

メマリー錠 5 mg
メマリー錠 10 mg
メマリー錠 20 mg
(メマンチン塩酸塩)

CTD 第 2 部 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

第一三共株式会社

目次

2.6.1 緒言	3
----------------	---

2.6.1 緒言

メマンチン塩酸塩 (3,5-Dimethyltricyclo [3.3.1.1^{3,7}] dec-1-ylamine monohydrochloride、[[図 2.6.1-1](#)参照]) はMerz + Co. GmbH & Co. (現 Merz Pharmaceuticals GmbH、以下、Merz 社) で開発され、ドパミン遊離促進作用を示すことから、主にパーキンソン症候群の治療薬として用いられてきた。近年、グルタミン酸神経系におけるN-methyl-D-aspartate (NMDA) 受容体チャネル阻害作用を有することが見出されたことを契機に、認知症患者に対する治療薬としての開発が進められ、2002年5月に欧州医薬品庁 (EMA) より「やや高度から高度アルツハイマー型認知症」治療薬として、2003年10月に米国食品医薬品局 (FDA) より「中等度から高度アルツハイマー型認知症」治療薬として承認された。更に2005年10月にはEMAより「中等度アルツハイマー型認知症」への適応が追加承認されている。

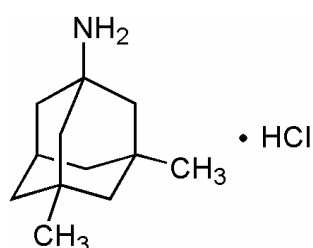


図 2.6.1-1 メマンチン塩酸塩の化学構造

アルツハイマー型認知症においては、グルタミン酸神経系の機能異常が関与しており、NMDA 受容体チャネルの過剰な活性化がその一つと考えられる。メマンチン塩酸塩は、NMDA 受容体チャネルに対して選択性と低親和性を示し、その結合・解離速度は速く、更にチャネル阻害作用は膜電位依存的であるという特徴を有している。この特徴は、従来の NMDA 受容体チャネル拮抗薬にはない性質であり、これによりメマンチン塩酸塩は、薬効用量では正常な記憶・学習機能に影響を及ぼすことなく、グルタミン酸によるシナプス可塑性の障害及び神経細胞毒性を抑制し、学習障害抑制作用を発揮する。また、この作用は既存のアルツハイマー型認知症治療薬である塩酸ドネペジル等のアセチルコリンエステラーゼ阻害薬とは異なる新規のメカニズムに基づくものである。

以上から、その作用メカニズムの違いにより、メマンチン塩酸塩はアルツハイマー型認知症に対して有用な新しい治療薬となり、本症に対する治療の選択肢が広がることが期待される。そこで、本邦においては、Merz 社よりライセンスを受けたサントリー株式会社医薬事業部 (申請時 アスピオファーマ株式会社、現 第一三共株式会社) が開発を行い、1日1回20mgの経口投与を推奨維持用量として申請することとした。

本項では、非臨床試験でのメマンチン塩酸塩に対する薬理、薬物動態、及び毒性評価の成績の概要に基づいて本薬の特徴を論述する。

メマリー錠 5 mg
メマリー錠 10 mg
メマリー錠 20 mg
(メマンチン塩酸塩)

CTD 第2部 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

第一三共株式会社

目次

2.6.2 薬理試験の概要文.....	7
2.6.2.1 まとめ.....	7
2.6.2.1.1 効力を裏付ける試験.....	7
2.6.2.1.1.1 NMDA 受容体に対する作用.....	7
2.6.2.1.1.1.1 NMDA 受容体チャネル親和性と選択性.....	7
2.6.2.1.1.1.2 NMDA 受容体チャネル阻害作用.....	7
2.6.2.1.1.1.3 NMDA 受容体チャネル阻害作用と LTP 形成抑制作用の比較.....	7
2.6.2.1.1.2 シナプス可塑性障害に対する作用.....	8
2.6.2.1.1.2.1 LTP 形成障害抑制作用.....	8
2.6.2.1.1.2.1.1 低濃度 Mg^{2+} 誘発 LTP 形成障害モデルにおける作用.....	8
2.6.2.1.1.2.1.2 NMDA 誘発 LTP 形成障害モデルにおける作用.....	8
2.6.2.1.1.2.2 学習障害抑制作用.....	8
2.6.2.1.1.2.2.1 NMDA 誘発学習障害抑制作用.....	8
2.6.2.1.1.3 神経細胞傷害に対する作用.....	8
2.6.2.1.1.3.1 神経細胞保護作用.....	8
2.6.2.1.1.3.1.1 $A\beta_{25-35}$ とグルタミン酸の併用により誘発される神経細胞傷害 に対する作用.....	8
2.6.2.1.1.3.1.2 グルタミン酸誘発神経細胞傷害に対する作用.....	8
2.6.2.1.1.3.1.3 NMDA 注入によるラット前脳基底部 (nbM) 破壊モデルにお ける作用.....	9
2.6.2.1.1.3.2 学習障害抑制作用.....	9
2.6.2.1.1.3.2.1 $A\beta_{1-40}$ とイボテン酸の両側海馬内注入ラットモデルにおける 学習障害抑制作用.....	9
2.6.2.1.1.4 代謝物の薬理作用.....	9
2.6.2.1.2 安全性薬理試験.....	9
2.6.2.1.2.1 一般症状・行動及び中枢神経系に及ぼす影響.....	9
2.6.2.1.2.2 呼吸・循環器系に及ぼす影響.....	10
2.6.2.1.2.3 自律神経系・平滑筋に及ぼす影響.....	10
2.6.2.1.2.4 消化器系に及ぼす影響.....	10
2.6.2.1.2.5 尿量・尿中電解質排泄に及ぼす影響.....	10
2.6.2.2 効力を裏付ける試験.....	11
2.6.2.2.1 NMDA 受容体に対する作用.....	11
2.6.2.2.1.1 NMDA 受容体チャネル親和性.....	11
2.6.2.2.1.2 各種受容体に対する親和性.....	11
2.6.2.2.1.3 NMDA 受容体チャネル阻害作用.....	12

2.6.2.2.1.4 NMDA 受容体チャネル阻害作用と LTP 形成抑制作用の比較	16
2.6.2.2.2 シナプス可塑性障害に対する作用	18
2.6.2.2.2.1 LTP 形成障害抑制作用	18
2.6.2.2.2.1.1 低濃度 Mg^{2+} 誘発 LTP 形成障害モデルにおける作用	18
2.6.2.2.2.1.2 NMDA 誘発 LTP 形成障害モデルにおける作用	19
2.6.2.2.2.2 学習障害抑制作用	21
2.6.2.2.2.2.1 NMDA 誘発学習障害抑制作用	21
2.6.2.2.3 神経細胞傷害に対する作用	22
2.6.2.2.3.1 神経細胞保護作用	22
2.6.2.2.3.1.1 $A\beta_{25-35}$ とグルタミン酸の併用により誘発される神経細胞傷害に対する作用	22
2.6.2.2.3.1.2 グルタミン酸誘発神経細胞傷害に対する作用	23
2.6.2.2.3.1.3 NMDA 注入によるラット前脳基底部 (nbM) 破壊モデルに対する作用	23
2.6.2.2.3.2 学習障害抑制作用	24
2.6.2.2.3.2.1 $A\beta_{1-40}$ とイボテン酸の両側海馬内注入ラットモデルにおける学習障害抑制作用	24
2.6.2.2.3.2.2 正常ラットの記憶・学習能に対する作用	31
2.6.2.2.4 代謝物の薬理	33
2.6.2.2.4.1 メマンチン代謝物の NMDA 受容体チャネル親和性	33
2.6.2.2.4.2 メマンチン代謝物の NMDA 受容体チャネル阻害作用	33
2.6.2.3 副次的薬理試験	35
2.6.2.4 安全性薬理試験	35
2.6.2.4.1 一般症状・行動及び中枢神経系に及ぼす影響	35
2.6.2.4.2 呼吸・循環器系に及ぼす影響	37
2.6.2.4.3 自律神経系・平滑筋に及ぼす影響	38
2.6.2.4.4 消化器系に及ぼす影響	38
2.6.2.4.5 尿量・尿中電解質排泄に及ぼす影響	38
2.6.2.5 薬力学的薬物相互作用	39
2.6.2.6 考察及び結論	39
2.6.2.7 図表	44
2.6.2.8 参考文献	45

略語一覧表

略語	英語名	和名又は内容説明
aCSF	Artificial cerebrospinal fluid	人工脳脊髄液
AD	Alzheimer's disease	アルツハイマー病 (アルツハイマー型認知症)
AMPA	Alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-isoxazole-4-propionic acid	アルファ-アミノ-3-ヒドロキシ-5-メチルイソキサゾール-4-プロピオン酸
A β	Amyloid beta	アミロイドベータ
CA1	Cornu ammonis 1	海馬アンモン角-領域 1
ChAT	Choline acetyltransferase	コリンアセチルトランスフェラーゼ
ED ₅₀	50% effective dose	50%有効量
fEPSP	Field excitatory postsynaptic potential	集合興奮性シナプス後電位
GABA	Gamma-aminobutyric acid	ガンマ-アミノ酪酸
hERG	Human ether-a-go-go-related gene	ヒト ether-a-go-go 関連遺伝子
IC ₅₀	50% inhibitory concentration	50%抑制濃度
Kd	Dissociation constant	解離定数
Ki	Inhibition constant	阻害定数
LTP	Long-term potentiation	長期増強
LV dp/dt max	The maximum first derivative of left ventricular pressure	左室内圧最大変化速度
MK-801	(+)-10,11-dihydro-5-methyl-5H-dibenzo[a,d]cyclohepten-5,10-imine	NMDA 受容体チャンネル拮抗薬
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide	細胞内ミトコンドリア脱水素酵素の基質(生細胞活性の測定に用いる)
nbM	Nucleus basalis magnocellularis	前脳基底部
NMDA	N-methyl-D-aspartate	N-メチル-D-アスパラギン酸
NMRI	Naval Medical Research Institute	マウスの系統名
PCP	Phenyl-cyclohexyl-piperidine (Phencyclidine)	フェンシクリジン
PTBBS	Peripheral type benzodiazepine binding site	末梢性ベンゾジアゼピン結合部位
QTc	Corrected QT interval of the electrocardiogram	心拍数で補正した心電図 QT 間隔
SD	Sprague-Dawley	ラットの系統名

化合物一覧表

化合物名	化学名	構造式
メマンチン	3,5-Dimethyltricyclo[3.3.1.1 ^{3,7}]dec-1-ylamine	
グルダントン体 ^{注1)}	(2 <i>S</i> ,3 <i>S</i> ,4 <i>R</i>)-5-{[(3,5-Dimethyltricyclo[3.3.1.1 ^{3,7}]dec-1-yl)amino]methyl}-3,4,5-trihydroxytetrahydrofuran-2-carboxylic acid	
7-ヒドロキシ体	3-Amino-5,7-dimethyltricyclo[3.3.1.1 ^{3,7}]decan-1-ol	
3-ヒドロキシメチル体	1-Amino-5-methyltricyclo[3.3.1.1 ^{3,7}]dec-3-yl-Methanol	
3-カルボキシル体	3-Amino-5-methyltricyclo[3.3.1.1 ^{3,7}]decane-1-carboxylic acid	
1-ヒドロキシ体	3,5-Dimethyltricyclo[3.3.1.1 ^{3,7}]decan-1-ol	
6-ヒドロキシ体	5-Amino-1,7-dimethyltricyclo[3.3.1.1 ^{3,7}]decan-2-ol	

注1) アミノ基にフラノース型グルクロン酸が結合した抱合体

化合物名	化学名	構造式
4-ヒドロキシ体	5-Amino-1,3-dimethyltricyclo[3.3.1.1 ^{3,7}]decan-2-ol	
1-ニトロ体	1,3-Dimethyl-5-nitrotricyclo[3.3.1.1 ^{3,7}]decane	
N-ヒドロキシ体	<i>N</i> -(3,5-Dimethyltricyclo[3.3.1.1 ^{3,7}]dec-1-yl)-hydroxylamine	
1-ニトロ-7-ヒドロキシ体	3,5-Dimethyl-7-nitrotricyclo[3.3.1.1 ^{3,7}]decan-1-ol	
N-ホルミル体	<i>N</i> -(3,5-Dimethyltricyclo[3.3.1.1 ^{3,7}]dec-1-yl)formamide	
8-ヒドロキシ体	1-Amino-5,7-dimethyltricyclo[3.3.1.1 ^{3,7}]decan-2-ol	

2.6.2 薬理試験の概要文

2.6.2.1 まとめ

メマンチン塩酸塩の効力を裏付ける試験として、(1) N-methyl-D-aspartate (NMDA) 受容体に対する作用、(2) シナプス可塑性障害に対する作用、及び(3) 神経細胞傷害に対する作用について検討した。

また、安全性薬理試験として、一般薬理試験ガイドライン¹⁾ で定められている試験を中心に検討した。

2.6.2.1.1 効力を裏付ける試験

2.6.2.1.1.1 NMDA受容体に対する作用

2.6.2.1.1.1.1 NMDA受容体チャンネル親和性と選択性

メマンチン塩酸塩は、ラット大脳皮質神経細胞膜画分のNMDA受容体チャンネルのフェンシクリジン (phencyclidine : PCP) 結合部位に対する³H]-MK-801 の結合に対して濃度依存的な置換活性を示し(50%抑制濃度: IC₅₀=1.47 µmol/L、阻害定数: Ki=0.67 µmol/L)、MK-801 (解離定数: K_d=0.0041 µmol/L) よりも親和性は低かった [2.6.2.2.1.1 項参照]。そのほかに検討した 60 種類の受容体に対しては、10 µmol/Lの濃度でも 50%以上の結合活性を示さず [2.6.2.2.1.2 項参照]、NMDA受容体チャンネル (PCP結合部位) への選択性が示唆された。

2.6.2.1.1.1.2 NMDA受容体チャンネル阻害作用

メマンチン塩酸塩は、ラット初代培養海馬神経細胞において-70 mVの膜電位固定下、NMDA受容体チャンネルアゴニストであるNMDA (200 µmol/L、D-セリン 10 µmol/L存在下) により誘発される電流に対して濃度依存的な抑制作用 (IC₅₀=1.56 µmol/L) を示した。この作用は発現及び消失が速やかであり、膜電位が浅くなるほど抑制率が小さくなる膜電位依存性を示した。また、alpha-amino-3-hydroxy- 5-methylisoxazole-4-propionic acid (AMPA) (100 µmol/L) 及びgamma-aminobutyric acid (GABA) (10 µmol/L) 誘発電流に対しては 30 µmol/Lでも影響しなかった [2.6.2.2.1.3 項参照]。

2.6.2.1.1.1.3 NMDA受容体チャンネル阻害作用とLTP形成抑制作用の比較

記憶・学習などの脳の高次機能は、神経活動に応じてシナプスの伝達効率が変化するシナプス可塑性によって成立しており、神経伝達の長期増強 (long-term potentiation : LTP) はシナプス可塑性の基本メカニズムとなる現象である^{1),2),3)}。メマンチン塩酸塩はラット海馬スライス標本におけるLTP形成に対して抑制作用を示したが、そのIC₅₀値 (11.6 µmol/L) とラット培養上丘神経細胞におけるNMDA誘発電流抑制作用のIC₅₀値 (2.2 µmol/L、-70 mVの細胞膜電位固定下) には乖離がみられ、-70 mVから-20 mV付近までの膜電位においてNMDA誘発電流抑制作用のIC₅₀値はLTP形成抑制作用のIC₅₀値を下回っていた。なお、MK-801は-70 mV以上の膜電位においてNMDA誘発電流抑制作用のIC₅₀値がLTP形成抑制作用のIC₅₀値 (0.13 µmol/L) を上回っていた [2.6.2.2.1.4 項参照]。

2.6.2.1.1.2 シナプス可塑性障害に対する作用

2.6.2.1.1.2.1 LTP形成障害抑制作用

2.6.2.1.1.2.1.1 低濃度Mg²⁺誘発LTP形成障害モデルにおける作用

ラット海馬スライス標本において、NMDA受容体チャンネルブロッカーであるMg²⁺の細胞外濃度を1 mmol/Lから10 μmol/Lに低下させると、内因性のグルタミン酸によるNMDA受容体チャンネルの活性化が持続的に亢進することによりLTP形成が障害された。このLTP形成障害に対して、メマンチン塩酸塩は1及び10 μmol/Lの濃度で抑制作用を示した [2.6.2.2.1.1 項参照]。

2.6.2.1.1.2.1.2 NMDA誘発LTP形成障害モデルにおける作用

ラット海馬スライス標本において、集合興奮性シナプス後電位を可逆的に抑制する濃度(10 μmol/L)のNMDAを添加してNMDA受容体を持続的に活性化すると、LTP形成が障害された。このLTP形成障害に対してメマンチン塩酸塩は1 μmol/Lの濃度で抑制作用を示した [2.6.2.2.1.2 項参照]。

2.6.2.1.1.2.2 学習障害抑制作用

2.6.2.1.1.2.2.1 NMDA誘発学習障害抑制作用

NMDA (25 mg/kg) をラットに腹腔内投与することにより惹起される、神経細胞傷害によらないと考えられる学習障害に対して、メマンチン塩酸塩は2.5及び5 mg/kgをNMDAと同時に腹腔内投与することにより抑制作用を示した [2.6.2.2.2.1 項参照]。

2.6.2.1.1.3 神経細胞傷害に対する作用

2.6.2.1.1.3.1 神経細胞保護作用

2.6.2.1.1.3.1.1 Aβ₂₅₋₃₅とグルタミン酸の併用により誘発される神経細胞傷害に対する作用

アルツハイマー型認知症(AD)の原因物質の一つであるアミロイドベータ(Aβ)はグルタミン酸毒性を増強することが知られている^{4),5)}。ラット初代培養大脳皮質神経細胞において、それぞれ単独では神経細胞傷害を起こさない濃度のAβ₂₅₋₃₅(1 μmol/L)(神経毒性の発現に必要な最小のAβフラグメント)及びグルタミン酸(50 μmol/L)を2日間間隔で添加することにより惹起した神経細胞傷害に対して、メマンチン塩酸塩は保護作用(IC₅₀=0.13 μmol/L)を示した [2.6.2.2.3.1.1 項参照]。

2.6.2.1.1.3.1.2 グルタミン酸誘発神経細胞傷害に対する作用

ラット初代培養大脳皮質神経細胞におけるグルタミン酸(100 μmol/L)による神経細胞傷害に対して、メマンチン塩酸塩は保護作用(IC₅₀=1.66 μmol/L)を示した [2.6.2.2.3.1.2 項参照]。

2.6.2.1.1.3.1.3 NMDA注入によるラット前脳基底部（nbM）破壊モデルにおける作用

ラットの前脳基底部（nucleus basalis magnocellularis：nbM）にNMDA（15 mmol/L、0.5 μ L）を注入して惹起される大脳皮質のコリンアセチルトランスフェラーゼ（ChAT）活性低下に対して、メマンチン塩酸塩は腹腔内投与で抑制作用を示し、その50%有効濃度（ED₅₀）は2.81 mg/kgであった [2.6.2.2.3.1.3 項参照]。

2.6.2.1.1.3.2 学習障害抑制作用

2.6.2.1.1.3.2.1 A β ₁₋₄₀とイボテン酸の両側海馬内注入ラットモデルにおける学習障害抑制作用

ラット両側海馬内に脳内の主要A β フラグメントであるA β ₁₋₄₀（4 μ g/ μ L、1 μ L）を注入し、2日後にNMDA受容体チャネルアゴニストであるイボテン酸（0.6 μ g/ μ L、0.5 μ L）を同部位に注入することによって惹起される神経細胞傷害及び水迷路学習障害に対して、メマンチン塩酸塩は10及び20 mg/kg/日をA β ₁₋₄₀注入24時間前から6週間持続皮下投与することにより、神経細胞保護作用と学習障害抑制作用を示した。なお、MK-801（0.624 mg/kg/日）は同様の処置によって神経細胞保護作用を示したにもかかわらず、学習障害を抑制せずにむしろ増悪した。一方、ドネペジル塩酸塩（アセチルコリンエステラーゼ阻害薬、アリセプト[®]）は \blacksquare mg/kgを学習訓練の60分前に経口投与することにより学習障害を改善する傾向がみられたが有意な作用ではなく、神経細胞保護も示さなかった [2.6.2.2.3.2.1 項参照]。また、正常ラットの水迷路学習に対して、メマンチン塩酸塩（20 mg/kg/日、10日間持続皮下投与）は影響を及ぼさなかったが、MK-801（0.624 mg/kg/日、10日間持続皮下投与）は学習障害を惹起した [2.6.2.2.3.2.2 項参照]。

2.6.2.1.1.4 代謝物の薬理作用

メマンチンの代謝物について、NMDA受容体チャネル結合置換活性 [2.6.2.2.4.1 項参照] 及びNMDA受容体チャネル阻害活性 [2.6.2.2.4.2 項参照] を測定した。代謝物の中で \blacksquare が最も強いNMDA受容体チャネル結合置換活性を示した（IC₅₀=19.95 μ mol/L、Ki=9.07 μ mol/L）が、その強さはメマンチン塩酸塩の1/10以下であった。また、 \blacksquare を含む4化合物のNMDA誘発電流抑制作用はいずれも弱いものであった（IC₅₀>30 μ mol/L）。

2.6.2.1.2 安全性薬理試験

2.6.2.1.2.1 一般症状・行動及び中枢神経系に及ぼす影響

メマンチン塩酸塩をマウスに経口投与して一般症状及び行動を観察した結果、30 mg/kg以上で体勢反応の軽度低下、100 mg/kgで触・疼痛反応、驚愕反応、同側屈筋反射、正向反射及び握力の低下若しくは抑制、常同行動、挙尾反応、振戦、異常姿勢及び歩行失調が認められた [2.6.2.4.1 項参照]。

中枢神経系に及ぼす作用としては、メマンチン塩酸塩をマウスに経口投与したとき、5

mg/kg以上で自発運動量を増加し、10 mg/kg以上でレセルピン誘発体温低下を抑制し、30 mg/kg以上ではヘキソバルビタール誘発睡眠時間を延長した。電撃痙攣に対して抗痙攣作用 ($ED_{50}=18.4$ mg/kg) を示したが、ペンテトラゾール誘発痙攣に対しては22 mg/kg以上で痙攣増強作用を示した。痙攣閾値下電撃に対しては100 mg/kgでも影響を及ぼさなかったが、痙攣を誘発しない低用量のペンテトラゾール投与に対しては痙攣誘発作用 ($ED_{50}=17.8$ mg/kg) を示した。また、酢酸ライジング法において鎮痛作用 ($ED_{50}=44.9$ mg/kg) を示したが、ラットを用いたテイルフリック法では40 mg/kgまで鎮痛作用は認められなかった [2.6.2.4.1 項参照]。

2.6.2.1.2.2 呼吸・循環器系に及ぼす影響

メマンチン塩酸塩を麻酔下イヌに十二指腸内投与したとき、10 mg/kg以上で心拍出量及び一回拍出量の減少、30 mg/kgでは更に左心室収縮期圧の低下が認められたが、末梢動脈圧や心拍数などに変化はみられなかった。一方、覚醒下イヌに7日間ずつ漸増的に28日間反復経口投与したとき、10 mg/kg/日まで、血圧、心拍数及び心電図への影響は認められなかった。

メマンチン塩酸塩は100 μ mol/Lでヒトether-a-go-go関連遺伝子 (hERG) 型 K^+ チャンネル電流の軽度な抑制を示したが、イヌを用いた26週間反復経口投与毒性試験において、高用量群 (18 mg/kg/日) の心電図QT間隔及びQTc間隔 (心拍数で補正した心電図QT間隔) に影響は認められなかった [2.6.2.4.2 項参照]。

2.6.2.1.2.3 自律神経系・平滑筋に及ぼす影響

メマンチン塩酸塩は 1×10^{-5} g/mL (46 μ mol/L) 以上の濃度でモルモット摘出回腸を収縮させ、この収縮はパパベリン、アンタゾリン及びアトロピンで抑制されなかった。一方、アセチルコリン、ヒスタミン、塩化バリウム及びセロトニンによる収縮を 1×10^{-5} g/mL以上で抑制した [2.6.2.4.3 項参照]。

2.6.2.1.2.4 消化器系に及ぼす影響

メマンチン塩酸塩をラットに経口投与したとき、腸管輸送能を抑制した (ED_{50} =約 20 mg/kg) [2.6.2.4.4 項参照]。

2.6.2.1.2.5 尿量・尿中電解質排泄に及ぼす影響

メマンチン塩酸塩をラットに経口投与したとき、投与後0~2時間から投与後0~5時間までの積算尿において、20 mg/kg以上で Na^+ 及び Cl^- の排泄量の増加、40 mg/kgで尿量の増加が認められたが、 K^+ の排泄量には影響しなかった [2.6.2.4.5 項参照]。

2.6.2.2 効力を裏付ける試験

2.6.2.2.1 NMDA受容体に対する作用

2.6.2.2.1.1 NMDA受容体チャンネル親和性

[資料番号 4.2.1.1.1]

雄性 Sprague-Dawley (SD) 系ラット大脳皮質神経細胞膜画分を用い、グルタミン酸 (10 $\mu\text{mol/L}$) 及びグリシン (10 $\mu\text{mol/L}$) を共存させて開口状態とした NMDA 受容体チャンネルの PCP 結合部位に結合する [^3H]-MK-801 (5 nmol/L) に対するメマンチン塩酸塩の置換活性を測定した。メマンチン塩酸塩は濃度依存的な置換活性を示し (IC_{50} =1.47 $\mu\text{mol/L}$ 、 K_i =0.67 $\mu\text{mol/L}$)、MK-801 (K_d =0.0041 $\mu\text{mol/L}$) よりも親和性は低かった。

2.6.2.2.1.2 各種受容体に対する親和性

[資料番号 4.2.1.1.2]

メマンチン塩酸塩の結合活性を 61 種類の受容体に対して検討した。NMDA受容体チャンネルのPCP結合部位に対しては、10 $\mu\text{mol/L}$ の濃度において91.08%の結合活性を示した。しかしながら、それ以外の60種類の受容体に対しては、10 $\mu\text{mol/L}$ の濃度でも50%以上の結合活性を示さなかった [表 2.6.2.2-1参照]。[2.6.2.2.1.1 項] と合わせ、メマンチン塩酸塩はNMDA受容体チャンネル (PCP結合部位) に対して高い選択性を示すことが明らかとなった。

表 2.6.2.2-1 各種受容体に対するメマンチン塩酸塩の結合置換活性

Receptor	Inhibition (%)	
	Memantine (10 μmol/L)	Receptor
	0.00	0.00
	2.21	91.08
	0.00	9.50
	1.67	0.00
	11.13	3.17
	0.00	2.56
	2.81	0.00
	1.57	0.12
	0.76	2.60
	0.00	7.16
	1.08	3.99
	4.33	5.14
	2.55	0.67
	0.00	0.00
	4.47	0.00
	3.26	0.10
	0.00	7.42
	0.00	30.86
	4.22	7.03
	0.00	4.66
	0.00	3.67
	1.78	4.48
	7.63	0.82
	0.00	3.38
	0.00	6.48
	0.00	0.00
	2.96	44.98
	1.09	0.00
	2.52	11.81
	0.20	0.00
	4.69	

[資料番号 4.2.1.1.2] の Table 1 と Table 2 を改変

2.6.2.2.1.3 NMDA受容体チャネル阻害作用

[資料番号 4.2.1.1.3]

胎生 20~21 日のラットより調製した培養 12~15 日目の海馬神経細胞を用いて、-70 mV の膜電位固定下、NMDA (200 μmol/L、D-セリン 10 μmol/L 存在下) 誘発電流に対するメマンチン塩酸塩の抑制作用をホールセルパッチクランプ法により検討した。メマンチン塩酸塩 (0.3~30 μmol/L) は濃度依存的に NMDA 誘発電流を抑制し、IC₅₀ 値は 1.56 ± 0.09 μmol/L であった [図 2.6.2.2-1 参照]。一方、AMPA (100 μmol/L) 及び GABA (10 μmol/L) 誘発

電流に対してメマンチン塩酸塩は 30 $\mu\text{mol/L}$ を添加しても抑制作用を示さなかった [図 2.6.2.2-2参照]。また、NMDA誘発電流抑制作用の発現速度 ($1/\tau_{\text{on}}$ ：図 2.6.2.2-3 (B) ●) はメマンチン塩酸塩濃度依存性を示したのに対し、作用消失速度 ($1/\tau_{\text{off}}$ ：図 2.6.2.2-3 (B) ○) は濃度に依存しなかった [図 2.6.2.2-3参照]。メマンチン塩酸塩の IC_{50} 付近 (1 $\mu\text{mol/L}$) における作用発現速度 ($1/\tau_{\text{on}}=0.27 \text{ sec}^{-1}$) 及び作用消失速度 ($1/\tau_{\text{off}}=0.19 \text{ sec}^{-1}$) は、いずれも同様の実験より求めたMK-801 の IC_{50} (0.14 $\mu\text{mol/L}$) における推定作用発現速度 ($1/\tau_{\text{on}}=0.029 \text{ sec}^{-1}$) 及び推定作用消失速度 ($1/\tau_{\text{off}}=0.005 \text{ sec}^{-1}$)⁶⁾よりも大きく、メマンチン塩酸塩のNMDA誘発電流抑制作用の発現及び消失が速やかであることが示された。更に、メマンチン塩酸塩によるNMDA受容体チャネル阻害作用は、膜電位が浅くなるほど抑制率が小さくなる膜電位依存性 [図 2.6.2.2-4参照] を示した。

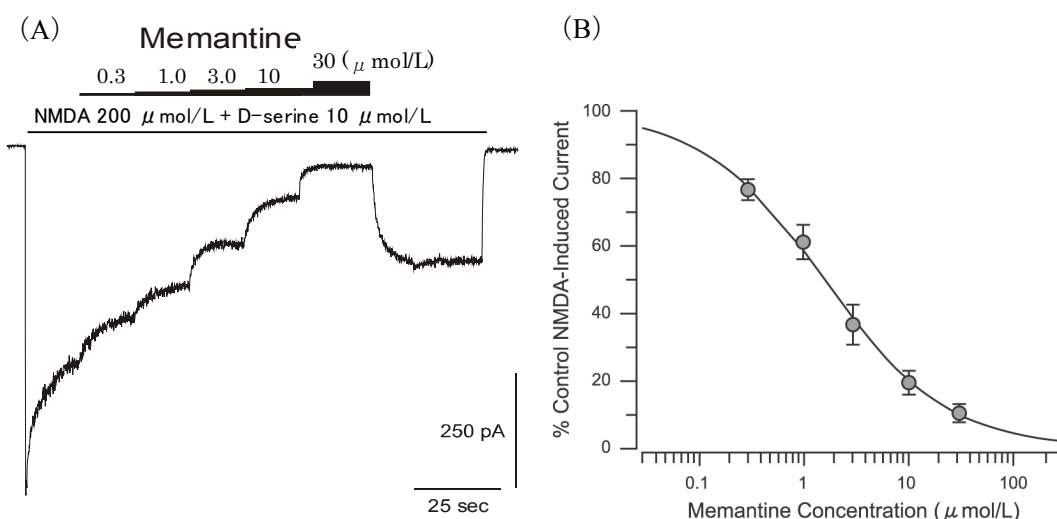


図 2.6.2.2-1 ラット培養海馬神経細胞の NMDA 誘発電流に対するメマンチン塩酸塩の抑制作用の濃度依存性

- (A) NMDA (200 $\mu\text{mol/L}$) は -70 mV の膜電位固定下、D-セリン (10 $\mu\text{mol/L}$) 存在下に 125 秒間添加した。メマンチン塩酸塩は 4 濃度 (0.3、1.0、3.0、10 $\mu\text{mol/L}$) を低濃度から順に 15 秒間ずつ、30 $\mu\text{mol/L}$ を 20 秒間、累積的に添加した。
- (B) 濃度-反応曲線。各値は海馬神経細胞 9 標本から得た平均値 \pm 標準誤差を示す。 IC_{50} 値はロジスティック回帰法により求めた。

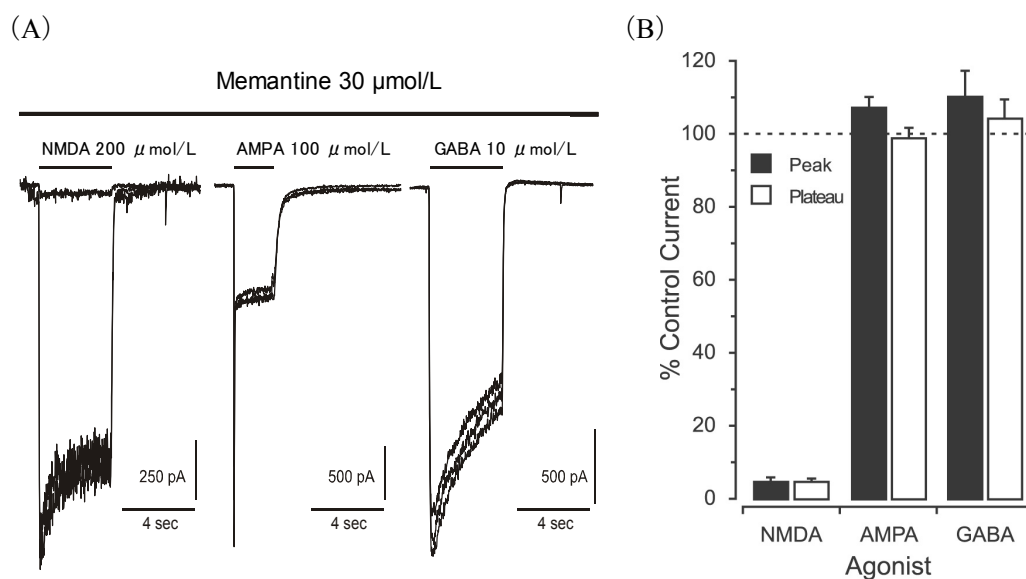


図 2.6.2.2-2 ラット培養海馬神経細胞の NMDA-、AMPA-、GABA-誘発電流に対するメマンチン塩酸塩の作用

- (A) NMDA (200 μmol/L を D-セリン 10 μmol/L と共に 4 秒間添加)、AMPA (100 μmol/L を D-セリン 10 μmol/L と共に 2 秒間添加)、又は GABA (10 μmol/L を D-セリン 10 μmol/L と共に 4 秒間添加) で誘発される電流を -70 mV の膜電位固定下に記録した。各アゴニストによる誘発電流は 20 秒間隔で 9 回、連続的に記録し、4~6 回目はメマンチン塩酸塩 (30 μmol/L) を共存させた。図には 3 回目 (メマンチン塩酸塩処置前)、6 回目 (共存下)、及び 9 回目 (除去後) の記録を重ねて示した。
- (B) 各アゴニストによる誘発電流のピーク及びプラトー値に対するメマンチン塩酸塩の作用を示す。各アゴニストとも 3 回目 (メマンチン塩酸塩処置前) と 9 回目 (除去後) の記録における値の平均を対照 (100%) として、6 回目 (メマンチン塩酸塩共存下) の記録における値を表した。
用いた細胞の数：NMDA 群 (n=5)、AMPA 群 (n=4)、GABA 群 (n=5)。各値は平均値 ± 標準誤差を示す。

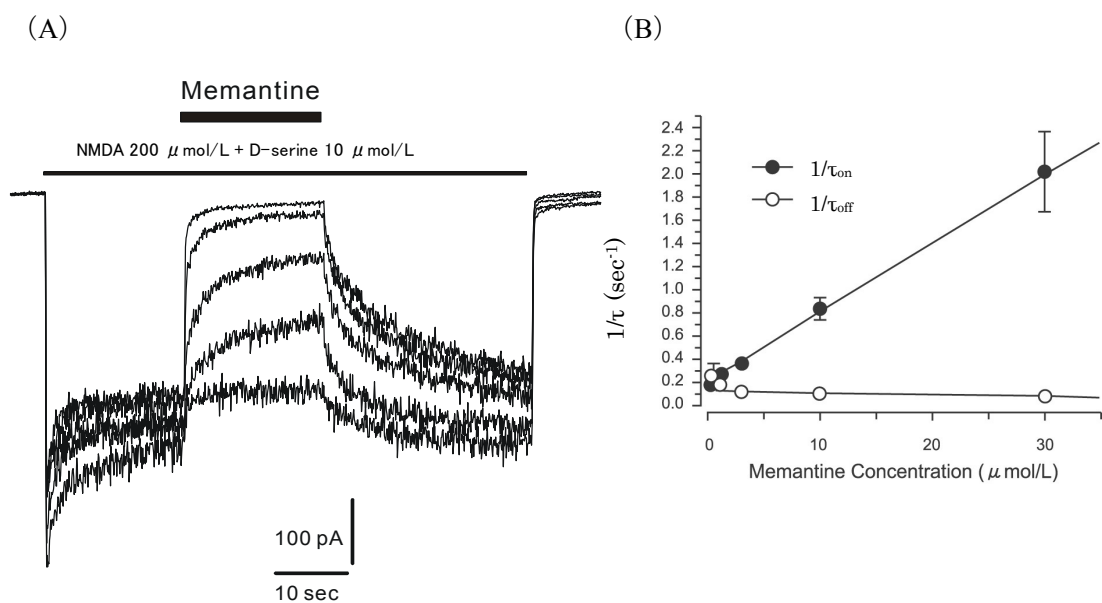


図 2.6.2.2-3 ラット培養海馬神経細胞の NMDA 誘発電流に対するメマンチン塩酸塩の抑制作用のキネティクス

- (A) NMDA (200 $\mu\text{mol/L}$ 、D-セリン 10 $\mu\text{mol/L}$ 存在下) は -70 mV の膜電位固定下に 70 秒間添加し、メマンチン塩酸塩 (0.3、1、3、10、30 $\mu\text{mol/L}$) は 20 秒間上乗せして添加した。
- (B) メマンチン塩酸塩による NMDA 誘発電流抑制作用の発現速度 ($1/\tau_{\text{on}}$) 及び消失速度 ($1/\tau_{\text{off}}$) とメマンチン塩酸塩の濃度との関係を示す。各値は 7 細胞の平均値 \pm 標準誤差を示す。 τ_{on} 及び τ_{off} はそれぞれ NMDA 誘発電流抑制作用の発現及び消失の時定数 (sec) を示す。

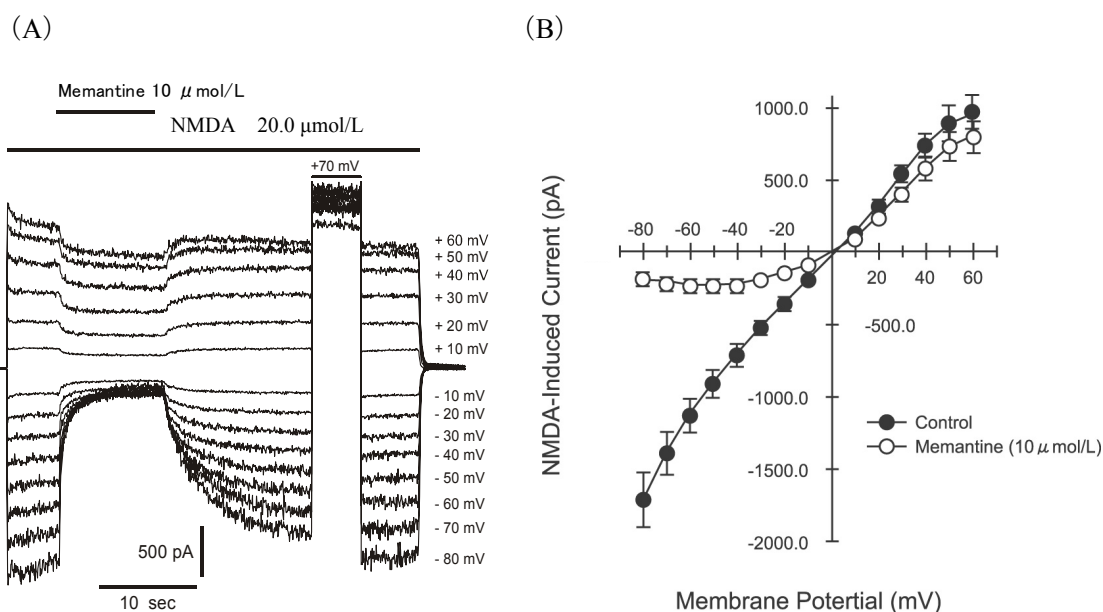


図 2.6.2.2-4 ラット培養海馬神経細胞の NMDA 誘発電流に対するメマンチン塩酸塩の抑制作用の膜電位依存性

- (A) NMDA (200 μmol/L、D-セリン 10 μmol/L 存在下) 誘発電流に対するメマンチン塩酸塩 (10 μmol/L、11 秒間添加) の抑制作用を種々の膜電位固定下で検討した。膜電位を-80 mV から+60 mV まで 10 mV ずつ上げて固定し、NMDA を 60 秒ごとに 41 秒間添加した。メマンチン塩酸塩除去 15 秒後に、神経細胞をメマンチン塩酸塩による NMDA 受容体チャネルに対する阻害作用から完全に回復させるために、NMDA 存在下に+70 mV で 5 秒間膜電位を固定させた。
- (B) NMDA 誘発電流に対するメマンチン塩酸塩の膜電位依存的な抑制作用をまとめた。メマンチン塩酸塩添加時の NMDA 誘発電流値 (○) は、メマンチン塩酸塩添加 10~11 秒後に記録された電流値の平均を示す。対照電流値 (●) は、メマンチン塩酸塩添加前とメマンチン塩酸塩除去と共に+70 mV で 5 秒間脱分極を与えた後にそれぞれ記録される NMDA 誘発電流値の平均を示す。各値は 8 若しくは 9 細胞の平均値 ± 標準誤差を示す。

2.6.2.2.1.4 NMDA受容体チャネル阻害作用とLTP形成抑制作用の比較

【参考資料】 [資料番号 4.3.11]

ラット海馬スライス標本において、シェーファー側枝をテタヌス刺激して誘導される CA1 野の LTP 形成に対するメマンチン塩酸塩及び MK-801 の作用を比較検討した。LTP はテタヌス刺激 30~60 分後に記録された集合興奮性シナプス後電位 (field excitatory postsynaptic potential: fEPSP) の立ち上がり相の傾き (スロープ) の刺激前値に対する増大% を指標とした。メマンチン塩酸塩及び MK-801 は LTP 形成に対して濃度依存的な抑制作用を示し、IC₅₀ 値はそれぞれ 11.6 ± 0.53 μmol/L 及び 0.13 ± 0.02 μmol/L であった [図 2.6.2.2-5 参照]。次に、胎生 20~21 日のラットより調製した培養 11~16 日目の上丘神経細胞を用いた NMDA 誘発電流に対するメマンチン塩酸塩及び MK-801 の作用を比較検討した。メマンチン塩酸塩の NMDA 誘発電流抑制作用は膜電位依存性を示し、その IC₅₀ 値は -20 mV 付近では LTP 形成抑制作用の IC₅₀ 値 (11.6 μmol/L) に近い値であったが、それよりも深い膜電位では NMDA 誘発電流をより強く抑制し、-70 mV においては 2.2 ± 0.2 μmol/L であった。一方、

MK-801 のNMDA誘発電流抑制作用の IC_{50} 値は、 -70 mVにおいて 0.14 ± 0.04 $\mu\text{mol/L}$ でLTP形成抑制作用の IC_{50} 値 (0.13 $\mu\text{mol/L}$) にほぼ一致しており、それより浅い膜電位においてはLTP形成抑制作用の IC_{50} 値を上回っていた [図 2.6.2.2-6参照]。すなわち、MK-801 が -70 mV以上の膜電位においてNMDA誘発電流を抑制する濃度でLTP形成を抑制するのに対し、メマンチン塩酸塩は -70 mVから -20 mV付近の膜電位の範囲において、NMDA誘発電流を抑制する濃度ではLTP形成に与える影響は少ないことが示唆された。

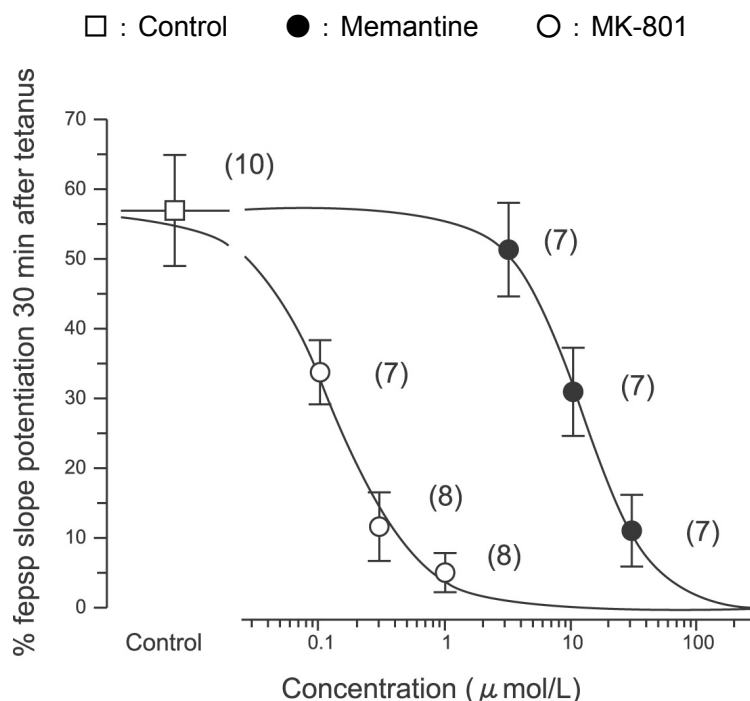


図 2.6.2.2-5 ラット海馬スライスにおけるメマンチン塩酸塩及びMK-801のLTP形成に対する抑制作用の濃度依存性

シェーファー側枝に双極刺激電極を、CA1野に記録電極をそれぞれ刺入し、最大反応の1/2を誘発する定電圧で 20 μsec パルス幅の刺激を 15 秒ごとに与え、fEPSPを記録した。LTP誘導のためのテタヌス刺激は 20 μsec パルス幅で 100 Hz、 1 秒間行った。メマンチン塩酸塩は 6.6 ± 0.4 時間、MK-801は 6.8 ± 0.4 時間、テタヌス刺激前にプレインキュベーションした。テタヌス刺激前30分間の平均fEPSPスロープに対する、刺激30~60分後のfEPSPスロープの増大%をLTPの指標とし、この値の平均値に対するメマンチン塩酸塩及びMK-801の濃度-抑制曲線を示した。各値は平均値 \pm 標準誤差を示し、括弧内に例数を示す。 IC_{50} 値はロジスティック回帰法により求めた。

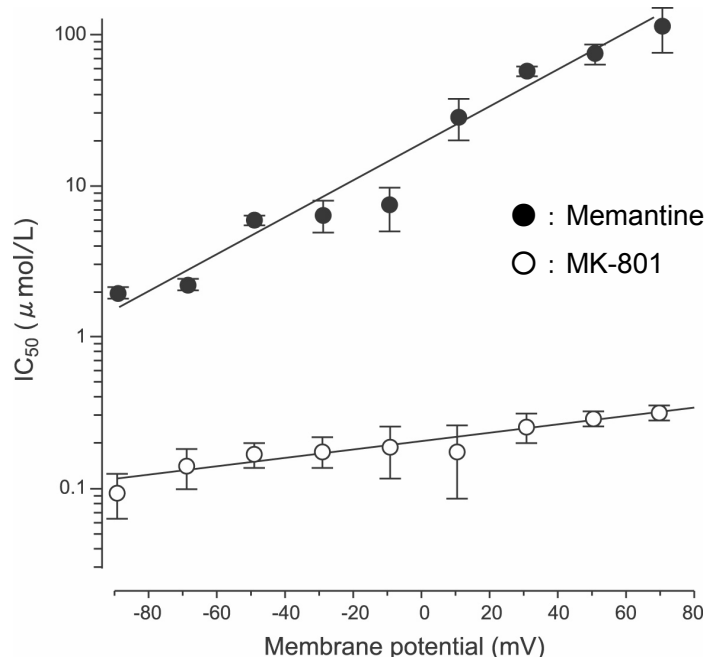


図 2.6.2.2-6 ラット培養上丘神経細胞における NMDA 誘発電流に対するメマンチン塩酸塩及び MK-801 の抑制作用

NMDA 誘発電流に対するメマンチン塩酸塩及び MK-801 の抑制作用の膜電位依存性を、ラット培養上丘神経細胞を用いて検討した。 $-90 \sim +70$ mV の膜電位固定下、NMDA ($200 \mu\text{mol/L}$) 及びグリシン ($1 \mu\text{mol/L}$) を 30 秒ごとに 2.5 秒間添加して誘発される電流値 (プラトー相) に対するメマンチン塩酸塩及び MK-801 の抑制作用の IC_{50} 値をプロットした。各値は平均値 \pm 標準誤差を示す。

[資料番号 4.3.11] の Fig. 7 を改変

2.6.2.2.2 シナプス可塑性障害に対する作用

2.6.2.2.2.1 LTP形成障害抑制作用

2.6.2.2.2.1.1 低濃度 Mg^{2+} 誘発 LTP 形成障害モデルにおける作用

[資料番号 4.2.1.1.4]

雄性SD系ラットの海馬スライス標本を用いて、灌流液中の Mg^{2+} 濃度を低下させること ($1 \text{ mmol/L} \rightarrow 10 \mu\text{mol/L}$) によって誘発される LTP 形成障害に対するメマンチン塩酸塩及び MK-801 の作用について検討した。低濃度 Mg^{2+} ($10 \mu\text{mol/L}$) をテタヌス刺激 60 分前から灌流するとテタヌス刺激前の fEPSP は増強し (fEPSP スロープが低濃度 Mg^{2+} 灌流前の定常値に比べて $87.2 \pm 10.6\%$ 増大) [図 2.6.2.2-7 (A) 参照]、テタヌス刺激後の LTP 形成は正常の Mg^{2+} 濃度 (1 mmol/L) 存在下に比べて著しく障害された (テタヌス刺激前に比べて fEPSP スロープが $4.1 \pm 9.8\%$ 減少) [図 2.6.2.2-7 (B) 参照]。これに対して、メマンチン塩酸塩は 7 時間以上プレインキュベーションすることにより、 $1 \mu\text{mol/L}$ ではテタヌス刺激前の低濃度 Mg^{2+} による fEPSP 増強に影響を与えなかったが [図 2.6.2.2-7 (A) 参照]、LTP 形成障害を著明に抑制した (テタヌス刺激前に比べて fEPSP スロープが $43.4 \pm 8.4\%$ 増大) [図 2.6.2.2-7 (B) 参照]。また $10 \mu\text{mol/L}$ ではテタヌス刺激前の低濃度 Mg^{2+} による fEPSP 増強を抑制し ($30.1 \pm 4.9\%$) [図 2.6.2.2-7 (A) 参照]、LTP 形成障害を完全に抑制した (テタヌス刺激前

に比べてfEPSPスロープが $61.5 \pm 5.3\%$ 増大) [図 2.6.2.2-7 (B) 参照]。30 $\mu\text{mol/L}$ ではテタヌス刺激前の低濃度 Mg^{2+} による fEPSP 増強を抑制したが ($32.8 \pm 7.4\%$) [図 2.6.2.2-7 (A) 参照]、LTP 形成障害に対しては抑制作用を示さなかった (テタヌス刺激前に比べて fEPSP スロープが $14.9 \pm 2.8\%$ 増大) [図 2.6.2.2-7 (B) 参照]。一方、MK-801 (0.01、0.1 及び 1 $\mu\text{mol/L}$) は低濃度 Mg^{2+} による fEPSP 増強を濃度依存的に抑制したにもかかわらず [図 2.6.2.2-7 (A) 参照]、LTP 形成障害に対しては抑制作用を示さなかった [図 2.6.2.2-7 (B) 参照]。以上より、NMDA 受容体チャネルブロッカーである Mg^{2+} の細胞外濃度を低下させることにより、内因性のグルタミン酸を介して NMDA 受容体チャネルを持続的に活性化すると LTP 形成が障害されるが、メマンチン塩酸塩はこれを抑制することが示された。

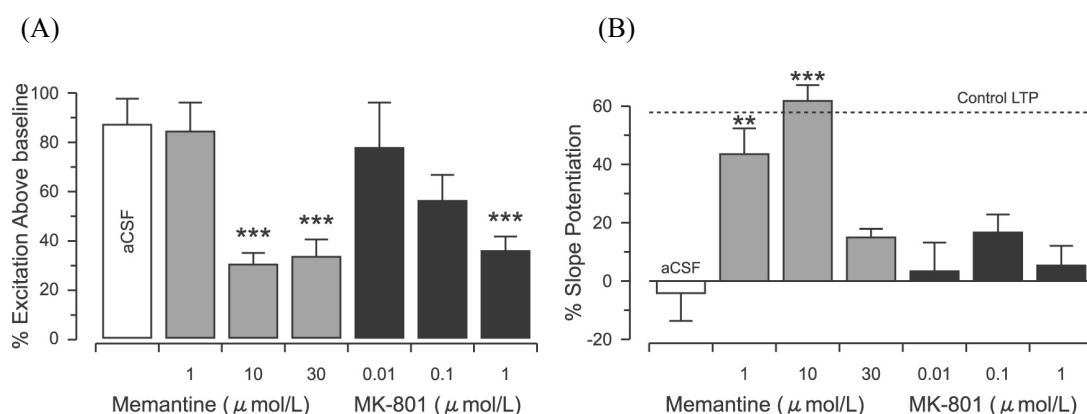


図 2.6.2.2-7 ラット海馬スライスにおける fEPSP 及び LTP 形成に対する低濃度 Mg^{2+} の作用及びそれに対するメマンチン塩酸塩と MK-801 の作用

LTP の誘導は [2.6.2.2.1.4 項] の試験と同様に行った。

(A) 灌流液中の Mg^{2+} 濃度を 1 mmol/L から 10 $\mu\text{mol/L}$ に低下させ、45~60 分後に測定された fEPSP のスロープの平均の、低濃度 Mg^{2+} 灌流前 30 分間に測定された fEPSP スロープの平均に対する変化率 (%) を表示した。メマンチン塩酸塩 (1~30 $\mu\text{mol/L}$) と MK-801 (0.01~1 $\mu\text{mol/L}$) は 7 時間以上プレインキュベーションしたが、いずれも濃度依存的にこれを抑制した。

(B) LTP の大きさは、テタヌス刺激 30~60 分後に測定された fEPSP スロープの平均の、テタヌス刺激前 15 分間の fEPSP スロープの平均に対する変化率 (%)、すなわち、低濃度 Mg^{2+} で誘発されたシナプス後膜興奮状態に対する変化率で表示した。メマンチン塩酸塩 (1、10 $\mu\text{mol/L}$) は低濃度 Mg^{2+} による LTP 形成障害を抑制したが、MK-801 (0.01~1 $\mu\text{mol/L}$) は LTP 形成障害に対して影響しなかった。破線は正常の Mg^{2+} 濃度 (1 mmol/L) 灌流下で得られる LTP の対照レベルを示す。

aCSF：人工脳脊髄液 (溶媒対照)

用いたスライス数：aCSF 群 (n=6)；メマンチン塩酸塩群 1 $\mu\text{mol/L}$ (n=6)、10 $\mu\text{mol/L}$ (n=6)、30 $\mu\text{mol/L}$ (n=7)；MK-801 群 0.01 $\mu\text{mol/L}$ (n=6)、0.1 $\mu\text{mol/L}$ (n=6)、1 $\mu\text{mol/L}$ (n=7)。各値は平均値 \pm 標準誤差を示す。

** $p < 0.005$ 、*** $p < 0.001$ vs. aCSF 群 (Student-Newman-Keuls test)

2.6.2.2.2.1.2 NMDA 誘発 LTP 形成障害モデルにおける作用

【参考資料】 [資料番号 4.2.1.1.5]

雄性 SD 系ラットの海馬スライス標本を用いて、NMDA によって誘発される LTP 形成障害に対するメマンチン塩酸塩の作用について検討した。対照群では、テタヌス刺激 35~45

分後に安定したLTP ($157 \pm 7\%$ ：テタヌ刺激後におけるfEPSPスロープの刺激前値に対する割合) がみられたが、可逆的にfEPSPを抑制する濃度 ($10 \mu\text{mol/L}$) のNMDAをテタヌ刺激 15 分前から 30 分間灌流すると、NMDA除去後のLTPは $131 \pm 6\%$ まで抑制された。これに対して、メマンチン塩酸塩 ($1 \mu\text{mol/L}$) を4時間以上プレインキュベーションすると、NMDA除去後には $152 \pm 15\%$ とほぼ対照群と同じ大きさのLTPが形成された [図 2.6.2.2-8参照]。以上、可逆的にfEPSPを抑制する濃度のNMDAの添加によってNMDA受容体チャネルを持続的に活性化するとLTP形成が障害されるが、メマンチン塩酸塩はこれを抑制することが示唆された。

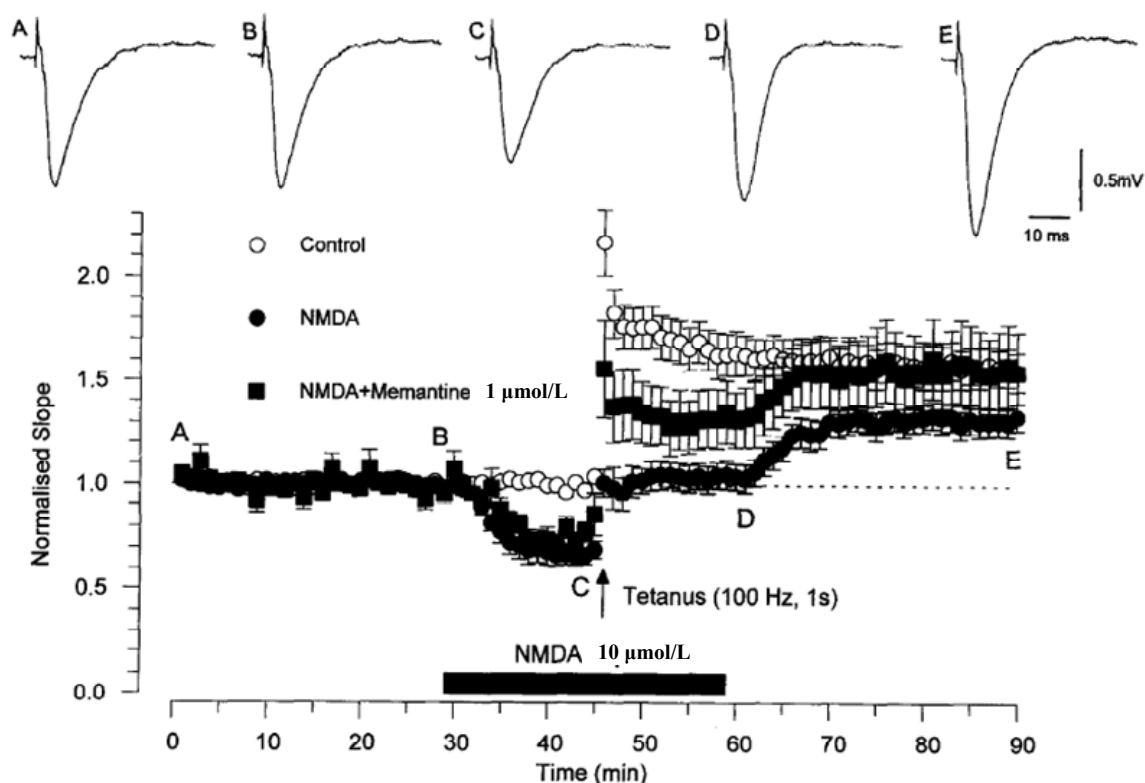


図 2.6.2.2-8 ラット海馬スライスにおける LTP 形成に対する NMDA の作用、及びそれに対するメマンチン塩酸塩の作用

LTPの誘導は [2.6.2.2.1.4 項] の試験と同様に行った。NMDA ($10 \mu\text{mol/L}$) を添加した場合 (●) の図中 A~Eの各時期における単回刺激に対するfEPSPのトレースを上段に示した。下段には、単回刺激に対するfEPSPのスロープを、対照群 (○) ではテタヌ刺激前30分間、NMDA群 (●) 及びNMDA+メマンチン塩酸塩群 (■) ではNMDA添加前30分間に測定された値の平均を1.0と標準化して経時的に示した。NMDA ($10 \mu\text{mol/L}$) はテタヌ刺激15分前から30分間灌流し、メマンチン塩酸塩 ($1 \mu\text{mol/L}$) はLTP誘導の少なくとも4時間前からプレインキュベーションした。

用いたスライス数：対照群 (n=8)、NMDA群 (n=8)、NMDA+メマンチン塩酸塩群 (n=8)。

各値は平均値 ± 標準誤差を示す。

すべての記録期間にわたるANOVA解析において、対照群、NMDA群、NMDA+メマンチン塩酸塩群間で有意な差が認められた ($p < 0.0001$)。

2.6.2.2.2.2 学習障害抑制作用

2.6.2.2.2.2.1 NMDA誘発学習障害抑制作用

[資料番号 4.2.1.1.5]

雄性SD系ラットを用い、NMDA誘発受動的回避学習障害に対するメマンチン塩酸塩の作用を検討した。学習訓練を行う30分前にNMDA（12.5～50 mg/kg）をラットに腹腔内投与すると、用量依存的に受動的回避学習の障害が惹起された。25 mg/kgのNMDAと同時に生理食塩液を腹腔内投与したNMDA単独群及びNMDAと同時にメマンチン塩酸塩（1.25、2.5、5.0及び10 mg/kg）を腹腔内投与したメマンチン塩酸塩群を設け、NMDAを投与しない対照群には学習訓練を行う30分前に生理食塩液を腹腔内投与した。メマンチン塩酸塩は2.5及び5.0 mg/kgを投与することにより、NMDA単独群と比較して有意な学習障害抑制作用を示した。また、10 mg/kgでは学習障害抑制作用はみられなかった [図 2.6.2.2-9参照]。なお、NMDAを学習訓練の24時間前に投与した場合には受動的回避学習障害が惹起されなかったことから、上記の学習障害には神経細胞傷害は関係しないと考えられた。以上より、神経細胞傷害によらないと考えられるNMDA誘発受動的回避学習障害をメマンチン塩酸塩が抑制することが示された。

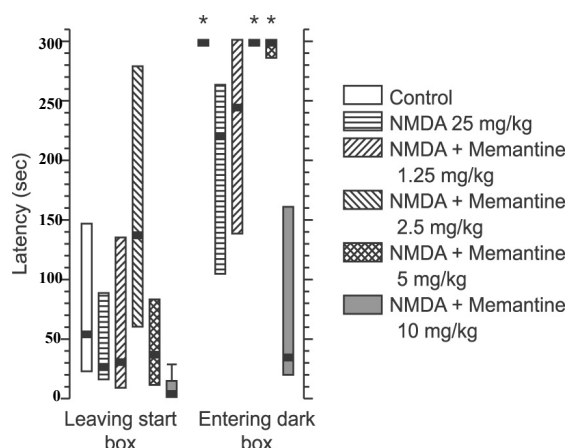


図 2.6.2.2-9 NMDA 誘発受動的回避学習障害に対するメマンチン塩酸塩の作用

スタート室、明室及び暗室の3つの同じサイズのコンパートメントで構成された受動的回避学習装置を用いて、暗室に入ると電気ショックを受けることを記憶させ(訓練)、その24時間後に保持試験を実施した。訓練時においてはスタート室を離れる時間 (leaving start box) 及び暗室に入るまでの時間 (entering dark box) に対して薬物処理による影響はみられなかった。NMDA (25 mg/kg) とメマンチン塩酸塩は訓練30分前に同時に腹腔内投与した。投与群は、対照群、NMDA (25 mg/kg) 単独群並びにメマンチン塩酸塩の1.25、2.5、5、及び10 mg/kgを投与した合計6群である (例数はそれぞれ16、16、8、8、8、8)。

図中のカラムにおいて、横棒は中央値、上辺及び下辺は第1及び第3四分位数を示す。

* $p < 0.05$ vs. NMDA 単独投与群 (Kruskal-Wallis test 及び Mann-Whitney test)

2.6.2.2.3 神経細胞傷害に対する作用

2.6.2.2.3.1 神経細胞保護作用

2.6.2.2.3.1.1 A β_{25-35} とグルタミン酸の併用により誘発される神経細胞傷害に対する作用

[資料番号 4.2.1.1.6]

胎生18日のWistar系ラットより調製した培養7日目の大脳皮質神経細胞において、A β_{25-35} (1 $\mu\text{mol/L}$) 及びグルタミン酸 (50 $\mu\text{mol/L}$) はそれぞれ単独では神経細胞傷害を惹起することはなかったが、A β_{25-35} 添加2日後にグルタミン酸を添加すると、グルタミン酸添加の1日後に顕著な傷害が惹起された。この神経細胞傷害に対して、メマンチン塩酸塩 (0.1~3 $\mu\text{mol/L}$) 及びMK-801 (0.001~0.03 $\mu\text{mol/L}$) は、グルタミン酸添加直前に添加することで濃度依存的にこれを抑制し、IC₅₀ 値はそれぞれ 0.13 及び 0.0004 $\mu\text{mol/L}$ であった [表 2.6.2.2-2 参照]。以上、メマンチン塩酸塩はA β_{25-35} とグルタミン酸の併用による神経細胞傷害に対して保護作用を示すことが明らかとなった。

表 2.6.2.2-2 A β_{25-35} 及びグルタミン酸添加によって惹起される大脳皮質神経細胞傷害に対するメマンチン塩酸塩及び MK-801 の作用

添加物質	濃度 ($\mu\text{mol/L}$)	吸光度の差 (OD570 nm - OD650 nm)	生存率 (%)
溶媒	-	0.475 \pm 0.032	100
A β_{25-35} (1 $\mu\text{mol/L}$)	-	0.458 \pm 0.037	94
グルタミン酸 (50 $\mu\text{mol/L}$)	-	0.428 \pm 0.031	83
A β_{25-35} +グルタミン酸	-	0.202 \pm 0.008 ^{##}	0
A β_{25-35} +グルタミン酸 +メマンチン塩酸塩	0.1	0.315 \pm 0.033	41
	0.3	0.396 \pm 0.020*	71
	1.0	0.506 \pm 0.032**	111
	3.0	0.473 \pm 0.014**	99
A β_{25-35} +グルタミン酸 +MK-801	0.001	0.380 \pm 0.015	65
	0.003	0.395 \pm 0.013*	71
	0.01	0.434 \pm 0.021**	85
	0.03	0.466 \pm 0.034**	97

ラット培養大脳皮質神経細胞に A β_{25-35} 、更に2日後にグルタミン酸を添加し、その1日後の生細胞活性を3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) を用いて、主波長 570 nm と副波長 650 nm での吸光度の差 (OD570 nm - OD650 nm) として比色定量により評価した。生存率は A β_{25-35} とグルタミン酸を加えない溶媒対照群 (溶媒には Hank's Balanced Salt Solution を使用) を 100%、A β_{25-35} とグルタミン酸添加群を 0% として算出した。各値は 8 例の平均値 \pm 標準誤差を示す。メマンチン塩酸塩及び MK-801 の IC₅₀ 値はロジスティック回帰法により求めた。

* p<0.05 及び ** p<0.01 vs. A β_{25-35} +グルタミン酸処置群、## p<0.01 vs. 溶媒群 (non-parametric Dunnett's test)

2.6.2.2.3.1.2 グルタミン酸誘発神経細胞傷害に対する作用

【参考資料】 [資料番号 4.3.17]

胎生 17～18 日のWistar系ラットより調製した培養 12～14 日目の大脳皮質神経細胞を用いて、グルタミン酸 100 $\mu\text{mol/L}$ 添加によって惹起される 20～24 時間後の細胞傷害に対するメマンチン塩酸塩の保護作用について検討した。メマンチン塩酸塩 (0.1～100 $\mu\text{mol/L}$: グルタミン酸添加時に同時添加) はグルタミン酸誘発細胞傷害を濃度依存的に抑制した ($\text{IC}_{50}=1.66 \pm 0.36 \mu\text{mol/L}$) [図 2.6.2.2-10参照]。以上、メマンチン塩酸塩はグルタミン酸による神経細胞傷害に対して保護作用を有することが示された。

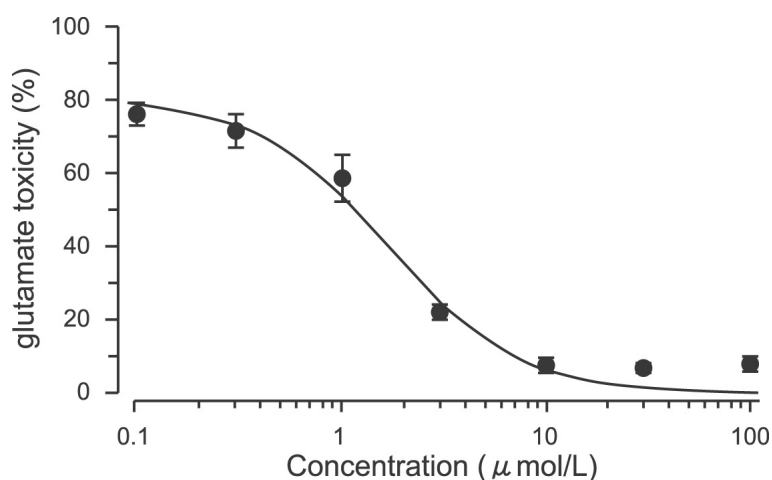


図 2.6.2.2-10 ラット培養大脳皮質神経細胞のグルタミン酸誘発細胞傷害に対するメマンチン塩酸塩の抑制作用

12～14 日間培養したラット大脳皮質神経細胞にグルタミン酸を添加し、20～24 時間後の生細胞活性を MTT を用いて定量化した。グルタミン酸添加によってメマンチン塩酸塩非存在下で減少した生細胞活性をグルタミン酸毒性 100%とし、メマンチン塩酸塩の種々の濃度における減少した生細胞活性をその百分率%として表した。各値は 6 例の平均値 \pm 標準偏差を示す。

2.6.2.2.3.1.3 NMDA注入によるラット前脳基底部分 (nbM) 破壊モデルに対する作用

【参考資料】 [資料番号 4.3.18]

雄性Long-Evans系ラットを用いてnbM (ADで好発的に変性するコリン作動性神経の起始核を含む部位) をNMDAで破壊するモデルを作製し、メマンチン塩酸塩の神経細胞保護作用を検討した。NMDA (15 mmol/L、0.5 μL) をラットnbM内に片側性に注入して2週間後に脳を摘出し、nbMからのコリン作動性神経が投射しているfrontolateral sensorimotor cortexを分画採取して、ChAT活性の低下を指標に神経細胞傷害を定量化した。NMDAによるChAT活性低下に対して、メマンチン塩酸塩及びMK-801はNMDA注入30分前に腹腔内投与することによりいずれも抑制作用を示し、 ED_{50} 値はそれぞれ2.81 mg/kg及び0.077 mg/kgであった [図 2.6.2.2-11参照]。以上、メマンチン塩酸塩は末梢投与において、NMDAによる神経細胞傷害を抑制することが示された。

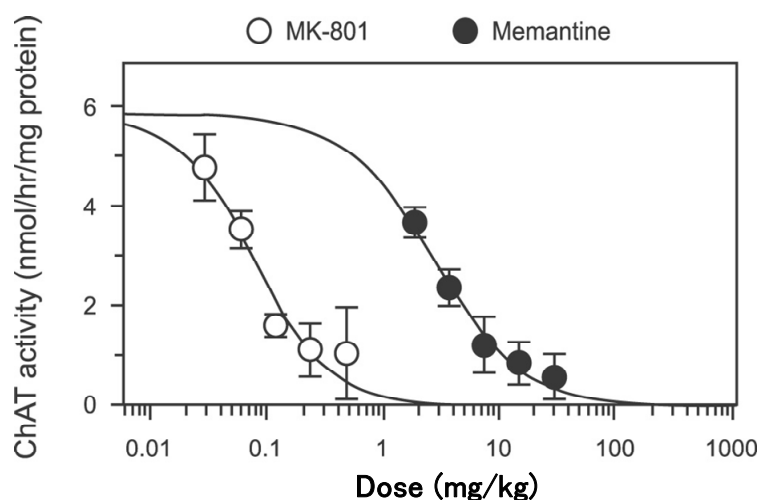


図 2.6.2.2-11 NMDA を nbM 内に注入して惹起される大脳皮質 ChAT 活性の低下に対するメマンチン塩酸塩及び MK-801 の抑制作用

ChAT 活性は NMDA の nbM 注入同側 (lesioned side) と反対側 (non-lesioned side) の大脳皮質 ChAT 活性の差として示した。各値は平均値 ± 標準誤差を示す。ED₅₀ 値は非線形回帰法により求めた。

2.6.2.2.3.2 学習障害抑制作用

2.6.2.2.3.2.1 Aβ₁₋₄₀ とイボテン酸の両側海馬内注入ラットモデルにおける学習障害抑制作用

[資料番号 4.2.1.1.7~4.2.1.1.9]

Aβ₁₋₄₀ と NMDA 受容体アゴニストであるイボテン酸を雄性 F344 系ラットの両側海馬内に微量注入することによって神経細胞傷害モデルを作製し、神経細胞傷害と学習機能障害に対するメマンチン塩酸塩の作用を検討した。ラットにおけるメマンチン塩酸塩の消失半減期はヒトに比べて短いため、経口投与ではなく持続皮下投与とした。Aβ₁₋₄₀ (4 μg/μL, 1 μL) をラットの両側海馬内に 2 カ所ずつ計 4 カ所に注入し、その 2 日後、同部位にイボテン酸 (0.6 μg/μL, 0.5 μL) を注入した。Aβ₁₋₄₀ 注入 5 週間より水迷路学習課題 (獲得試行及び探査試行) を実施し、学習実験終了翌日に海馬を分割採取して神経細胞傷害に伴って増加するグリオシスのマーカーとして末梢性ベンゾジアゼピン結合部位 (peripheral type benzodiazepine binding site : PTBBS) レベルを測定した。溶媒投与群では偽手術群に比較して、獲得試行 (プラットホームへの逃避潜時にて評価) において逃避潜時の顕著な延長、及び獲得試行終了 2 時間後に実施した探査試行 (プラットホームのあった場所を横切る回数で評価) において回数の減少がみられた [図 2.6.2.2-12~図 2.6.2.2-14 参照]。また、偽手術群に比較して PTBBS レベルは増加を示し、神経細胞傷害が惹起されていることが示唆された [表 2.6.2.2-3~表 2.6.2.2-5 参照]。メマンチン塩酸塩は Aβ₁₋₄₀ 注入 24 時間前より 10 及び 20 mg/kg/日を 6 週間持続皮下投与することにより、獲得試行においては溶媒投与群でみられた逃避潜時の延長を短縮し、探査試行においては溶媒投与群でみられた回数の減少を抑制する傾向を示した [図 2.6.2.2-12 参照]。また溶媒投与群でみられた PTBBS

レベルの増加に対しては抑制作用を示した [表 2.6.2.2-3参照]。しかし、5 mg/kg/日では逃避潜時の延長及び探査試行の回数減少のいずれに対しても抑制作用はみられず [図 2.6.2.2-13参照]、神経細胞傷害に対する保護作用も示さなかった [表 2.6.2.2-4参照]。なお、メマンチン塩酸塩の持続皮下投与開始3日後、2、4及び6週後に採血し、血漿中濃度を測定した結果、メマンチン塩酸塩の5、10及び20 mg/kg/日を投与した後の、測定期間中における血漿中濃度はそれぞれ21.8~32.8 ng/mL (0.12~0.18 $\mu\text{mol/L}$, n=12)、51.5~64.0 ng/mL (0.28~0.35 $\mu\text{mol/L}$, n=11 若しくは12)、150.2~198.7 ng/mL (0.83~1.09 $\mu\text{mol/L}$, n=11 若しくは12)であった。一方、ドネペジル塩酸塩 (アセチルコリンエステラーゼ阻害薬、アリセプト[®]) はA β_{1-40} 注入5週後より4日間の学習訓練の60分前に■mg/kgを経口投与することにより、溶媒投与群でみられた逃避潜時の延長に対しては短縮する傾向を示したが有意な作用ではなく [図 2.6.2.2-12参照]、PTBBSレベルの増加に対しても抑制作用は示さなかった [表 2.6.2.2-3参照]。

次に、MK-801の0.312、0.624及び1.248 mg/kg/日を6週間持続皮下投与した場合の作用について検討したところ、0.312 mg/kg/日では逃避潜時の延長及び探査試行の回数減少に対して抑制作用はみられず [図 2.6.2.2-13参照]、神経細胞傷害に対する保護作用も認められなかった [表 2.6.2.2-4参照]。0.624 mg/kg/日では逃避潜時の延長及び探査試行の回数減少に対して抑制作用は認められず、訓練4日目では逃避潜時の延長を更に延長させる作用を示したが [図 2.6.2.2-14参照]、神経細胞傷害に対しては保護作用を示した [表 2.6.2.2-5参照]。なお、最高用量の1.248 mg/kg/日では投与10日までに全例が死亡した。

以上、A β_{1-40} 及びイボテン酸の両側海馬内注入ラットモデルにおける水迷路学習障害に対し、メマンチン塩酸塩は10及び20 mg/kg/日の持続皮下投与で神経細胞保護作用に基づくと考えられる学習障害抑制作用を示した。一方、MK-801は0.624 mg/kg/日で神経細胞保護作用を示したものの、学習障害を増悪させた。

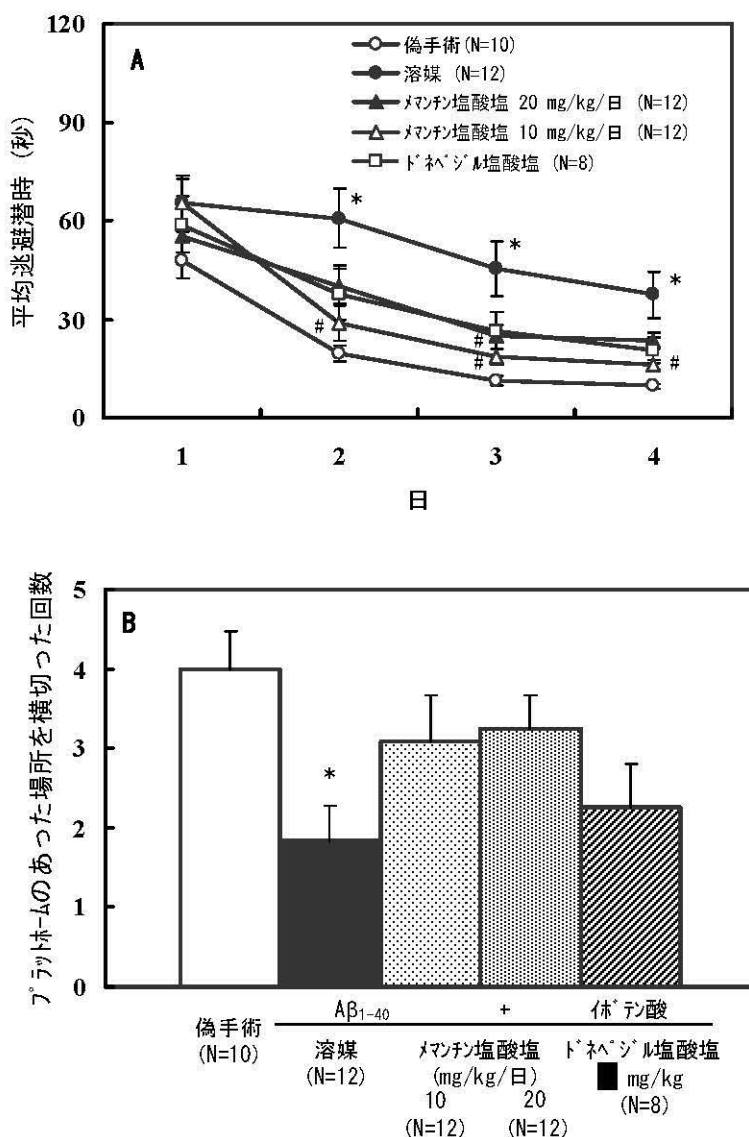


図 2.6.2.2-12 Aβ₁₋₄₀ 及びイボテン酸海馬内注入ラットの水迷路学習障害に及ぼすメマンチン塩酸塩及びドネペジル塩酸塩の作用

- (A) 水迷路学習課題の獲得試行に対する作用
水迷路学習課題の獲得試行は Aβ₁₋₄₀ 注入 35 日目より 4 日間、1 日 4 回試行し、プラットフォームへの逃避潜時を測定した。
- (B) 水迷路学習課題の探査試行に対する作用
探査試行は獲得試行終了 2 時間後に 1 試行 (60 秒間) 行い、プラットフォームのあった場所を横切る回数を測定した。

メマンチン塩酸塩 (10, 20 mg/kg/日) は Aβ₁₋₄₀ 注入 24 時間前より 6 週間持続皮下投与し、ドネペジル塩酸塩 (■ mg/kg) は Aβ₁₋₄₀ 注入 5 週後より 4 日間の学習実験 60 分前及び探査試行 60 分前に経口投与した。溶媒には生理食塩液を使用した。それぞれの値は平均値 ± 標準誤差を示す。

* p<0.05 vs. 偽手術群、# p<0.05 vs. 溶媒群 (Tukey-Kramer's test)

[資料番号 4.2.1.1.7]

表 2.6.2.2-3 Aβ₁₋₄₀とイボテン酸海馬内注入によって惹起される神経細胞傷害（PTBBSレベルの増加）に対するメマンチン塩酸塩及びドネペジル塩酸塩の作用

群	例数	PTBBS レベル (%偽手術群)
偽手術	10	100
溶媒（生理食塩液）	12	312.9 ± 19.9*
メマンチン塩酸塩（10 mg/kg/日）	12	215.7 ± 21.4* #
メマンチン塩酸塩（20 mg/kg/日）	12	196.5 ± 21.1* #
ドネペジル塩酸塩（ \blacksquare mg/kg）	8	245.9 ± 21.8*

水迷路学習試験終了翌日にラットをエーテル麻酔下で断頭後、速やかに脳を摘出した。氷冷下で左側脳より海馬領域を分割採取して測定まで-80°Cにて冷凍保存した。PTBBSレベルはDemerle-Pallardy⁷⁾らの方法に準じてPTBBSのリガンドである[³H]-PK11195の結合数として測定した。各値は平均値 ± 標準誤差を示す（偽手術群の絶対値：64.4 ± 2.9 fmol/mgたん白質）。

* p<0.05 vs. 偽手術群、# p<0.05 vs. 溶媒群（Tukey-Kramer's test）

[資料番号 4.2.1.1.7] の本文記載の数値及び Fig. 3 から作成

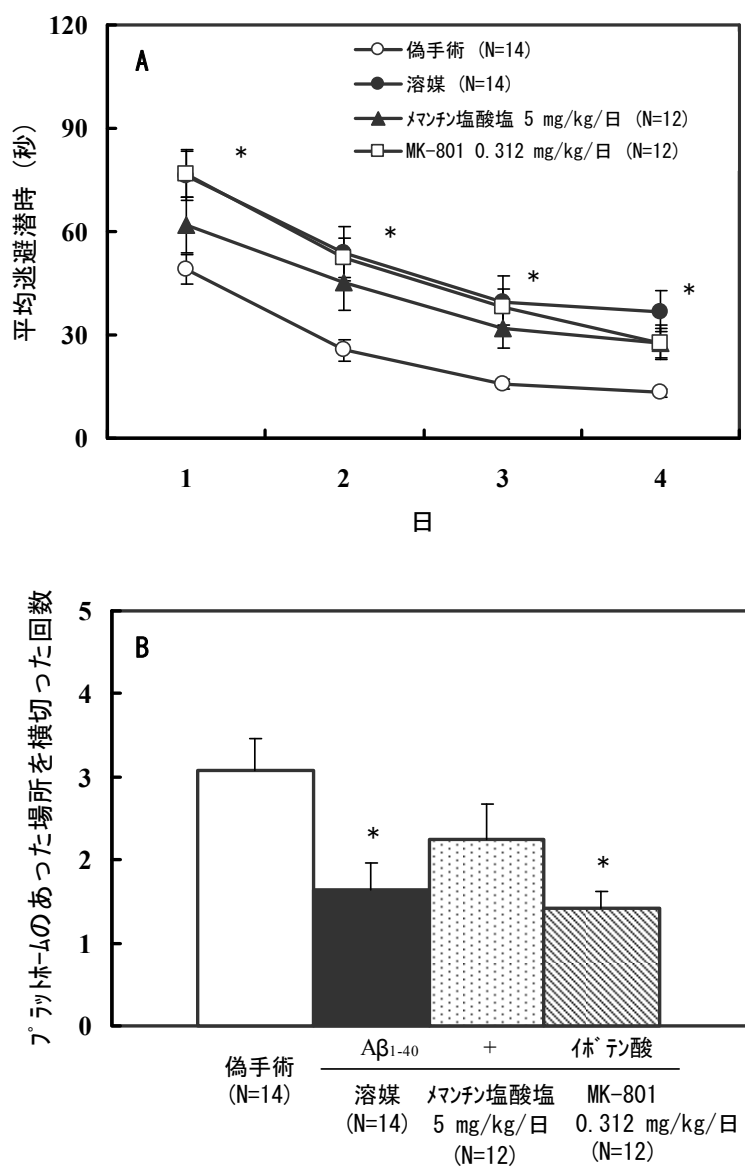


図 2.6.2.2-13 Aβ₁₋₄₀ 及びイブプロフェン海馬内注入ラットの水迷路学習障害に及ぼす低用量のメマンチン塩酸塩及び MK-801 の作用

- (A) 水迷路学習課題の獲得試行に対する作用
水迷路学習課題の獲得試行は Aβ₁₋₄₀ 注入 35 日目より 4 日間実施した。
- (B) 水迷路学習課題の探索試行に対する作用
探索試行は獲得試行終了 2 時間後に 1 試行 (60 秒間) 行った。

メマンチン塩酸塩 (5 mg/kg/日) 及び MK-801 (0.312 mg/kg/日) は Aβ₁₋₄₀ 注入 24 時間前より 6 週間持続皮下投与した。溶媒には生理食塩液を使用した。それぞれの値は平均値 ± 標準誤差を示す。

*p<0.05 vs. 偽手術群 (Tukey-Kramer's test)

[資料番号 4.2.1.1.8]

表 2.6.2.2-4 A β_{1-40} とイボテン酸海馬内注入によって惹起される神経細胞傷害に対する低用量のメマンチン塩酸塩及び MK-801 の作用

群	例数	PTBBS レベル (%偽手術群)
偽手術	14	100
溶媒 (生理食塩液)	14	329.6 \pm 22.5*
メマンチン塩酸塩 (5 mg/kg/日)	12	311.3 \pm 22.7*
MK-801 (0.312 mg/kg/日)	12	291.1 \pm 27.0*

水迷路学習試験終了翌日にラットをエーテル麻酔下で断頭後、速やかに脳を摘出した。氷冷下で左側脳より海馬領域を分割採取して測定まで -80°C にて冷凍保存した。各値は平均値 \pm 標準誤差を示す (偽手術群の絶対値：114.0 \pm 2.7 fmol/mg たん白質)。

* $p < 0.05$ vs. 偽手術群 (Tukey-Kramer's test)

[資料番号 4.2.1.1.8] の本文記載の数値及び Fig. 3 から作成

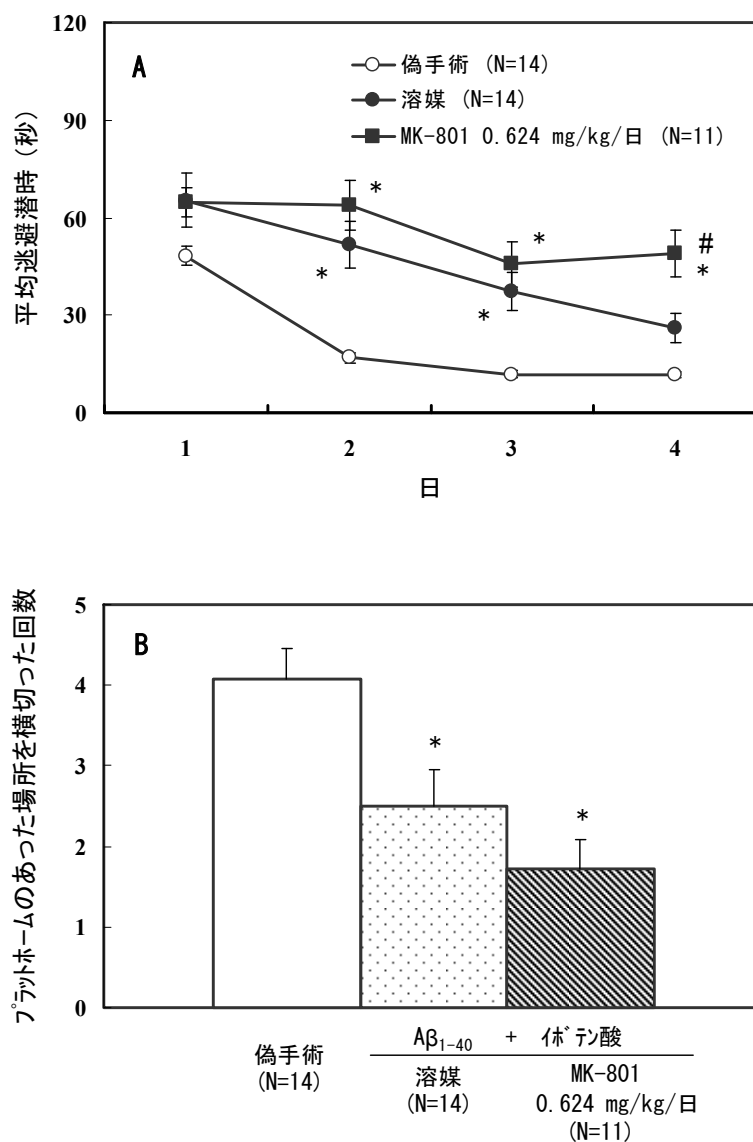


図 2.6.2.2-14 $A\beta_{1-40}$ 及びイボテン酸海馬内注入ラットの水迷路学習障害に及ぼす高用量 MK-801 の作用

(A) 水迷路学習課題の獲得試行に対する作用
水迷路学習課題の獲得試行は $A\beta_{1-40}$ 注入 35 日目より 4 日間実施した。

(B) 水迷路学習課題の探索試行に対する作用
探索試行は獲得試行終了 2 時間後に 1 試行 (60 秒間) 行った。

MK-801 (0.624 mg/kg/日) は $A\beta_{1-40}$ 注入 24 時間前より 6 週間持続皮下投与した。溶媒には生理食塩液を使用した。それぞれの値は平均値 \pm 標準誤差を示す。

* $p < 0.05$ vs. 偽手術群、# $p < 0.05$ vs. 溶媒群 (Tukey-Kramer's test)

[資料番号 4.2.1.1.9]

表 2.6.2.2-5 A β_{1-40} とイボテン酸海馬内注入によって惹起される神経細胞傷害に対する高用量 MK-801 の作用

群	例数	PTBBS レベル (%偽手術群)
偽手術	14	100
溶媒 (生理食塩液)	14	285.6 \pm 11.8*
MK-801 (0.624 mg/kg/日)	11	232.5 \pm 15.6* [#]

水迷路学習試験終了翌日にラットをエーテル麻酔下で断頭後、速やかに脳を摘出した。氷冷下で左側脳より海馬領域を分割採取して測定まで -80°C にて冷凍保存した。各値は平均値 \pm 標準誤差を示す (偽手術群の絶対値：118.7 \pm 2.1 fmol/mg たん白質)。

* $p < 0.05$ vs. 偽手術群、# $p < 0.05$ vs. 溶媒群 (Tukey-Kramer's test)

[資料番号 4.2.1.1.9] の本文記載の数値及び Fig. 2 から作成

2.6.2.2.3.2.2 正常ラットの記憶・学習能に対する作用

[資料番号 4.2.1.1.10]

A β_{1-40} とイボテン酸の両側海馬内注入ラットモデルにおいて神経細胞保護作用を示したメマンチン塩酸塩 (20 mg/kg/日持続皮下投与) 及びMK-801 (0.624 mg/kg/日持続皮下投与) [2.6.2.2.3.2.1 項参照] の正常ラットの記憶・学習能に及ぼす影響を、雄性F344 系ラットを用いて比較検討した。水迷路学習の獲得試行において、メマンチン塩酸塩投与群では溶媒投与群と同様の経日的な逃避短縮がみられ、両群間で差は認められなかった。一方、MK-801 投与群では溶媒投与群に比べてプラットホームへの逃避潜時の延長がみられた。探査試行ではメマンチン塩酸塩投与群では溶媒投与群との間に差はみられなかったが、MK-801 投与群ではプラットホームのあった場所を横切る回数の減少が認められた。以上より、神経細胞保護作用を示す用量のメマンチン塩酸塩は正常ラットの水迷路学習に何ら影響しないが、MK-801 は学習障害を惹起することが明らかとなった[図 2.6.2.2-15参照]。

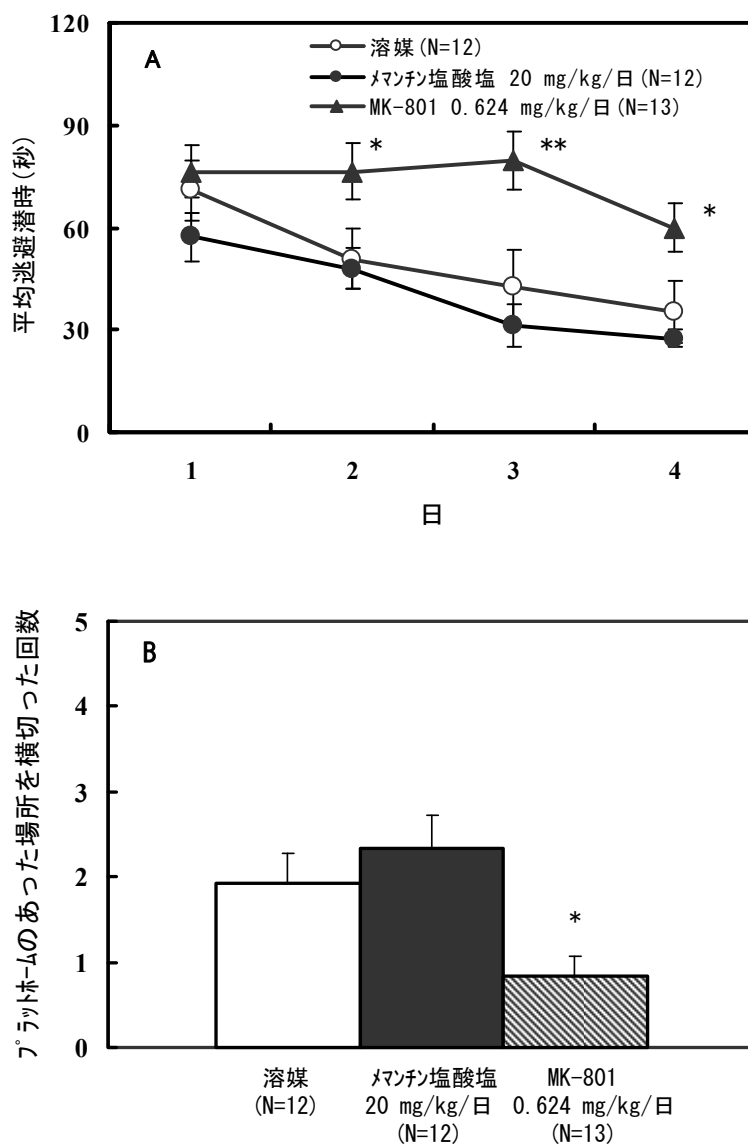


図 2.6.2.2-15 正常ラットの水迷路学習課題に対するメマンチン塩酸塩及び MK-801 の作用

水迷路学習課題の獲得試行は被験薬投与開始7日後から4日間、1日4回試行し、プラットフォームへの逃避潜時を測定した(A)。探索試行は獲得試行終了2時間後に1試行(60秒間)を行い、プラットフォームのあった場所を横切る回数を測定した(B)。メマンチン塩酸塩(20 mg/kg/日)及びMK-801(0.624 mg/kg/日)は試験開始6日前より皮下に10日間持続皮下投与した。溶媒には生理食塩液を使用した。それぞれの値は平均値 ± 標準誤差を示す。

* p<0.05, ** p<0.01 vs. 溶媒群 (Dunnett's test)

2.6.2.2.4 代謝物の薬理

2.6.2.2.4.1 メマンチン代謝物のNMDA受容体チャネル親和性

[資料番号 4.2.1.1.1]

代謝物 █████ 化合物について、雄性SD系ラット大脳皮質神経細胞膜画分を用い、グルタミン酸 (10 μmol/L) 及びグリシン (10 μmol/L) を共存させることでNMDA受容体チャネルを開口状態とし、³H]-MK-801 (5 nmol/L) をリガンドとして置換活性を測定した。その結果、メマンチン塩酸塩の置換活性 (IC₅₀=1.47 μmol/L、Ki=0.67 μmol/L) に対して、最も強かった █████ でも 1/10 以下の活性 (IC₅₀=19.95 μmol/L、Ki=9.07 μmol/L) であった [表 2.6.2.2-6参照]。

表 2.6.2.2-6 ラット大脳皮質神経細胞膜画分における³H]-MK-801 結合置換活性

化合物	³ H]-MK-801 結合置換活性 (μmol/L)		例数
	IC ₅₀	Ki	
メマンチン塩酸塩	1.47	0.67	2
█████	73.15	33.3	8
█████	54.43	24.74	2
█████	25.50	11.59	2
█████	664	301	2
█████	>100	>100	2
█████	37.20	16.91	2
█████	19.95	9.07	2
█████	>100	>100	2
█████	55.32	25.15	2
█████	>100	>100	2
█████	>100	>100	2
█████	84.89	35.6	2

[資料番号 4.2.1.1.1] のTableを改変

2.6.2.2.4.2 メマンチン代謝物のNMDA受容体チャネル阻害作用

[資料番号 4.2.1.1.11]

代謝物のうち、³H]-MK-801 置換活性が最も強かった █████ を含め、█████、█████、█████ 及び █████ の4化合物について、ラット海馬初代培養神経細胞を用いて-70 mVの膜電位固定下でのNMDA (200 μmol/L、D-セリン 10 μmol/L 存在下) 誘発電流に対する抑制作用を検討した。その結果、メマンチン塩酸塩の抑制活性 (IC₅₀=1.56 μmol/L) に対して、各代謝物のIC₅₀値は 30.07~68.45 μmol/Lであり、いずれもメマンチン塩酸塩と比較して弱かった [表 2.6.2.2-7参照]。

表 2.6.2.2-7 ラット培養海馬神経細胞における NMDA 誘発電流抑制作用

化合物	NMDA 誘発電流抑制活性 (IC ₅₀ ; μmol/L)	例数
メマンチン塩酸塩	1.56	9
██████████	68.45	4
██████████████████	30.78	4
██████████	37.21	4
██████████	30.07	7

[資料番号 4.2.1.1.11] の Table を改変

2.6.2.3 副次的薬理試験

本項目に該当する試験は実施していない。

2.6.2.4 安全性薬理試験

安全性薬理試験は、従来的一般薬理試験としてメマンチン塩酸塩の中樞神経系及び呼吸・循環器系を含む各器官系に対する作用を臨床投与経路である経口投与若しくは十二指腸内投与により検討し、また *in vitro* 試験も併せて実施した。経口投与ではメマンチン塩酸塩の 100 mg/kg を、十二指腸内投与では 30 mg/kg を最高用量に、また、*in vitro* 試験では 1×10^{-3} g/mL (4.6 mmol/L) を最高濃度に設定した。

2.6.2.4.1 一般症状・行動及び中枢神経系に及ぼす影響

[資料番号 4.2.1.3.1]

統計補充解析 [資料番号 4.2.1.3.2] ^{注1)}

メマンチン塩酸塩の 10、30 及び 100 mg/kg を雌性 Naval Medical Research Institute (NMRI) 系マウス (1 群 8 匹) に経口投与し、投与後 30、90、150 及び 300 分に Irwin 法に従い一般症状及び行動に及ぼす影響を検討した。メマンチン塩酸塩は 30 mg/kg 以上で体勢反応の軽度低下を示し、100 mg/kg では更に反応性、触・疼痛反応、驚愕反応、同側屈筋反射、正向反射及び握力の低下若しくは抑制がみられ、常同行動、挙尾反応、振戦、異常姿勢及び歩行失調が認められた。

メマンチン塩酸塩の 5、15 及び 50 mg/kg を雌性 NMRI 系マウス (1 群 10 匹) に経口投与し、投与直後から 30 分間隔で 120 分後まで各 10 分間の自発運動量を測定した。陽性対照として d-アンフェタミンの 1 及び 2.5 mg/kg を経口投与した。メマンチン塩酸塩は用量依存的に自発運動量を増加し、5 mg/kg 以上で有意であった。一方、d-アンフェタミンの 2.5 mg/kg は投与後 60 分以降に自発運動量を増加させた。

メマンチン塩酸塩の 15、30 及び 60 mg/kg を雌雄 NMRI 系マウス (1 群雌雄各 5 匹) に経口投与し、60 分後にヘキソバルビタール (45 mg/kg) を静脈内投与後、正向反射が回復するまでの時間を計測して睡眠時間 (最長 30 分間) とした。陽性対照としてクロルプロマジンの 4 mg/kg を経口投与した。メマンチン塩酸塩の用量の増加に伴ってヘキソバルビタール誘発睡眠時間は延長し、30 mg/kg 以上で有意であった。一方、クロルプロマジンは全例でヘキソバルビタール誘発睡眠時間を 30 分以上に延長させた。

メマンチン塩酸塩の 10、15、22 及び 33 mg/kg を雌性 NMRI 系マウス (1 群 5 匹) に経口投与し、60 分後に電撃 (45 mA、0.7 秒) を与え、後肢の強直性屈曲若しくは伸展、及び痙攣死の有無を観察した。陽性対照としてジアゼパムの 20 mg/kg を経口投与した。メマンチン塩酸塩は電撃痙攣に対して抗痙攣作用 ($ED_{50}=18.4$ mg/kg) を示した。一方、ジアゼパムは 80% の個体で抗痙攣作用を示した。

^{注1)} 本試験における統計学的解析が試験デザインに相応しい解析方法ではなかったため、適切な統計学的手法により再解析を実施した。

メマンチン塩酸塩の 10、15、22 及び 33 mg/kg を雌性 NMRI 系マウス（1 群 5 匹）に経口投与し、60 分後にペンテトラゾール（110 mg/kg）を皮下投与してその後 60 分間の強直性若しくは間代性痙攣、及び痙攣死の有無を観察した。陽性対照としてジアゼパムの 25 mg/kg を経口投与した。メマンチン塩酸塩はペンテトラゾール誘発痙攣に対していずれの用量でも抗痙攣作用を示さず、22 mg/kg 以上で有意に痙攣を増強した。一方、ジアゼパムはペンテトラゾール誘発痙攣を完全に抑制した。

メマンチン塩酸塩の 10、30 及び 100 mg/kg を雌性 NMRI 系マウス（1 群 5 匹）に経口投与し、60 分後に痙攣閾値下電撃（5 mA、0.8 秒）を与え、後肢の強直性伸展の有無を観察した。陽性対照としてベメグリドの 20 及び 40 mg/kg を経口投与した。メマンチン塩酸塩はいずれの用量でも痙攣誘発作用を示さなかった。一方、ベメグリドは 20 mg/kg では 40% の個体で、40 mg/kg では全例で痙攣を示した。

メマンチン塩酸塩の 10、30 及び 100 mg/kg を雌性 NMRI 系マウス（1 群 10 匹）に経口投与し、投与後 60 分に痙攣を誘発しない低用量のペンテトラゾール（50 mg/kg）を皮下投与してその後 60 分間の強直性若しくは間代性痙攣及び痙攣死の有無を観察した。陽性対照として、d-アンフェタミンの 50 mg/kg を経口投与した。メマンチン塩酸塩は用量依存的に痙攣誘発作用（ED₅₀=17.8 mg/kg）を示したが死亡例はなかった。d-アンフェタミンも痙攣を誘発し、個体の 30%が死亡した。

メマンチン塩酸塩の 10、30 及び 100 mg/kg を雌性 NMRI 系マウス（1 群 10 匹）に経口投与し、60 分後に 1%酢酸を 10 mL/kg の割合で腹腔内投与してその後 15 分間のライジング反応（苦悶症状）を観察した。陽性対照としてアセチルサリチル酸の 100 mg/kg を経口投与した。メマンチン塩酸塩はマウス酢酸ライジング法において鎮痛作用（ED₅₀=44.9 mg/kg）を示した。一方、アセチルサリチル酸はライジング反応数を 39%抑制した。

メマンチン塩酸塩の 10、20 及び 40 mg/kg を雌性 SD 系ラット（1 群 10 匹）に経口投与し、30 分及び 60 分後にラットの尾に熱刺激を加えて痛み反応を示すまでの時間を計測した。陽性対照として、アセチルサリチル酸の 100 及び 250 mg/kg を経口投与した。メマンチン塩酸塩はいずれの用量でもラットテイルフリック法において鎮痛作用を示さなかった。一方、アセチルサリチル酸は 250 mg/kg で有意な鎮痛作用を示した。

メマンチン塩酸塩の 10、30 及び 100 mg/kg を雌性 NMRI 系マウス（1 群 8 匹）に経口投与し、1 時間後にレセルピン（5 mg/kg）を腹腔内投与して誘発される体温低下に対する影響を直腸温を測定して検討した。直腸温は、メマンチン塩酸塩投与前に 30 分間隔で 2 回、投与後は 1 時間間隔で 4 時間まで 4 回測定した。メマンチン塩酸塩は、レセルピン誘発体温低下を 10 mg/kg 以上で抑制したが、用量依存性は認められなかった。

2.6.2.4.2 呼吸・循環器系に及ぼす影響

[資料番号 4.2.1.3.1, 4.2.1.3.3~4.2.1.3.5]

統計補充解析 [資料番号 4.2.1.3.2, 4.2.1.3.6] 注¹⁾

α -クロラロースとウレタンの混合液を静脈内投与して麻酔した雌性ビーグル犬（5 頭）に溶媒及びメマンチン塩酸塩の 3、10 及び 30 mg/kg を 60 分間隔で累積的に十二指腸内に投与し、呼吸・循環器系に及ぼす影響を検討した。なお溶媒投与前及びメマンチン塩酸塩の最終投与後の測定以降にノルアドレナリン及びイソプロテレノールの 2 μ g/kg を投与し、血圧及び心拍数への影響を検討した [資料番号 4.2.1.3.1 参照]。溶媒投与後の変化と比較して、メマンチン塩酸塩は 10 mg/kg 以上で心拍出量及び一回拍出量の有意な減少を、30 mg/kg では更に左心室収縮期圧の有意な低下を示したが、末梢動脈圧、肺動脈圧、肺動脈楔入圧、心拍数、左室内圧最大上昇速度（LV dp/dt max）、中心静脈圧、血中酸素分圧、及び血液 pH に変化はみられなかった。なお、ノルアドレナリン及びイソプロテレノールの血圧及び心拍数に及ぼす作用はメマンチン塩酸塩の投与による影響を受けなかった。

送信機を埋め込んだ雌雄のビーグル犬（各 4 頭）にメマンチン塩酸塩の 0.3、3.0、6.0 及び 10 mg/kg/日を 7 日間ごとに漸増させながら 28 日間経口投与し、血圧、心拍数及び心電図各パラメータ（PR、RR、QRS 及び QT 間隔）をテレメトリー法により連続的に測定し、QTc 間隔を算出した。また、一般状態及び体重への影響を検討した。メマンチン塩酸塩の 6.0 及び 10 mg/kg/日投与群の雄で用量依存的な心拍数の増加が認められたが、軽度な変化で有意差もなく毒性学的な意義は小さいと考えられた。血圧及び心電図各パラメータにはいずれの投与量でも変化は認められず、また、一般状態及び体重にも影響はなかった。0.3、3.0、6.0 及び 10 mg/kg/日の投与 7 日目の投与後 4 時間の血漿中濃度は、それぞれ、13.1、215、544 及び 918 ng/mL であった [資料番号 4.2.1.3.4 参照]。

メマンチン塩酸塩の 10、30 及び 100 μ mol/L を hERG を発現させたチャイニーズハムスター卵巣細胞に適用し、蛍光色素法による膜電位測定とホールセルパッチクランプ法による K⁺チャンネル電流測定を行い、hERG 型 K⁺チャンネルへの影響を検討した [資料番号 4.2.1.3.3 参照]。メマンチン塩酸塩は 100 μ mol/L で膜電位変化を 29%抑制し、K⁺チャンネル電流を 15%抑制した。

雌雄のビーグル犬を用いた 26 週間反復経口投与毒性試験（最終投与量：3、9 及び 18 mg/kg/日、各群雌雄 6 頭、[2.6.6.3.4 項参照]）において心電図 QT 間隔及び QTc 間隔（Fridericia 式及び Van de Water's 式）への影響を評価した [資料番号 4.2.1.3.5 参照]。投与第 26 週の投与後 2 時間の心電図 QT 間隔及び QTc 間隔に影響は認められなかった。

注¹⁾ 本試験における統計学的解析が試験デザインに相応しい解析方法ではなかったため、適切な統計学的手法により再解析を実施した。

2.6.2.4.3 自律神経系・平滑筋に及ぼす影響

[資料番号 4.2.1.3.1]

統計補充解析 [資料番号 4.2.1.3.2] 注¹⁾

雌性 Hartley 系モルモット (6 匹) から約 1.5 cm の回腸を摘出して Tyrode 液で満たした器官槽内に懸垂し、メマンチン塩酸塩の $1 \times 10^{-9} \sim 1 \times 10^{-3}$ g/mL (4.6 nmol/L ~ 4.6 mmol/L) を適用して収縮反応を測定した。メマンチン塩酸塩は 1×10^{-5} g/mL (46 μ mol/L) 以上で摘出回腸を収縮させ、 1×10^{-4} g/mL (460 μ mol/L) で最大収縮反応 (アセチルコリン 5×10^{-7} g/mL による収縮の 26% 相当) を示したが、 1×10^{-3} g/mL (4.6 mmol/L) では反応が減弱 (アセチルコリン 5×10^{-7} g/mL による収縮の 9% 相当) した。メマンチン塩酸塩による収縮は、パパベリン (3×10^{-5} g/mL)、アンタゾリン (3×10^{-8} g/mL) 及びアトロピン (3×10^{-8} g/mL) で抑制されなかった。一方、アセチルコリン (5×10^{-7} g/mL)、ヒスタミン (5×10^{-8} g/mL)、塩化バリウム (2×10^{-4} g/mL) 及びセロトニン (1.5×10^{-8} g/mL) による収縮をメマンチン塩酸塩は 1×10^{-5} g/mL 以上で濃度依存的に抑制した。

2.6.2.4.4 消化器系に及ぼす影響

[資料番号 4.2.1.3.1]

統計補充解析 [資料番号 4.2.1.3.2] 注¹⁾

メマンチン塩酸塩の 10、20 及び 40 mg/kg を雌性 SD 系ラット (1 群 10 匹) に経口投与し、1 時間後に 10% 炭末と 5% アラビアゴム末の混合液を 10 mL/kg で経口投与してその 3 時間後に盲腸内の炭末の有無で腸管輸送能を評価した。メマンチン塩酸塩は腸管輸送能を抑制し、ED₅₀ 値は約 20 mg/kg であった。

2.6.2.4.5 尿量・尿中電解質排泄に及ぼす影響

[資料番号 4.2.1.3.1]

統計補充解析 [資料番号 4.2.1.3.2] 注¹⁾

メマンチン塩酸塩の 10、20 及び 40 mg/kg を雌性 SD 系ラット (1 群 10 匹) に経口投与し、投与後 0~1、1~2、2~3、3~4、4~5 及び 5~24 時間にそれぞれ尿を採取し、尿量及び尿中電解質排泄に及ぼす影響を検討した。陽性対照としてフロセミドの 20 mg/kg を投与した。メマンチン塩酸塩を投与後 0~2、0~3、0~4 及び 0~5 時間の積算尿において 20 mg/kg 以上で Na⁺ 及び Cl⁻ の総排泄量の有意な増加、40 mg/kg で尿量の有意な増加が認められたが、K⁺ の排泄量には 40 mg/kg でも影響はみられなかった。なお、投与後 0~24 時間の積算尿では、いずれの測定項目についても変化はみられなかった。一方、フロセミドでは、投与後 0~1 時間から投与後 0~5 時間までの積算尿において Na⁺、K⁺ 及び Cl⁻ の排泄量の有意な増加が認められた。

注¹⁾ 本試験における統計学的解析が試験デザインに相応しい解析方法ではなかったため、適切な統計学的手法により再解析を実施した。

2.6.2.5 薬力学的薬物相互作用

本項目に該当する試験は実施しなかった。

2.6.2.6 考察及び結論

グルタミン酸は興奮性神経伝達物質として記憶や学習などの脳の高次機能に重要な役割を果たしている一方で、過剰にNMDA受容体チャネルを活性化した場合にはLTP形成障害^{8,9)}や神経細胞傷害^{10,11)}を惹起することが報告されている。AD患者においては、死後脳でグルタミン酸取り込み機構の機能低下がみられること¹²⁾、一部の患者では脳脊髄液中のグルタミン酸濃度が高いこと^{13,14)}、症状の悪化に伴って脳脊髄液中のグルタミン酸濃度が上昇していること¹⁴⁾など脳内の細胞外グルタミン酸濃度が上昇していることが示唆されている。以上のことから、ADの認知障害や神経変性には増加したグルタミン酸によるNMDA受容体チャネルの過剰な活性化が関与していることが考えられ、NMDA受容体チャネル拮抗薬はADの病態を改善することが期待される。

メマンチン塩酸塩はNMDA受容体チャネルに対して選択的で低親和性の結合を示し [2.6.2.2.1.1, 2.6.2.2.1.2 項参照]、ラット培養海馬神経細胞においてNMDA誘発電流を選択的かつ濃度依存的に抑制した (IC₅₀=1.56 μmol/L、-70 mVの膜電位固定下) [2.6.2.2.1.3 項参照]。また、メマンチン塩酸塩のNMDA誘発電流抑制作用は、その発現と消失が速やかである特徴を有し、膜電位が浅くなるほどその作用が弱くなる膜電位依存性を示した [2.6.2.2.1.3 項参照]。これらの性質から、メマンチン (メマンチン塩酸塩の遊離塩基体) は、生理的な神経興奮により一過性に高濃度のグルタミン酸がシナプス間隙に遊離して¹⁵⁾、シナプス後膜電位が上昇したときには速やかにNMDA受容体チャネルから解離すると考えられた。また、このときLTP形成には一過性のNMDA受容体チャネルの活性化が必要となるが、メマンチンは解離しているために影響を及ぼさないと推測された [図 2.6.2.6-1 参照]。NMDA受容体チャネル阻害作用を有する代表的な化合物であるMK-801 との比較実験において、MK-801 では-70 mV以上の膜電位においてNMDA誘発電流抑制のIC₅₀ 値はLTP形成抑制作用のIC₅₀ 値を上回っていたのに対し、メマンチン塩酸塩では-70 mVから-20 mV付近までの膜電位においてNMDA誘発電流抑制のIC₅₀ 値はLTP形成抑制作用のIC₅₀ 値を下回っていた。すなわち、メマンチン塩酸塩はNMDA誘発電流を抑制する濃度ではLTP形成に与える影響は少ないことが示唆された [2.6.2.2.1.4 項参照]。

NMDA受容体チャネルの持続的な活性化によるシナプス可塑性障害を反映する*in vitro*モデルとして、ラット海馬スライスを用い、内因性のNMDA受容体チャネルブロッカーであるMg²⁺の細胞外濃度を低下させることによるLTP形成への影響を検討したところ、LTP形成は著しく障害されたが、メマンチン塩酸塩は 1 及び 10 μmol/Lの濃度でこれを抑制した [2.6.2.2.2.1.1 項参照]。また、可逆的にfEPSPを抑制する濃度 (10 μmol/L) のNMDAを存在させることによってLTP形成は障害されたが、メマンチン塩酸塩は 1 μmol/Lの濃度でこれを抑制した [2.6.2.2.2.1.2 項参照]。NMDA受容体チャネルが持続的に活性化された状態ではバックグラウンドレベルのシナプス後膜電位変化 (シナプティックノイズ) が増大

するために、LTP誘導のためのシグナル/ノイズ比が減少し、LTPが形成されにくくなったと考えられ、メマンチン塩酸塩はこれを解消したと推測される[図 2.6.2.6-2参照]。更に、*in vivo*のモデルとして、ラットにNMDAを末梢投与することによって惹起された、神経細胞傷害によらないと考えられる受動的回避学習障害に対して、メマンチン塩酸塩は 2.5 及び 5.0 mg/kgの腹腔内投与でこれを抑制した [2.6.2.2.2.2 項参照]。このように、NMDA受容体チャンネルの持続的な活性化は神経細胞傷害とは関係のないLTP形成障害や学習障害をもたらし、メマンチン塩酸塩はそれらに対して抑制作用を有することが示唆された。

ラット培養大脳皮質神経細胞を用いた神経細胞傷害モデルにおいて、メマンチン塩酸塩は $A\beta_{25-35}$ とグルタミン酸の併用、及びグルタミン酸単独による神経細胞傷害に対して濃度依存的な抑制作用を示し、 IC_{50} 値はそれぞれ 0.13 $\mu\text{mol/L}$ 及び 1.66 $\mu\text{mol/L}$ であった [2.6.2.2.3.1 項参照]。前者では、 $A\beta_{25-35}$ 及びグルタミン酸はともに単独では明らかな細胞傷害を惹起しない濃度を用いていることから、グルタミン酸の濃度上昇が細胞傷害を起こさないレベルであっても $A\beta_{25-35}$ が共存することによって神経細胞毒性を発現しうること、そのような相乗効果に対してメマンチン塩酸塩がグルタミン酸単独による神経細胞傷害に対してよりも強力な抑制作用を示すことが明らかとなった (1.0 $\mu\text{mol/L}$ で完全に抑制)。また*in vivo*においても、 $A\beta_{1-40}$ 及びイボテン酸をラットの海馬に注入して惹起される神経細胞傷害及び水迷路学習障害に対し、メマンチン塩酸塩は 10 及び 20 mg/kg/日の持続皮下投与で神経細胞保護作用とそれに基づくと考えられる学習障害抑制作用を示した [2.6.2.2.3.2 項参照]。一方、MK-801 は 0.624 mg/kg/日の持続皮下投与で神経細胞保護作用を示したにもかかわらず、学習障害に対してはむしろ増悪をもたらした。このような両者の作用の差異については正常ラットにおける成績から以下のように考察している。

正常ラットの水迷路学習において、メマンチン塩酸塩 20 mg/kg/日及びMK-801 0.624 mg/kg/日を持続皮下投与したとき、メマンチン塩酸塩では水迷路学習機能には何ら影響はみられなかったが、MK-801 では明らかな学習障害惹起作用が認められた [2.6.2.2.3.2.2 項参照]。すなわち、この学習障害惹起作用が $A\beta_{1-40}$ とイボテン酸のラット海馬内注入モデルにおいて発現したため、MK-801 では神経細胞保護による学習障害抑制作用が相殺されたと考えられ、これに対して、メマンチン塩酸塩は学習障害惹起作用を有さないため、神経細胞保護に基づく学習障害抑制作用を示したものと推察された。メマンチン塩酸塩が学習障害を惹起しなかったことは、前述したようにMK-801 に比較してメマンチン塩酸塩が強い膜電位依存性及び速やかな作用発現と消失のキネティクスを有することにより、NMDA誘発電流抑制作用とLTP形成抑制作用の有効濃度に乖離があることに起因すると考えられる。以上より、メマンチン塩酸塩は正常な記憶学習機能やLTP形成には影響しない安全な治療薬になりうる可能性が示唆された。

ヒトにメマンチン塩酸塩 20 mgを 24 週間反復投与したときの平均血漿中濃度 (後期第II相試験 (IE2101 二重盲検期)) は 149 ng/mL (0.83 $\mu\text{mol/L}$) であり [2.7.6.19.4 項参照]、 $A\beta_{1-40}$ 及びイボテン酸海馬内注入モデルにおける 10 及び 20 mg/kg/日投与時の定常血漿中濃度 (0.28~0.35 $\mu\text{mol/L}$ 及び 0.83~1.09 $\mu\text{mol/L}$) とほぼ同じレベルである [2.6.2.2.3.2 項参照]。

NMDAの末梢投与モデルにおける5.0 mg/kg腹腔内投与時の血清中濃度も1.0 μmol/Lであることが報告されている¹⁶⁾。また、これらの濃度は*in vitro*におけるメマンチン塩酸塩の有効濃度範囲に相当しており、メマンチン塩酸塩の臨床的な有効用量と非臨床試験成績（有効性）との関連性が認められた。したがって、メマンチン塩酸塩はAD患者において、グルタミン酸によるNMDA受容体活性化を介した記憶学習障害及び神経細胞毒性を抑制することが期待される。

メマンチンの代謝物のNMDA受容体チャンネルに対する結合親和性及びNMDA受容体チャンネル電流に対する抑制作用はメマンチン塩酸塩に比べて弱く、メマンチン塩酸塩の薬効果において、これら代謝物はNMDA受容体チャンネル拮抗薬として寄与しないと考えられた[2.6.2.2.4 項参照]。

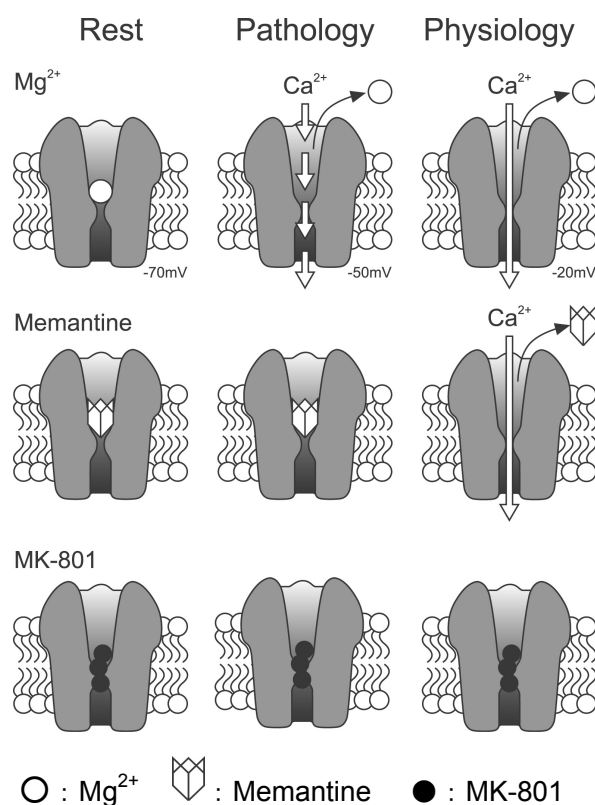


図 2.6.2.6-1 病態及び生理的状態におけるメマンチン、Mg²⁺及びMK-801のNMDA受容体チャネル阻害様式の違い¹⁷⁾

メマンチンの NMDA 受容体チャネル阻害作用の膜電位依存性の強さ、及び受容体からの解離速度は Mg²⁺ と MK-801 の間にあり、この性質によりメマンチンは、病態特異的な NMDA 受容体チャネル阻害作用を示すと考えられる。

Rest : 静止時のシナプス後膜電位は-70 mV 程度と想定され、この状態では NMDA 受容体チャネルは Mg²⁺、メマンチン及び MK-801 のいずれによってもブロックされている。

Pathology : AD の病態においてシナプス間隙のグルタミン酸濃度が持続的に上昇するときにはシナプス後膜電位は-50 mV 程度に上昇する。この条件では、Mg²⁺がそのチャネル阻害作用の強い膜電位依存性により NMDA チャネル受容体から解離し、グルタミン酸による受容体活性化に伴う細胞内への Ca²⁺流入などを介して細胞傷害、並びにシナプティックノイズが惹起される。一方、メマンチン及び MK-801 は、この程度の脱分極では NMDA 受容体チャネルから解離することなく、グルタミン酸による細胞傷害やシナプティックノイズを抑制する。

Physiology : 生理的に LTP のようなシナプス可塑性変化を誘導する伝達シグナルが伝わると一過性に高濃度のグルタミン酸が遊離し、シナプス後膜電位が-20 mV 程度にまで上昇する。この強い脱分極条件では、メマンチンがそのチャネル阻害作用の膜電位依存性と速い解離速度により NMDA 受容体チャネルから速やかに解離し、一時的な NMDA 受容体チャネルの活性化を必要とする LTP 形成には影響しない。一方、MK-801 はこの状態においても NMDA 受容体チャネルから解離せず、LTP 形成を妨げる。

[資料番号 4.3.1] の Fig. 6 を改変

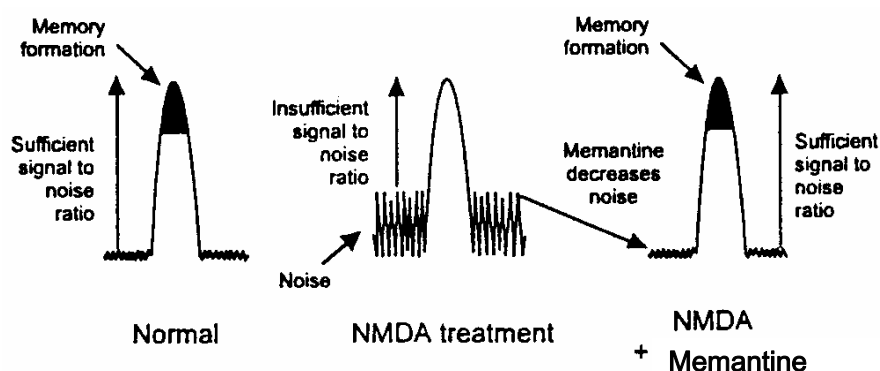


図 2.6.2.6-2 シナプティックノイズの上昇時におけるNMDA受容体チャンネルに対するメマンチンの作用と認知機能改善作用（仮説）¹⁷⁾

持続的な NMDA 受容体チャンネルの活性化により、シナプティックノイズが増大した状態では、LTP のようなシナプス可塑性変化を誘導する伝達シグナルがノイズに隠れてしまい、情報が伝わり難くなる（シグナル/ノイズ比の低下）。メマンチンはそのシナプティックノイズを解消し、正常なシナプス可塑性変化の誘導を回復することによって、認知機能改善作用を示す。

安全性薬理試験として中枢神経系、呼吸・循環器系、自律神経系、消化器系及び泌尿器系に対する影響を評価した結果、中枢神経系に対する作用をはじめとして種々の作用が観察されたが、高用量若しくは高濃度で認められた変化がほとんどであり、薬効用量（20 mg/kg/日持続皮下投与、血漿中濃度：約 1 $\mu\text{mol/L}$ =179 ng/mL）[2.6.2.2.3.2 項参照] で臨床的に問題となる可能性は低いと考えられた。

メマンチン塩酸塩はhERG型 K^+ チャンネルに対して、100 $\mu\text{mol/L}$ （17.9 $\mu\text{g/mL}$ ）で膜電位変化を 29%抑制、 K^+ チャンネル電流を 15%抑制したのみで、 IC_{50} 値は 100 $\mu\text{mol/L}$ を超える濃度と推定され、NMDA受容体チャンネル阻害作用（ IC_{50} =1.56 $\mu\text{mol/L}$ ）[2.6.2.2.1.3 項参照] と比べて約 60 倍以上高い値であった。また、ビーグル犬にメマンチン塩酸塩の 10 mg/kg/日を 7 日間経口投与後のQT及びQTc間隔を含む心電図各パラメータに変化はみられず、投与後 4 時間の血漿中濃度は 918 ng/mLであった。ビーグル犬を用いた 26 週間反復経口投与毒性試験（最終投与量：3、9 及び 18 mg/kg/日）においても、投与第 26 週の心電図QT及びQTc間隔にメマンチン塩酸塩投与による影響は認められず、投与第 26 週の 18 mg/kg/日群（雄/雌）の最高血漿中濃度は 1264/1288 ng/mL [2.6.6.3.4 項参照] であった。これらの試験における血漿中濃度は薬効用量（約 1 $\mu\text{mol/L}$ =179 ng/mL）と比べて 5～7 倍以上高い濃度であった。以上の*in vitro*及び*in vivo*非臨床試験成績から、メマンチン塩酸塩は催不整脈作用を有さないと考えられた。

効力を裏付ける試験結果から、メマンチン塩酸塩は選択的な低親和性の NMDA 受容体チャンネル拮抗薬であり、その特徴的な電気生理学的性質から、生理的なグルタミン酸神経活動には影響せず、過剰な NMDA 受容体チャンネルの活性化に基づくシナプス可塑性の障害や神経細胞毒性を抑制し、記憶学習障害を抑制すると推察された。また、安全性薬理

試験の結果から、メマンチン塩酸塩の薬効用量では中枢神経系、呼吸・循環器系、自律神経系、消化器系及び泌尿器系に対して影響を及ぼす可能性は低いと考えられた。

2.6.2.7 図表

(本文中に記載した)

2.6.2.8 参考文献

文献・社内資料

- 1) Bliss TV, Collingridge GL. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature*. 1993;361:31-9. [資料番号 4.3.13]
- 2) Malenka RC, Nicoll RA. Long-term potentiation—A decade of progress? *Science*. 1999;285:1870-4. [資料番号 4.3.14]
- 3) Whitlock JR, Heynen AJ, Shuler MG, Bear MF. Learning induces long-term potentiation in the hippocampus. *Science*. 2006;313:1093-7. [資料番号 4.3.15]
- 4) Mattson MP, Cheng B, Davis D, Bryant K, Lieberburg I, Rydel RE. β -amyloid peptides destabilize calcium homeostasis and render human cortical neurons vulnerable to excitotoxicity. *J Neurosci*. 1992;12:376-89. [資料番号 4.3.6]
- 5) Gray CW, Patel AJ. Neurodegeneration mediated by glutamate and β -amyloid peptide: a comparison and possible interaction. *Brain Res*. 1995;691:169-79. [資料番号 4.3.7]
- 6) Parsons CG, Quack G, Bresink I, Baran L, Przegalinski E, Kostowski W et al. Comparison of the potency, kinetics and voltage-dependency of a series of uncompetitive NMDA receptor antagonists *in vitro* with anticonvulsive and motor impairment activity *in vivo*. *Neuropharmacology*. 1995;34:1239-58. [資料番号 4.3.16]
- 7) Demerle-Pallardy C, Duverger D, Spinnewyn B, Pirotzky E, Braquet P. Peripheral type benzodiazepine binding sites following transient forebrain ischemia in the rat: effect of neuroprotective drugs. *Brain Res*. 1991;565:312-20. [資料番号 4.3.19]
- 8) Coan EJ, Irving AJ, Collingridge GL. Low-frequency activation of the NMDA receptor system can prevent the induction of LTP. *Neurosci Lett*. 1989;105:205-10. [資料番号 4.3.8]
- 9) Izumi Y, Clifford DB, Zorumski CF. Low concentrations of N-methyl-D-aspartate inhibit the induction of long-term potentiation in rat hippocampal slices. *Neurosci Lett*. 1992;137:245-8. [資料番号 4.3.9]
- 10) Rothman SM, Olney JW. Excitotoxicity and the NMDA receptor. *Trends Neurosci*. 1987;10:299-302. [資料番号 4.3.2]

- 11) Greenamyre JT, Young AB. Excitatory amino acids and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 1989;10:593-602. [資料番号 4.3.20]
- 12) Masliah E, Alford M, DeTeresa R, Mallory M, Hansen L. Deficient glutamate transport is associated with neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Ann Neurol*. 1996;40:759-66. [資料番号 4.3.3]
- 13) Pomara N, Singh R, Deptula D, Chou JC, Schwartz MB, LeWitt PA. Glutamate and other CSF amino acids in Alzheimer's disease. *Am J Psychiatry*. 1992;149:251-4. [資料番号 4.3.4]
- 14) Csernansky JG, Bardgett ME, Sheline YI, Morris JC, Olney JW. CSF excitatory amino acids and severity of illness in Alzheimer's disease. *Neurology*. 1996;46:1715-20. [資料番号 4.3.5]
- 15) Clements JD, Lester RAJ, Tong G, Jahr CE, Westbrook GL. The time course of glutamate in the synaptic cleft. *Science*. 1992;258:1498-501. [資料番号 4.3.21]
- 16) Danysz W, Parsons CG, Kornhuber J, Schmidt WJ, Quack G. Aminoadamantanes as NMDA receptor antagonists and antiparkinsonian agents--preclinical studies. *Neurosci Biobehav Rev*. 1997;21:455-68. [資料番号 4.3.22]
- 17) Parsons CG, Danysz W, Quack G. Memantine is a clinically well tolerated N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor antagonist--a review of preclinical data. *Neuropharmacology*. 1999;38:735-67. [資料番号 4.3.1]

通知・ガイドライン

- i) 平成3年1月29日付 薬新薬第4号通知「新医薬品等の製造（輸入）承認申請に必要な一般薬理試験のガイドラインについて」

メマリー錠 5 mg
メマリー錠 10 mg
メマリー錠 20 mg
(メマンチン塩酸塩)

CTD 第2部 CTDの概要

2.6 非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.3 薬理試験概要表

第一三共株式会社

目次

2.6.3 薬理試験概要表.....	3
2.6.3.1 薬理試験.....	3
2.6.3.2 効力を裏付ける試験.....	7
2.6.3.3 副次的薬理試験.....	11
2.6.3.4 安全性薬理試験.....	12
2.6.3.5 薬力学的薬物相互作用試験.....	18

2.6.3 薬理試験概要表

2.6.3.1 薬理試験

一覧表

被験物質：メマンチン塩酸塩

試験の種類	試験系	投与方法	実施施設	試験番号	記載箇所
効力を裏付ける試験					
受容体チャネル親和性と選択性 [³ H]-MK-801 結合	ラット大脳皮質神経細胞膜画分	<i>in vitro</i>	Merz Pharma	J-16	4.2.1.1.1
各種受容体結合	ラット脳、脊髄、肝、モルモット脳、ヒト組換え型受容体	<i>in vitro</i>	■■■■■	J-2	4.2.1.1.2
NMDA 受容体チャネル阻害作用 電気生理学的特徴づけ LTP 形成抑制作用との比較	ラット培養海馬神経細胞	<i>in vitro</i>	Merz Pharma	J-3	4.2.1.1.3
	ラット海馬スライス及びラット培養上丘神経細胞	<i>in vitro</i>	Merz	J-4	4.3.11
シナプス可塑性障害に対する作用 低濃度 Mg ²⁺ 誘発 LTP 形成障害モデル NMDA 誘発 LTP 形成障害モデル NMDA 誘発学習障害抑制作用	ラット海馬スライス	<i>in vitro</i>	Merz	J-6	4.2.1.1.4
	ラット海馬スライス	<i>in vitro</i>	Merz	J-5	4.2.1.1.5
	ラット	腹腔内	Merz	J-5	4.2.1.1.5

Merz Pharma : Merz Pharmaceuticals GmbH

Merz : Merz + Co. GmbH & Co. (現 Merz Pharmaceuticals GmbH)

■■■■■

一覧表（続き）

被験物質：メマンチン塩酸塩

試験の種類	試験系	投与方法	実施施設	試験番号	記載箇所
神経細胞傷害に対する作用					
Aβ ₂₅₋₃₅ 及びグルタミン酸誘発神経細胞死	ラット培養大脳皮質神経細胞	<i>in vitro</i>	DSB	J-7	4.2.1.1.6
グルタミン酸誘発神経細胞死	ラット培養大脳皮質神経細胞	<i>in vitro</i>	Merz	J-8	4.3.17
NMDA の前脳基底部内注入モデル	ラット	腹腔内	■	J-10	4.3.18
Aβ ₁₋₄₀ 及びイボテン酸海馬内注入モデル					
ドネペジル塩酸塩との比較	ラット	持続皮下投与	DSB	J-12	4.2.1.1.7
MK-801 との比較	ラット	持続皮下投与	DSB	J-13	4.2.1.1.8
MK-801 の作用	ラット	持続皮下投与	DSB	J-14	4.2.1.1.9
正常ラットに対する作用					
学習障害惹起作用	ラット	持続皮下投与	DSB	J-15	4.2.1.1.10
代謝物の薬理					
[³ H]-MK-801 結合	ラット大脳皮質神経細胞膜画分	<i>in vitro</i>	Merz Pharma	J-16	4.2.1.1.1
NMDA 受容体チャネル阻害作用	ラット培養海馬神経細胞	<i>in vitro</i>	Merz Pharma	J-17	4.2.1.1.11
副次的薬理試験	該当せず				

DSB：株式会社第一サントリー生物医学研究所（現 アスピオファーマ株式会社）

Merz：Merz + Co. GmbH & Co.（現 Merz Pharmaceuticals GmbH）

Merz Pharma：Merz Pharmaceuticals GmbH

一覧表（続き）

被験物質：メマンチン塩酸塩

試験の種類	試験系	投与方法	実施施設	試験番号	記載箇所
安全性薬理試験					
一般症状・行動に及ぼす影響	マウス	経口	■	10042/■*	4.2.1.3.1
中枢神経系に及ぼす影響					
自発運動量	マウス	経口	■	10043/■*	4.2.1.3.1
睡眠延長作用	マウス	経口	■	10044/■*	4.2.1.3.1
抗痙攣作用					
電撃痙攣	マウス	経口	■	10045/■*	4.2.1.3.1
ペンテトラゾール誘発痙攣	マウス	経口	■	10046/■*	4.2.1.3.1
痙攣誘発作用					
痙攣閾値下電撃	マウス	経口	■	10047/■*	4.2.1.3.1
痙攣閾値下量ペンテトラゾール	マウス	経口	■	10048/■*	4.2.1.3.1
鎮痛作用					
酢酸ライジング	マウス	経口	■	10049/■*	4.2.1.3.1
テイルフリック	ラット	経口	■	10050/■*	4.2.1.3.1
体温	マウス	経口	■	10051/■*	4.2.1.3.1

* : 海外 GLP 適合試験
■

一覧表（続き）

被験物質：メマンチン塩酸塩

試験の種類	試験系	投与方法	実施施設	試験番号	記載箇所
呼吸・循環器系に及ぼす影響 血圧、心拍数、肺動脈圧、肺動脈楔入圧、心拍出量、一回拍出量、左心室内圧、LV dP/dt max、中心静脈圧、血中酸素分圧及び血液 pH hERG 型 K ⁺ チャンネル	麻酔下イヌ hERG 発現 CHO 細胞	十二指腸内 <i>in vitro</i>	■ ■■■■	10053/■* ■■■■ 02/20■	4.2.1.3.1 4.2.1.3.3
血圧、心拍数、心電図、一般状態、体重 心電図	送信機埋め込みイヌ 覚醒下イヌ	経口 経口	■■■■ ■	N102772* ■■■■-244006* (addendum)	4.2.1.3.4 4.2.1.3.5
自律神経系及び摘出平滑筋に及ぼす影響 摘出回腸	モルモット	<i>in vitro</i>	■	10052/■*	4.2.1.3.1
消化器系に及ぼす影響 腸管輸送能	ラット	経口	■	10054/■*	4.2.1.3.1
水及び電解質代謝に及ぼす影響 尿量及び尿中電解質排泄	ラット	経口	■	10055/9■*	4.2.1.3.1
統計学的補充解析 安全性薬理 (対象試験番号：10042/96-10055/96) 心電図 (対象試験番号：WIL-244006 (addendum))			DSP DSP	ZZ■55 ZZ■56	4.2.1.3.2 4.2.1.3.6
薬力学的薬物相互作用試験	該当せず				

* : 海外 GLP 適合試験

DSP : 第一サントリーファーマ株式会社 (現 第一三共株式会社)

2.6.3.2 効力を裏付ける試験

薬効薬理試験成績一覧表

被験物質：メマンチン塩酸塩

試験項目	動物種／系統	投与方法	試験成績	試験番号	記載箇所
1) NMDA 受容体チャンネル親和性と選択性					
(1) [³ H]-MK-801 結合	雄性ラット／SD	<i>in vitro</i>	グルタミン酸 (10 μmol/L) 及びグリシン (10 μmol/L) 共存下 Ki=0.67 μmol/L (大脳皮質神経細胞膜画分)	J-16	4.2.1.1.1
(2) 各種受容体結合	ラット、モルモット、ヒト組換え型	<i>in vitro</i> 10 μmol/L	10 μmol/L の濃度において、NMDA 受容体チャンネル (PCP 結合部位) に対して 91.08% の置換活性を示したが、それ以外の 60 種類の受容体に対しては 50% 以上の置換活性を示さなかった。	J-2	4.2.1.1.2
2) NMDA 受容体チャンネル阻害作用					
(1) 海馬神経細胞における NMDA (200 μmol/L) 誘発電流	ラット (胎生 20~21 日)	<i>in vitro</i> (0.3~30 μmol/L)	D-セリン (10 μmol/L) 存在下 IC ₅₀ =1.56 μmol/L (-70 mV) : AMPA 及び GABA 誘発電流に対しては影響せず、NMDA 誘発電流抑制作用は膜電位依存的で、速やかな発現と消失を示した。	J-3	4.2.1.1.3
(2) 海馬スライスにおける LTP 形成	雄性ラット	<i>in vitro</i> (3, 10, 30 μmol/L) 6.6 ± 0.4 hr 前添加	IC ₅₀ =11.6 μmol/L	J-4	4.3.11
(3) 上丘神経細胞における NMDA (200 μmol/L) 誘発電流	雄性ラット	<i>in vitro</i> (1~100 μmol/L)	グリシン (1 μmol/L) 存在下 IC ₅₀ =2.2 μmol/L (-70 mV) : MK-801 とは異なり、LTP 形成抑制の IC ₅₀ と乖離がみられた。	J-4	4.3.11

薬効薬理試験成績一覧表（続き）

被験物質：メマンチン塩酸塩

試験項目	動物種／系統	投与方法	試験成績	試験番号	記載箇所
3) シナプス可塑性障害に対する作用					
(1) 海馬スライス低濃度 Mg ²⁺ 誘発 LTP 形成障害モデル	雄性ラット／SD	<i>in vitro</i> (1、10、30 μmol/L)	灌流液中の Mg ²⁺ を低濃度（10 μmol/L）にすることにより、LTP 形成が障害されたが、メマンチン塩酸塩 1 及び 10 μmol/L（7 時間以上のプレインキュベーション）はこの LTP 形成障害を抑制した。	J-6	4.2.1.1.4
(2) 海馬スライス NMDA 誘発 LTP 形成障害モデル	雄性ラット／SD	<i>in vitro</i> (1 μmol/L)	NMDA 10 μmol/L 存在下で LTP 形成は障害されたが、メマンチン塩酸塩 1 μmol/L（4 時間以上のプレインキュベーション）はこの LTP 形成障害を抑制した。	J-5	4.2.1.1.5
(3) NMDA（25 mg/kg 腹腔内投与）誘発学習障害抑制作用	雄性ラット／SD	1.25～10 mg/kg NMDA と同時に腹腔内投与	神経細胞傷害によらないと考えられる受動的回避学習障害を 2.5 及び 5.0 mg/kg で抑制した。	J-5	4.2.1.1.5
4) 神経細胞傷害に対する作用					
(1) Aβ ₂₅₋₃₅ （1 μmol/L）及びグルタミン酸（50 μmol/L）誘発大脳皮質神経細胞傷害モデル	ラット／Wistar (胎生 18 日)	<i>in vitro</i> 0.1～3 μmol/L (グルタミン酸添加直前に添加)	Aβ ₂₅₋₃₅ 添加の 2 日後にグルタミン酸を添加することによる細胞傷害に対して保護作用を示した。 IC ₅₀ =0.13 μmol/L	J-7	4.2.1.1.6
(2) グルタミン酸（100 μmol/L）誘発大脳皮質神経細胞傷害モデル	ラット／Wistar (胎生 17～18 日)	<i>in vitro</i> 0.1～100 μmol/L (同時添加)	グルタミン酸による細胞傷害に対して保護作用を示した。IC ₅₀ =1.66 μmol/L	J-8	4.3.17
(3) NMDA(1.5 mmol/L、0.5 μL) の前脳基底部内注入モデル	雄性ラット／Long-Evans	NMDA 注入 30 分前に腹腔内投与	NMDA 注入 2 週間後の大脳皮質 ChAT 活性低下を抑制した。ED ₅₀ =2.81 mg/kg	J-10	4.3.18

薬効薬理試験成績一覧表（続き）

被験物質：メマンチン塩酸塩

試験項目	動物種／系統	投与方法	試験成績	試験番号	記載箇所
(4) A β ₁₋₄₀ 及びイボテン酸 海馬内注入モデル	雄性ラット／ F344	5、10、20 mg/kg/day 6週間持続皮下 投与 (A β ₁₋₄₀ 注入 24 時間前より持続 投与)	A β ₁₋₄₀ 海馬内注入の2日後にイボテン酸を注入することによる水迷路学習障害及び海馬のPTBBSレベル上昇に対し、10及び20 mg/kg/dayで抑制作用を示した。なお、MK-801 (0.624 mg/kg/日) はPTBBSレベルの上昇を抑制したにもかかわらず、水迷路学習障害をむしろ増悪させた。ドネペジル塩酸塩 (■ mg/kg) は学習障害を改善する傾向のみを示した。	J-12	4.2.1.1.7
				J-13	4.2.1.1.8
				J-14	4.2.1.1.9
5) 正常ラットに対する作用					
(1) 学習障害惹起作用	雄性ラット／ F344	20 mg/kg/day 10日間持続皮下 投与	MK-801とは異なり、正常ラットに対して水迷路学習障害を惹起しなかった。	J-15	4.2.1.1.10

薬効薬理試験成績一覧表（続き）

被験物質：メマンチン塩酸塩

試験項目	動物種／系統	投与方法	試験成績	試験番号	記載箇所
6) 代謝物の薬理					
(1) [³ H]-MK-801 結合	雄性ラット／SD	<i>in vitro</i> (0.01～1000 μmol/L)	グルタミン酸 (10 μmol/L) 及びグリシン (10 μmol/L) 共存下 代謝物 種のうち最も強い置換活性を示したのは で、その IC ₅₀ 値は 19.95 μmol/L であった (大脳皮質神経細胞膜画分)。	J-16	4.2.1.1.1
(2) NMDA (200 μmol/L) 誘発電流	ラット (胎生 12～15 日)	<i>in vitro</i> (1.0～300 μmol/L)	D-セリン (10 μmol/L) 存在下 メマンチン代謝物 4 種 () の NMDA 誘発電流抑制作用は弱く、IC ₅₀ 値はそれぞれ 30.07、68.45、30.78 及び 37.21 μmol/L (膜電位；-70 mV) であった。	J-17	4.2.1.1.11

2.6.3.3 副次的薬理試験

本項目に該当する試験は実施しなかった。

2.6.3.4 安全性薬理試験

Core Battery & Follow up Study

該当せず

Supplemental Study (一般薬理試験ガイドラインに準拠)

被験物質：メマンチン塩酸塩

試験項目	動物種／ 系統	投与 方法	投与量 ^{a)} (mg/kg)	性別及び 動物数/群	特記すべき所見	GLP 適用	試験番号	記載箇所
1. 一般症状・行動 に及ぼす影響	マウス／ NMRI	経口	0、10、30、 100	雌 8	30 mg/kg 以上：体勢反応の軽度低下 100 mg/kg：反応性、触・疼痛反応、驚愕 反応、同側屈筋反射、正向反 射及び握力の低下若しくは 抑制 常同行動、挙尾反応、振戦、 異常姿勢及び歩行失調	適	10042/■	4.2.1.3.1 4.2.1.3.2
2. 中枢神経系に及 ぼす影響								
1) 自発運動量	マウス／ NMRI	経口	0、5、15、50	雌 10	用量依存的に自発運動量を増加し、5 mg/kg 以上で有意な作用あり	適	10043/■	4.2.1.3.1 4.2.1.3.2
2) 睡眠延長作用 ヘキサバルビター ル (45 mg/kg 静脈 内投与)	マウス／ NMRI	経口	0、15、30、 60	雄 5 雌 5	用量依存的に睡眠時間を延長し、30 mg/kg 以上で有意な作用あり	適	10044/■	4.2.1.3.1 4.2.1.3.2

a) 特にことわりがない限り単回投与

Supplemental Study（一般薬理試験ガイドラインに準拠）（続き）

被験物質：メマンチン塩酸塩

試験項目	動物種 ／系統	投与方法	投与量 ^{a)} (mg/kg)	性別及び 動物数/群	特記すべき所見	GLP 適用	試験番号	記載箇所
3) 痙攣 (1) 抗痙攣作用								
a) 電撃痙攣法 (45 mA、0.7 秒)	マウス ／NMRI	経口	0、10、15、 22、33	雌 5	15 mg/kg 以上で用量依存的な抗痙攣作用あり (ED ₅₀ =18.4 mg/kg)	適	10045/■	4.2.1.3.1 4.2.1.3.2
b) ペンテトラゾール (110 mg/kg 皮下投与) 誘発痙攣法	マウス ／NMRI	経口	0、10、15、 22、33	雌 5	抗痙攣作用はなく、22 mg/kg 以上で有意に痙攣増強作用あり	適	10046/■	4.2.1.3.1 4.2.1.3.2
(2) 痙攣誘発作用								
a) 痙攣閾値下電撃法 (5 mA、0.8 秒)	マウス ／NMRI	経口	0、10、30、 100	雌 5	痙攣誘発作用なし	適	10047/■	4.2.1.3.1 4.2.1.3.2
b) 痙攣閾値下量ペンテトラゾール (50 mg/kg 皮下投与) 法	マウス ／NMRI	経口	0、10、30、 100	雌 10	用量依存的な痙攣誘発作用を示し、30 mg/kg 以上で有意な作用あり (ED ₅₀ =17.8 mg/kg)	適	10048/■	4.2.1.3.1 4.2.1.3.2

a) 特にことわりがない限り単回投与

Supplemental Study（一般薬理試験ガイドラインに準拠）（続き）

被験物質：メマンチン塩酸塩

試験項目	動物種 ／系統	投与方法	投与量 ^{a)} (mg/kg)	性別及び 動物数/群	特記すべき所見	GLP 適用	試験番号	記載箇所
4) 痛覚 (1) 酢酸ライジング法	マウス ／NMRI	経口	0、10、30、 100	雌 10	鎮痛作用あり (ED ₅₀ =44.9 mg/kg)	適	10049/■	4.2.1.3.1 4.2.1.3.2
(2) テイルフリック法	ラット ／SD	経口	0、10、20、 40	雌 10	鎮痛作用なし	適	10050/■	4.2.1.3.1 4.2.1.3.2
5) レセルピン (5 mg/kg 腹腔内投与) 誘発低体温	マウス ／NMRI	経口	0、10、30、 100	雌 8	体温低下抑制作用あり (用量依存性なし)	適	10051/■	4.2.1.3.1 4.2.1.3.2

a) 特にことわりがない限り単回投与

Supplemental Study (一般薬理試験ガイドラインに準拠) (続き)

被験物質：メマンチン塩酸塩

試験項目	動物種 /系統	投与方法	投与量 ^{a)} (mg/kg)	性別及び 動物数/群	特記すべき所見	GLP 適用	試験番号	記載箇所
3. 呼吸・循環器系 1) 血圧、心拍数、 肺動脈圧、肺動脈楔 入圧、心拍出量、一 回拍出量、左心室内 圧、LV dP/dt max、 中心静脈圧、血中酸 素分圧及び血液 pH	イヌ /ビーグル	十二指 腸内	0、3、10、30 (60 分間隔 で累積的投 与)	雌 5	10 mg/kg 以上で心拍出量及び 一回拍出量の有意な減少 30 mg/kg で左心室収縮期圧の 有意な低下	適	10053/■	4.2.1.3.1 4.2.1.3.2
2) hERG 型 K ⁺ チャ ネル ^{b)} (1) 膜電位変化 (蛍光色素法) (2) K ⁺ チャネル電流 (ホールセルパッ チクランプ法)	hERG 発現 CHO 細胞	<i>in vitro</i>	10、30、100 µmol/L		100 µmol/L で膜電位変化を 29%抑制 100 µmol/L で K ⁺ チャネル電流 を 15%抑制	非適	■ 02/20■	4.2.1.3.3

a) 特にことわりがない限り単回投与

b) 準拠するガイドラインなし

Supplemental Study (続き)

被験物質：メマンチン塩酸塩

試験項目	動物種 /系統	投与方法	投与量 (mg/kg)	性別及び 動物数/群	特記すべき所見	GLP 適用	試験番号	記載箇所
3) 血圧、心拍数、心電図 (PR、RR、QRS、QT、QTc)、一般状態、体重 ^{a)}	イヌ /ビーグル	経口	0、0.3、3.0、6.0、10 (7日間間隔で28日間反復投与、漸増法)	雄 4 雌 4	6.0 及び 10 mg/kg/日投与群の雄で用量依存的な心拍数の増加が認められたが、軽度な変化で有意差は無く、毒性的な意義は小さいと判断 血圧、心電図、一般状態及び体重には10 mg/kg まで影響なし	適	N102772	4.2.1.3.4
4) 心電図 ^{b)}	イヌ /ビーグル	経口	0、3、9、18 (26週間反復投与、漸増法)	雄 6 雌 6	QT/QTc 間隔に影響なし	適	■■■■ 244006 (Addendum)	4.2.1.3.5 4.2.1.3.6

a) ICH S7A に準拠

b) National and International Drug Safety Guidelines, M.T.C. Verlag, Zollikon, Switzerland に準拠

Supplemental Study (一般薬理試験ガイドラインに準拠) (続き)

被験物質：メマンチン塩酸塩

試験項目	動物種 ／系統	投与方法	投与量 ^{a)} (mg/kg)	性別及び 動物数/群	特記すべき所見	GLP 適用	試験番号	記載箇所
4. 自律神経系 1) 単独作用 2) アセチルコリン、ヒスタミン、塩化バリウム及びセロトニンによる収縮	モルモット ／Hartley 摘出回腸	<i>in vitro</i>	1×10^{-9} ～ 1×10^{-3} g/mL	雌 6	1×10^{-5} g/mL 以上で収縮惹起 (濃度依存性なし)：収縮はパパペリン、アンタゾリン及びアトロピンで抑制されない 1×10^{-5} g/mL 以上で濃度依存的に収縮抑制	適	10052/■	4.2.1.3.1 4.2.1.3.2
5. 消化器 腸管輸送能	ラット ／SD	経口	0、10、20、 40	雌 10	用量依存的に抑制 (ED ₅₀ =約 20 mg/kg)	適	10054/■	4.2.1.3.1 4.2.1.3.2
6. 泌尿器 尿量及び尿中電解質排泄	ラット ／SD	経口	0、10、20、 40	雌 10	投与後 0～2 時間までから投与後 0～5 時間までの積算尿 尿量：40 mg/kg で有意に増加 Na ⁺ ：20 mg/kg 以上で有意に増加 Cl ⁻ ：20 mg/kg 以上で有意に増加 K ⁺ ：40 mg/kg まで影響なし	適	10055/■	4.2.1.3.1 4.2.1.3.2

a) 特にことわりがない限り単回投与

2.6.3.5 薬力学的薬物相互作用試験

本項目に該当する試験は実施しなかった。