



# $\beta$ -アミロイド投与マウスの 認知機能障害に対する メマンチン塩酸塩 OD 錠「明治」の薬効確認試験

大山昌代<sup>1)</sup>／蓮沼恵子<sup>1)</sup>／小林洋之<sup>2)</sup>／村澤寛泰<sup>2)</sup>／パブラック晶子<sup>2)</sup>／  
今西泰一郎<sup>1)</sup>／三浦有紀<sup>1)</sup>

## ● 要旨

メマンチン塩酸塩 OD 錠「明治」(以下, 試験製剤と略す)は, メマリー<sup>®</sup> OD 錠(以下, 標準製剤と略す)の有効成分を同量含有する同一剤型の後発医薬品であり, Meiji Seika ファルマ株式会社が製造販売承認を取得した錠剤である。今回,  $\beta$ -アミロイドのコアフラグメント ( $A\beta_{(25-35)}$ ) が誘発するマウスの認知機能障害に対する試験製剤の効果について Y 迷路試験と受動回避試験により検討した。標準製剤を陽性対照とした。

$A\beta_{(25-35)}$  の脳室内投与により, Y 迷路試験で自発的交替行動率は有意な減少を示し, また受動回避試験において保持潜在時間が有意に短縮したことから,  $A\beta_{(25-35)}$  投与により認知機能障害が誘発されたことが確認できた。試験製剤及び標準製剤それぞれ 2.5 及び 5 mg/kg の 1 日 1 回, 11 日間反復経口投与は, 用量依存的に  $A\beta_{(25-35)}$  が誘発する認知機能障害を改善し, 両製剤ともに 5 mg/kg で有意に改善した。

以上のように, 試験製剤は標準製剤と同様に  $A\beta_{(25-35)}$  が誘発するマウスの認知機能障害を改善した。

**キーワード:** メマンチン塩酸塩, グルタミン酸,  $A\beta_{(25-35)}$  誘発認知機能障害モデル, Y 迷路試験, 受動回避試験, 後発医薬品

## 1. はじめに

メマンチン塩酸塩 OD 錠「明治」(以下, 試験製剤と略す)は, メマリー<sup>®</sup> OD 錠(以下, 標準製剤と略す)の有効成分メマンチン塩酸塩を同量含有する同一剤型の後発医薬品であり, Meiji Seika ファルマ株式会社が製造販売承認を取得した錠剤である。

メマンチン塩酸塩はグルタミン酸受容体サブタイプの一つである, *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) 受容体拮抗を作用機序とする中等度及び高度アルツ

ハイマー型認知症治療薬である<sup>1)</sup>。

アルツハイマー型認知症は, 認知機能障害を中核とする進行性の神経変性疾患であり, 病理学的特徴として  $\beta$ -アミロイド(以下,  $A\beta$ )の凝集・蓄積による老人斑, 神経原線維変化, 神経細胞死が認められる。臨床症状の特徴としては, 認知機能障害に加えて意欲や感情の障害, 妄想, 幻覚, 徘徊, 興奮などの行動・心理症状を呈することが多いことが知られている<sup>2)</sup>。アルツハイマー型認知症の原因の一つとして, グルタミン酸神経の機能異常による NMDA 受容体の過剰な活性化が考えられており, メマンチンは生理的なグルタミン酸神経伝達には影響せず, NMDA 受容体拮抗作用により過剰なグルタミン酸による神経細胞毒性や記憶・学習障害を抑

1) Meiji Seika ファルマ株式会社

2) 株式会社日本バイオリサーチセンター

制することが示されている<sup>3)</sup>。

そこで本研究では、試験製剤の認知機能障害に対する改善効果について、 $A\beta$ のコアフラグメントである  $A\beta_{(25-35)}$  の脳室内投与が誘発するマウスの認知機能障害モデルを用いて、Y迷路試験と受動回避試験により標準製剤を陽性対照として検討した。なお、 $A\beta_{(25-35)}$  を脳室内投与したマウスは、短期間で神経細胞変性や認知機能障害を示すことから、簡便なアルツハイマー型認知機能障害モデルとして知られている。

## 2. 材料及び実験方法

### 2.1 使用動物

5週齢（受入時）の雄性マウス（ddY系，日本エスエルシー株式会社）を，5日間の検疫期間と，その後6日間の馴化飼育を経て実験に使用した。マウスは，オートクレーブ処理した床敷（ペパークリーン，日本エスエルシー株式会社）を入れたプラスチック製ケージ（W：310×D：360×H：175 mm）を用いて1ケージ10匹まで，群分け後は1ケージあたり3～5匹までの群飼育とした。管理温度：20～26℃，管理湿度：40～70%，明暗各12時間（照明：午前6時～午後6時），換気回数：12回/時（フィルターを通した新鮮空気）に維持した環境下で飼育した。飼育期間中，水道水と固型飼料（MF，オリエンタル酵母工業株式会社）を自由摂取させた。

実験群として，偽手術， $A\beta_{(25-35)}$  投与＋溶媒（溶媒対照）， $A\beta_{(25-35)}$  投与＋試験製剤 2.5 mg/kg 及び 5 mg/kg， $A\beta_{(25-35)}$  投与＋標準製剤 2.5 mg/kg 及び 5 mg/kg の計6群を設定した。なお，各群の例数は12匹とした。

### 2.2 使用薬剤と薬剤の調製

メマンチン塩酸塩 OD錠 20 mg「明治」（Meiji Seika ファルマ株式会社）並びにメモリー® OD錠 20 mg（第一三共株式会社）を使用した。両製剤は，それぞれ磨砕後，0.5 w/v%メチルセルロース（メトローズ® SM-100，信越化学工業株式会社）で懸濁し，逐次希釈してそれぞれメマンチン塩酸塩として 0.25 mg/mL，0.5 mg/mL の濃度の懸濁液として調製した。試験製剤並びに標準製剤は 10 mL/kg の容量で1日1回11日間反復経口投与した。 $\beta$ -Amyloid<sub>(25-35)</sub> (PolyPeptide Laboratories) は注射用

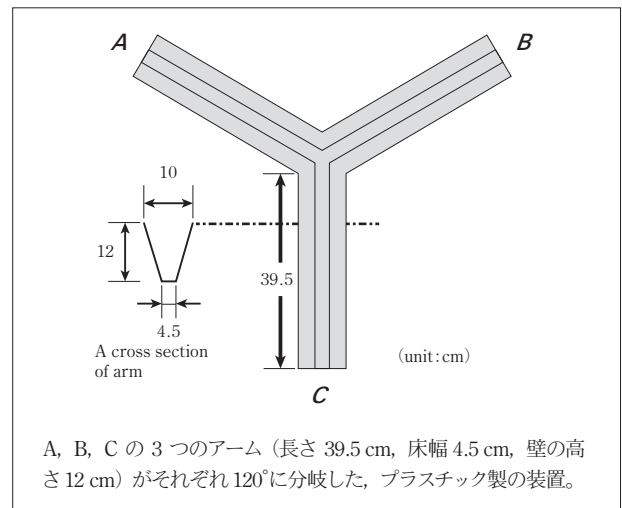


図1 Y迷路試験装置の模式図

水（株式会社大塚製薬工場）で 2 mM に調整し，37℃設定の定温保管庫に4日間インキュベーションした。偽手術群には注射用水を用いた。

### 2.3 実験方法

#### 2.3.1 $A\beta_{(25-35)}$ 溶液の注入

マウスはペントバルビタールナトリウム（東京化成工業株式会社）40 mg/kg を腹腔内投与（投与液量：10 mL/kg）し麻酔した。頭皮にレボピバカイン塩酸塩（ポプスカイン® 0.25%注，丸石製薬株式会社）を皮下投与（0.1 mL）した。マウスの頭頂部の毛を刈り，頭部を脳定位固定装置に固定後，頭皮をヨードチンキで消毒後に切開して皮下組織を取り除いた。歯科用ドリルを用いて bregma より側方 1 mm（右側），後方 0.2 mm の頭蓋骨にステンレス製パイプ刺入用の穴を開け，骨表面から 2.5 mm の深さまで外径 0.5 mm のシリコンチューブ及びマイクロシリンジに接続されたステンレス製パイプを垂直に刺入した。脳室内に  $A\beta_{(25-35)}$  溶液（偽手術群は注射用水）の 6 nmol/3  $\mu$ L をマイクロシリンジポンプで3分間かけて注入した。注入後は，ステンレス製パイプを挿入したまま3分間静置し，ステンレス製パイプをゆっくりと抜去した。頭蓋穴を非吸収性骨髄止血剤（ネストップ®，アルフレッサファーマ株式会社）で塞ぎ，頭皮を縫合した後，飼育ケージに戻した。なお， $A\beta_{(25-35)}$  溶液の注入は，試験製剤又は標準製剤の3日目の投与前に行った。

#### 2.3.2 Y迷路試験（自発的交替行動試験）

試験には，3つのアーム（長さ 39.5 cm，床幅 4.5 cm，壁の高さ 12 cm）がそれぞれ 120° に分岐して

いるプラスチック製のY字型迷路（有限会社ユニコム）を用いた（**図1**）。装置の床面の照度は10～40 lxに調節した。マウスをY字型迷路のいずれかのアームに置き、8分間迷路内を自由に探索させた。マウスが測定時間内に移動したアームの順番を記録し、アームに移動した回数を数えた。なお、測定は試験製剤又は標準製剤の9日目の投与1時間後に行った。

自発的交替行動率は、マウスが測定時間内に移動したアームの回数を総エントリー数、その中で連続して異なる3つのアームを選択した組み合わせの数を自発的交替行動数とし、以下の式を用いて算出した。

$$\text{自発的交替行動率 (\%)} = \left[ \frac{\text{自発的交替行動数}}{\text{総エントリー数} - 2} \right] \times 100$$

〔計算例〕

Y字型迷路の各アームをA, B, Cとし、マウスがACBABACBABの順で移動した場合、自発的交替行動数はACB, CBA, BAC, ACB, CBAの5回となり、これを総エントリー数10回から2を引いた“8”で割った値に100を掛けた数値62.5が自発的交替行動率となる。

$$\text{自発的交替行動率 (\%)} = \left[ \frac{5}{10 - 2} \right] \times 100 = 62.5$$

### 2.3.3 受動回避試験

試験には、中央がスライド式ドアで仕切られた明室（W：100×D：100×H：300 mm）と床のグリッドを通して電気刺激を流すことができる暗室（W：240×D：245×H：300 mm）から成るstep through型受動的回避反応装置（明暗箱：自社製，SHOCK SCRAMBLER：有限会社ユニコム）を用いた。

獲得試行（投与10日）は、試験製剤又は標準製剤投与1時間後に行った。マウスを明室に入れて10秒後にスライド式ドアを静かに開け、マウスが暗室に入るまでの時間（獲得潜時）を測定した。マウスが暗室に入ると同時にスライド式ドアを閉め電気刺激（0.2 mA, 2 sec, スクランブル方式）を負荷し、その後マウスをホームケージへ戻した。保持試行は24時間後（投与11日）に行い、電気刺激は負荷せず、マウスが暗室に入るまでの時間（保持潜時）を測定した。明室で300秒経過した場合はその時点で終了し、300秒を保持潜時とした。

## 2.4 動物倫理

本試験は、Meiji Seika ファルマ株式会社横浜研究所動物実験管理委員会及び株式会社日本バイオリサーチセンター羽島研究所実験動物委員会で審査・承認された方法に従い、株式会社日本バイオリサーチセンター羽島研究所で実施した。

## 2.5 統計解析方法

Y迷路試験（総エントリー数、自発的交替行動数、自発的交替行動率）及び受動回避試験（獲得潜時及び保持潜時）について各群の平均値及び標準誤差を算出した。両試験において、偽手術群と $A\beta_{(25-35)}$ 投与群（溶媒対照群）及び試験製剤と標準製剤の同用量群間の比較には分散比のF検定により等分散であることを確認しStudent's t検定を用いた。溶媒対照群に対する標準製剤群又は試験製剤群の比較にはBartlett検定による分散の均一性の検定を行い等分散であることを確認しDunnett型多重比較検定（Dunnett検定）を用いた。いずれも、有意水準は5%とした。なお、有意差検定には、市販の統計プログラム（SASシステム；SAS Institute Japan株式会社あるいはEXSUS；株式会社CACクロア）を使用した。

## 3. 結 果

Y迷路試験の自発的交替行動率の結果を**図2**に示した。自発的交替行動率について、偽手術群では $69.7 \pm 7.5\%$ であったのに対し、 $A\beta_{(25-35)}$ 投与群（溶媒対照群）では $59.9 \pm 7.7\%$ と偽手術群に対して有意な減少が認められ（ $p = 0.006$ , Student's t検定）、 $A\beta_{(25-35)}$ 投与により認知機能障害が誘発されていることが確認できた。試験製剤2.5 mg/kg群及び5 mg/kg群の自発的交替行動率はそれぞれ $64.5 \pm 4.8\%$ 及び $68.4 \pm 5.2\%$ と用量依存的に自発的交替行動率は増加し、5 mg/kg群では溶媒対照群と比較して有意な増加が認められた（ $p = 0.003$ , Dunnett検定）。標準製剤でも同様に2.5 mg/kg群及び5 mg/kg群でそれぞれ $66.6 \pm 9.5\%$ 及び $72.3 \pm 8.3\%$ と用量依存的に自発的交替行動率は増加し、5 mg/kg群では溶媒対照群と比較して有意な増加が認められた（ $p = 0.002$ , Dunnett検定）。試験製剤と標準製剤の同用量間に有意な差はみられなかった（2.5 mg/kg； $p = 0.504$ , 5 mg/kg； $p = 0.172$ , Student's t検定）。なお、総エントリー数及び自発的交替行動

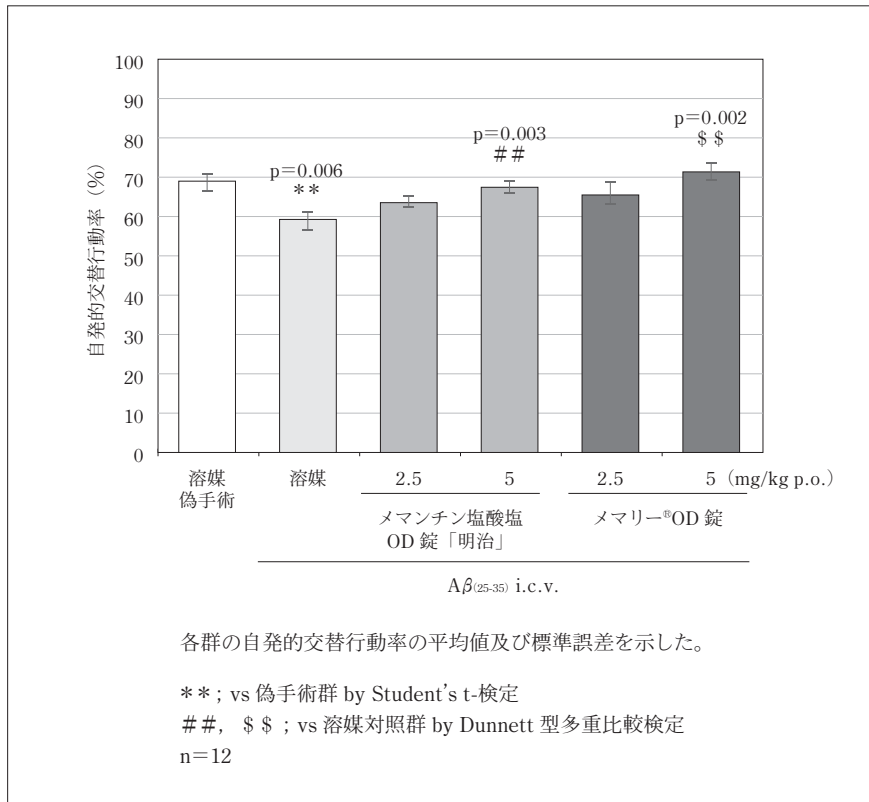


図2 マウス  $A\beta_{(25-35)}$  誘発認知機能障害モデルの Y 迷路課題に及ぼすメマンチン塩酸塩 OD 錠「明治」の影響

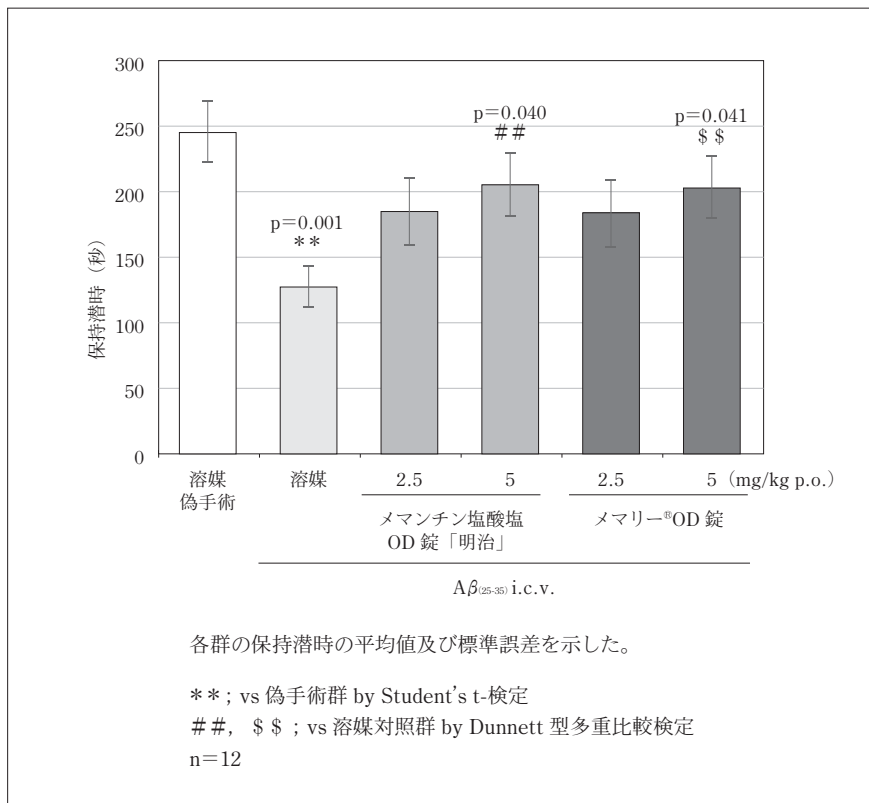


図3 マウス  $A\beta_{(25-35)}$  誘発認知機能障害モデルの受動回避試験に及ぼすメマンチン塩酸塩 OD 錠「明治」の影響

数については各群間に有意な差はなかった（データ示さず）。

受動回避試験の保持潜時の結果を図3に示した。偽手術群の保持潜時は  $246.0 \pm 23.5$  秒であったのに対し、 $A\beta_{(25-35)}$  投与群（溶媒対照群）では  $126.5 \pm 16.3$  秒と偽手術群に対して有意な減少が認められた（ $p = 0.001$ , Student's t-検定）,  $A\beta_{(25-35)}$  投与により認知機能障害が誘発されていることが確認できた。試験製剤 2.5 mg/kg 群及び 5 mg/kg 群の保持潜時はそれぞれ  $184.5 \pm 16.3$  秒及び  $205.1 \pm 25.4$  秒と用量依存的に延長し、5 mg/kg 群では溶媒対照群と比較して有意な延長が認められた（ $p = 0.040$ , Dunnett 検定）。同様に標準製剤でも 2.5 mg/kg 群及び 5 mg/kg 群でそれぞれ  $183.3 \pm 25.5$  秒及び  $203.0 \pm 24.7$  秒と用量依存的に反応潜時は延長し、5 mg/kg 群では溶媒対照群と比較して有意な延長が認められた（ $p = 0.041$ , Dunnett 検定）。試験製剤と標準製剤の同用量間に有意な差はみられなかった（2.5 mg/kg ;  $p = 0.974$ , 5 mg/kg ;  $p = 0.953$ , Student's t-検定）。なお、各群の獲得潜時には有意な差はなかった（データ示さず）。

#### 4. 考 察

メマンチン塩酸塩 OD錠「明治」は先発医薬品である中等度及び高度アルツハイマー型認知症治療薬メマリー®OD錠の後発医薬品である。後発医薬品は、「後発品の生物学的同等性試験ガイドライン」に従い製剤評価（溶出試験及びヒトでの生物学的同等性試験）を実施し、先発医薬品と同等であることが認められ、製造販売承認された医薬品である。本試験ではマウスの  $A\beta_{(25-35)}$  誘発認知機能障害モデルを用いて、試験製剤の認知機能への影響について検討した。

$A\beta$  はアルツハイマー型認知症の原因物質の一つとして知られており、 $A\beta$  が脳内に凝集・蓄積することにより神経細胞が変性・脱落し、脳の働きを低下させることで認知機能障害などの症状が発現すると考えられている。今回の動物モデルに用いた  $A\beta_{(25-35)}$  は、 $A\beta$  のコアフラグメントであり、 $A\beta$  と同様に凝集能や神経毒性の特性を備えている。 $A\beta_{(25-35)}$  を脳室内投与したマウスは、投与後短時間で神経細胞変性と認知機能障害を示すことから、簡便なアルツハイマー型認知機能障害に対する薬効評価モデルと

して汎用されている<sup>4)</sup>。

$A\beta$  は脳内のグルタミン酸がその産生に関与しているだけでなく、 $A\beta$  がシナプスにおけるグルタミン酸遊離に影響することが報告されている。アルツハイマー型認知症では  $A\beta$  がグルタミン酸神経の異常な活性化を誘発し、シナプスの可塑性が障害され、神経細胞死や認知機能障害を起こすと考えられている<sup>5)</sup>。メマンチンは NMDA 受容体に作用することでグルタミン酸神経伝達を抑制し、シナプスの可塑性の回復や認知機能障害を改善すると考えられている<sup>6)</sup>。 $A\beta$  を脳内に投与したラットやマウスでは神経細胞死や認知機能障害が認められることが知られており、メマンチンはそれらを改善することが報告されている<sup>7)</sup>。

本試験では、 $A\beta_{(25-35)}$  が誘発するマウスの認知機能障害モデルを用いて Y 迷路試験と受動回避試験に及ぼす試験製剤の影響を、標準製剤を陽性対照として検討した。その結果、試験製剤及び標準製剤は同様に Y 迷路課題と受動回避試験で認められた  $A\beta_{(25-35)}$  投与によるマウスの認知機能障害を改善したことから、試験製剤は標準製剤と同様の作用を有することが明らかとなった。また、試験製剤と標準製剤はいずれも Y 迷路試験における総エントリー数と受動回避試験における獲得潜時には影響しなかったことから、今回の試験で用いた両製剤の投与量はマウスの活動性に影響しないと考えられた。

ヒトでのメマンチンの血漿中有効濃度は  $1 \mu\text{M}$  と報告されている<sup>7)</sup>。マウスにメマンチン塩酸塩を単回経口投与した場合の  $C_{\text{max}}$  は、1 mg/kg で  $0.477 \mu\text{M}$ 、10 mg/kg で  $7.60 \mu\text{M}$  で<sup>8)</sup>、投与量依存的に血漿中濃度が上昇していることから、今回の投与用量としてヒト血漿中有効濃度  $1 \mu\text{M}$  を上回ると推定される 2.5 mg/kg に加え、さらにその2倍量の 5 mg/kg を設定した。本試験では臨床で用いられる製剤をマウスの  $A\beta_{(25-35)}$  誘発認知機能障害モデルマウスに経口投与し、両剤とも認知機能障害改善作用を有することが示された。

認知機能の評価に加え、安全性評価として試験製剤及び標準製剤のラットを用いた単回経口投与試験を実施した。両製剤はメマンチン塩酸塩の臨床における1日最大用量 20 mg<sup>1)</sup> (約 0.3 mg/kg ; ヒトの体重 60 kg として換算) の 100 倍量に相当する 30 mg/kg を投与量に設定して、6 週齢の SD 系雄性ラット (1

群3匹)にそれぞれ単回経口投与し、一般状態観察、体重測定および剖検を行った。その結果、投与直後から投与30分後までに自発運動の低下が両製剤群で散見されたが、投与1時間後には異常は認められず、一過性の発現であった。体重は両製剤群とも溶媒を投与した対照群と同様に推移し、有意な差は認められなかった。投与7日後の剖検でも変化は認められなかった<sup>9)</sup>。

以上、メマンチン塩酸塩 OD錠「明治」の認知機能障害に及ぼす影響について、先発医薬品であるメマリー<sup>®</sup>OD錠を陽性対照として、 $A\beta_{(25-35)}$ が誘発するマウスのモデルを用いてY迷路試験と受動回避試験により検討した。その結果、メマンチン塩酸塩 OD錠「明治」はメマリー<sup>®</sup>OD錠と同様に $A\beta_{(25-35)}$ が誘発するマウスにおける認知機能障害を改善させることが確認できた。

## 5. 利益相反

本試験は、Meiji Seika ファルマ株式会社が起案し、試験計画書作成、試験実施と統計解析を株式会社日本バイオリサーチセンターへ委託し実施した。なお、大山昌代、蓮沼恵子、今西泰一郎、三浦有紀は、Meiji Seika ファルマ株式会社の社員であり、小林洋之、村澤寛泰、パブラック晶子は、株式会社日本バイオリサーチセンターの社員である。

## 6. 参考文献

1) メマリー<sup>®</sup>錠・OD錠・ドライシロップ. 医薬品インタ

ビューフォーム. 2018年6月改訂(第15版)

- 2) 日本神経学会(監修),「認知症患者診療ガイドライン」作成委員会(編集). 認知症患者診療ガイドライン 2017. 医学書院, 2017.
- 3) 中村 祐. メマンチン. 日本生物学的精神医学会誌 2011; **22**: 227-35.
- 4) Klementiev B, Novikova T, Novitskaya V, et al. A neural cell adhesion molecule-derived peptide reduces neuropathological signs and cognitive impairment induced by  $A\beta_{25-35}$ . *Neuroscience* 2007; **145**: 209-24.
- 5) Revett TJ, Baker GB, Jhamandas J, et al. Glutamate system, amyloid  $\beta$  peptides and tau protein: functional interrelationships and relevance to Alzheimer disease pathology. *J Psychiatry Neurosci* 2013; **38**: 6-23.
- 6) Danysz W, Parsons CG, Mobius HJ, et al. Neuroprotective and symptomatological action of memantine relevant for Alzheimer's disease — a unified glutamatergic hypothesis on the mechanism of action. *Neurotox Res* 2000; **2**: 85-97.
- 7) Rammes G, Danysz W, Parsons CG. Pharmacodynamics of memantine: an update. *Curr Neuropharmacol* 2008; **6**: 55-78.
- 8) Beconi MG, Howland D, Park L, et al. Pharmacokinetics of memantine in rats and mice. *PLoS Curr* 2011; **3**: RRN1291.
- 9) Meiji Seika ファルマ株式会社. メマンチン「明治」の雄性ラットを用いた単回投与毒性試験に関する資料(社内資料). 2020.

(公開日: 2020年2月18日)