

日本医療研究開発機構 医薬品等規制調和・評価研究事業 事後評価報告書

公開

I 基本情報

研究開発課題名：（日本語）中枢神経系に対する新規安全性薬理試験評価法に関する研究
（英 語） Study on novel evaluation methods for central nervous system safety pharmacology assessment

研究開発実施期間：令和 3年 4月1日～令和6年3月31日

研究開発代表者 氏名：（日本語）関澤 信一
（英 語） Shin-ichi Sekizawa

研究開発代表者 所属機関・部署・役職：
（日本語）国立大学法人東京大学・大学院農学生命科学研究科獣医学専攻・准教授
（英 語） Department of Veterinary Pathophysiology and Animal Health, Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo

II 研究開発の概要

研究開発の成果およびその意義等

和文：

医薬品開発において、ヒト初回投与臨床試験の前段階で非臨床安全性薬理試験はGLP下で実施され、特に、呼吸・循環・中枢神経系（CNS）への影響が確認される。この中で、CNSへの影響は、行動観察から判断する場合が多く、主観的であり特段の指標がない。また、その後の開発段階でCNSへの影響を確認する機会は少なく、客観的に判断できる指標をMRIなどの高度医療機器を利用せずに検出できれば、非常に有意義である。さらに、安全性薬理試験において呼吸・循環への影響を検討することは必須の要件であり、複合的な検討が可能であれば、3Rsにも貢献する。自律神経系は、交感・副交感神経の活動、及びそのバランスにより呼吸・循環等を制御するシステムであるが、大脳辺縁系や海馬など様々な部位から、神経やホルモン、そして視床下部を介して変調を引き起こす。従って、自律神経活動指標は呼吸・循環への中枢性制御状態を表すだけでなく、開発医薬品のCNSに対する影響も反映する可能性が考えられる。以上を踏まえ、非臨床安全性

試験において、無麻酔下、及び非侵襲的な方法でCNS並びに呼吸・循環への影響に対する客観指標を提示できれば、開発医薬品の有用な安全性情報になると考えられる。

本研究従事者らは、長年、げっ歯類等を用いたテレメトリーシステムによる長時間心電図記録を行っており、その心電図記録から得られる心拍変動（HRV）を高速フーリエ変換することでパワースペクトル解析を行い、自律神経活動を数値化することに成功してきた。そこで、得られた解析結果の中で自律神経バランスを表すとされる高周波成分（HF値）と低周波成分（LF値）の比、LF/HFが薬剤のCNSへの影響を検出できる指標候補になると仮説をたて、これを証明するために本研究開発を行ってきた。

イソフルラン麻酔下でラットに心電図テレメトリー送信機を埋設する手術を実施し、1週間の回復期を経た後、連続的に心電図波形を記録した。心電図のQRS波形のうち最大振幅を持つR波を検出、各隣り合うR波の間隔（R-R間隔）から、そのゆらぎについて、パワースペクトル解析を実施し、HRV指標を算出した。（経口投与の試技自体に対する影響を見るために、心電図記録を行いながら対照実験として水あるいは溶媒を投与し、後日、低用量の薬剤（後述）を経口投与、さらに日を経て高用量の薬剤を経口投与した。高用量は、各薬剤におけるLD50の1/5程度、あるいは、溶解度、投与容量等の制限から設定され、低用量は高用量の1/3～1/5の範囲で設定された。経時的な変化を5分間、30分間、60分間毎に解析したが、薬物動態の一般的な計測状況も踏まえ、60分間毎のデータが最適と判断し、今後のデータ解析に使用した。後述するように、特に抗ヒスタミン剤において、薬理作用と思われる用量依存性の反応がLF/HFで認められたが、心拍数やLF、HFには明瞭な変化は認められなかったことから、以降、データの表示はLF/HFに限定して記載する。

本研究においては、以下の3カテゴリーに大別された薬剤が投与された； 1）CNSを治療標的とした薬剤、2）CNSに関連した副作用を示す薬剤、および3）CNSへの影響が少ない薬剤。

- 1） トリアゾラム（0.2mg/kg, 1.0mg/kg）；アリピプラゾール（1.0mg/kg, 5.0mg/kg）；バルプロ酸（166.7mg/kg, 500mg/kg）；カルバマゼピン（130.5mg/kg, 391.4mg/kg）；タリペキソール（5.0 mg/kg i.v.）
- 2） ポララミン（6.0mg/kg, 30 mg/kg）；ジフェンヒドラミン（33.3mg/kg, 100mg/kg）； カフェイン（10mg/kg, 50mg/kg）
- 3） アセトアミノフェン（388.8mg/kg, 1000mg/kg）； アセチルサリチル酸（300mg/kg）； オセルタミビル（400mg/kg）； インドメタシン（0.161mg/kg, 0.484mg/kg）

タリペキソール以外の薬剤は全て経口投与されたため、血中濃度が最高値に到達する時間（Tmax）はど投与後2時間程度、あるいはそれ以降と想定されており、また、個体及び薬剤により反応がばらつくことも想定し、安全性薬理を適切に評価できる対象値としては、基本的に投与後2～5時間における最大反応を選択することとし、投与前の基準値（ベースライン）に対する変化率（%）で示すことにした。アスピリンとオセルタミビルは高用量のみの投与が行われ、タリペキソールに関しては、静脈内投与を行ったことから、グループデータとしては扱わないこととした。

1）のCNSを治療標的とした薬剤において、LF/HFの基準値に対する変化率は、溶媒対照、低用量、高用量で、 $-5.8 \pm 9.4\%$ 、 $60.3 \pm 29.0\%$ 、 $145.6 \pm 73.5\%$ であり、用量依存性に増加傾向にあったものの、統計学的に有意な差は認められなかった（one way ANOVA: $p=0.149$ ）。2）のCNSに関連した副作用を示す薬剤においては、LF/HFの基準値に対する変化率が、 $4.1 \pm 13.2\%$ 、 $55.2 \pm 10.6\%$ 、 $131.1 \pm 38.4\%$ であり、用量依存性の増加を示した（one way ANOVA: $p=0.004$ ）。これらに対し、3）のCNSへの影響が少ないと考えられる薬剤においては、上記変化率は、 $19.7 \pm 18.3\%$ 、 $35.4 \pm 15.1\%$ 、 $72.6 \pm 26.9\%$ となり、統計学的に有意な差は認められず（one way ANOVA: $p=0.377$ ）、また、変化率も低い傾向を示していた。

ジフェンヒドラミンなどの抗ヒスタミン剤は傾眠を引き起こし、自動車運転に影響を及ぼすことが知られていることから、その影響作用としてLF/HFの増加が認められている可能性がある。すなわち、CNSを直接的な治療標的としない薬剤の開発において、投与によりLF/HFが大きく変化する結果は、CNS対して望まし

くない作用があることを意味している可能性がある。本研究においては、3) のCNSへの影響が少ない薬剤として分類した中に自動車運転に影響のある薬剤、インドメタシンを含めた。総合感冒薬中にも含まれる成分であるが、LF/HFの変化は、低用量で 24.6 ± 21.0 %の増加、高用量で 48.2 ± 23.5 %の増加であり、本結果からインドメタシンがCNSへの望ましくない作用を持つ、と断言するには難しいが、少なくとも第I相臨床試験を実施する上でCNSに特段の懸念があることを示唆する結果では無い、と結論付けることは可能であろう。本研究では、抗インフルエンザウイルス剤であるオセルタミビルもCNSへの影響が少ない薬剤として分類した。小児の服用時に異常行動が認められるケースがあると注意喚起された薬剤の一つであり、インフルエンザの罹患自体により異常行動を起こす可能性も高く、また、非臨床の6カ月間反復投与毒性試験における中枢神経系の所見や、一般行動観察からも異常や毒性兆候は認められていないが、本研究におけるLF/HFに関しては、ばらつきが大きく一貫したデータではないものの、 123.9 ± 95.7 %の増加が認められている。本研究では、上述した毒性試験よりも高い用量を使用しているものの、この結果から、本剤の安全性薬理におけるCNSへの作用として影響があるとの結論に達することはできないが、もし、今後さらに検討する機会があるのであれば、個体数を増やし、また、より若齢の、あるいは幼若動物を使用した実験を行う必要があると考えられる。1) ～ 3) の薬剤群における溶媒対照をまとめると、LF/HFの変化率は 9.2 ± 35.6 % (mean $\pm$ SD)であったことから、平均値に2SD、2.5SD、3SDを加えた値はそれぞれ80.4%、98.2%、116.0%となり、LF/HFの100%の増加は、CNSへの影響を検出するための十分な閾値として設定できるのではないかと考えられた。

統計学的な有意差は認められなかったものの、CNSを治療標的とした薬剤において、LF/HFの用量依存性の増加傾向が観察され、CNSに関連した副作用を示す薬剤でも類似の結果が観察されている。このことは、少なくとも、CNSへの作用がある薬剤が経口投与された場合においては、LF/HFの増加がこれを検出でき、したがって、CNSへの作用を意図していない薬剤の開発において、CNSへの望ましくない影響をもつ薬剤を検出できる指標として、先述の閾値も踏まえながらLF/HFが該当する可能性を示唆している。

静脈内投与されたタリペキソールに関しては、血中濃度の最高値は投与直後であると想定されるため、投与直後1時間におけるLF/HFの基準値に対する変化率を求めた。その結果、溶媒の投与によって、 114.2 ± 31.4 %のLF/HFの増加が認められ、投与手技による影響が大きく認められた。タリペキソールの投与では、LF/HFは基準値と比較して -59.2 ± 10.6 %の減少が認められ、溶媒投与との間に統計学的な有意差が認められた (t -test: $p = 0.006$)。タリペキソールは、自動車運転に影響のある薬剤として知られており、特に本研究においては、静脈内投与をすることで投与直後に薬理作用が大きく表れるはずであり、LF/HFの劇的な減少として検出された可能性がある。LF/HFの増加ではないものの、タリペキソールのCNSへの影響を検出できたと言えるが、本薬剤の開発においては、予めCNSへの作用が想定されている薬剤であることから、安全性薬理試験におけるCNSへの影響を検出する意義はそれほど大きくないかもしれない。

以上の結果は、CNS作動薬（治療薬）及びCNS副作用薬、どちらの経口投与もCNSへの影響としてLF/HFの変化をもたらし、特に、100%を超える変化率を生じる場合には、CNSへの影響は大きい可能性があることを示唆した。本事業で使用された薬剤数は、市場で流通している薬剤数と比較したら十分ではないものの、安全性薬理試験におけるCNSへの影響を検出する試験において、その影響を客観的な指標としてLF/HFがその責を担える可能性を提起できたと言える。今後は、テレメトリー法による心拍変動解析ではなく、非侵襲的なテールカフ法等を用いて心拍変動、あるいは脈波を用いた変動解析等による検討が期待される。

In drug development, non-clinical safety pharmacology studies are conducted under GLP in the preliminary stages of first-in-human clinical trials, securing pharmacological effects on the respiratory, circulatory, and central nervous system (CNS) are not critical. Among these, effects on the CNS are often determined from behavioral observations, which are relatively subjective. In addition, there are few opportunities to confirm effects on the CNS during the subsequent development phase, and it would be very meaningful if an objective indicator could be detected without the use of advanced medical equipment such as MRI.

The autonomic nervous system regulates respiration and circulation through sympathetic and parasympathetic nervous activity and their balance, which is modulated by neuronal inputs and hormones from various sites, including the limbic system, hippocampus, hypothalamus, etc. Therefore, the index of the autonomic nervous system activity may reflect not only central control over cardio-respiration, but also some adverse effects of developmental drugs on the CNS. Thus, we thought the index of the autonomic nervous system activity can provide an objective measure of pharmacological effects on the CNS. For the autonomic nervous system activity, we have succeeded in quantifying it by analyzing the power spectrum of heart rate variability (HRV) obtained from the long-term electrocardiographic recordings using a telemetry system in rodents. In this context, we hypothesized that the low frequency-to-high frequency ratio (LF/HF) derived from the HRV power spectrum, which is considered as an autonomic balance, would be a candidate index to detect the effects of drugs on the CNS.

Rats were implanted with ECG telemetry transmitter for continuously recording of ECG. The R wave of the ECG was detected, and a power spectrum analysis was performed to obtain the HRV index. Oral administration of a low and/or a high dose of drugs or their vehicle was given at least one week apart or to other animals. Time-course changes were analyzed every 60 minutes based on frequency typically used in pharmacokinetic studies. The maximum responses from baseline in LF, HF, or LF/HF up to 5 hours after oral administration were used for analysis, however only LF/HF seemed to respond to drug administration in a dose-dependent manner and therefore results below will be limited to LF/HF.

Drugs administered in this study were categorized into three groups: 1) drugs therapeutically targeting the CNS including triazolam, aripiprazole, valproic acid, carbamazepine, and talipexole; 2) drugs exhibiting CNS-related adverse effects including polaramine, diphenhydramine, and caffeine; and 3) drugs with minimal CNS effects including acetaminophen, acetylsalicylic acid, indomethacin, and oseltamivir. Drugs targeting the CNS increased LF/HF 60.3 ± 29.0 % in low dose and 145.6 ± 73.5 % in high dose, while drugs exhibiting CNS-related adverse effects also increased 55.2 ± 10.6 % in low dose and 131.1 ± 38.4 % in high dose with statistically significant difference. In contrast, drugs with minimal CNS effects showed 35.4 ± 15.1 % increase in low dose and 72.6 ± 26.9 % increase in high dose without statistically significant difference. Since changes in LF/HF in response to vehicle solution was 9.2 ± 35.6 % (mean $\pm$ SD), a 100 % increase in LF/HF could be set as a sufficient threshold for detecting CNS adverse effects for non-CNS targeting drug development.

In conclusion, although the number of drugs used in this project is not sufficient compared to the number of drugs available on the market, these results suggest that LF/HF obtained from HRV analysis can be an objective index of CNS effects in safety pharmacology studies in the development of orally administered drug. In the future, it is expected that LF/HF will be examined not by analyzing heart rate variability using telemetry but by analyzing heart rate variability using a non-invasive method such as tail cuff method with pulse wave.