第 2 部（モジュール 2）
CTD の概要

2.6.2 薬理試験の概要文

ネクセラファーマジャパン株式会社

目次

1. まとめ....5
2. 効力を裏付ける試験....6
2.1 *In vitro* 薬理試験....6
2.1.1 オレキシン受容体におけるダリドレキサントの阻害の効力、持続性及び滞留時間....6
2.1.2 ヒトオレキシン受容体に対するダリドレキサント代謝物の阻害活性....7
2.2 *In vivo* 薬理試験....8
2.2.1 雄 Wistar ラットにおけるダリドレキサントの作用....9
2.2.1.1 脳への移行....9
2.2.1.2 睡眠及び覚醒パラメータにおける作用....9
2.2.1.3 覚醒時の運動能....12
2.2.2 雄 Beagle イヌにおけるダリドレキサントの作用....14
2.2.2.1 睡眠及び覚醒パラメータに対する作用....14
2.2.2.2 食餌提示による覚醒能（食餌活性化試験）....17
3. 副次的薬理試験....18
3.1 ダリドレキサント及びその代謝物（M1、M3 及び M10）の *in vitro* 選択性....18
4. 安全性薬理試験....19
4.1 中枢神経系....20
4.1.1 体温に対する影響（非 GLP 試験）....20
4.1.2 Irwin 試験（GLP 試験）....21
4.2 心血管系....21
4.2.1 hERG チャネルアッセイ（GLP 試験）....22
4.2.2 *In vivo* 試験での血行動態及び心臓のパラメータ....22
4.2.2.1 覚醒 Wistar ラットの血行動態及び心臓のパラメータ、体温及び自発運動量に対する影響（非 GLP 試験）....22
4.2.2.2 覚醒 SHR の血行動態及び心血管系パラメータ、体温及び自発運動量に対する影響（非 GLP 試験）....22
4.2.2.3 麻酔モルモットの血行動態及び心臓のパラメータに対する影響（非 GLP 試験）..23
4.2.2.4 覚醒 Beagle イヌの血行動態及び心臓のパラメータ及び体温に対する影響（GLP 試験）....23
4.3 呼吸器系....23
4.3.1 ラット呼吸器機能の全身プレチスモグラフィーによる評価（GLP 試験）....23
5. 薬力学的薬物相互作用試験....24
6. 考察及び結論....24
6.1 *In vitro* 及び *in vivo* の効力を裏付ける試験....24
6.2 安全性薬理試験....25
6.2.1 中枢神経系リスク評価....25
6.2.2 心血管系リスク評価....26

6.2.3 呼吸器系リスク評価 26
7. 参考文献 26

表目次

表 1. CHO 細胞発現ヒト、ラット及びイヌ組換え型 OX1R 及び OX2R に対するダリドレキサントの阻害作用 6
表 2. ヒト組換え型 OX1R 及び OX2R 発現 CHO 細胞におけるダリドレキサント及びその代謝物の阻害作用の効力 8
表 3. ラット及びイヌの *in vivo* 薬理試験の概要 9
表 4. 雄 Wistar ラットのホームケージ活動量並びに睡眠及び覚醒パラメータに及ぼす投与後 6 時間でのダリドレキサントの作用 11
表 5. ロータロッド試験成績におけるダリドレキサント及びゾルピデムの作用 14
表 6. 握力試験成績におけるダリドレキサント及びゾルピデムの作用 14
表 7. 雄 Beagle イヌへの投与後 6 時間の睡眠—覚醒パラメータ及びホームケージ活動量に対するダリドレキサントの作用 16
表 8. ダリドレキサントの安全性薬理試験の概要 20

図目次

図 1. ヒト OX1R 又は OX2R 発現 CHO 細胞におけるオレキシン A 誘発カルシウム遊離の濃度反応曲線におけるダリドレキサントの作用 7
図 2. 夜時間（活動相）におけるテレメトリー装着雄 Wistar ラットの投与後最初の 6 時間中の各睡眠及び覚醒ステージの相対時間（総時間の%）に対するダリドレキサントの作用 12
図 3. ロータロッド試験成績におけるダリドレキサント及びゾルピデムの作用 13
図 4. テレメトリー装着雄 Beagle イヌにおける日中（活動期）の投与後 6 時間中の相対的な睡眠及び覚醒時間（%）に対するダリドレキサントの作用 17

略語

略語	略さない用語	日本語訳
ANOVA	Analysis of variance	分散分析
AT_1	Angiotensin II receptor type 1	アンジオテンシン II タイプ 1 受容体
bpm	Beats per minute	1 分間の拍動数/分
CHO	Chinese hamster ovary	チャイニーズハムスター卵巣
C_{max}	Maximum plasma concentration	最高血漿中濃度
CNS	Central nervous system	中枢神経系
CSF	Cerebrospinal fluid	脳脊髄液
DORA	Dual orexin receptor antagonist	デュアルオレキシン受容体拮抗薬

略語	略さない用語	日本語訳
EC_{50}	Concentration that causes 50% response	50%効果濃度
EC_{70}	Concentration that causes 70% response	70%効果濃度
ECG	Electrocardiogram	心電図
EEG	Electroencephalogram	脳波図
EMG	Electromyogram	筋電図
FLIPR	Fluorometric imaging plate reader	蛍光イメージングプレートリーダー
GABA	Gamma-aminobutyric acid	γ-アミノ酪酸
GLP	Good Laboratory Practice	医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準
GPCR	G protein-coupled receptor	G タンパク質共役受容体
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
IC_{20}	Concentration that causes 20% inhibition	20%阻害濃度
IC_{50}	Concentration that causes 50% inhibition	50%阻害濃度
K_b	Equilibrium dissociation constant	平衡解離定数
LC-MS/MS	Liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry	液体クロマトグラフィータンデム質量分析法
MDR1	Multi-drug resistance protein-1	多剤耐性タンパク質 1
NMDA	N-methyl-D-aspartate	N メチル D アスパラギン酸
NK_3	Tachykinin receptor 3	タキキニン NK3 受容体
NOAEL	No-observed-adverse-effect level	無毒性量
NOEL	No-observed-effect level	無作用量
Non-REM	Non-rapid eye movement	早い眼球の動きがない、ノンレム
OX1R	Orexin receptor type 1	オレキシン 1 受容体
OX2R	Orexin receptor type 2	オレキシン 2 受容体
PDE4	Phosphodiesterase 4	ホスホジエステラーゼ 4
Penh	Enhanced pause	エンハンスドポーズ（気道狭窄の指標）
P-gp	P-glycoprotein	P 糖タンパク質
QTc	Corrected QT interval	補正 QT 間隔
REM	Rapid eye movement	早い眼球の動き、レム
SHR	Spontaneously hypertensive rat	自然発症高血圧ラット
t_{max}	Time to reach maximum plasma concentration	最高血漿中濃度到達時間

1. まとめ

ダリドレキサント（ACT-541468）は効力の高いデュアルオレキシン受容体拮抗薬（DORA）であり、オレキシン 1 受容体（OX1R）及びオレキシン 2 受容体（OX2R）において、オレキシン神経ペプチドであるオレキシン A 及びオレキシン B の作用を阻害する。

DORA は新規クラスの不眠症治療薬として開発されており、オレキシン神経ペプチドの覚醒促進作用を特異的に阻害する。

不眠症は過覚醒疾患であり、オレキシン系が重要な役割を担っている。不眠症患者では不眠傾向にない正常被験者に比べて、血漿中オレキシン A 濃度が高いことが示されている[Tang 2017]。

ダリドレキサントは脳内の覚醒促進領域において OX1R 及び OX2R の両方を阻害することにより、不眠症患者の異常な過覚醒状態を低下させる。ダリドレキサントは、いわゆる Z－薬（すなわち zaleplon、エスゾピクロン及びゾルピデム）のような伝統的睡眠導入剤とは違い、主な抑制系 γ-アミノ酪酸（GABA）神経伝達物質系の作用を増強しない。

細胞アッセイにおいて、ダリドレキサントは OX1R 及び OX2R を介するオレキシン A 誘発カルシウム遊離に対して持続性のオルソステリック拮抗薬として機能し、ヒト、ラット及びイヌオレキシン受容体に対していずれも同程度の高い効力を示した。ダリドレキサントの 3 種の主要代謝物［M1（ACT-776537）、M3（ACT-776063）及び M10（ACT-1016-3307）］は、いずれも OX1R 及び OX2R に対する効力が未変化体よりも有意に低く、ヒトにおける睡眠促進作用への寄与は考えにくい。ダリドレキサント、M1、M3 及び M10 は臨床で見られるより高い濃度で約 120 種類のオフターゲット受容体、チャネル及び酵素のいずれにも結合又は活性を阻害しなかった。

ダリドレキサントは用量依存的にラット及びイヌの覚醒状態を低下させ、睡眠を促進した。ダリドレキサントの投与により持続的なノンレム（non-REM）睡眠に至るまでの時間は短縮し、ノンレム及びレム（REM）睡眠時間はともに延長した。自然な睡眠構成、すなわち総睡眠時間に占めるノンレム睡眠及びレム睡眠時間の割合は、両種ともにダリドレキサントの投与によって影響を受けなかった。

脳波図（EEG）記録/筋電図（EMG）検査の出力及びビデオ画像をスコア化して評価することで、ダリドレキサントの単回経口投与後に眠ったイヌに食餌を与えると、イヌは即座に目覚め、正常な行動をとることが示された。

ラットにダリドレキサントを単回経口投与した後種々の時間に起こすと、ラットは即座に覚醒し、ロータロッド試験及び握力測定で、ゾルピデム投与ラットとは異なり、媒体投与ラットと同様の成績が得られた。

呼吸器系、中枢神経系（CNS）及び心血管系機能の評価において、機能と関連性のある有害事象は観察されず、臨床での最高用量である 50 mg/日の曝露の少なくとも 52 倍の安全域が得られた。

2. 効力を裏付ける試験

2.1 *In vitro* 薬理試験

2.1.1 オレキシン受容体におけるダリドレキサントの阻害の効力、持続性及び滞留時間

OX1R 及び OX2R は G タンパク質共役受容体（GPCR）であり、受容体活性化によりホスホリパーゼ C 経路が刺激され細胞内 Ca^{2+}濃度が一過性に上昇する。ダリドレキサントの塩酸塩（図表中は ACT-541468A と表記）を用いた検討で、ダリドレキサントの OX1R 及び OX2R に対する拮抗薬としての効力［見かけの平衡解離定数（K_b 値）］及び持続性をカルシウム遊離アッセイで評価した。カルシウム感受性色素（fluo-4 AM）を負荷したヒト、ラット又はイヌ組換え型受容体発現チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞にダリドレキサント塩酸塩（0～1000 nM）を添加して室温で 120 分間インキュベートした後、オレキシン A を希釈系列の濃度（0～1000 nM）で添加した。カルシウム遊離を蛍光イメージングプレートリーダー（FLIPR）で測定し、ピーク蛍光値を使ってオレキシン A の濃度反応曲線を作成した（モジュール 4.2.1.1.1）。

OX1R 又は OX2R 発現細胞におけるオレキシン A 誘発細胞内 Ca^{2+}濃度上昇反応の濃度反応曲線から、この試験条件下で、ダリドレキサントは次に記載するように相対的に遅い解離速度を有し、見かけの K_b はヒト OX1R 及び OX2R に対してそれぞれ 0.47 及び 0.93 nM（いずれも n = 3）であり（表 1、図 1）、両受容体に対して強い持続性拮抗薬として作用した。効力、選択性又は持続性に関して明らかな種特異性は認められなかった。

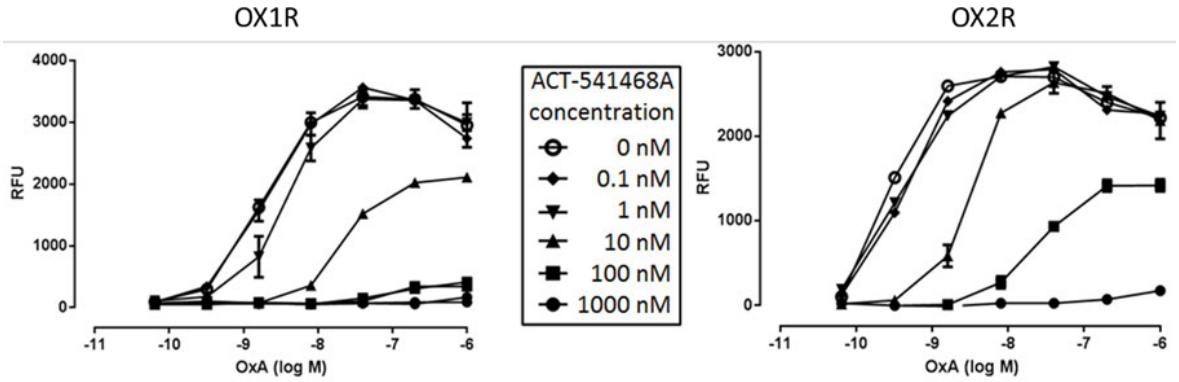
オレキシン A と同時に添加したときに、ダリドレキサントは同じ結合部位においてオレキシン A と競合するオルソステリック拮抗薬であることが、別の一連のカルシウム遊離アッセイにおいて示された（モジュール 4.2.1.1.1）。

表 1. CHO 細胞発現ヒト、ラット及びイヌ組換え型 OX1R 及び OX2R に対するダリドレキサントの阻害作用

種	見かけの K_b (nM)	
	OX1R	OX2R
ヒト	0.47	0.93
ラット	1.1	1.7
イヌ	0.33	0.66

見かけの K_b 値は 1.6 nM オレキシン A 存在下で測定した IC_{50} 値から一般化 Cheng-Prusoff 式を用いて算出、数値は幾何平均値（n = 3）
CHO = チャイニーズハムスター卵巣、IC_{50} = 50%阻害濃度、K_b = 機能試験で測定したリガンドの平衡解離定数、OX1R = オレキシン 1 受容体、OX2R = オレキシン 2 受容体
データの出典：モジュール 4.2.1.1.1 表 1～表 3 を改変

図 1. ヒト OX1R 又は OX2R 発現 CHO 細胞におけるオレキシン A 誘発カルシウム遊離の濃度反応曲線におけるダリドレキサントの作用



各データポイント（2 回測定の平均値）は、3 試験中の代表例
カルシウム感受性色素負荷組換え型 CHO 細胞を種々の濃度のダリドレキサント塩酸塩（ACT-541468A）と室温で 120 分間インキュベートした後、オレキシン A を希釈系列の濃度で添加。カルシウム遊離を測定しピーク蛍光値を使って濃度反応曲線を作成し、見かけの K_b を算出（表 1）。CHO = チャイニーズハムスター卵巣、OX1R = オレキシン 1 受容体、OX2R = オレキシン 2 受容体、OxA = オレキシン A、RFU = 相対蛍光単位
データの出典：モジュール 4.2.1.1.1 図 1

最初の試験と同様の方法で、ヒト組換え型 OX1R 又は OX2R 発現 CHO 細胞に種々の濃度のダリドレキサント塩酸塩を添加して 37°C で 120 分間インキュベートした後にダリドレキサントを十分に洗浄し、更にインキュベートを続けた。洗浄の 8～63 分後に 70%効果濃度（EC_{70}）のオレキシン A を添加してカルシウム遊離アッセイを行い、洗浄後のオレキシン A 活性に対する 50%阻害濃度（IC_{50}）値からダリドレキサントの受容体滞留時間を評価した（モジュール 4.2.1.1.2）。

ヒト OX1R 及び OX2R において、ダリドレキサントの見かけの滞留時間は 37°C でそれぞれ 8 及び 4 分であった。このような受容体滞留時間は持続性拮抗薬作用を発揮するのに十分な時間であると考えられ、したがって、非持続性拮抗薬よりも高い活性を示す可能性が考えられる。しかし、この滞留時間は、曝露以上にダリドレキサントの薬理作用が持続するほどの長い時間ではないと考えられる。

2.1.2 ヒトオレキシン受容体に対するダリドレキサント代謝物の阻害活性

ヒトにおいて、3 種類の主要代謝物、M1（ACT-776537）、M3（ACT-776063）及び M10（ACT-1016-3307）が同定されている（AC-078-101 試験、モジュール 5.3.2.3.1）。ヒト組換え型 OX1R 及び OX2R 発現 CHO 細胞のカルシウム遊離アッセイを用いて主要代謝物の活性を検討した（モジュール 4.2.1.1.3）。

M1、M3 及び M10 のヒト OX1R 及び OX2R における阻害活性はダリドレキサントに比べて、それぞれ 1/40～1/1545 倍、及び 1/8～1/555 倍であった（n = 3）（表 2）。したがって、ダリドレキサント代謝物はヒトにおいてダリドレキサントの睡眠促進作用に寄与しないと考えられる。

表 2. ヒト組換え型 OX1R 及び OX2R 発現 CHO 細胞におけるダリドレキサント及びその代謝物の阻害作用の効力

試験系	ヒト組換え型 OX1R 及び OX2R 発現 CHO 細胞	
アッセイ	カルシウム感受性色素の蛍光増加を指標にしたオレキシン A 誘発カルシウム遊離の阻害	
化合物	見かけの K_b (nM)	
	OX1R	OX2R
ダリドレキサント	0.77	0.95
M1 (ACT-776537)	63	45
M3 (ACT-776063)	31	7.8
M10 (ACT-1016-3307)	1190	527

幾何平均値（n = 3）
見かけの K_b 値は 1.6 又は 8 nM オレキシン A 存在下で測定した IC_{50} 値から一般化 Cheng-Prusoff 式を用いて算出、CHO = チャイニーズハムスター卵巣、IC_{50} = 50%阻害濃度、K_b = 平衡解離定数、OX1R = オレキシン 1 受容体、OX2R = オレキシン 2 受容体
データの出典：モジュール 4.2.1.1.3 表 2 を改変

2.2 *In vivo* 薬理試験

睡眠及び覚醒ステージ並びに覚醒時の筋強度及び運動機能におけるダリドレキサントの作用を正常 Wistar ラット及び Beagle イヌで検討し、ダリドレキサントの脳への移行をラットで検討した。ラット試験はダリドレキサント塩酸塩を、イヌ試験はダリドレキサントの遊離塩基を使用した。全用量は遊離塩基相当で調整し、テレメトリーによる EEG/EMG、自発運動量及び体温データはすべて覚醒、無拘束動物から収集した。*In vivo* 薬理試験の概要を表 3 及び概要表（モジュール 2.6.3.1）にまとめた。

表 3. ラット及びイヌの *in vivo* 薬理試験の概要

試験番号 モジュール番号	動物	測定パラメータ （被験物質）	投与経路及び投与間隔	用量 (遊離塩基換算)	性別・動物数
B-14.036 （モジュール 4.2.1.1.4）	Wistar ラット	ホームケージ活動量，体温，睡眠/覚醒ステージ時間，ノンレム及びレム睡眠までの時間(ダリドレキサント)	単回経口	10, 30, 100, 300 mg/kg	雄 8/群
		投与後 1, 3, 6, 24 時間での血漿中, CSF 中及び脳内濃度 (ダリドレキサント)	単回経口	30, 100 mg/kg	雄 4/群
B-20.029 （モジュール 4.2.1.1.5）	Wistar ラット	ロータロッド落下までの時間及び握力 (ダリドレキサント，ゾルピデム)	単回経口	10, 30, 100 mg/kg[1)]	雄 12/群
B-14.056 （モジュール 4.2.1.1.6）	Beagle イヌ	活動量，睡眠/覚醒ステージ時間，ノンレム睡眠に至る時間，食餌刺激テスト後の行動評価 (ダリドレキサント)	単回経口	10, 30, 90 mg/動物	雄 6-10/群
		睡眠/覚醒ステージ時間，持続的ノンレム睡眠に至る時間 (異なる物理化学的状態及び処方 [2)]のダリドレキサント)	単回経口	30 mg/動物	雄 6-10/群

1) ダリドレキサント及びゾルピデムの用量は 30 及び 100 mg/kg
2) 微粒子化、非微粒子化又は非結晶製剤、CSF = 脳脊髄液

2.2.1 雄 Wistar ラットにおけるダリドレキサントの作用

ダリドレキサントは用量依存的にラットの睡眠を促進した。すなわち、睡眠潜時を短縮し、ノンレム及びレム睡眠時間をいずれも生理的割合で延長した（総睡眠時間の延長とともに、ノンレム及びレム睡眠時間も同様の割合で延長）。ダリドレキサント投与ラットは、媒体投与ラットと同様に刺激直後に覚醒し、同様に運動課題をこなしたことから、ダリドレキサントが促進する睡眠は容易に覚醒可能な睡眠であることが示された。

2.2.1.1 脳への移行

ダリドレキサントの効力を評価する試験の準備として、ダリドレキサントの雄 Wistar ラットの脳内移行を評価した（n = 4/用量/測定時点）。ダリドレキサント塩酸塩（30 及び 100 mg/kg）を単回強制経口投与して、投与後 1、3、6 及び 24 時間に採取した血漿中、脳脊髄液（CSF）中及び脳内ダリドレキサント濃度を液体クロマトグラフィータンデム質量分析法（LC-MS/MS）を用いて測定した（モジュール 4.2.1.1.4）。

ダリドレキサントは速やかに脳に移行し、30 及び 100 mg/kg の投与後 1 時間での全脳内濃度はそれぞれ最大で 3.2 及び 5.2 µg/g であり、脳血漿比はいずれも 2.1～2.2 であった。

2.2.1.2 睡眠及び覚醒パラメータにおける作用

皮下に埋め込んだテレメトリー発信器を装着した雄 Wistar ラット（n = 8）を無拘束で個別ケー

ジに入れ 24 時間の概日周期下で睡眠ポリグラフィー検査を行い、ダリドレキサントの作用を測定した。

媒体（0.5%メチルセルロース水溶液）（0 mg/kg）又はダリドレキサント塩酸塩（10、30、100 又は 300 mg/kg）を、内因性オレキシン濃度が自然に高くなる夜時間（活動相）[Gotter 2013] [Taheri 2000]の始めにラットに単回強制経口投与した。投与 24 時間前から、EEG、EMG 及びホームケージ活動量を遠隔で、並びに体温を記録した。各ラットにはクロスオーバー法で全用量を投与し、用量間に 3 日間の休薬期間を設定した。体温の測定結果は 4.1.1 項に記載した（モジュール 4.2.1.1.4）。

ダリドレキサントは、投与後 6 時間中の覚醒時間及びホームケージ活動量を用量依存的に低下させた［両パラメータとも $p < 0.0001$、一元配置分散分析（ANOVA）］。同様に、ダリドレキサントはレム及びノンレム睡眠時間を用量依存的に延長した（それぞれ、$p = 0.0008$ 及び $p < 0.0001$）。ダリドレキサント投与により総睡眠時間中のノンレム及びレム睡眠時間の生理的な割合は影響を受けず（$p = 0.1689$）、自然の睡眠構造が保持された（表 4）。ラットが通常非活動状態にある昼間においては、検討した最大用量（300 mg/kg）投与ラットのノンレム及びレム睡眠時間は、非投与ラットで見られた睡眠時間を超えなかった（図 2）。

ダリドレキサントの作用を最も鋭敏に反映するパラメータはホームケージ活動量及びノンレム睡眠であった。最小用量（10 mg/kg）を含め検討した全用量で、両パラメータは媒体投与ラットに比べて統計学的に有意に変動した。30 mg/kg 以上では、静覚醒（目は開いているが体動がない状態）を除くすべての測定パラメータに統計学的に有意な影響が見られた。

持続的ノンレム睡眠（最初の 60 秒以上続くノンレム睡眠エピソード）に至るまでの平均時間は媒体投与ラットで 61 分であり、ダリドレキサントはそれを 11～17 分短縮した。レム睡眠（最初の 30 秒以上続くレム睡眠エピソード）に至るまでの平均時間は媒体投与ラットで 63 分であり、ダリドレキサントはそれを 25～48 分短縮した。

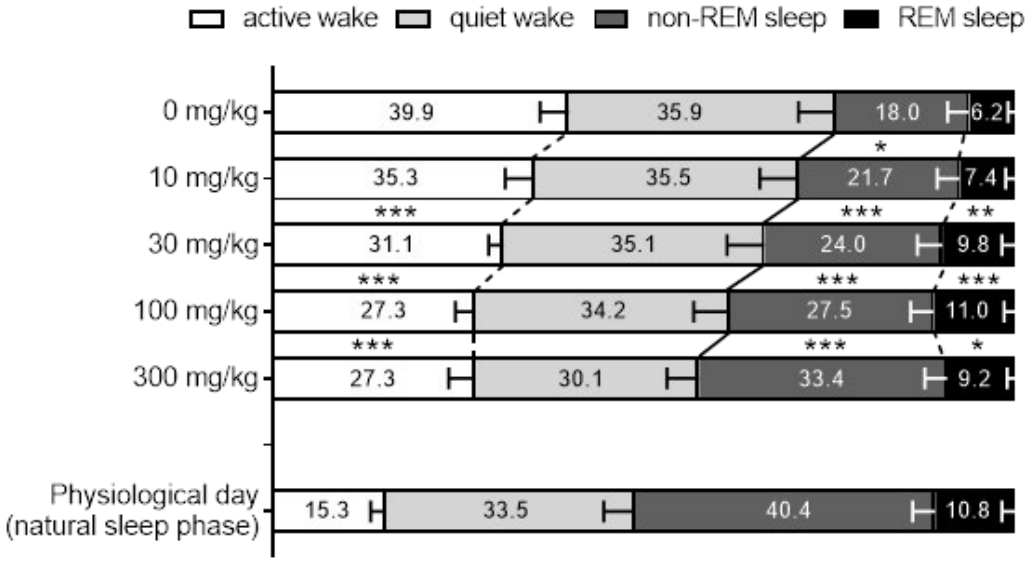
ダリドレキサントの睡眠作用は最小用量で約 6 時間、最大用量では 12 時間を超えて持続した。

表 4. 雄 Wistar ラットのホームケージ活動量並びに睡眠及び覚醒パラメータに及ぼす投与後 6 時間でのダリドレキサントの作用

用量 (mg/kg)		0 (媒体)	10	30	100	300
ホームケージ活動量 (カウント/分)[1)]		2.9 ± 0.2	2.3 ± 0.2*	1.9 ± 0.1***	1.3 ± 0.1***	1.4 ± 0.2***
活動的覚醒時間	(%)	39.9 ± 3.9	35.3 ± 4.0	31.1 ± 2.0***	27.3 ± 2.7***	27.3 ± 3.6***
	(分)	143.6 ± 13.9	127.1 ± 14.3	112.1 ± 7.2***	98.1 ± 9.6***	98.2 ± 13.0***
静覚醒時間	(%)	35.9 ± 5.0	35.5 ± 5.2	35.1 ± 5.0	34.2 ± 4.8	30.1 ± 4.3
	(分)	129.1 ± 18.1	127.9 ± 18.7	126.4 ± 18.1	123.1 ± 17.1	108.4 ± 15.6
総覚醒時間	(%)	75.8 ± 2.8	70.8 ± 3.3	66.2 ± 4.2***	61.5 ± 4.2***	57.4 ± 3.6***
	(分)	272.7 ± 10.2	254.9 ± 11.7	238.5 ± 15.0***	221.2 ± 15.1***	206.6 ± 13.0***
ノンレム睡眠時間	(%)	18.0 ± 2.9	21.7 ± 3.0*	24.0 ± 3.4***	27.5 ± 3.1***	33.4 ± 3.0***
	(分)	65.0 ± 10.6	78.3 ± 10.7*	86.3 ± 12.3***	99.1 ± 11.2***	120.3 ± 10.7***
レム睡眠時間	(%)	6.2 ± 1.0	7.4 ± 1.2	9.8 ± 1.8**	11.0 ± 1.5***	9.2 ± 1.1*
	(分)	22.3 ± 3.4	26.8 ± 4.5	35.2 ± 6.3**	39.7 ± 5.3***	33.1 ± 3.9*
総睡眠時間	(%)	24.2 ± 2.8	29.2 ± 3.3	33.8 ± 4.2***	38.5 ± 4.2***	42.6 ± 3.6***
	(分)	87.3 ± 10.2	105.1 ± 11.7	121.5 ± 15.0***	138.8 ± 15.1***	153.4 ± 13.0***
ノンレム睡眠/総睡眠時間比 (%)		71.4 ± 5.6	73.6 ± 3.8	70.8 ± 4.1	71.7 ± 2.3	78.6 ± 2.1
レム睡眠/総睡眠時間比 (%)		28.6 ± 5.6	26.4 ± 3.8	29.2 ± 4.1	28.3 ± 2.3	21.4 ± 2.1
持続的ノンレム睡眠に至る時間 (分)		60.5 ± 15.0	17.4 ± 1.9***	13.4 ± 2.7***	14.7 ± 2.6***	10.8 ± 1.1***
持続的レム睡眠に至る時間 (分)		63.4 ± 6.8	33.0 ± 6.4*	25.4 ± 5.0**	31.0 ± 7.1*	48.3 ± 16.3

平均値 ± 標準誤差（n = 8）
1) 埋め込まれたテレメトリー装置（送信機）の受信器側における信号強度の変化に基づく
覚醒、睡眠の各パラメータにおける%は投与後の 6 時間を 100%としたときの値
ラットが活動相に入り内因性オレキシン濃度が自然に高くなる夜時間の始めに投与を実施、一元配置 ANOVA は各パラメータ別に実施し、post-hoc Dunnett 多重比較法で検定、*：$p < 0.05$、**：$p < 0.01$、***：$p < 0.001$ vs 媒体投与群、ANOVA：分散分析
データの出典：モジュール 4.2.1.1.4 表 2、表 4 を改変

図 2. 夜時間（活動相）におけるテレメトリー装着雄 Wistar ラットの投与後最初の 6 時間中の各睡眠及び覚醒ステージの相対時間（総時間の%）に対するダリドレキサントの作用



データは平均値（n = 8）、バーは平均値の標準誤差
媒体（0.5%メチルセルロース水溶液、0 mg/kg）又はダリドレキサント塩酸塩（10、30、100 又は 300 mg/kg、遊離塩基相当）を、内因性オレキシン濃度が自然に高くなる夜時間（活動相）の始めにラットに単回強制経口投与、Physiological day：ラットにおける自然な睡眠相である日中の生理状態をベースライン記録から抽出して算出し、最初の 6 時間を以下の 4 段階で%相対表示、active wake：活動的覚醒、quiet wake：静覚醒、non-REM sleep：ノンレム睡眠、REM sleep：レム睡眠、一元配置 ANOVA は各覚醒、睡眠段階別に実施し、post-hoc Dunnett 多重比較法で検定、媒体投与群（0 mg/kg）の各パラメータと比較して*：$p < 0.05$、**：$p < 0.01$、***：$p < 0.001$、ANOVA：分散分析
データの出典：モジュール 4.2.1.1.4 図 8

2.2.1.3 覚醒時の運動能

睡眠から素早く起きて、完全な覚醒に至ること及び正常な運動課題を実施できることが自然な睡眠の重要な特徴である。覚醒状態での運動機能におけるダリドレキサントの単回経口投与の影響を雄 Wistar ラットで検討した（n = 12/群）。

ラットへの、被験物質非投与時（ベースライン）並びに投与後 30、60、90、120 及び 150 分に 2 種類の運動課題を反復実施した。1 種類は回転速度を加速させたロッド（ロータロッド）を用いた試験で全体の運動機能と協調性を評価するもの、もう 1 種類は前肢握力試験で繊細な運動機能及び筋力を評価するものである。対照薬として、運動機能抑制作用を有することが知られている GABA-A 受容体修飾薬ゾルピデム[Beuckmann 2019] [Boss 2014] [Steiner 2011]を使用した。

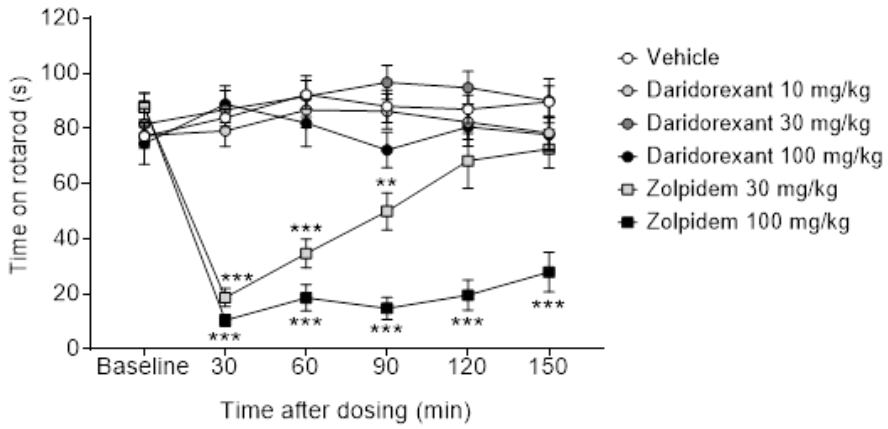
非処理ラットにトレーニング期間を 1 日設け試験を 6 回実施して安定的に課題（次第に回転速度があがるロッド上でバランスをとる）を実施できるようにした。翌日に追加で 1 回ベースラインセッションを実施して 1 時間後（ラットにとって不活動期である日中）に媒体（0.5%メチルセルロース水溶液）（0 mg/kg）、ダリドレキサント塩酸塩（10、30 又は 100 mg/kg）若しくはゾルピデム（30 又は 100 mg/kg）を強制経口投与した。両薬とも、これらの用量でラットに睡眠を誘発することが知られている。ロータロッド試験は投与後 30、60、90、120 及び 150 分に実施し、ロータロッド上にいる時間（ロータロッドから落ちるまでの時間）を覚醒時の運動能の指標とし

て記録し、各ロータロッド試験セッションの直後に前肢握力を測定した（モジュール 4.2.1.1.5）。

ダリドレキサントの単回経口投与では、どの用量、どの時間での測定でもロータロッド試験成績は媒体群に比べて低下していなかった（図 3、表 5）。一方、ゾルピデムは 30 及び 100 mg/kg で用量依存的にロータロッド上にいる時間を短縮した（二元配置 ANOVA、$F[5, 66] = 23.7$、$p < 0.001$）。成績の低下は投与後 30 分で一番大きかった。30 mg/kg でのゾルピデムの作用は時間につれ徐々に消失した（投与後 30、60 及び 90 分でロータロッド上の時間は媒体群に比べて有意に短縮、$p < 0.01$）。100 mg/kg では、ゾルピデムは投与後 150 分までのどの時点でもロータロッド上の時間を有意に短縮した（いずれも $p < 0.001$）。

前肢握力の測定でも同様の結果が観察された。ダリドレキサントは、どの用量、どの時間での測定でも媒体群と比べて前肢握力に影響を及ぼさず、一方、ゾルピデムは用量依存的に前肢握力を低下させた（二元配置 ANOVA、$F[5, 66] = 11.9$、$p < 0.001$）（表 6）。

図 3. ロータロッド試験成績におけるダリドレキサント及びゾルピデムの作用



平均値 ± 標準誤差（n = 12/群）
ベースライン値は投与前 60 分に測定、時間ポイントごとの媒体群との比較で**p < 0.01、***p < 0.001、二元配置反復測定 ANOVA 後に Dunnett 多重比較法で検定、ANOVA：分散分析
データの出典：モジュール 4.2.1.1.5 図 1

表 5. ロータロッド試験成績におけるダリドレキサント及びゾルピデムの作用

用量 (mg/kg)	媒体	ダリドレキサント			ゾルピデム	
		10	30	100	30	100
ベースライン	77.3 ± 3.4	77.3 ± 4.7	81.4 ± 5.6	74.5 ± 7.6	87.6 ± 5.2	88.0 ± 4.8
30 分	83.3 ± 3.2	79.0 ± 5.7	86.7 ± 7.0	88.7 ± 6.6	18.6 ± 3.2***	10.3 ± 2.1***
60 分	92.3 ± 5.2	86.5 ± 6.4	91.6 ± 7.4	82.0 ± 8.6	34.5 ± 5.2***	18.6 ± 4.8***
90 分	88.1 ± 5.9	86.1 ± 6.3	96.7 ± 6.2	72.1 ± 6.4	50.0 ± 6.7**	14.7 ± 4.0***
120 分	86.9 ± 5.1	82.3 ± 6.3	94.9 ± 5.9	80.6 ± 7.0	68.3 ± 9.9	19.5 ± 5.5***
150 分	89.6 ± 5.7	78.5 ± 6.1	90.1 ± 8.1	77.7 ± 6.1	72.6 ± 6.9	27.7 ± 7.2***

各 2 分間のテスト中のロータロッド装置上にいた時間（秒）の平均値 ± 標準誤差（n = 12/群）
ベースライン（被験物質投与前 60 分）、投与後 30、60、90、120 及び 150 分後に評価、時間ポイントごとの媒体群との比較で**p < 0.01、***p < 0.001、二元配置反復測定 ANOVA 後に Dunnett 多重比較法で検定、
ANOVA：分散分析
データの出典：モジュール 4.2.1.1.5 表 1 を改変

表 6. 握力試験成績におけるダリドレキサント及びゾルピデムの作用

用量 (mg/kg)	媒体	ダリドレキサント			ゾルピデム	
		10	30	100	30	100
ベースライン	1342 ± 33	1271 ± 30	1298 ± 34	1270 ± 32	1318 ± 26	1285 ± 35
30 分	1264 ± 44	1243 ± 32	1247 ± 33	1232 ± 34	942 ± 38***	844 ± 59***
60 分	1234 ± 42	1214 ± 25	1228 ± 29	1208 ± 40	1016 ± 34**	886 ± 62***
90 分	1208 ± 40	1235 ± 37	1215 ± 21	1189 ± 40	1081 ± 47	858 ± 56***
120 分	1219 ± 43	1188 ± 38	1221 ± 34	1168 ± 35	1100 ± 49	923 ± 55**
150 分	1174 ± 34	1194 ± 33	1177 ± 29	1165 ± 40	1103 ± 38	927 ± 68*

各 2 分間のロータロッド試験直後の前肢握力（g）の平均値 ± 標準誤差（n = 12/群）
ベースライン（被験物質投与前 60 分）、投与後 30、60、90、120 及び 150 分後に評価、時間ポイントごとの媒体群との比較で*p < 0.05、**p < 0.01、***p < 0.001、二元配置反復測定 ANOVA 後に Dunnett 多重比較法で検定、ANOVA：分散分析
データの出典：モジュール 4.2.1.1.5 表 2 を改変

2.2.2 雄 Beagle イヌにおけるダリドレキサントの作用

ダリドレキサントは用量依存的にイヌの睡眠を促進した。すなわち、睡眠潜時を短縮し、ノンレム及びレム睡眠を生理的割合で延長した。睡眠中にイヌは刺激により直ちに起きることができ、正常に行動できることから、ダリドレキサント誘発睡眠は覚醒させやすい睡眠であることが示された。

2.2.2.1 睡眠及び覚醒パラメータに対する作用

皮下に埋め込んだテレメトリー装置を装着した無拘束雄 Beagle イヌ（n = 6～10/群）を個別ケージに入れ、睡眠ポリグラフィー検査及びビデオ記録の自動映像定量化装置により、22 時間の間ずっとイヌの睡眠及び覚醒パラメータ、ホームケージ活動量及び移動度を測定しダリドレキサントの作用を検討した。

ゼラチンカプセルに入れたダリドレキサント遊離塩基の非結晶固体散剤をイヌに 0 mg（媒体：[redacted]）、10 mg（0.6～0.8 mg/kg 相当）、30 mg（1.8～2.4 mg/kg 相当）又は 90 mg（5.5～7.1 mg/kg 相当）を単回経口投与した。投与は内

因性オレキシンレベルが自然に上昇する活動期（日中、午前 10 時）に実施し、各個体に 1 週間の休薬期間をおいて全用量を投与した（モジュール 4.2.1.1.6）。

投与後 6 時間で、ダリドレキサントはいずれも用量依存的に有意な覚醒時間の短縮作用、並びにレム及びノンレム睡眠時間の延長作用を示した（一元配置 ANOVA、それぞれ $p = 0.0001$、$p = 0.0004$ 及び $p = 0.002$）。ダリドレキサントの投与によりノンレム及びレム睡眠の生理的割合は影響を受けず、自然な睡眠構成が保たれていた（ダリドレキサント群の総睡眠中のノンレム睡眠の割合 vs 媒体群、一元配置 ANOVA、$p = 0.3923$）（表 7）。一方、イヌが通常不活動期である夜間においては、検討した最高用量である 90 mg（5.5～7.1 mg/kg）でのノンレム及びレム睡眠時間はそれぞれ媒体群で観察された各睡眠時間を超えなかった（図 4）。

イヌにおいてダリドレキサントの作用を反映するもっとも感受性の高いパラメータはノンレム睡眠時間と総睡眠時間であり、最低用量の 10 mg からすべての用量で、どちらも対照群と比べて統計学的に有意に延長した。

移動度及びホームケージ活動量カウントは統計学的に有意な低下が見られなかった（一元配置 ANOVA、それぞれ $p = 0.62$ 及び $p = 0.79$）ことから、覚醒状態の低下は両パラメータの低下として説明できなかった。テレメトリー測定用ケージに置かれたイヌのように、個々に収容されているイヌは相対的に不活発なので、動きと関連するパラメータに感度がないことの説明が可能であると思われる。

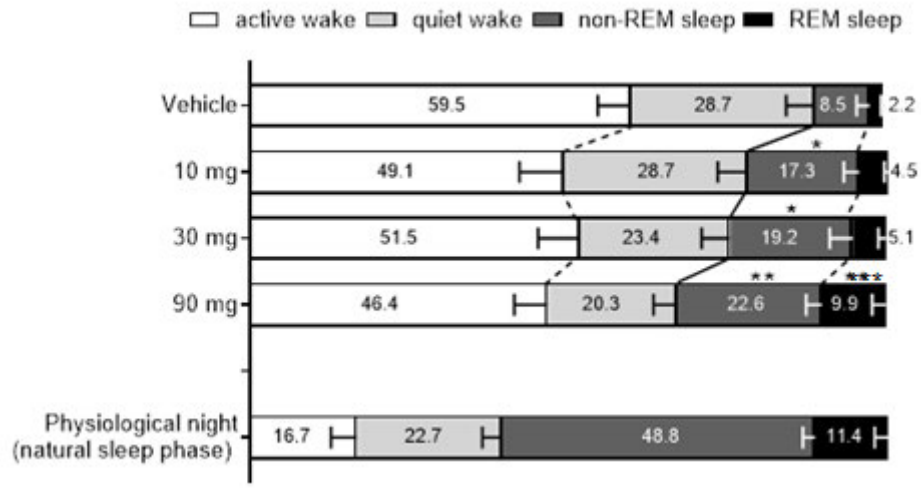
媒体群で持続的ノンレム睡眠に至る時間の平均は 104 分であった。ダリドレキサントは 10、30 及び 90 mg でその時間をそれぞれ 53、35 及び 42 分に短縮した。同様に、媒体群での持続的レム睡眠に至る時間の平均は 136 分であり、ダリドレキサントは 10、30 及び 90 mg でその時間をそれぞれ 61、57 及び 50 分に短縮した。ダリドレキサントの睡眠への作用は、低用量の 10 mg で 3 時間持続し、高用量の 90 mg では 6 時間まで持続した。

表 7. 雄 Beagle イヌへの投与後 6 時間の睡眠—覚醒パラメータ及びホームケージ活動量に対するダリドレキサントの作用

用量	(mg)	媒体	10	30	90
	(mg/kg)	-	0.6 - 0.8	1.8 - 2.4	5. 5 - 7.1
活動時間 (分)		77.3 ± 14.2	64.5 ± 12.2	53.9 ± 13.9	57.4 ± 14.3
ホームケージ活動量 [1)] (カウント/分)		7.6 ± 2.8	5.0 ± 2.1	4.9 ± 2.7	4.9 ± 1.8
活動的覚醒時間	(%)	59.5 ± 5.2	49.1 ± 7.0	51.5 ± 6.5	49.4 ± 5.1
	(分)	214.2 ± 18.7	176.8 ± 25.2	185.4 ± 23.4	167.0 ± 18.4
静覚醒時間	(%)	28.7 ± 4.5	28.7 ± 4.8	23.4 ± 4.4	20.3 ± 3.7
	(分)	103.3 ± 16.2	103.3 ± 17.3	84.2 ± 15.8	73.1 ± 13.3
総覚醒時間	(%)	88.1 ± 1.9	77.9 ± 2.6*	74.9 ± 4.3**	66.7 ± 3.4***
	(分)	317.2 ± 7.0	280.4 ± 9.4*	269.6 ± 15.4**	240.1 ± 12.3***
ノンレム睡眠時間	(%)	8.5 ± 2.0	17.3 ± 2.4*	19.2 ± 3.6*	22.6 ± 2.5**
	(分)	30.6 ± 7.1	62.2 ± 8.6*	69.0 ± 13.0*	81.3 ± 9.2**
レム睡眠時間	(%)	2.2 ± 0.4	4.5 ± 0.6	5.1 ± 1.1	9.9 ± 2.1***
	(分)	7.8 ± 1.6	16.4 ± 2.3	18.4 ± 4.0	35.8 ± 7.6***
総睡眠時間	(%)	10.7 ± 2.1	21.8 ± 2.6*	24.3 ± 4.4*	32.5 ± 3.7***
	(分)	38.4 ± 7.6	78.5 ± 9.5*	87.4 ± 15.7*	117.1 ± 13.2***
ノンレム睡眠/総睡眠時間比 (%)		77.5 ± 3.7	77.7 ± 3.0	78.5 ± 3.8	69.8 ± 4.5
レム/総睡眠時間比 (%)		22.5 ± 3.7	22.3 ± 3.0	21.5 ± 3.8	30.2 ± 4.5
持続的ノンレム睡眠に至る時間		103.8 ± 26.7	52.7 ± 8.5	35.3 ± 4.5*	41.6 ± 8.5
持続的レム睡眠に至る時間		136.1 ± 35.6	61.1 ± 9.3	57.0 ± 13.0	49.6 ± 8.6*

平均値 ± 標準誤差（n = 10）
1) 埋め込まれたテレメトリー装置（送信機）の受信器側における信号強度の変化に基づく
ダリドレキサントはイヌの活動期で、内因性オレキシンレベルが自然に上昇する日中（午前 10 時）に投与、%は投与後 6 時間中の各パラメータ時間のパーセントに相当、一元配置 ANOVA は各パラメータで独立に実施し、post-hoc Dunnett 多重比較法で検定、媒体群との比較で*p < 0.05、**p < 0.01、***p < 0.001、ANOVA：分散分析
データの出典：モジュール 4.2.1.1.6 表 1、表 3、表 4 から作成

図 4. テレメトリー装着雄 Beagle イヌにおける日中（活動期）の投与後 6 時間中の相対的な睡眠及び覚醒時間（%）に対するダリドレキサントの作用



データは平均値（n = 10）、バーは平均値の標準誤差
テレメトリー装置装着イヌに、ダリドレキサント遊離塩基の非結晶固体散剤を 0 mg（媒体：[redacted]）、10 mg（0.6～0.8 mg/kg 相当）、30 mg（1.8～2.4 mg/kg）又は 90 mg（5.5～7.1 mg/kg）単回経口投与、投与は内因性オレキシンレベルが自然に上昇する活動期（日中、午前 10 時）に実施、Physiological night (natural sleep phase)：媒体群の正常な不活動期（睡眠期）の最初の 6 時間から得たデータ、一元配置 ANOVA は各パラメータで独立に実施し、post-hoc Dunnett 多重比較法で検定、媒体群との比較で*p < 0.05、**p < 0.01、***p < 0.001、ANOVA：分散分析
データの出典：モジュール 4.2.1.1.6 表 3 のデータを図示化

追加のサテライト群のイヌ（n = 3）を用いてダリドレキサントの薬物動態を 30 mg/イヌ（1.7～1.9 mg/kg）の用量で評価したところ、最高血漿中濃度到達時間（t_{max}）は 2 時間、最高血漿中濃度（C_{max}）は 308 ng/mL（min - max：193 - 412 ng/mL）であった。イヌ血漿の非結合型分率は 2.4%であり（モジュール 2.6.4 第 4.2.1 項）、非結合型のダリドレキサントの平均遊離血漿中濃度は 7.4 ng/mL（min - max：4.6 - 9.9 ng/mL）に相当した。

2.2.2.2 食餌提示による覚醒能（食餌活性化試験）

同じイヌの効力試験の中で、覚醒中に顕著な外部刺激を提示して（例えば食餌提示）その後の行動評価をエンドポイントの一つとして設定した。追加のエンドポイントとして、ダリドレキサントの脱力発作イベント誘発可能性を検討した。脱力発作は、情動がトリガーとなる意識障害を伴わない、突然の筋力低下発作であり、オレキシン系の機能低下と関連する疾患であるナルコレプシーにおいて典型的に見られる発作である[Mieda 2017]。イヌの行動及び筋力低下の徴候を、2 台のカメラによるビデオ録画の詳細な検査、並びに同時に実施した EMG 検査及び EEG 記録により評価した（モジュール 4.2.1.1.6）。

ダリドレキサント投与後 3 時間で食餌を提示すると、いずれの用量でも、イヌは直ちに覚醒した。検討した最高用量である 90 mg/イヌ（5.5～7.1 mg/kg）まで、いずれの測定時間でもカタプレキシーが想定される筋力低下の徴候は見られなかった。

3. 副次的薬理試験

3.1 ダリドレキサント及びその代謝物（M1、M3 及び M10）の *in vitro* 選択性

120 種類を超える酵素アッセイ及び放射性リガンド結合アッセイの確立したパネルにおいて、ダリドレキサント並びに主要代謝物（M1、M3 及び M10）は選択されたイオンチャネル、受容体、トランスポーター及び酵素に対してリスク評価に関連するオフターゲット活性を示さなかった。これらのターゲットには、薬物乱用と関連した CNS ターゲット［カンナビノール受容体、オピオイド受容体、セロトニン受容体、GABA 受容体、モノアミントランスポーター、グルタミン酸 N メチル D アスパラギン酸（NMDA）受容体及び種々のイオンチャネル］も含まれた。

ダリドレキサントは 10 μM で、検討したターゲットに対して、リスク評価に関係するレベルでの結合又は活性を示さなかった。ドーパミントランスポーターに対しては放射性リガンド結合を 52%阻害し、生物学的ソースとしてヒト単球系のヒト U937 細胞を用いたホスホジエステラーゼ 4（PDE4）活性を、81%阻害した（モジュール 4.2.1.2.1、モジュール 4.2.1.2.2）。フォローアップ機能アッセイから、ドーパミントランスポーター及び他のターゲットに対してリスク評価に関連する活性を示さないことを確認した。CHO-S 細胞発現ドーパミントランスポーターの機能アッセイ（細胞への ^{3}H 標識ドーパミン取り込みを指標）においてダリドレキサントは 14.3 μM の IC_{50} 値で阻害し、ヒト胎児腎（HEK）293 細胞発現ヒト組換え型アドレナリン β_3 受容体の機能アッセイ（アデニル酸シクラーゼ活性を指標）において 16.7 μM の IC_{50} 値で阻害した（モジュール 4.2.1.2.3、モジュール 4.2.1.2.4）。

ヒト用量 50 mg/日投与時のダリドレキサントの平均 C_{max} は 1006 ng/mL であること（AC-078-105 試験、モジュール 5.3.3.3.1）及び *in vitro* ヒト血漿の非結合型分率が 0.3%であること（モジュール 2.6.4 第 4.2.1 項）から、ダリドレキサントの平均遊離 C_{max} は 3.0 ng/mL（6.7 nM）である。ドーパミントランスポーター及びアドレナリン β_3 受容体に対する IC_{50} 値及び PDE4 に対して 81%阻害作用を示す濃度は、50 mg/日投与時のヒト平均遊離 C_{max} よりもそれぞれ約 2134、2493 及び 1493 倍高濃度であることから、ダリドレキサントに関連するオフターゲット活性はヒトのリスク評価に関係するとは考えられない。

M1 は 10 μM で、ヒトアンジオテンシン II タイプ 1 受容体（AT_1）へのラジオリガンド結合を 63%阻害した。組換え型受容体発現 HEK293 細胞を用いた機能アッセイ（細胞内カルシウム遊離を指標）において、M1 はヒト AT_1 を 24 μM の IC_{50} 値で阻害した。また、M1 はヒトタキキニン NK_3 受容体（NK_3）へのラジオリガンド結合を 54%阻害し、組換え型受容体発現 CHO-K1 細胞を用いた機能アッセイ（細胞内カルシウム遊離を指標）において、20 μM の IC_{50} 値で機能的拮抗薬活性を示した（モジュール 4.2.1.2.5、モジュール 4.2.1.2.6）。さらに、M1 はヒトオピオイド κ 受容体へのラジオリガンド結合を 58%阻害し、組換え型受容体発現 CHO-K1 細胞を用いた機能アッセイ（アデニル酸シクラーゼ活性）において 14.6 μM の 50%効果濃度（EC_{50}）値で作動薬活性を示した（モジュール 4.2.1.2.5、モジュール 4.2.1.2.4）。

ヒト用量 50 mg/日投与時の M1 の平均 C_{max} は 251 ng/mL であること（AC-078-105 試験、モジュール 5.3.3.3.1）及び *in vitro* ヒトの血漿非結合型分率が 0.1%であることから、M1 の平均遊離 C_{max} は 0.25 ng/mL（0.54 nM）である。M1 が AT_1 及び NK_3 結合を 50%阻害する濃度、並びにオピ

オイド κ 受容体を 50%活性化する濃度は、50 mg/日投与時のヒト平均遊離 C_{max} よりもそれぞれ約 44000、37000 及び 27000 倍高いことから、M1 に関連するオフターゲット活性はヒトのリスク評価に関係するとは考えられない。

M3 は 10 µM でヒトドーパミントランスポーターの放射線リガンド結合を 68%阻害したが（モジュール 4.2.1.2.7）、組換え型トランスポーター発現 CHO-S 細胞を用いた機能アッセイ（細胞への ^{3}H 標識ドーパミン取り込み）において、30 µM までドーパミントランスポートを有意に阻害しなかった（阻害作用 50%未満）（モジュール 4.2.1.2.4）。

M10 は検討したターゲットのすべてに対して活性を示さなかった（モジュール 4.2.1.2.8）。

結論として、ダリドレキサント及び 3 種類の主要代謝物には、ヒトのリスク評価に関係するオフターゲット作用は確認されなかった。

4. 安全性薬理試験

安全性薬理試験において、*in vitro* でのヒト ether-à-go-go 関連遺伝子（hERG）活性、並びに薬理用量及びそれを超える用量投与後のラット、イヌ及びモルモットの生理機能におけるダリドレキサントの影響を検討した。これらの試験の概要及び医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準（GLP）適用の有無を表 8 及びモジュール 2.6.3.4 にまとめた。

ダリドレキサントは中枢神経系、心血管系及び呼吸器系においてリスク評価に関係する有害事象を示さなかった。

表 8. ダリドレキサントの安全性薬理試験の概要

試験系 試験の種類 モジュール番号	GLP 適用	投与経路	動物種/試験系	投与期間	用量 1)/濃度	性別/動物数
中枢神経系						
体温に対する影響 （モジュール 4.2.1.1.4）	非適用	強制経口	Wistar ラット	単回	0, 10, 30,100, 300 mg/kg	雄 8
Irwin 法を用いたラットの一般行動への影響 （モジュール 4.2.1.3.1）	適用	強制経口	Wistar ラット	単回	0, 100, 300,1000 mg/kg	雄 6/群
心血管系						
In vitro での hERG イオンチャネルに対する影響 （モジュール 4.2.1.3.2）	適用	*in vitro*	安定的に遺伝子導入した HEK293 細胞	N/A	3.0, 10, 30, 60 μM	N/A
テレメトリー装置装着、覚醒下でのラットの心血管系パラメータ、体温及び自発運動量に対する影響 （モジュール 4.2.1.3.3）	非適用	強制経口	覚醒 Wistar ラット	単回	0, 300 mg/kg	雄 5/群
テレメトリー装置装着、覚醒下での SHR の心血管系パラメータ、体温及び自発運動量に対する影響 （モジュール 4.2.1.3.4）	非適用	強制経口	覚醒 SHR	単回	0, 300 mg/kg	雄 6/群
心血管系テレメトリー装置装着、麻酔下でのモルモットの心血管系パラメータに対する影響 （モジュール 4.2.1.3.5）	非適用	静脈内	麻酔 Dunkin Hartley モルモット	単回	0, 3, 10, 30 mg/kg 20 分間 (遊離塩基投与)	被験薬群 雄 6 対照群 雄 5
テレメトリー装置装着、覚醒下でのイヌの心血管系パラメータ及び体温に対する影響 （モジュール 4.2.1.3.6）	適用	強制経口	覚醒 Beagle イヌ	単回、4 用量 (クロスオーバー法)	0, 10, 30, 100 mg/kg	雄 3+雌 3
呼吸器系						
全身プレチスモグラフィー試験による雄ラットの呼吸器系パラメータに対する影響 （モジュール 4.2.1.3.7）	適用	強制経口	Wistar ラット	単回	0, 100, 300, 1000 mg/kg	雄 8/群

1) 特に記載ない限り ACT-541468A を使用、全試験とも用量は遊離塩基換算
GLP：医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準、HEK：ヒト胎児腎、hERG：ヒト ether-à-go-go 関連遺伝子、N/A：非適用、SHR：自然発症高血圧ラット

4.1 中枢神経系

4.1.1 体温に対する影響（非 GLP 試験）

正常雄 Wistar ラット（n＝8）の睡眠－覚醒サイクルにおけるダリドレキサントの影響を検討し

た効力を裏付ける薬理試験において、皮下に埋め込んだテレメトリー装置を用いて体温を測定した（2.2.1.2 項）。

夜間（活動相）の始めにダリドレキサント塩酸塩［0（媒体）、10、30、100 又は 300 mg/kg、遊離塩基相当］を単回強制経口投与した。投与間に 3 日間の休薬期間をおいて、各ラットに全用量をクロスオーバー法で投与した（モジュール 4.2.1.1.4）。

ダリドレキサント投与後 6 時間の間に平均体温は低下した（一元配置 ANOVA、$p = 0.0014$）。30 及び 300 mg/kg で体温はそれぞれ 36.1 ± 0.2（平均値 ± 標準誤差）及び 35.9 ± 0.2°C であり、媒体群（36.5 ± 0.2°C）に比べて統計学的に有意に低かった（ANOVA 後の post-hoc Dunnett 多重比較法の検定で、それぞれ $p < 0.05$ 及び $p < 0.01$）。低体温を引き起こすことが知られている[Mailliet 2001]ゾルピデム等の GABA-A 受容体モジュレーターと対照的に、300 mg/kg のダリドレキサントを夜間（活動相）に投与した後の平均体温は、正常な生理条件で日中（非活動期）に測定した非処置ラットの平均体温より低くなかった（それぞれ 35.9 ± 0.2 及び 35.6 ± 0.2°C）。

結論として、雄ラットへの最高 300 mg/kg までのダリドレキサントの投与で体温は低下したものの、その数値は正常な生理的範囲内であった。

4.1.2 Irwin 試験（GLP 試験）

ダリドレキサントのラット CNS 機能における影響を、主に中枢及び末梢神経系機能をカバーする一連の行動的及び生理的（反射測定）パラメータを用いた Irwin 試験で検討した。評価は盲検法で実施した。4 群の雄 Wistar ラット（n = 6/群）にダリドレキサント［0（媒体）、100、300 又は 1000 mg/kg］を強制経口投与し、投与後 24 時間まで行動変化を評価した（モジュール 4.2.1.3.1）。

刺激のない状態でのダリドレキサントの投与により、全用量で用量依存的な活動及び覚醒状態の低下が見られた。これらの変化は眼瞼閉鎖状態の増加、姿勢及び覚醒のスコア低下並びに探索的行動の低下を伴っていた。これらのラットを刺激すると通常の反応を示した。自律神経機能を示す排尿スコアはダリドレキサント投与群で媒体群よりも低かった。全用量で一過性の用量依存的な直腸温低下が見られ、1000 mg/kg 投与後 5 時間で投与前値からの直腸温の最大低下が観察された（–2.1°C vs 媒体群：–0.9°C）。全用量で全身の安静時振戦の頻度及び重症度が増加したが、これは体温の低下に関連すると考えられた。

最高 300 mg/kg までの用量での全所見はダリドレキサントの薬理作用に関連しており、したがって有害事象とは判断されず、300 mg/kg の用量が無毒性量（NOAEL）であると考えられた。雄ラットの 4 週間投与毒性試験における 300 mg/kg の用量での平均 C_{max} は 8030 ng/mL であり（モジュール 2.6.6 第 9.4 項）、遊離 C_{max} の 265 ng/mL に相当した（これは 50 mg/日の用量をヒトに曝露したときの約 88 倍）。

4.2 心血管系

心臓の再分極に対するダリドレキサントの影響を、*in vitro* ヒト細胞アッセイ、並びにいずれもテレメトリー装置を埋め込んだ麻酔モルモット、覚醒正常血圧ラット、覚醒高血圧ラット（SHR）及び覚醒 Beagle イヌを用いた *in vivo* 試験において検討した。ラット及びイヌの試験では、血圧及び心拍数に対するダリドレキサントの影響も検討した。

4.2.1 hERG チャネルアッセイ（GLP 試験）

hERG 遺伝子導入 HEK293 細胞のホールセルパッチクランプアッセイにより、カリウム電流を測定し、ダリドレキサント（3、10、30 及び 60 μM）適用前後の影響を検討した（モジュール 4.2.1.3.2）。

ダリドレキサントは濃度依存的に内向き及び外向きカリウム電流を抑制し、20%阻害濃度（IC_{20}）及び IC_{50} 値はそれぞれ 7.4 μM（3400 ng/mL）及び 25.0 μM（11500 ng/mL）であった。これらのデータから、hERG チャネルを介するカリウム電流をダリドレキサントが 20%を超えて抑制する濃度は、予定最高治療用量である 50 mg/日を健康なヒトへ投与したときの遊離 C_{max} の約 1100 倍であることが示された。

4.2.2 *In vivo* 試験での血行動態及び心臓のパラメータ

4.2.2.1 覚醒 Wistar ラットの血行動態及び心臓のパラメータ、体温及び自発運動量に対する影響（非 GLP 試験）

腹腔内にテレメトリー装置を装着した正常血圧の覚醒雄 Wistar ラット（n = 5/群）を用いて、ダリドレキサント単回投与による平均動脈圧、心拍数、体温、自発運動量及び心電図（ECG）間隔への影響を検討した（モジュール 4.2.1.3.3）。

ダリドレキサントの 300 mg/kg の単回経口投与により心拍数（最大変化、–42 bpm）、体温（最大変化、–0.3°C）及び自発運動量（最大変化、–55%）が媒体群と比較していずれも低下した。これらの心拍数、体温及び自発運動量への影響はいずれもダリドレキサントの睡眠促進作用に関連するものと考えられ、有害事象とは判断されなかった。平均動脈圧及び ECG 間隔（PR、QRS 及び RR）への影響は見られなかった。

これらのダリドレキサントの影響は軽度であり、薬理活性に関連するものであることから、NOAEL は 300 mg/kg に設定された。この用量に相当する平均 C_{max} は 4757 ng/mL であり、遊離 C_{max} は 157 ng/mL であった（50 mg/日の用量をヒトに曝露したときの約 52 倍に相当）。

4.2.2.2 覚醒 SHR の血行動態及び心血管系パラメータ、体温及び自発運動量に対する影響（非 GLP 試験）

腹腔内にテレメトリー装置を装着した覚醒雄 SHR（n = 6/群）を用いて、ダリドレキサント単回投与による平均動脈圧、心拍数、体温、自発運動量への影響を検討した（モジュール 4.2.1.3.4）。

ダリドレキサント、300 mg/kg の単回経口投与により平均動脈圧（最大変化、–8 mmHg）、心拍数（最大変化、–40 bpm）、体温（最大変化、–0.5°C）及び自発運動量（最大–63%）が媒体群と比較していずれも軽度低下した。これらの軽度の変化は、SHR のみで見られた血圧低下を除き、全般的に 300 mg/kg 投与の正常血圧ラットで見られた所見と同様であった。血圧、心拍数、体温及び自発運動量への影響はいずれもダリドレキサントの薬理作用に関連するものと推察され、有害事象とは判断されなかった。

NOAEL は 300 mg/kg に設定された。この用量に相当する平均 C_{max} は 5650 ng/mL であり、遊離 C_{max} は 186 ng/mL（50 mg/日の用量をヒトに曝露したときの約 62 倍に相当）であった。

4.2.2.3 麻酔モルモットの血行動態及び心臓のパラメータに対する影響（非 GLP 試験）

テレメトリー装置を装着した麻酔モルモット（ダリドレキサント群 n = 6/群、媒体群 n = 5/群）を用いて、ダリドレキサントの ECG 間隔、平均動脈圧、心拍数への影響を検討した（モジュール 4.2.1.3.5）。ダリドレキサントは 3、10 及び 30 mg/kg の各用量を累積的に 20 分間ずつ静脈内持続注入した。

ダリドレキサントは最高 30 mg/kg/20 分間の用量まで、媒体群と比べて平均動脈圧、心拍数及び ECG 間隔にいかなる影響も及ぼさなかった。

モルモットの心血管系における無作用量（NOEL）は 30 mg/kg に設定され、この用量に相当する平均 C_{max} は 23265 ng/mL であった。

4.2.2.4 覚醒 Beagle イヌの血行動態及び心臓のパラメータ及び体温に対する影響（GLP 試験）

テレメトリー装置を装着した覚醒非拘束 Beagle イヌ（雄及び雌各 n = 3）を用いて、ダリドレキサントの動脈圧、心拍数、ECG パラメータ及び体温に及ぼす影響を検討した。各イヌにダリドレキサント［0（媒体）、10、30 及び 100 mg/kg］の各用量をクロスオーバー法で経口投与し、用量間に 3 日間の最短休薬期間を設定した。各パラメータ測定は投与前の少なくとも 20 時間前に開始し、投与後 24 時間まで続けた（モジュール 4.2.1.3.6）。

軽度の心拍数の低下及びそれに関連した RR、PR 及び QT 間隔の延長が全用量の投与後 4 時間、及び 30 mg/kg 以上の投与後 7 時間で観察された。これらの所見は用量依存的ではなく、また、いずれの用量でも補正 QT 間隔（QTc）には影響が見られなかった。また、いずれの用量でも、動脈圧及び体温に影響は見られなかった。

これらの ECG 間隔の軽度延長の所見から NOAEL は 100 mg/kg に設定された。その用量に相当する平均 C_{max} は雄で 8900 ng/mL、雌で 9550 ng/mL であった。その用量での遊離 C_{max} は雄で 445 ng/mL、雌で 478 ng/mL であり、臨床での最高用量である 50 mg/日投与で見られる濃度の少なくとも約 140 倍であった。

4.3 呼吸器系

4.3.1 ラット呼吸器機能の全身プレチスモグラフィーによる評価（GLP 試験）

全身プレチスモグラフィーを用いて、覚醒非拘束雄 Wistar ラット（n = 8/群）の呼吸器系へのダリドレキサントの影響を検討した。ラットにダリドレキサント［0（媒体）、100、300 及び 1000 mg/kg］を単回経口投与し、呼吸器パラメータ［呼吸数、1 回換気量、吸気時間、呼気時間、最大吸気流量、最大呼気流量、緩和時間、分時拍出量及び気道狭窄指標（Penh）］の変化を投与後 240 分まで連続的に記録した（モジュール 4.2.1.3.7）。

ダリドレキサントはいずれの用量でも呼吸器機能に影響を及ぼさなかった。したがって、呼吸器系の NOEL は 1000 mg/kg に設定された。雄ラットの 4 週間毒性試験において 1000 mg/kg の用量での平均 C_{max} は 12600 ng/mL であり（モジュール 2.6.6 第 9.4 項）、遊離 C_{max} の 529 ng/mL に相当した（これは 50 mg/日の用量をヒトに曝露したときの約 175 倍）。

5. 薬力学的薬物相互作用試験

ダリドレキサントの非臨床薬力学的薬物相互作用試験は実施しなかった。

6. 考察及び結論

ダリドレキサントは不眠症治療薬に特化して開発された、作用発現が早く持続的な作用を有する高活性 DORA である。

オレキシン系は覚醒及び警戒状態の調節に重要であり[de Lecea 2012] [Sakurai 2007] [Scammell 2017]、哺乳類の種を超えて高度に保存されている[Soya 2020]。オレキシン産生ニューロンは主に覚醒状態で活性化しており、細胞外オレキシンレベルは、目覚めの間及び高度覚醒期間中継続して最高値を維持している[Blouin 2013]。

不眠症は過覚醒疾患として説明されている[Buysse 2011] [Levenson 2015] [Roth 2007]。この疾患において、オレキシンシグナルが恒常的に睡眠を抑制した結果、持続的な覚醒状態に至ると考えられている[Modirrousta 2005] [Tang 2017] [Zeitzer 2003]。脳内のすべての主要な覚醒促進領域に OX1R 及び OX2R は存在し[Eggermann 2001] [Hagan 1999] [Lee 2005] [Liu 2002] [Yamanaka 2002]、それらの受容体をダリドレキサントのような DORA が阻害することにより、この異常な過覚醒状態を減弱することが可能である。

6.1 *In vitro* 及び *in vivo* の効力を裏付ける試験

これまでに示したデータから、ダリドレキサントはラット、イヌ及びヒトにおいていずれも類似の高い効力を示す、両オレキシン受容体（OX1R 及び OX2R）に対して同等の拮抗薬であることが示された。ダリドレキサントは、オレキシンと同じ受容体結合部位において競合するオルソステリック拮抗薬であり、オレキシン非存在下でオレキシン受容体に結合すると低解離速度のため持続性の拮抗作用を示す。これらの性質のため、非持続性拮抗薬[Swinney 2015]よりも高い効力が期待される。

ダリドレキサント投与により誘発する睡眠は、容易に覚醒可能な睡眠であることがラット及びイヌで示された。ダリドレキサントの単回経口投与により両種ともに睡眠潜時が短縮し、用量依存的にノンレム睡眠及びレム睡眠時間が延長した。総睡眠時間に占めるノンレム睡眠及びレム睡眠時間の相対的割合は一定に保たれたことから、ダリドレキサント投与下での睡眠構成は生理的睡眠パターンと同程度であることが示された。

運動又は認知機能を損なうことなく覚醒できること（容易に覚醒可能な睡眠）が自然睡眠に重要な特徴であり、睡眠促進剤に望ましい特性である。睡眠促進用量のダリドレキサント投与ラット及びイヌはいずれも直ちに覚醒でき、運動機能試験（ラット）又は顕著な外部刺激提示（例えば食餌提示、イヌ）による行動評価で正常な行動を示した。これらの知見からダリドレキサントによって促進される睡眠は覚醒させやすい性質を持つ睡眠であることが説明できる。

対照的に、GABA-A 受容体モジュレーターであるゾルピデムは総睡眠時間に占めるノンレム睡眠及びレム睡眠時間の相対的割合を変化させ、ラットの運動機能を障害することが報告されている[Beuckmann 2019] [Boss 2014] [Steiner 2011]。

ダリドレキサントの主要代謝物（M1、M3 及び M10）のヒト OX1R に対する阻害作用の効力

はダリドレキサントの 1/40 以下であり、OX2R に対しては 1/8 以下であった（表 2）。M3 及び M10 は多剤耐性タンパク質 1/P 糖タンパク質（MDR1/P-gp）排出ポンプの基質であり、脳内曝露は限定される。高い血漿タンパク質結合及び MDR1/P-gp 基質としての性質から、これら 3 種の代謝物のヒト脳内遊離濃度は *in vitro* で定量した OX1R 及び OX2R のそれぞれの K_b 値未満である（モジュール 2.6.4 第 4.2.1 及び 4.6.2 項）。したがって、ダリドレキサント代謝物はヒトにおける睡眠促進作用に寄与しないと推察される。

ダリドレキサント及び主要代謝物は臨床試験で得られる濃度で、確立した評価系で選択されたオフターゲット受容体、トランスポーター、酵素及びイオンチャネルに対して放射性リガンド結合を阻害せず、又は活性を示さなかった。

結論として、ダリドレキサントはラット及びイヌにおいて覚醒状態を低下させ、容易に覚醒可能な睡眠を促進したが、生理的睡眠構成は保持したままであった。ダリドレキサント代謝物はヒトにおける睡眠促進作用に寄与しないと推察される。

6.2 安全性薬理試験

数種の動物種における主要器官系の生理機能へのダリドレキサントの影響を薬理用量及びそれを超える用量で検討した。主要代謝物（M1、M3 及び M10）のラット及びイヌの血漿中曝露はヒトの最高治療用量である 50 mg/日投与時の曝露と同程度又はそれ以上であり（モジュール 2.6.4 第 5.2 項及びモジュール 2.7.2）、安全性薬理の観点ですべての主要代謝物の十分な評価が可能であると考えられる。

6.2.1 中枢神経系リスク評価

ダリドレキサントは検討した全用量（100、300 及び 1000 mg/kg）で雄ラットの活動性及び覚醒状態を低下させた（Irwin 試験）。これらの所見はダリドレキサントの薬理活性に関連しており、有害事象とは判断しなかった。

正常及び高血圧ラットへの 300 mg/kg の単回経口投与により体温が軽度低下したが、それは生理的なサーカディアンリズムの範囲内であった。Irwin 試験における、より高用量（1000 mg/kg）の単回経口投与では、対照群の体温と比べて最大の低下（約 1.2°C）が見られた。体温への影響は、げっ歯類特有の恒常性調節に影響を及ぼすダリドレキサントの過剰な薬力学的反応と関係していると推察された。ラットでは、体温調節に関与する脳幹部位にオレキシンニューロンが投射している[Berthoud 2005]。この領域へのオレキシンの注入により交感神経活性が強まり、褐色脂肪組織の熱産生が増加する[Ciriello 2003a] [Ciriello 2003b] [Madden 2012]。一方でオレキシン受容体拮抗によりこのような作用は低下する。ラット及びマウスのような小動物では褐色脂肪組織が熱産生の主たる部位であり、低温環境での熱産生の最大 2/3 に寄与している一方、大動物では褐色脂肪組織はほとんどなく、体温維持への褐色脂肪組織の寄与はごくわずかである[van Marken Lichtenbelt 2011]。ラットと同程度かそれ以上のダリドレキサントの曝露があるイヌでは体温への影響は見られず、他の DORA である almorexant のヒトへの投与でも同様に体温への影響はない[Hoever 2012]。第 1 相から第 3 相の臨床試験において、ダリドレキサントは最高 200 mg/日まで体温に影響を及ぼさなかった（モジュール 2.7.4 第 2.1 項）。

6.2.2 心血管系リスク評価

In vitro でダリドレキサントは濃度依存的に内向き及び外向きカリウム電流を抑制し、IC_{20} 値は 3400 ng/mL であった。ヒトに 50 mg/日を投与した時の C_{max} は 1006 ng/mL であり（AC-078-105 試験、モジュール 5.3.3.3.1）、ヒト血漿の非結合型分率が 0.3%である（モジュール 2.6.4 第 4.2.1 項）ことから遊離ダリドレキサントの C_{max} は 3.0 ng/mL と算出される。したがって、ダリドレキサントのヒト最高遊離濃度と hERG チャネルに対する IC_{20} 値の間に約 1100 倍安全域が設定される。

麻酔モルモット（最高用量で 30 mg/kg/20 分、単回静脈内持続投与）及び覚醒イヌ（100 mg/kg、単回経口投与）において、血行動態及び心臓のパラメータは影響を受けなかった。hERG チャネル遮断の安全域が大きいこと及び *in vivo* において QTc 間隔への影響がないことから、ヒトにおいてダリドレキサント誘発 QT 延長のリスクは低いと考えられる。

ダリドレキサントは正常血圧 Wistar ラットの平均動脈圧には影響せず、SHR でのみ平均動脈圧を低下させた。ダリドレキサントはラット及びイヌの心拍数も軽度低下させたが、これはダリドレキサントの睡眠促進作用と関連すると考えられたため、有害事象とはみなさなかった。SHR において、CNS の OX2R の阻害により動脈圧及び心拍数がともに低下したとの報告がある[Lee 2013]。したがって、当該試験での動脈圧及び心拍数の低下はダリドレキサントの薬理作用と関連するものと考えられ、それらの変化が軽度であったことから有害事象とはみなさなかった。

6.2.3 呼吸器系リスク評価

ダリドレキサントは、雄ラットへの最高 300 mg/kg までの投与で体温は低下したものの検討した最高用量の 1000 mg/kg まで雄ラットの呼吸器系機能に影響を及ぼさなかった。

以上、安全性薬理試験の結果からヒトへの投与に際して安全性の懸念を生じないものと判断した。

7. 参考文献

[Berthoud 2005] Berthoud HR, Patterson LM, Sutton GM, Morrison C, Zheng H. Orexin inputs to caudal raphé neurons involved in thermal, cardiovascular, and gastrointestinal regulation. Histochem Cell Biol. 2005;123(2):147-56.（モジュール 4.3.3）

[Beuckmann 2019] Beuckmann CT, Ueno T, Nakagawa M, Suzuki M, Akasofu S. Preclinical in vivo characterization of lemborexant (E2006), a novel dual orexin receptor antagonist for sleep/wake regulation. Sleep. 2019;42(6).:doi.org/10.1093/sleep/zsz076（モジュール 4.3.5）

[Blouin 2013] Blouin AM, Fried I, Wilson CL, Staba RJ, Behnke EJ, Lam HA, et al. Human hypocretin and melanin-concentrating hormone levels are linked to emotion and social interaction. Nat Commun. 2013;4:1547.:doi.org/10.1038/sleep/ncomms2461（モジュール 4.3.6）

[Boss 2014] Boss C, Roch-Brisbare C, Steiner MA, Treiber A, Dietrich H, Jenck F, et al. Structure-activity relationship, biological, and pharmacological characterization of the proline sulfonamide ACT-462206: a potent, brain-penetrant dual orexin 1/orexin 2 receptor antagonist. ChemMedChem. 2014;9:2486-96.（モジュール 4.3.7）

[Buysse 2011] Buysse DJ, Germain A, Hall M, Monk TH, Nofzinger EA. A Neurobiological model of

insomnia. Drug Discov Today Dis Models. 2011;8(4):129-37.（モジュール 4.3.12）

[Ciriello 2003a] Ciriello J, de Oliveira CV. Cardiac effects of hypocretin-1 in nucleus ambiguus. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2003a;284:R1611-20.（モジュール 4.3.16）

[Ciriello 2003b] Ciriello J, Li Z, de Oliveira CV. Cardioacceleratory responses to hypocretin-1 injections into rostral ventromedial medulla. Brain Res. 2003b;991:84-95.（モジュール 4.3.17）

[de Lecea 2012] de Lecea L. Hypocretins and the neurobiology of sleep-wake mechanisms. Prog Brain Res. 2012;198:15-24.（モジュール 4.3.22）

[Eggermann 2001] Eggermann E, Serafin M, Bayer L, Machard D, Saint-Mleux B, Jones BE, et al. Orexins/hypocretins excite basal forebrain cholinergic neurons. Neuroscience. 2001;108(2):177-81.（モジュール 4.3.24）

[Gotter 2013] Gotter AL, Winrow CJ, Brunner J, Garson SL, Fox SV, Binns J, et al. The duration of sleep promoting efficacy by dual orexin receptor antagonists is dependent upon receptor occupancy threshold. BMC Neurosci. 2013;14:90.（モジュール 4.3.34）

[Hagan 1999] Hagan JJ, Leslie RA, Patel S, Evans ML, Wattam TA, Holmes S, et al. Orexin A activates locus coeruleus cell firing and increases arousal in the rat. Proc Natl Acad Sci USA. 1999;96:10911-6.（モジュール 4.3.35）

[Hoever 2012] Hoever P, de Haas SL, Dorffner G, Chiossi E, van Gerven JM, Dingemanse J. Orexin receptor antagonism: an ascending multiple-dose study with almorexant. J Psychopharmacol. 2012;26(8):1071-80.（モジュール 4.3.38）

[Lee 2005] Lee MG, Hassani OK, Jones BE. Discharge of identified orexin/hypocretin neurons across the sleep-waking cycle. J Neurosci. 2005;25(28):6716-20.（モジュール 4.3.45）

[Lee 2013] Lee Y-H, Dai Y-W, Huang S-C, Li T-L, Hwang L-L. Blockade of central orexin 2 receptors reduces arterial pressure in spontaneously hypertensive rats. Exp Physiol. 2013;98(7):1145-55.（モジュール 4.3.46）

[Levenson 2015] Levenson JC, Kay DB, Buysse DJ. The pathophysiology of insomnia. Chest. 2015;147(4):1179-92.（モジュール 4.3.47）

[Liu 2002] Liu RJ, van den Pol AN, Aghajanian GK. Hypocretins (orexins) regulate serotonin neurons in the dorsal raphe nucleus by excitatory direct and inhibitory indirect actions. J Neurosci. 2002;22(21):9453-64.（モジュール 4.3.51）

[Madden 2012] Madden CJ, Tupone D, Morrison SF. Orexin modulates brown adipose tissue thermogenesis. Biomol Concepts. 2012;3(4):381-6.（モジュール 4.3.52）

[Mailliet 2001] Mailliet F, Galloux P, Poisson D. Comparative effects of melatonin, zolpidem and diazepam on sleep, body temperature, blood pressure and heart rate measured by radiotelemetry in Wistar rats. Psychopharmacology. 2001;156:417-26.（モジュール 4.3.55）

[Mieda 2017] Mieda M. The roles of orexins in sleep/wake regulation. Neurosci Res. 2017;118:56-65.（モジュール 4.3.58）

[Modirrousta 2005] Modirrousta M, Mainville L, Jones BE. Orexin and MCH neurons express c-Fos differently after sleep deprivation vs. recovery and bear different adrenergic receptors. Eur J Neurosci. 2005;21:2807-16.（モジュール 4.3.59）

[Roth 2007] Roth T. Insomnia: definition, prevalence, etiology, and consequences. J Clin Sleep Med. 2007;3(5 Suppl):S7-10.（モジュール 4.3.69）

[Sakurai 2007] Sakurai T. The neural circuit of orexin (hypocretin): maintaining sleep and wakefulness. Nat Rev Neurosci. 2007;8(3):171-81.（モジュール 4.3.72）

[Scammell 2017] Scammell TE, Arrigoni E, Lipton JO. Neural circuitry of wakefulness and sleep. Neuron. 2017;93(4):747-65.（モジュール 4.3.73）

[Soya 2020] Soya S, Sakurai T. Evolution of orexin neuropeptide system: structure and function. Front Neurosci. 2020;14:691.（モジュール 4.3.76）

[Steiner 2011] Steiner MA, Lecourt H, Strasser DS, Brisbare-Roch C, Jenck F. Differential effects of the dual orexin receptor antagonist almorexant and the $GABA_A$-α_1 receptor modulator zolpidem, alone or combined with ethanol, on motor performance in the rat. Neuropsychopharmacology. 2011;36:848-56.（モジュール 4.3.77）

[Swinney 2015] Swinney DC, Haubrich BA, Van Liefde I, Vauquelin G. The role of binding kinetics in GPCR drug discovery. Curr Top Med Chem. 2015;15(24):2504-22.（モジュール 4.3.80）

[Taheri 2000] Taheri S, Sunter D, Dakin C, Moyes S, Seal L, Gardiner J, et al. Diurnal variation in orexin A immunoreactivity and prepro-orexin mRNA in the rat central nervous system. Neurosci Lett. 2000;279:109-12.（モジュール 4.3.81）

[Tang 2017] Tang S, Huang W, Lu S, Lu L, Li G, Chen X, et al. Increased plasma orexin-A levels in patients with insomnia disorder are not associated with prepro-orexin or orexin receptor gene polymorphisms. Peptides. 2017;88:55-61.（モジュール 4.3.82）

[van Marken Lichtenbelt 2011] Van Marken Lichtenbelt WD, Schrauwen P. Implications of nonshivering thermogenesis for energy balance regulation in humans. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2011;301:R285-96.（モジュール 4.3.87）

[Yamanaka 2002] Yamanaka A, Tsujino N, Funahashi H, Honda K, Guan J-l, Wang Q-P, et al. Orexins activate histaminergic neurons via the orexin 2 receptor. Biochem Biophys Res Commun. 2002;290(4):1237-45.（モジュール 4.3.92）

[Zeitzer 2003] Zeitzer JM, Buckmaster CL, Parker KJ, Hauck CM, Lyons DM, Mignot E. Circadian and homeostatic regulation of hypocretin in a primate model: implications for the consolidation of wakefulness. J Neurosci. 2003;23(8):3555-60.（モジュール 4.3.94）