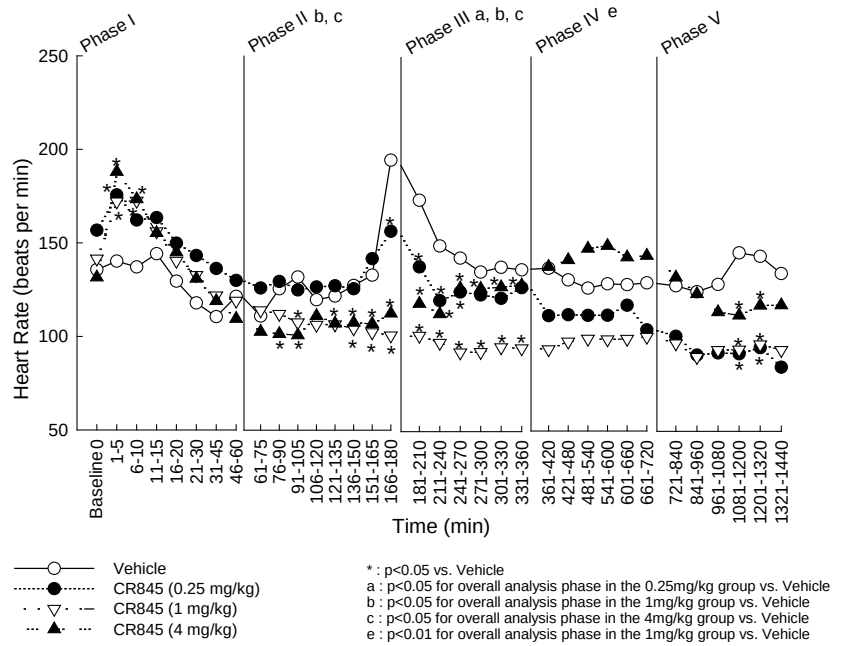
CR845はジフェリケファリンを示す。
データは最小二乗平均値（n=4）を示す。
各ポイントは、区間ごとに反復測定共分散分析（RANCOVA）を用いて解析した。

図 2.6.2.4.2.2- 3　平均血圧



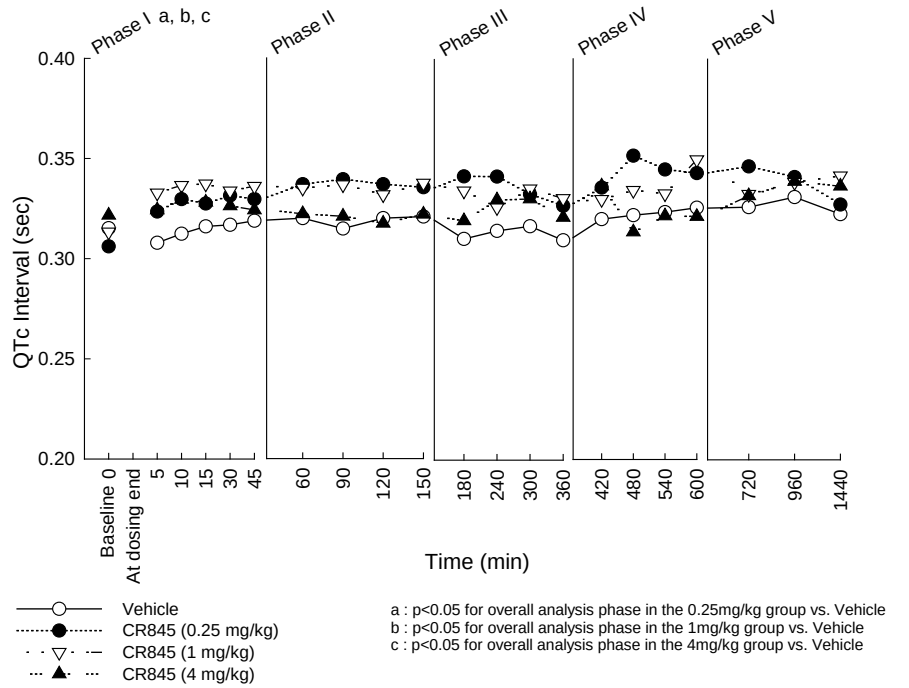
CR845はジフェリケファリンを示す。
データは最小二乗平均値（n=4）を示す。
各ポイントは、区間ごとに反復測定共分散分析（RANCOVA）を用いて解析した。

図 2.6.2.4.2.2- 4　心拍数



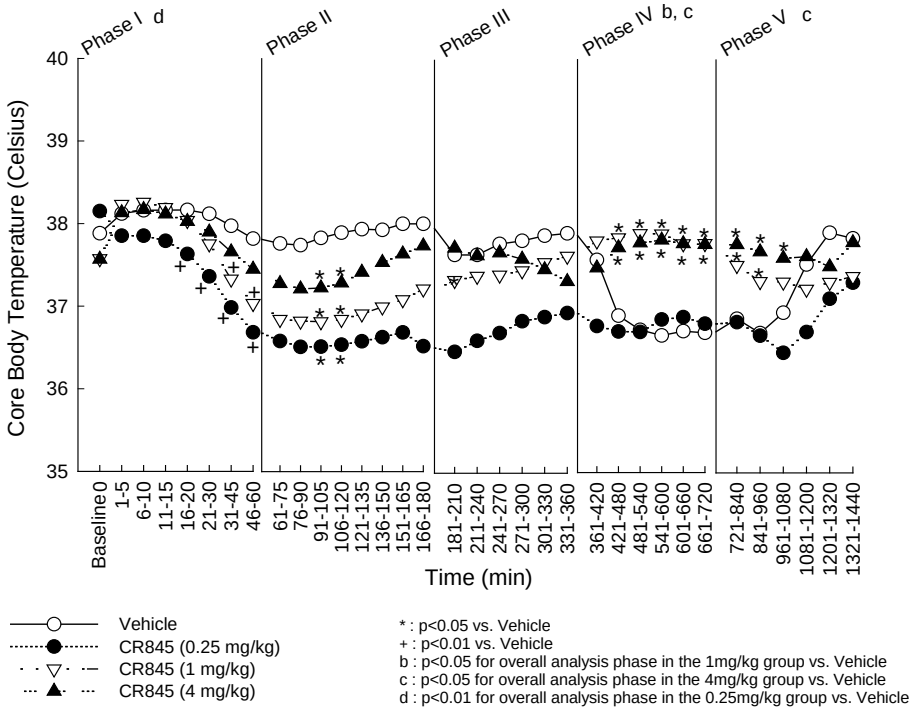
CR845はジフェリケファリンを示す。
データは最小二乗平均値（n=4）を示す。
各ポイントは、区間ごとに反復測定共分散分析（RANCOVA）を用いて解析した。

図 2.6.2.4.2.2- 5　QTc



CR845はジフェリケファリンを示す。
データは最小二乗平均値（n=4）を示す。
各ポイントは、区間ごとに反復測定共分散分析（RANCOVA）を用いて解析した。

図 2.6.2.4.2.2- 6　体温



CR845はジフェリケファリンを示す。
データは最小二乗平均値（n=4）を示す。
各ポイントは、区間ごとに反復測定共分散分析（RANCOVA）を用いて解析した。

2.6.2.4.3 呼吸系

2.6.2.4.3.1 ラット呼吸系に対する作用

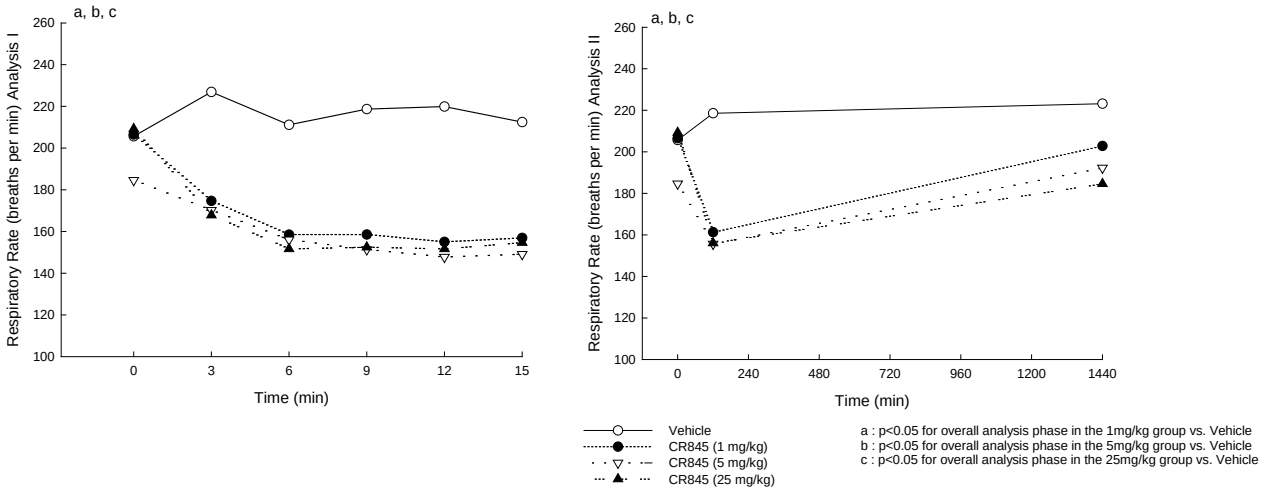
・・・・・・・・・添付資料 4.2.1.3-9 参照

雄性ラット（CD（SD）IGSBR、約 7 週齢、体重 210～288 g）を各群 8 匹用い、ジフェリケファリン（1、5 及び 25 mg/kg）及び溶媒（生理食塩液）を 1 mL/kg の容量で静脈内投与した。呼吸機能は、head-out プレチスモグラフィーを用いて呼吸数、1 回換気量及び分時換気量を投与前、投与直後から 15 分間は 3 分間ごとに、投与後 2 及び 24 時間は 15 分間測定し、その平均値を求めた。

呼吸数は、投与後 2 時間に全投与群で同程度の明らかな減少（26～29%）が認められ、投与後 24 時間においても溶媒群より低く、用量依存的であった（ジフェリケファリン 1、5 及び 25 mg/kg でそれぞれ 9、14 及び 17%）。一回換気量は、溶媒群よりわずかに増加したが、呼吸数低下に対する生理的な代償を反映していると考えられた。分時換気量は、ジフェリケファリンによる影響は認められなかった（図 2.6.2.4.3.1- 1～3 参照）。以上のことから、ジフェリケファリンは、呼吸抑制を引き起こさないと考えられた。

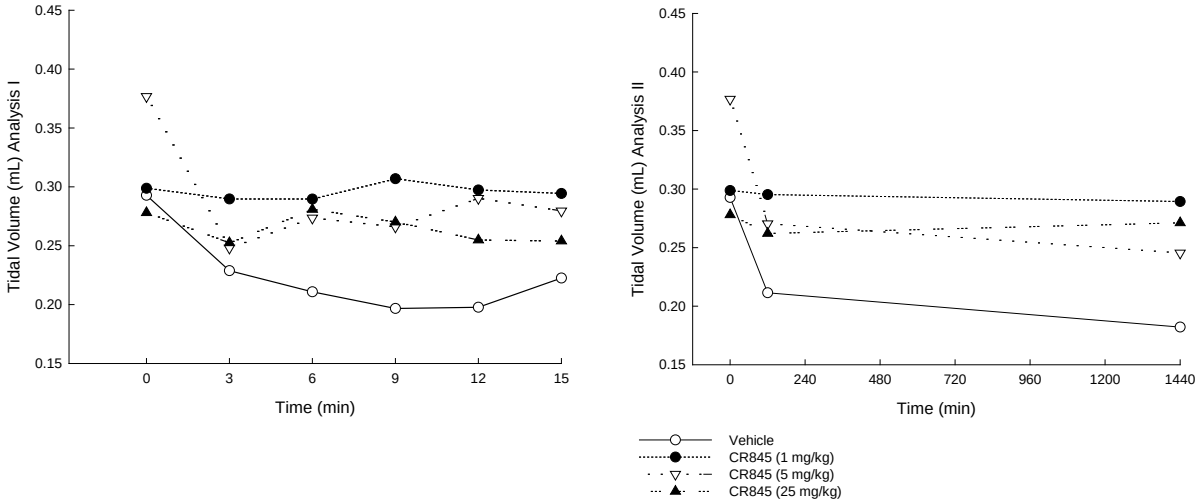
なお、全投与群で嗜眠、運動失調（特にジフェリケファリン 5 及び 25 mg/kg）がみられ、また、尿排泄量増加及び尿着色が認められた。

図 2.6.2.4.3.1- 1　ジフェリケファリン（CR845）投与後のラット呼吸数の変化



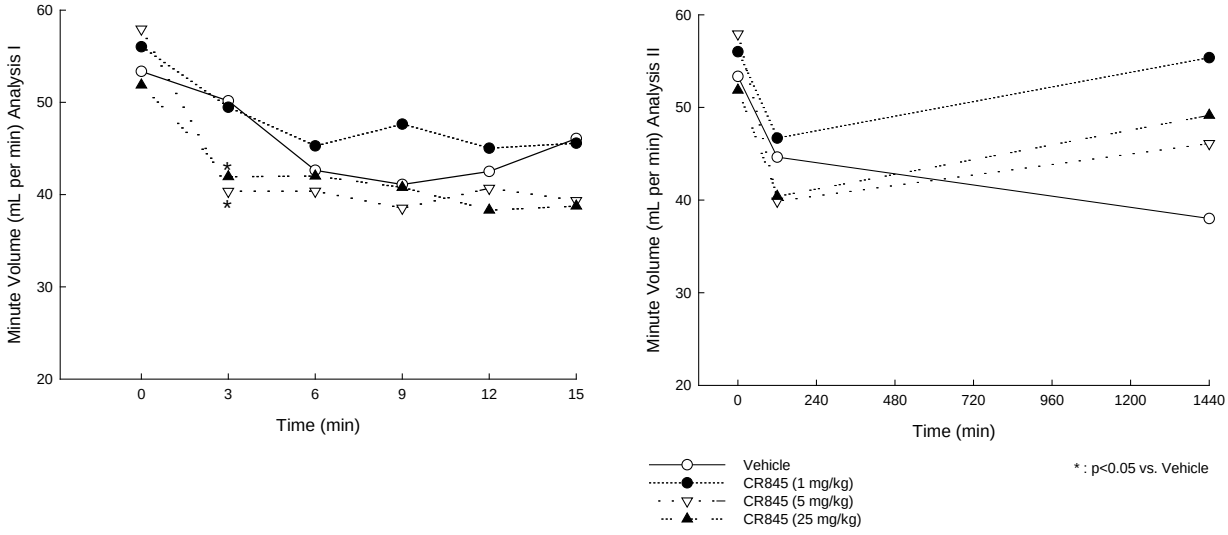
（投与後 15 分まで（左）及び投与後 24 時間まで（右））
データは最小二乗平均値（n=8）を示す。
各呼吸パラメータは、反復測定共分散分析（RANCOVA）を用いて解析した。

図 2.6.2.4.3.1- 2　ジフェリケファリン（CR845）投与後のラット 1 回換気量の変化



（投与後 15 分まで（左）及び投与後 24 時間まで（右））
データは最小二乗平均値（n=8）を示す。
各呼吸パラメータは、反復測定共分散分析（RANCOVA）を用いて解析した。

図 2.6.2.4.3.1- 3　ジフェリケファリン（CR845）投与後のラット分時換気量の変化



（投与後 15 分まで（左）及び投与後 24 時間まで（右））
データは最小二乗平均値（n=8）を示す。
各呼吸パラメータは、反復測定共分散分析（RANCOVA）を用いて解析した。

2.6.2.4.4 胃腸管系

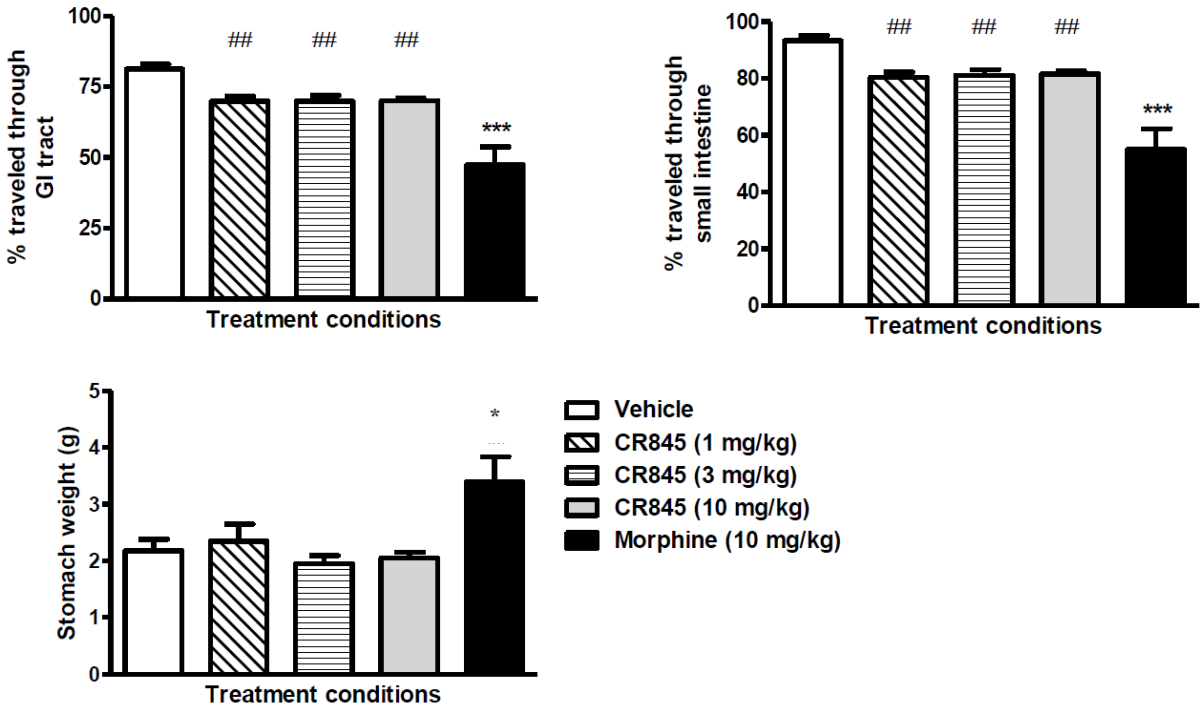
2.6.2.4.4.1 ラットを用いた腸管輸送能及び胃排出能に対する作用

・・・・・・・・・添付資料 4.2.1.3-10 参照

雄性ラット（SD、体重 230～264 g）を各群 10 匹用い、試験の 48 時間前から通常消費量の 60%の餌を与え、24 時間前から絶食させた後、ジフェリケファリン（1、3 及び 10 mg/kg）及び溶媒（生理食塩液）は 1 mL/kg の容量で静脈内投与し、モルヒネ（10 mg/kg）は 2 mL/kg の容量で皮下投与した。なお、ラットは、イソフルラン麻酔下で、あらかじめ右外頸静脈にカテーテルを留置した。溶媒及びジフェリケファリン投与後 15 分、モルヒネ投与後 30 分に、2 mL の炭末懸濁液を経口投与した。炭末投与後 2 時間に、胃から直腸までを摘出し、腸管の長さ、小腸の長さ、炭末の最先端までの距離及び胃重量を測定した。

ジフェリケファリン全投与群において、溶媒群に比べ炭末輸送能に対して少ないながらも有意な減少が認められたが、胃内容物排出能に対しては有意な作用は認められなかった（図 2.6.2.4.4.1- 1 参照）。ジフェリケファリン投与後の症状として、ジフェリケファリン 1、3 及び 10 mg/kg 投与直後から挙尾と硬直が、それぞれ 1、5 及び 10 例にみられた。なお、ジフェリケファリン 1 及び 3 mg/kg 投与でみられた挙尾と硬直は、10 mg/kg 投与時と比べ軽度であった。ジフェリケファリンの腸管への作用はモルヒネに比べ弱かった。

図 2.6.2.4.4.1- 1　腸管輸送能及び胃排出能に対するジフェリケファリン（CR845）の作用



データは平均値＋標準誤差（n=10）を示す。
* p<0.01, *** p<0.0001 vs. Vehicle (unpaired t-test)
p<0.01 vs. Vehicle (Dunnett test)

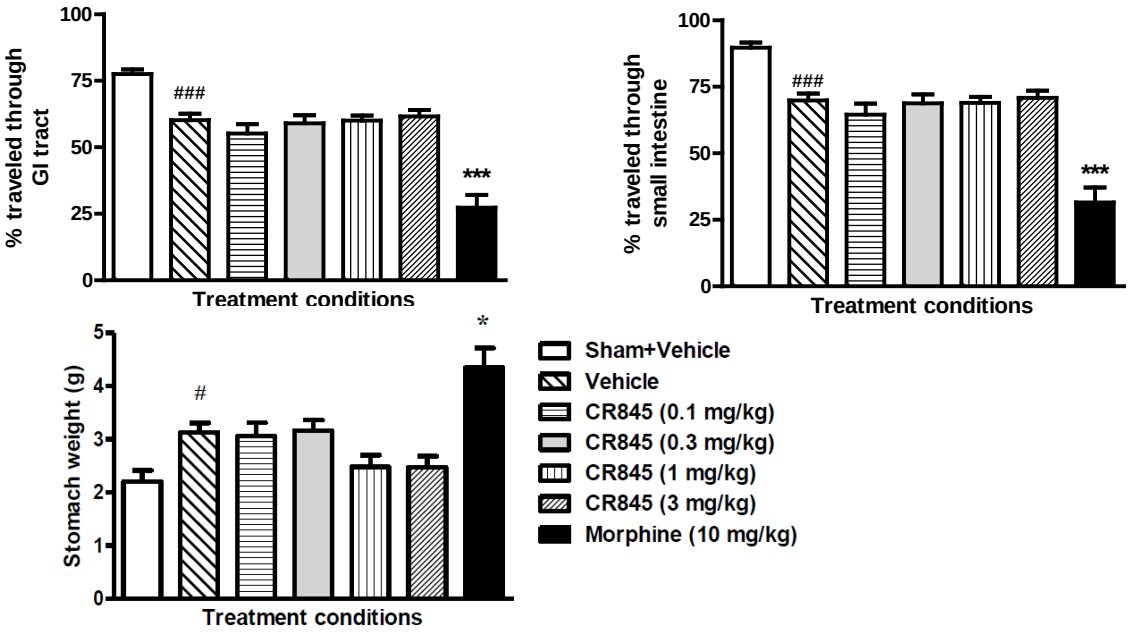
2.6.2.4.4.2 ラット術後イレウスモデルを用いた腸管輸送能及び胃排出能に対する作用

・・・・・・・・・添付資料 4.2.1.3-11 参照

雄性ラット（SD、体重 230～276 g）を用いて、試験の 48 時間前から通常消費量の 60%の餌を与え、24 時間前から絶食させた後、3～5%のイソフルラン麻酔下で腹部を 2.5 cm 正中切開し、盲腸を露出させ、生理食塩液を浸したガーゼを置き、1 分間マッサージした後、4-0 縫合糸で筋肉を縫合し、創傷クリップで皮膚を閉じることにより術後イレウスモデルを作製した。また、腹部を 2.5 cm 正中切開し、閉腹した群を皮膚切開（偽手術）群とした。なお、ラットはイソフルラン麻酔下で、右外頸静脈にカテーテルを留置した。術後イレウスモデル作製後 90 分に各群 9～12 匹を用いて、ジフェリケファリン（0.1、0.3、1 及び 3 mg/kg）及び溶媒（生理食塩液）は 1 mL/kg の容量で静脈内投与し、モルヒネ（10 mg/kg）は 2 mL/kg の容量で皮下投与した。溶媒及びジフェリケファリン投与後 15 分、モルヒネ投与後 30 分に、2 mL の炭末懸濁液を経口投与した。炭末投与後 2 時間に、胃から直腸までを摘出し、腸管の長さ、小腸の長さ、炭末の最先端までの距離及び胃重量を測定した。

ジフェリケファリン全投与群において、溶媒群に比べて炭末輸送能及び胃内容物排出能に対する有意な作用は認められなかった（図 2.6.2.4.4.2- 1 参照）。ジフェリケファリン投与後の症状として、1 及び 3 mg/kg の投与直後から試験期間中に軽度の挙尾と硬直が、それぞれ 1 及び 8 例にみられた。

図 2.6.2.4.4.2- 1　術後イレウスモデルを用いた腸管輸送能及び胃排出能に対するジフェリケファリン（CR845）の作用



データは平均値＋標準誤差（n=9-12）を示す。
# p<0.001, ### p<0.0001 vs. Sham + Vehicle (unpaired t-test)
* p<0.001, *** p<0.0001 vs. Vehicle (unpaired t-test)
有意差なし Vehicle vs. CR845 処置群 (Dunnett test)

2.6.2.5 薬力学的薬物相互作用試験

該当なし。

2.6.2.6 考察及び結論

血液透析を受けている慢性腎障害患者における掻痒症の病因は完全には理解されていないが、炎症及びμオピオイド受容体（MOR）活性の増加とκオピオイド受容体（KOR）のダウンレギュレーションを伴うMORとKORの生理学的バランスの乱れにより掻痒を誘発すると考えられている[1,2,3,4]。

オピオイド受容体は、動物やヒトにおける掻痒、炎症及び疼痛のシグナル調節に関与し、KORの活性化により抗掻痒作用[2,5,6]、免疫調節作用[7]及び抗侵害作用[8]を発現する。KORは、中枢及び末梢の神経並びに非神経細胞（例えば、T 細胞、肥満細胞、好中球、好酸球、ケラチノサイト）の両方に発現している[9]。

痒みの経路は、痒み誘発物質により感覚神経線維が活性化され、KORが多く発現している後根神経節の細胞体にシグナルが伝達される。痒みシグナルはその後、脊髄視床路を経て複数の脳領域に上行し、感覚処理に関与し、認知及び情動的-動機づけシステムとの相互作用をもたらす。末梢神経のC線維上のKORの活性化は、末梢神経の直接的な痒みシグナルを抑制し、加えて、痒み誘発物質に対するC線維の反応も調節すると考えられている[10]。これらのことから、外因性オピオイドアゴニストにより末梢神経のKORを活性化させることだけで、中枢神経系の直接的な抑制なしに、痒みシグナルを調節することができる[6,9]。中枢神経系におけるKORの活

---

1 Kimmel M, Alscher DM, Dunst R, Braun N, Machleidt C, Kiefer T, et al. The role of micro-inflammation in the pathogenesis of uraemic pruritus in haemodialysis patients. Nephrol Dial Transplant 2006;21(3):749-55.［資料 4.3-3］

2 Phan NQ, Lotts T, Antal A, Bernhard JD, Stander S. Systemic Kappa Opioid Receptor Agonists in the Treatment of Chronic Pruritus: A Literature Review. Acta Derm Venereol. 2012;92:555–560.［資料 4.3-4］

3 Patel TS, Freedman BI, Yosipovitch G. An update on pruritus associated with CKD. Am J Kidney Dis. 2007;50(1):11-20.［資料 4.3-5］

4 Wieczorek A, Krajewski P, Kozioł-Gałczyńska M, Szepietowski JC. Opioid receptors expression in the skin of haemodialysis patients suffering from uraemic pruritus. J Eur Acad Dermatol Venereol. 2020;34(10):2368-72.［資料 4.3-6］

5 Bigliardi PL, Bigliardi-Qi M. Peripheral Opioids. In: Carstens E, Akiyama T, editors. Itch: Mechanisms and Treatment. Chapter 18. Boca Raton (Fl): CRC Press/Taylor & Francis; 2014.［資料 4.3-7］

6 Cowan A, Kehner GB, Inan S. Targeting Itch with Ligands Selective for κ Opioid Receptors. Handb Exp Pharmacol. 2015;226:291-314.［資料 4.3-8］

7 Liang X, Liu R, Chen C, Ji F, Li T. Opioid System Modulates the Immune Function: A Review. Transl Perioper Pain Med. 2016;1(1):5-13.［資料 4.3-9］

8 Beck TC, Hapstack MA, Beck KR, Dix TA. Therapeutic Potential of Kappa Opioid Agonists. Pharmaceuticals (Basel). 2019;12(2):95.［資料 4.3-10］

9 Snyder LM, Chiang MC, Loeza-Alcocer E, Omori Y, Hachisuka J, Sheahan TD, et al. Kappa Opioid Receptor Distribution and Function in Primary Afferents. Neuron. 2018;99(6):1274-88.［資料 4.3-11］

10 Inan S, Dun NJ, Cowan A. Nalfurafine prevents 5'-guanidinonaltrindole- and compound 48/80-induced spinal c-fos expression and attenuates 5'-guanidinonaltrindole-elicited scratching behavior in mice. Neuroscience. 2009;163(1):23-33.［資料 4.3-12］

性化は、投与量の制限につながる嫌悪感及び幻覚を生じやすい[1,2,3,4]。したがって、ジフェリケファリンは、これらの副作用を低減させることを目的に、末梢神経の KOR を標的として開発された[5,6,7]。

ジフェリケファリンは、低分子合成ペプチドであり、受動拡散及び能動輸送のいずれにおいても膜透過性が低く、脳への透過は制限されている。一連の排出及び取り込みトランスポーターの検討から、ジフェリケファリンは、血液脳関門（BBB）内で発現している多くのトランスポーターに対して基質及び阻害剤にならないことが確認されている。また、定量的及び定性的全身オートラジオグラフィー及び組織分布試験において、ジフェリケファリンを 1 mg/kg の用量で静脈内投与したラット及びサルでは、ジフェリケファリンは脳には検出されない、又はほとんど分布しないことが示されている。この 1 mg/kg の用量での曝露量（C_{max}）は、予定臨床用量である 0.5 µg/kg のヒトの C_{max} のそれぞれ 600 倍以上及び 1100 倍以上に相当する（2.6.4 参照）。したがって、ジフェリケファリンの主要な作用点は脳領域ではなく、末梢の感覚神経及び免疫細胞に発現する KOR と考えられる。

in vitro 及び *in vivo* の効力を裏付ける試験及び副次的薬理試験では、痒み、炎症及び痛みに対するジフェリケファリンの効果だけでなく、末梢神経の KOR の関与についても確認した。

in vitro 試験では、ジフェリケファリンは KOR に選択的で強力なフルアゴニストであり（2.6.2.2.1.2 参照）、ヒト KOR に対する高い結合親和性（Ki = 0.32 nmol/L）を示した（2.6.2.2.1.1 参照）。また、ジフェリケファリンの 10 µmol/L（6800 ng/mL）では、KOR 以外の受容体、トランスポーター及びイオンチャネルへのリガンド結合並びに酵素活性に対して 30%以上の阻害を示さなかった（2.6.2.2.1.4 参照）。ジフェリケファリンの 10 µmol/L は、予定臨床用量である 0.5 µg/kg を投与したときの C_{max} の 1000 倍を超える濃度であることから、ジフェリケファリンが生物学的に意義のあるオフターゲット活性を示す可能性は低いと考えられる。また、ジフェリケファリンがオピオイド鎮痛薬の主要な標的である MOR への結合又は機能的活性を持たないことから、呼吸抑制、依存、多幸感などの MOR に関連した副作用は生じないと考えられる。

---

1 Pfeiffer A, Brantl V, Herz A, Emrich HM. Psychotomimemsis mediated by kappa opiate receptors. Science. 1986; 233(4765): 774-776.［資料 4.3-13］

2 Reece PA, Sedman AJ, Rose S, Wright DS, Dawkins R, Rajagopalan R. Diuretic effects, pharmacokinetics, and safety of a new centrally acting kappa-opioid agonist (CI-977) in humans. J Clin Pharmacol. 1994;34(11):1126-32.［資料 4.3-14］

3 Pande AC, Pyke RE, Greiner M, Wideman GL, Benjamin R, Pierce MW. Analgesic efficacy of enadoline versus placebo or morphine in postsurgical pain. Clin Neuropharmacol. 1996;19(5):451-6.［資料 4.3-15］

4 Walsh SL, Strain EC, Abreu ME, Bigelow GE. Enadoline, a selective kappa opioid agonist: comparison with butorphanol and hydromorphone in humans. Psychopharmacology. 2001;157(2):151-162.［資料 4.3-16］

5 Delgado-Aros S, Chial HJ, Camilleri M, Szarka LA, Wever FT, Jacob J, et al. Effects of a kappa-opioid agonist, asimadoline, on satiation and GI motor and sensory functions in humans. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2003;284(4):G558-66.［資料 4.3-17］

6 Delvaux M, Beck A, Jacob J, Bouzamondo H, Weber FT, Frexinos J. Effect of asimadoline, a kappa opioid agonist, on pain induced by colonic distension in patients with irritable bowel syndrome. Aliment Pharmacol Ther. 2004;20(2):237-46.［資料 4.3-18］

7 Mangel AW, Bornstein JD, Hamm LR, Buda J, Wang J, Irish W, et al. Clinical trial: asimadoline in the treatment of patients with irritable bowel syndrome. Aliment Pharmacol Ther. 2008;28(2):239-49.［資料 4.3-19］

in vivo 試験では、ジフェリケファリンの抗掻痒作用は、ヒスタミン、サブスタンス P、compound 48/80 及び 5'-Guanidinonaltrindole（GNTI）[1,2]によって痒みが誘発されるマウスの掻痒モデルにおいて検討した。ジフェリケファリンは、ヒスタミン、サブスタンス P、compound 48/80 及び GNTI により誘発された痒みに対して、抗掻痒作用を示し、ED_{50} は、それぞれ 0.018、0.32、0.077 及び 0.053 mg/kg であった（2.6.2.2.2.1.1、2.6.2.2.2.1.2、2.6.2.2.2.1.5 参照）。また、サブスタンス P 誘発掻痒モデルにおける抗掻痒作用は、少なくとも 12 時間持続し（2.6.2.2.2.1.3 参照）、選択的 κ オピオイド受容体拮抗薬であるノルビナルトルフィミン（nor-BNI）により拮抗された（2.6.2.2.2.1.4 参照）。ジフェリケファリンの長い作用持続時間は、KOR に対して 92 分と推定される長い結合半減期（$t_{1/2}$）に起因する可能性が考えられる（2.6.2.2.1.3 参照）。また、マウスを用いた安全性薬理試験においてジフェリケファリンにより活動性の低下が確認されているが、痒みを有意に減少させる ED_{50} は、自発運動量及び運動機能を低下させる ED_{50} よりも約 1.5～40 倍低かった（2.6.2.4.1.2、2.6.2.4.1.3 参照）。したがって、掻痒モデルで確認された引っ掻き行動の減少は、活動性の低下によるものではないと考えられる。これらのことから、マウスの掻痒モデルを用いた試験により、ジフェリケファリンは抗掻痒作用を示し、その抗掻痒作用は KOR を介することが裏付けられた。

ジフェリケファリンは、*in vitro* 試験において、2 nmol/L 以上の濃度で、LPS 及び IFNγ により刺激したヒト単球由来マクロファージによるサイトカイン放出を低下させた（2.6.2.2.1.5 参照）。*in vivo* 試験においても、マウスの LPS モデル（2.6.2.2.2.2.1 参照）及びラットのカラゲニン誘発足浮腫モデル（2.6.2.2.2.2.2 参照）において、それぞれ LPS によって誘発された炎症誘発性サイトカインの放出を抑制し、カラゲニンによる足浮腫を減少させ、用量依存的な抗炎症作用を示した。そのジフェリケファリンの効果は、それぞれステロイドのプレドニゾロン又は NSAID のイブプロフェンと同様であった。また、マクロファージによるサイトカイン放出に対するジフェリケファリンの抑制作用は、nor-BNI によって減弱した（2.6.2.2.1.5 参照）。これらのことから、炎症モデルを用いた試験により、ジフェリケファリンは抗炎症作用を示し、その抗炎症作用は、免疫細胞（マクロファージ）に局在する KOR の活性化を介していることが示唆された。血液透析を受けている慢性腎障害患者における掻痒症は、炎症成分を含むことから、ジフェリケファリンの抗炎症作用も抗掻痒作用に関連していると考えられる。

さらに、ジフェリケファリンは、各種疼痛モデル（侵害受容性疼痛として酢酸ライジング及び慢性膵炎モデル、神経因性疼痛として SNL モデル、急性及び慢性炎症疼痛としてカラゲニン誘発痛覚過敏モデル及び完全フロインドアジュバント誘発炎症性疼痛モデル）において鎮痛作用を示した（2.6.2.3.1.1.1、2.6.2.3.1.1.3、2.6.2.3.1.2.1、2.6.2.3.1.3.1、2.6.2.3.1.3.2 参照）。また、ラットの SNL モデルにおいて、nor-BNI の足蹠皮下投与により、ジフェリケファリンの鎮痛作用は阻害された（2.6.2.3.1.2.2 参照）。また、ラットの DBTC 誘発膵炎モデルにおいて、nor-BNI

[1] Jones RM and Portoghese PS. 5'-Guanidinonaltrindole, a highly selective and potent Kappa-opioid receptor antagonist. Eur J Pharm. 2000;396(1):49-52.［資料 4.3-20］

[2] Kuraishi Y, Nagasawa T, Hayashi K, Satoh M. Scratching behavior induced by pruritogenic but not algesiogenic agents in mice. Eur J Pharm. 1995;275(3):229-33.［資料 4.3-21］

又は末梢性のオピオイド受容体拮抗薬であるナロキソンメチオジドの腹腔内投与により、ジフェリケファリンの鎮痛作用は阻害された（2.6.2.3.1.1.4 参照）。これらの結果は、ジフェリケファリンの作用が末梢の KOR を介することを裏付けるものである。

オピオイドの反復投与は、しばしば期待する効果に対して耐性を引き起こし、その結果、時間の経過とともに有効性が低下する。ラットの SNL モデルにおけるジフェリケファリンの 7 日間反復静脈内投与の結果は、ジフェリケファリンの反復投与により鎮痛作用はわずかに低下するのみであったことから、耐性を引き起こしにくいことが示唆された（2.6.2.3.1.2.3 参照）。

中枢神経系の試験では、ジフェリケファリンの静脈内投与により、0.3 mg/kg 以上でマウスの自発運動量の低下（2.6.2.4.1.2 参照）、1 及び 3 mg/kg 以上でマウス及びラットの運動協調性への影響（2.6.2.4.1.3、2.6.2.4.1.4 参照）、0.3 mg/kg 以上でマウスのペントバルビタール誘発睡眠時間の延長（2.6.2.4.1.5 参照）、0.1 mg/kg 以上でラットの睡眠-覚醒周期の変化（2.6.2.4.1.6 参照）が認められ、げっ歯類においては、自発運動及び運動協調性への影響が特徴であることが示された。ラットを用いた機能観察総合評価試験において、ジフェリケファリン 1～25 mg/kg の静脈内投与後 2 時間では、すべての機能評価（中枢神経活動性及び覚醒、自律神経系機能、感覚運動機能及び神経筋機能）において活動性の低下による影響が認められた。また、覚醒低下、歩行障害、外観の変化、姿勢の変化、直腸温の低下及び排尿の増加なども認められた。これらの作用は用量依存性を示さず、一過性であり、投与後 24 時間には概ね消失し、48 時間には回復した（2.6.2.4.1.1 参照）。ラットで影響が認められた 0.1～1 mg/kg の用量を静脈内投与したときの C_{max} は、予定臨床用量である 0.5 μg/kg 投与時の C_{max} の約 60～600 倍に相当する。

行動の変化全般と水利尿作用として知られる排尿の増加は、KOR の活性化によることが報告されており [1]、ジフェリケファリンの選択性と効力に基づく過剰な薬力学的活性に起因する可能性が考えられる。また、ラット及びサルにそれぞれ 0.25～25 mg/kg/day 及び 0.06～4mg/kg/day を静脈内投与した反復毒性試験においても、同様の一過性の行動変化が認められている（2.6.6.3 参照）。これらのジフェリケファリンの曝露量で観察された臨床症状に対する機序の可能性として、中枢神経系への作用を完全に否定することはできないが、ジフェリケファリンは、受動拡散や能動輸送のいずれにおいても膜透過性は低く、脳への透過は制限されていること、ラット及びサルを用いた定量的及び定性的全身オートラジオグラフィー及び組織分布試験から、ジフェリケファリン 1 mg/kg の静脈内投与では、ジフェリケファリンは、脳には検出されないか、又はほとんど分布しないことが示されていることから（2.6.4.4 参照）、ジフェリケファリンの主要な作用点は、末梢の感覚神経及び免疫細胞に発現する KOR と考えられる。そのため、げっ歯類及びサルを用いた安全性薬理試験及び一般毒性試験で観察された行動変化全般は、脳に局在する KOR の直接的な活性化よりも、末梢に局在する KOR の一次的活性化を介し、二次的な変化を生じさせている可能性が考えられる。KOR を介した作用としては水利尿が考えられ、実際、安全性薬理試験では定量的には測定されていないが、ジフェリケファリン投与後にラットで排尿増加が認められている。κ オピオイドは、ラットの腎臓で同定された κ オピオイド結合

[1] Dykstra LA, Gmerek DE, Winger G, Woods JH. k-opioids in rhesus monkeys. I. Diuresis, sedation, analgesia and discriminative stimulus effects. J Pharmacol Exp Ther 1987; 242: 413-20.［資料 4.3-22］

部位に直接的に作用し、バソプレシン非依存的に排尿を増加することが示唆されており[1]、またラットの摘出灌流腎においてKORアゴニストの曝露により、用量依存的な水利尿反応が報告されている[2]。したがって、KORを介した水利尿は、末梢性の作用であると考えられる。反復毒性試験において確認されたジフェリケファリン投与後の一過性の脱水と思われる徴候（血液濃縮、皮膚弾力の減少）は末梢性のKORに起因した水利尿と考えられ、水利尿は、非臨床試験で認められた中枢神経系様作用の因子となる可能性が考えられる。

動物実験と同様に、ジフェリケファリンを投与された慢性腎障害患者に中枢神経様作用が報告されているが、全体として、これらの事象のほとんどは、軽度又は中等度であり、低い発現頻度である。また、ほとんどの中枢作用性KORアゴニストに関連する典型的な副作用は、嫌悪感及び幻覚であり[3,4]、これらの副作用により中枢作用性KORアゴニストは開発を中止する結果となっているが、ジフェリケファリンを用いた臨床試験においては、嫌悪感は認められず、幻覚が認められたのは1例（0.2%）のみであった。

心血管系の試験では、覚醒下サルへのジフェリケファリン 0.25～4 mg/kg の漸増した静脈内投与により、血圧パラメータが低下した。低用量の0.25 mg/kgでは、収縮期、拡張期及び平均血圧は、最大で43%低下し、投与後18～20時間持続した。心拍数は、投与後15分間に約30～50 bpm増加した後、用量に依存しない減少がみられ、3～24時間持続した。高用量の4 mg/kgでは、収縮期、拡張期及び平均血圧は、最大で22%低下し、4～7時間持続した（2.6.2.4.2.2参照）。血圧低下の原因は不明である。試験の結果から、サルにおける血圧に対する最小毒性用量は0.25 mg/kg以下であり、この用量でのC_{max}は、予定臨床用量におけるC_{max}の約300倍に相当する。心電図は、QT又はQTc間隔を含むECGパラメータに影響は認められなかった。hERGチャネル発現細胞におけるカリウム電流（hERG電流）では、1000 µmol/L（680 µg/mL）の濃度で7.2%の抑制が認められた（2.6.2.4.2.1参照）。また、サルにジフェリケファリンを1 mg/kg/dayまでの用量で39週間投与したところ、心電図所見は認められなかった（2.6.6.3.8参照）。サルへの4 mg/kg投与時のC_{max}及びhERG電流を抑制する1000 µmol/Lの濃度は、予定臨床用量である0.5 µg/kg投与時のC_{max}のそれぞれ約5000倍及び約158,000倍に相当し、はるかに高かった。以上の心血管系に対する*in vitro*及び*in vivo*評価の結果から、ジフェリケファリンは心血管系機能に影響を及ぼす可能性は低いと考えられる。

呼吸系の試験では、ラットへのジフェリケファリン 1～25 mg/kg の静脈内投与により、呼吸数の減少及び1回換気量の軽微な増加が認められたが、分時換気量では変化が認められなかった（2.6.2.4.3.1参照）。呼吸数の減少は1回換気量の増加により代償することが可能であると考えられた。この所見は、ジフェリケファリンの受容体選択性を考慮すると、オピオイド受容体

[1] Slizgi GR, Ludens JH. Displacement of 3H-EKC binding by opioids in rat kidney: a correlate to diuretic activity. Life Sci. 1985;36(23):2189-93.［資料 4.3-23］
[2] Salas SP, Roblero J, Ureta H, Huidobro-Toro JP. Diuretic effect of bremazocine, a kappa-opioid with central and peripheral sites of action. J Pharmacol Exp Ther. 1989;250(3):992-9.［資料 4.3-24］
[3] Pfeiffer A, Brantl V, Herz A, Emrich HM. Psychotomimemsis mediated by kappa opiate receptors. Science. 1986; 233(4765): 774-776.［資料 4.3-13］
[4] Walsh SL, Strain EC, Abreu ME, Bigelow GE. Enadoline, a selective kappa opioid agonist: comparison with butorphanol and hydromorphone in humans. Psychopharmacology. 2001;157(2):151-162.［資料 4.3-16］

又は他の受容体での薬理作用よりも、活動性の低下による間接的な作用によるものと考えられる。ラットに 25 mg/kg を静脈内投与したときの C_{max} は、予定臨床用量である 0.5 μg/kg 投与時の C_{max} の約 11000 倍に相当する。

胃腸管系の試験では、正常ラットにおいて、ジフェリケファリンの静脈内投与により、腸管輸送能に対して 1 mg/kg 以上でわずかな影響が認められた（2.6.2.4.4.1 参照）。術後イレウスモデルにおいては、腸管輸送能又は胃排出能に対して影響は認められなかった（2.6.2.4.4.2 参照）。正常ラットに投与された 1 mg/kg の C_{max} は、予定臨床用量である 0.5 μg/kg 投与時の C_{max} の約 600 倍以上の曝露量である。これらの結果から、血液透析を受けている慢性腎障害患者における掻痒症において、予定臨床用量のジフェリケファリンにより便秘を誘発する、又は術後のイレウスを悪化させる可能性は低いと考えられる。

以上より、ジフェリケファリンは KOR に選択的で強力なフルアゴニストであり、効力を裏付ける試験から、血液透析を受けている慢性腎障害患者における中等度から重度の掻痒症（尿毒症性掻痒症）に対する抗掻痒作用が期待できる。安全性薬理試験の結果から、中枢神経系に対しては、予定臨床用量の 0.5 μg/kg の C_{max} よりもはるかに高い用量（約 60～600 倍）で活動性の低下を主とする影響が認められている。これら中枢神経系の影響の中には、臨床試験で報告されているものもあるが、それらの事象の発現率は低い。また、心血管系、呼吸系及び胃腸管系に対する懸念すべき薬理作用が生じる可能性は低いと考えられる。

2.6.2.7 図表

図表は、本文中に記載した。

目次

略号一覧 2
2. CTD の概要 3
2.6 非臨床試験の概要文及び概要表 3
2.6.3 薬理試験の概要表 3
2.6.3.1 薬理試験：一覧表 3
2.6.3.2 効力を裏付ける試験 6
2.6.3.3 副次的薬理試験 9
2.6.3.4 安全性薬理試験 11

略号一覧

略号	説明
bpm	beat per minute：1 分間の拍動回数
CHO	chinese hamster ovary：チャイニーズハムスターの卵巣
DBTC	dibutyltin dichloride：ジブチルスズジクロライド
EC_{50}	50％ effective concentration：50%効果濃度
ECG	electrocardiogram：心電図
ED_{50}	50％ effective dose：50%有効用量、50%阻害用量、50%抑制用量
FOB	functional observational battery：機能観察総合評価
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
GNTI	5’-guanidinonaltrindole：5’-グアニジノナルトリンドール
HEK	human embryonic kidney：ヒト胎児腎
hERG	human ether-à-go-go-related gene：ヒト ether-à-go-go 関連遺伝子
5-HT	5-hydroxytryptamine (serotonin)：5-ヒドロキシトリプタミン（セロトニン）
IC_{50}	50％ inhibition concentration：50%阻害濃度
IL	interleukin：インターロイキン
Ki	inhibition constant：阻害定数
LPS	lipopolysaccharide：リポ多糖類
MIP	macrophage inflammatory protein：マクロファージ炎症性タンパク質
NM	naloxone methiodide：ナロキソンメチオジド
Nor-BNI	nor-binaltorphimine：ノルビナルトルフィミン
TNF	tumor necrosis factor：腫瘍壊死因子

2. CTD の概要

2.6 非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.3 薬理試験の概要表

2.6.3.1 薬理試験：一覧表

被験物質：ジフェリケファリン

試験の種類	試験系	投与方法	試験施設	報告書番号	記載番号
効力を裏付ける試験					
ヒトオピオイド受容体選択性	ヒト受容体	*in vitro*	[redacted] France	CR845-PHARM003	4.2.1.1-1
ヒト κ オピオイド受容体選択性及び親和性	ヒト受容体	*in vitro*	[redacted]	CR845-PHARM004	4.2.1.1-2
オピオイド受容体機能活性	マウス R1G1 細胞及びヒト受容体を発現させた HEK293 細胞	*in vitro*	[redacted] US	CR845-PHARM001	4.2.1.1-3
バインディングキネティクス	ヒト受容体	*in vitro*	[redacted] US	CR845-PHARM064	4.2.1.1-4
バインディングアッセイ	マウス、ラット及びヒトの受容体、イオンチャネル、トランスポーター	*in vitro*	[redacted] France	CR845-PHARM003	4.2.1.1-1
バインディングアッセイ及び酵素アッセイ	マウス、ラット、ヘビ及びヒトの受容体、イオンチャネル、酵素	*in vitro*	[redacted]	CR845-PHARM004	4.2.1.1-2
バインディングアッセイ	ヒト受容体	*in vitro*	[redacted]	CR845-PHARM071	4.2.1.1-5
バインディングアッセイ	ラット及びヒトの受容体、イオンチャネル、トランスポーター	*in vitro*	[redacted] France	CR845-PHARM091	4.2.1.1-6
バインディングアッセイ	ラット及びヒトの受容体、イオンチャネル、トランスポーター	*in vitro*	[redacted]	CR845-PHARM092	4.2.1.1-7
ヒト単球由来マクロファージにおけるサイトカイン放出に対する抑制作用	ヒト単球由来マクロファージ	*in vitro*	[redacted] UK	CR845-PHARM066	4.2.1.1-8

2.6.3.1 薬理試験：一覧表（続き）

被験物質：ジフェリケファリン

試験の種類	試験系	投与方法	試験施設	報告書番号	記載番号
ヒスタミン誘発掻痒モデルに対する抗掻痒作用	マウス	静脈内	[redacted]	360025	4.2.1.1-9
サブスタンス P 誘発掻痒モデルに対する抗掻痒作用	マウス	静脈内	[redacted]	360026	4.2.1.1-10
サブスタンス P 誘発掻痒モデルにおける作用持続時間	マウス	静脈内	丸石製薬株式会社 中央研究所	MR13A9-[redacted]P03	4.2.1.1-11
サブスタンス P 誘発掻痒モデルを用いたκオピオイド受容体拮抗薬の拮抗作用	マウス	静脈内	丸石製薬株式会社 中央研究所	MR13A9-[redacted]P02	4.2.1.1-12
Compound 48/80 誘発掻痒モデル及び GNTI 誘発掻痒モデルに対する抗掻痒作用	マウス	静脈内	[redacted]US	CR845-PHARM013	4.2.1.1-13
LPS 誘発サイトカイン放出モデルに対する抗炎症作用	マウス	皮下	[redacted]US	CR845-PHARM062	4.2.1.1-14
カラゲニン誘発足浮腫モデルに対する抗炎症作用	ラット	静脈内	[redacted]US	CR845-PHARM067	4.2.1.1-15
副次的薬理試験					
酢酸ライジング試験	マウス	静脈内	[redacted]US	CR845-PHARM007	4.2.1.2-1
酢酸ライジング試験における作用持続時間	マウス	静脈内	[redacted]US	CR845-PHARM008	4.2.1.2-2
DBTC 誘発膵炎モデルに対する抗侵害作用	ラット	腹腔内	[redacted]US	CR845-PHARM009	4.2.1.2-3
DBTC 誘発膵炎モデルを用いたオピオイド受容体拮抗薬の拮抗作用	ラット	腹腔内	[redacted]US	CR845-PHARM010	4.2.1.2-4
神経因性疼痛モデルに対する鎮痛作用	ラット	静脈内	[redacted]US	CR845-PHARM063	4.2.1.2-5
神経因性疼痛モデルを用いた κ オピオイド受容体拮抗薬の拮抗作用	ラット	静脈内	[redacted]US	CR845-PHARM063	4.2.1.2-5
神経因性疼痛モデルを用いた 7 日間反復投与による鎮痛作用	ラット	静脈内	[redacted]US	CR845-PHARM063	4.2.1.2-5
カラゲニン誘発痛覚過敏モデルに対する鎮痛作用	ラット	静脈内	[redacted]US	CR845-PHARM067	4.2.1.1-15

2.6.3.1 薬理試験：一覧表（続き）

被験物質：ジフェリケファリン

試験の種類	試験系	投与方法	試験施設	報告書番号	記載番号
完全フロインドアジュバンドモデルに対する鎮痛作用	ラット	静脈内	[redacted] US	CR845-PHARM012	4.2.1.2-6
安全性薬理試験					
中枢神経系 機能観察総合評価法（FOB 法）	ラット	静脈内	[redacted] US	CR845-SP055	4.2.1.3-1
中枢神経系 自発運動量試験	マウス	静脈内	[redacted]	[redacted]-129	4.2.1.3-2
中枢神経系 ロータロッド試験	マウス	静脈内	[redacted]	[redacted]-130	4.2.1.3-3
中枢神経系 ロータロッド試験	ラット	静脈内	[redacted] US	CR845-SP034	4.2.1.3-4
中枢神経系 睡眠増強試験	マウス	静脈内	[redacted]	[redacted]-131	4.2.1.3-5
中枢神経系 脳波測定試験	ラット	静脈内	[redacted]	9718	4.2.1.3-6
心血管系 hERG 試験	hERG チャネルを発現させた HEK293 細胞	*in vitro*	[redacted] US	CR845-SP037	4.2.1.3-7
心血管系 覚醒下テレメトリー	サル	静脈内	[redacted] US	CR845-SP039	4.2.1.3-8
呼吸系 プレチスモグラフ法	ラット	静脈内	[redacted] US	CR845-SP040	4.2.1.3-9
胃腸器系 腸管輸送能/胃排出能	ラット	静脈内	[redacted] US	CR845-SP041	4.2.1.3-10
胃腸管系 術後イレウスモデルに対する腸管輸送能/胃排出能	ラット	静脈内	[redacted] US	CR845-PHARM015	4.2.1.3-11
薬力学的薬物相互作用試験					
該当資料なし					

2.6.3.2 効力を裏付ける試験

被験物質：ジフェリケファリン

試験の種類	動物種/系統	投与方法	濃度又は用量	性別及び動物数/群	特記すべき所見	試験番号
ヒトオピオイド受容体選択性	ヒト受容体	*in vitro*	10 µmol/L	—	ジフェリケファリン 10 µmol/L のヒト µ 及び δ オピオイド受容体におけるリガンド結合に対する阻害率は、それぞれ 14 及び<10%であった。	CR845-PHARM003
ヒトκオピオイド受容体選択性及び親和性	ヒト受容体	*in vitro*	10 µmol/L	—	ジフェリケファリン 10 µmol/L のヒト κ オピオイド受容体におけるリガンド結合に対する阻害率は、95%であった。また、ジフェリケファリンのヒト κ オピオイド受容体へのリガンド結合に対する Ki は、0.32 nmol/L であった。 ジフェリケファリンは、ヒト κ オピオイド受容体に選択的で高い親和性を示した。	CR845-PHARM004
オピオイド受容体機能活性	マウス R1G1 細胞及びヒト受容体発現 HEK293 細胞	*in vitro*	R1G1 細胞 様々な濃度 HEK293 細胞 10 pmol/L～1 mol/L	R1G1 細胞 12,000 cells/well HEK293 細胞 4-5 x 10^4 cells/well	マウス κ オピオイド受容体に対するジフェリケファリンの% Efficacy は 96%、EC_{50} は 0.048 nmoL/L であった。また、ヒトκオピオイド受容体に対するジフェリケファリンの% Efficacy は 99%、EC_{50} は 0.16 nmoL/L であり、µ 及び δ オピオイド受容体に対しては 10000 nmoL/L までアゴニスト活性を示さなかった。 ジフェリケファリンは、κオピオイド受容体に特異的な作用をもつフルアゴニストであることが示された。	CR845-PHARM001
バインディングキネティクス	ヒト受容体	*in vitro*	1 nmol/L	—	CHO 細胞膜に発現させたヒトκオピオイド受容体に対する、ジフェリケファリンの薬物-受容体間の結合速度定数、解離速度定数、解離定数及び半減期はそれぞれ、5.4×10^7/min･moL/L、0.0075/min、0.14 nmoL/L 及び 92 分であった。 ジフェリケファリンはヒト κ オピオイド受容体に対して遅い解離速度で高い結合親和性を示した。	CR845-PHARM064
バインディングアッセイ	マウス、ラット及びヒトの受容体、イオンチャネル、トランスポーター	*in vitro*	10 µmol/L	—	ジフェリケファリンは 10 µmoL/L の濃度において、受容体（κ オピオイド受容体を除く）、イオンチャネル及びトランスポーターへのリガンド結合に対して 30%以上の阻害作用を示さなかった。	CR845-PHARM003

2.6.3.2 効力を裏付ける試験（続き）

被験物質：ジフェリケファリン

試験の種類	動物種/系統	投与方法	濃度又は用量	性別及び動物数/群	特記すべき所見	試験番号
バインディングアッセイ及び酵素アッセイ	マウス、ラット、ヘビ及びヒトの受容体、イオンチャネル、酵素	*in vitro*	10 µmol/L	—	ジフェリケファリンは 10 µmoL/L の濃度において、受容体（κ オピオイド受容体を除く）及びイオンチャネルへのリガンド結合並びに酵素活性に対して 30%以上の阻害作用を示さなかった。	CR845-PHARM004
バインディングアッセイ	ヒト受容体	*in vitro*	10 µmol/L	—	ジフェリケファリンは 10 µmoL/L の濃度において、5-HT_{2B} 受容体へのリガンド結合に対して阻害作用を示さなかった。	CR845-PHARM071
バインディングアッセイ	ラット及びヒトの受容体、イオンチャネル、トランスポーター	*in vitro*	10 µmol/L	—	ジフェリケファリンは 10 µmol/L の濃度において、受容体、イオンチャネル及びトランスポーターへのリガンド結合に対して阻害作用を示さなかった。	CR845-PHARM091
バインディングアッセイ	ラット及びヒトの受容体、イオンチャネル、トランスポーター	*in vitro*	10 µmol/L	—	ジフェリケファリンは 10 µmol/L の濃度において、受容体、イオンチャネル及びトランスポーターへのリガンド結合に対して 30%以上の阻害作用を示さなかった。	CR845-PHARM092
ヒト単球由来マクロファージにおけるサイトカイン放出に対する抑制作用	ヒト単球由来マクロファージ	*in vitro*	2 10 50 nmol/L nor-BNI 10 nmol/L	2×10^5 cells/mL/well	ジフェリケファリンは 2 nmol/L 以上でサイトカインの放出を抑制した。また、ジフェリケファリンによるサイトカイン放出の抑制は、選択的 κ オピオイド受容体拮抗薬であるノルビナルトルフィミン（nor-BNI）により阻害された。 ジフェリケファリンの抗炎症作用は、免疫細胞上の κ オピオイド受容体の活性を介することが示唆された。	CR845-PHARM066
ヒスタミン誘発掻痒モデルに対する抗掻痒作用	マウス/ICR	静脈内	0.03 0.1 0.3 1 mg/kg	雄 10/群	ジフェリケファリンはヒスタミンにより誘発させた引っ掻き行動を、0.03 mg/kg 以上の用量で抑制し、ED_{50} は 0.018 mg/kg であった。 ジフェリケファリンの抗掻痒作用が示された。	360025

2.6.3.2 効力を裏付ける試験（続き）

被験物質：ジフェリケファリン

試験の種類	動物種/系統	投与方法	濃度又は用量	性別及び動物数/群	特記すべき所見	試験番号
サブスタンス P 誘発掻痒モデルに対する抗掻痒作用	マウス/ICR	静脈内	0.03 0.1 0.3 1 mg/kg	雄 10/群	ジフェリケファリンはサブスタンス P により誘発させた引っ掻き行動を、0.3 mg/kg 以上の用量で抑制し、ED_{50} は 0.32 mg/kg であった。 ジフェリケファリンの抗掻痒作用が示された。	360026
サブスタンス P 誘発掻痒モデルにおける作用持続時間	マウス/ICR	静脈内	0.3 mg/kg	雄 10/群	ジフェリケファリンの抗掻痒作用は、0.3 mg/kg の用量において、少なくとも投与後 12 時間以上持続することが示された。	MR13A9-[redacted]P03
サブスタンス P 誘発掻痒モデルを用いたκオピオイド受容体拮抗薬の拮抗作用	マウス/ICR	静脈内 皮下	0.3 mg/kg nor-BNI 3 10 30 mg/kg	雄 10/群	ジフェリケファリンの抗掻痒作用は、選択的 κ オピオイド受容体拮抗薬である nor-BNI により用量依存的に抑制され、30 mg/kg で有意に抑制された。 ジフェリケファリンの抗掻痒作用は、κオピオイド受容体を介することが示された。	MR13A9-[redacted]P02
Compound 48/80 誘発掻痒モデル及び GNTI 誘発掻痒モデルに対する抗掻痒作用	マウス /Swiss Webster	静脈内	0.01 0.03 0.1 0.3 mg/kg	雄 10-11/群	ジフェリケファリンは Compound 48/80 及び 5'-Guanidinonaltrindole（GNTI）により誘発させた引っ掻き行動を、それぞれ 0.1 mg/kg 以上の用量で抑制し、ED_{50} はそれぞれ 0.077 mg/kg 及び 0.053 mg/kg であった。 ジフェリケファリンの抗掻痒作用が示された。	CR845-PHARM013
LPS 誘発サイトカイン放出モデルに対する抗炎症作用	マウス /Balb/c	皮下	1 3 10 mg/kg	雌 8/群	ジフェリケファリンは LPS により誘発させた TNFα の放出を用量依存的に減少させ、10 mg/kg においては TNFα の放出を 47%減少させた。また、ジフェリケファリン 10 mg/kg において IL-1β、IL-2、MIP-1β 及び IL-12（p40/p70）の放出も減少させた。 ジフェリケファリンの抗炎症作用が示された。	CR845-PHARM062
カラゲニン誘発足浮腫モデルに対する抗炎症作用	ラット/SD	静脈内	0.1 0.3 1 mg/kg	雄 6/群	ジフェリケファリンはカラゲニンによる足浮腫を 0.3 mg/kg 以上の用量で抑制した。 ジフェリケファリンの抗炎症作用が示された。	CR845-PHARM067

2.6.3.3 副次的薬理試験

被験物質：ジフェリケファリン

試験種	動物種/系統	投与方法	用量	性別及び動物数/群	特記すべき所見	試験番号
酢酸ライジング試験	マウス/ICR	静脈内	0.01 0.03 0.1 0.3 mg/kg	雄 8/群	ジフェリケファリンは酢酸によるライジング反応を 0.03 mg/kg 以上の用量で抑制し、ED_{50} は 0.07 mg/kg であった。	CR845-PHARM007
酢酸ライジング試験における作用持続時間	マウス/ICR	静脈内	0.3 mg/kg	雄 8/群	ジフェリケファリンは酢酸によるライジング反応を投与後 18 時間まで抑制した。ジフェリケファリンの鎮痛作用は長時間持続することが示された。	CR845-PHARM008
DBTC 誘発膵炎モデルに対する鎮痛作用	ラット/SD	腹腔内	0.1 0.3 1 mg/kg	雄 6-9/群	ジフェリケファリンはジブチルスズジクロライドにより誘発させた膵炎による痛覚過敏を 0.1 mg/kg 以上の用量で抑制し、ED_{50} は 0.03 mg/kg であった。	CR845-PHARM009
DBTC 誘発膵炎モデルを用いたオピオイド受容体拮抗薬の拮抗作用	ラット/SD	腹腔内	1 mg/kg nor-BNI 1 mg/kg NM 10 mg/kg	雄 6-9/群	ジブチルスズジクロライドにより誘発させた膵炎による痛覚過敏に対するジフェリケファリンの抑制作用は、選択的な κ オピオイド受容体拮抗薬のノルビナルトルフィミン（nor-BNI）及び非選択的な末梢性オピオイド受容体拮抗薬のナロキソンメチオジド（NM）によって拮抗された。 ジフェリケファリンの鎮痛作用は、末梢の κ オピオイド受容体を介することが示唆された。	CR845-PHARM010
神経因性疼痛モデルに対する鎮痛作用	ラット/SD	静脈内	0.1 0.3 1 mg/kg	雄 6/群	ジフェリケファリンは神経因性疼痛に対して 0.3 mg/kg 以上の用量で鎮痛作用を示し、その作用は 8 時間以上持続した。ED_{50} は 0.31 mg/kg であった。	CR845-PHARM063
神経因性疼痛モデルを用いた κ オピオイド受容体拮抗薬の拮抗作用	ラット/SD	静脈内 足蹠皮下	1 mg/kg nor-BNI 0.2 mg/kg	雄 6/群	神経因性疼痛に対するジフェリケファリンの鎮痛作用は、選択的な κ オピオイド受容体拮抗薬の nor-BNI により阻害された。 ジフェリケファリンは末梢の κ オピオイド受容体に作用し、神経因性疼痛を抑制することが示唆された。	CR845-PHARM063
神経因性疼痛モデルを用いた 7 日間反復投与による鎮痛作用	ラット/SD	静脈内	1 mg/kg	雄 6/群	神経因性疼痛に対するジフェリケファリン 1 mg/kg の 7 日間反復投与では、各投与日においてジフェリケファリンは鎮痛作用を示した。 ジフェリケファリンは、耐性を引き起こしにくいことが示唆された。	CR845-PHARM063

2.6.3.3 副次的薬理試験（続き）

被験物質：ジフェリケファリン

試験種	動物種/系統	投与方法	用量	性別及び動物数/群	特記すべき所見	試験番号
カラゲニン誘発痛覚過敏モデルに対する鎮痛作用	ラット/SD	静脈内	0.1 0.3 1 mg/kg	雄 8/群	ジフェリケファリンはカラゲニンによる痛覚過敏に対して 0.3 mg/kg 以上の用量で鎮痛作用を示し、その作用は少なくとも 3 時間持続した。 ED_{50} は 0.33 mg/kg であった。	CR845-PHARM067
完全フロインドアジュバンドモデルに対する鎮痛作用	ラット/SD	静脈内	0.03 0.1 0.3 1 mg/kg	雄 6-8/群	ジフェリケファリンは完全フロインドアジュバントによる炎症性疼痛に対して 0.1 mg/kg 以上の用量で鎮痛作用を示し、その作用は、90～120 分持続した。ED_{50} は 0.07 mg/kg であった。	CR845-PHARM012

2.6.3.4 安全性薬理試験

被験物質：ジフェリケファリン

試験種	動物種/系統	投与方法	濃度又は用量	性別及び動物数/群	特記すべき所見	GLP 適用	試験番号
中枢神経系 機能観察総合評価法 （FOB 法）	ラット/SD	静脈内	1 5 25 mg/kg	雌雄 10/群	すべての投与群において、投与後 2 時間に以下の所見が観察された。 ホームケージ観察及びオープンフィールド観察における活動性の低下、姿勢の変化（うずくまり、円背位、挙尾及び壁又は前肢に対する寄りかかり）及び探索的な立ち上がり行動の減少、眼瞼閉鎖状態、縮瞳、流涙及び排尿の増加、接近、触覚及び驚愕反応に対する応答の低下、テールフリック反応に対する反応潜時の延長、身体的緊張の低下、歩行障害、平面又は空中での正向反射の障害、直腸温低下 観察されたほとんどの所見が投与後 24 時間に正常に回復したが、いくつかの所見は、程度は減弱したが、投与後 24 時間まで持続した。なお、投与後 48 時間までには、正常に回復した。 観察された作用は、κ オピオイド受容体アゴニストの薬理学的反応と考えられた。	適	CR845-SP055
中枢神経系 自発運動量試験	マウス/ICR	静脈内	0.03 0.1 0.3 1 3 mg/kg	雄 8/群	ジフェリケファリンは、0.1 mg/kg まで自発運動量（投与後 60 分間）に対して影響を示さなかった。0.3 mg/kg 以上の用量では、用量依存的に自発運動量が減少し、ED_{50} は 0.47 mg/kg であった。	適	[redacted]-129
中枢神経系 ロータロッド試験	マウス/ICR	静脈内	0.1 0.3 1 3 10 mg/kg	雄 6/群	ジフェリケファリンは、0.3 mg/kg まで運動協調性に対して影響を示さなかった。1 mg/kg 以上の用量では、投与後少なくとも 1.5 時間は運動協調性に影響が認められた。投与後 0.5 及び 1 時間の ED_{50} は、それぞれ 0.63 mg/kg 及び 0.74 mg/kg であった。	適	[redacted]-130
中枢神経系 ロータロッド試験	ラット/SD	静脈内	0.3 1 3 10 30 mg/kg	雄 6/群	ジフェリケファリンは、1 mg/kg まで運動協調性に対して影響を示さなかった。3 mg/kg 以上の用量では、運動協調性に影響が認められた。	不適	CR845-SP034

2.6.3.4 安全性薬理試験（続き）

被験物質：ジフェリケファリン

試験種	動物種/系統	投与方法	濃度又は用量	性別及び動物数/群	特記すべき所見	GLP 適用	試験番号
中枢神経系 睡眠増強試験	マウス/ICR	静脈内	0.03 0.1 0.3 1 3 mg/kg	雄 8/群	ジフェリケファリンは、0.3 mg/kg 以上の用量で、ペントバルビタールによる睡眠時間の延長を示した。	適	[redacted]-131
中枢神経系 脳波測定試験	ラット/SD	静脈内	0.1 0.3 1 mg/kg	雄 6/群	自発脳波はすべての投与群において正常であった。 ジフェリケファリンは、睡眠-覚醒周期に対して 0.3 mg/kg 以上の用量で覚醒期の増加、1 mg/kg の用量で徐波睡眠期の減少が認められた。また、0.1 mg/kg 以上の用量で、速波睡眠期が認められなかった。睡眠潜時及び入眠潜時は、それぞれ 0.3 mg/kg 以上及び 1 mg/kg の用量で延長が認められた。	不適	9718
心血管系 hERG 試験	HEK293 細胞	*in vitro*	10 100 1000 μmol/L	3-4 細胞/群	ジフェリケファリンは、hERG 電流に対して 10 及び 100 μmol/L では影響を示さなかった。1000 μmol/L では、hERG 電流を 7.2%抑制した。IC_{50} は、1000 μmol/L 以上と推定された。	適	CR845-SP037
心血管系 覚醒下テレメトリー試験	サル/カニクイ	静脈内	0.25 1 4 mg/kg	雄 4/群	血圧（収縮期、拡張期、平均）は、ジフェリケファリンにより、投与後約 10 分に最大の低下（約 41～43%低下）が認められた。血圧の低下は、4～20 時間持続し、回復は緩やかであった。 心拍数は、投与後 15 分に約 30～50 bpm 増加し、その後徐々に減少した。0.25 mg/kg では投与後 3～24 時間、1 mg/kg では投与後 1～24 時間、4 mg/kg では投与後 1～6 時間に溶媒群に比べ減少した。4 mg/kg の投与後 18～22 時間の心拍数も減少したが、正常範囲内であった ECG パラメータに影響は認められず、体温の変化も正常の範囲内であった。 なお、すべての投与群において、嗜眠及び円背位が認められ、加えて、嘔吐が、0.25、1 及び 4 mg/kg でそれぞれ 1、2 及び 3 例に認められた。	適	CR845-SP039

2.6.3.4 安全性薬理試験（続き）

被験物質：ジフェリケファリン

試験種	動物種/系統	投与方法	濃度又は用量	性別及び動物数/群	特記すべき所見	GLP 適用	試験番号
呼吸系 プレチスモグラフ法	ラット/SD	静脈内	1 5 25 mg/kg	雄 8/群	呼吸数の減少が、すべての投与群において投与後 2 時間に認められ、投与後 24 時間においても溶媒群よりも低かった。一回換気量は、わずかに増加したが、呼吸数低下に対する生理的な代償と考えられた。分時換気量に影響は認められなかった。 なお、すべての投与群において、嗜眠及び運動失調が認められ、また、尿排泄量の増加及び尿着色も認められた。	適	CR845-SP040
胃腸器系 腸管輸送能/胃排出能	ラット/SD	静脈内	1 3 10 mg/kg	雄 10/群	ジフェリケファリンは、すべての投与群において、わずかに腸管輸送能の低下を示したが、胃内容物排出能に対して影響を示さなかった。	不適	CR845-SP041
胃腸管系 術後イレウスモデルに対する腸管輸送能/胃排出能	ラット/SD	静脈内	0.1 0.3 1 3 mg/kg	雄 9-12/群	ジフェリケファリンは、術後イレウスモデルの腸管輸送能及び胃内容物排出能に対して、影響を示さなかった。	不適	CR845-PHARM015