



# ミルタザピン錠「明治」の ラット脳内ノルアドレナリン並びに セロトニン遊離に及ぼす影響

大山昌代<sup>1)</sup>／松倉スチトラ<sup>1)</sup>／村澤寛泰<sup>2)</sup>／パブラック晶子<sup>2)</sup>／  
小林洋之<sup>2)</sup>／山内美紀<sup>1)</sup>／今西泰一郎<sup>1)</sup>／三浦有紀<sup>1)</sup>

## ● 要約

ミルタザピン錠「明治」(試験製剤)は、抗うつ薬であるリフレックス<sup>®</sup>錠(標準製剤)／レメロン<sup>®</sup>錠と有効成分を同量含有する同一剤型の後発医薬品として大蔵製薬株式会社が製造販売承認を取得した錠剤である。今回、試験製剤が標準製剤と同様に抗うつ作用を発揮するかを推察する目的で、両製剤がラット海馬ノルアドレナリン並びにセロトニン遊離に及ぼす影響を、微小透析法を用いて検討した。

試験製剤及び標準製剤を磨砕・懸濁し、ミルタザピンとして20 mg/kgの用量でラットに経口投与した。投与60分前から投与180分後にわたり、20分毎の海馬のノルアドレナリン並びにセロトニン遊離量を測定した。その結果、試験製剤群では投与前値に比べて最大3.3倍、標準製剤群では最大4.1倍までノルアドレナリン遊離量が上昇した。ノルアドレナリン遊離量を投与0～180分間までプロットした曲線下面積(以下、AUC)では、溶媒群に比べて試験製剤群は3.0倍、標準製剤群は2.8倍に増加し、いずれも有意な増加が認められた。また、試験製剤群では投与前値に比べて最大2.1倍、標準製剤群は最大1.8倍までセロトニン遊離量が上昇した。セロトニン遊離量のAUCでは、溶媒群に比べて試験製剤群、標準製剤群とも1.8倍に増加し、いずれも有意な増加が認められた。

以上の結果より、試験製剤は標準製剤と同様にラット脳内ノルアドレナリン並びにセロトニン遊離を促進させることが確認された。

**キーワード**：ミルタザピン、うつ、ノルアドレナリン、セロトニン、ラット、脳内微小透析、後発医薬品

## 1. はじめに

ミルタザピン錠「明治」(以下、試験製剤と略す)は、リフレックス<sup>®</sup>錠(以下、標準製剤と略す)／レメロン<sup>®</sup>錠と有効成分を同量含有する同一剤型の後発医薬品として大蔵製薬株式会社が製造販売承認を取得した錠剤である。

ミルタザピンは、ノルアドレナリン作動性・特異的セロトニン作動性抗うつ薬(noradrenergic and specific serotonergic antidepressant, NaSSA)に分

類される唯一の薬剤である<sup>1)2)</sup>。他の選択的セロトニン再取り込み阻害薬(selective serotonin reuptake inhibitor, SSRI)、セロトニン・ノルアドレナリン再取り込み阻害薬(serotonin noradrenaline reuptake inhibitor, SNRI)や三環系抗うつ薬(tricyclic antidepressant, TCA)とは異なり、ミルタザピンのノルアドレナリンとセロトニン再取り込み阻害作用は極めて弱い。ミルタザピンはアドレナリン $\alpha_2$ 受容体拮抗作用によりノルアドレナリン並びにセロトニンの遊離を促進すると考えられている。ミルタザピンはセロトニン5-HT<sub>2A</sub>、5-HT<sub>2C</sub>並びに5-HT<sub>3</sub>受容体拮抗作用を有するため、親和性が低い5-HT<sub>1A</sub>受容体が選択的に刺激される。ま

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

た、ミルタザピンはヒスタミン $H_1$ 受容体拮抗作用を有するが、アドレナリン $\alpha_1$ 受容体、ムスカリン受容体、ドパミン受容体との親和性は低い。ミルタザピンは、これらの特徴的な薬理作用により有効性・安全性の両面で他のカテゴリーの抗うつ薬とは異なった薬理プロファイルを示す。この薬理プロファイルから、ミルタザピンの抗うつ効果の発現は、少なくともフルボキサミンよりも早いことが示されている<sup>3)</sup>。また、ミルタザピンの副作用として、傾眠、食欲増加及び体重増加が主に認められる<sup>4)</sup>。

ミルタザピンによるラット海馬ノルアドレナリン並びにセロトニンの遊離の促進は、Yamauchi Mらによりミルタザピン原薬を用いた結果が報告されている<sup>5)</sup>。そこで本研究では、試験製剤が標準製剤と同様に抗うつ作用を発揮するかを推察する目的で、脳内微小透析法を用いて試験製剤がラット海馬ノルアドレナリン並びにセロトニンの遊離に及ぼす影響について、標準製剤の作用と比較検討した。

## 2. 実験材料及び実験方法

### 2. 1. 使用動物

6週齢(受入時)の雄性ラット(Wistar系, 日本チャールズ・リバー株式会社)を, 5日間の検疫期間と, その後8日間の馴化飼育を経て実験に使用した。動物は, 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4匹までの群飼育とした。管理温度: 20 ~ 26°C, 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(CRF-1, オリエンタル酵母工業株式会社)を自由摂取させた。

### 2. 2. 使用薬剤と薬剤の調製

ミルタザピン錠15 mg「明治」(大蔵製薬株式会社)並びにリフレックス<sup>®</sup>錠15 mg (Meiji Seikaファルマ株式会社)を使用した。両製剤は, それぞれ磨砕後, 0.5 w/v%メトロゾ<sup>®</sup>SM-100 (信越化学工業株式会社, 以下, 溶媒)で懸濁し, いずれもミルタザピンとして4 mg/mLの濃度の懸濁液を調製した。

### 2. 3. 試験方法

#### 2. 3. 1. ガイドカニューレの装着手術

ラットをペントバルビタール麻酔下(40 mg/kg, 腹腔内投与)で, 頭皮にレボブピバカイン塩酸塩(ポプスカイン<sup>®</sup>0.25%注, 丸石製薬株式会社)を皮下投与(0.1 mL)した。動物の頭頂部の毛を刈り, 頭部を脳定位固定装置(ST-7, NARISHIGE)に固定後, 頭皮を切開して皮下組織を取り除いた。Paxinos & Watson<sup>6)</sup>の脳図譜に従って右背側海馬の位置(Tooth barを-3.3 mmにセットし, bregmaより右側方に1.2 mm, 後方に3.6 mm)に歯科用ドリル(NE-120, 株式会社ナカニシ)を用いて穴を開け, マニピュレーターに取り付けたガイドカニューレ(AG-4, 株式会社エイコム)を硬膜下(深さ2.3 mm)に挿入後, 3本のビス(特注品)及び歯科用セメント(株式会社ジーシーデンタルプロダクツ)を用いて固定した。術後, ガイドカニューレにダミーカニューレ(AD-4, 株式会社エイコム)を挿入し, 頭皮を縫合した後, 飼育ケージに戻した。なお, ガイドカニューレ装着手術は, 馴化期間中に行い, 手術3日以上経過後に実験に使用した。

#### 2. 3. 2. 脳内微小透析

試験当日, ラットからダミーカニューレを取り外し, 透析用プローブ(A-I-4-02, 株式会社エイコム)をガイドカニューレに沿って挿入した。ラットは無麻酔で, アクリル製観察ケージ(W: 300 × D: 300 × H: 350 mm)に入れ, 自由に行動できるようにし測定開始時まで動物を馴化させた。透析用プローブ内にインフュージョンポンプ(ESP-64, 株式会社エイコム)を用いてリンゲル液(リンゲル液「オーツカ」: 塩化ナトリウム 8.6 g / 1000 mL, 塩化カリウム 0.3 g / 1000 mL, 塩化カルシウム 0.33 g / 1000 mL, 株式会社大塚製薬工場)を2.0  $\mu$ L/minの流速で灌流し, 2時間以上動物を馴化した。その後, 透析液(1サンプル/20分)を20分毎に回収した。回収した透析液をオートサンプリングインジェクター(M-510, 株式会社エイコム)を用いて高速液体クロマトグラフィー電気化学検出器システム(EP-700, ECD-700, 株式会社エイコム)へ連続自動注入し, 透析液中のノルアドレナリン並びにセロトニン濃度を分析した。電気化学検出器の加圧電圧は+450 mV (Ag/AgCl電極)に設定し, 分析用カ

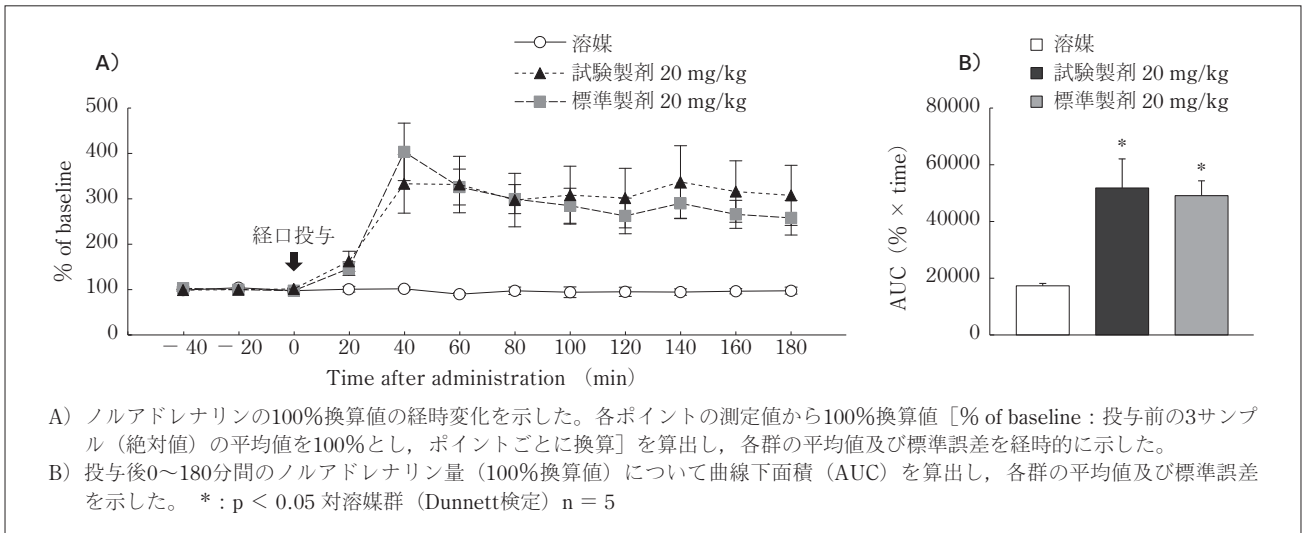


図1 ラット海馬ノルアドレナリン遊離に及ぼす試験製剤及び標準製剤の影響

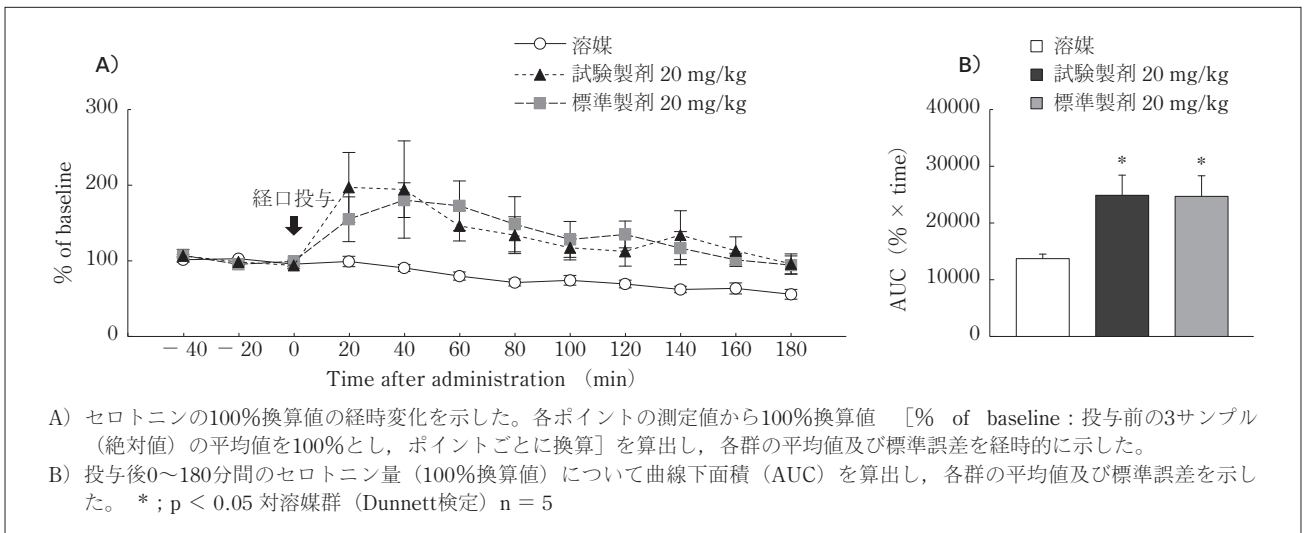


図2 ラット海馬セロトニン遊離に及ぼす試験製剤及び標準製剤の影響

ラムは陽イオンカラム (EICOMPAK CAX, 2.00 mm, i.d. x 200 mm, 株式会社エイコム) を用いた。移動相には 0.1 mol/L 酢酸アンモニウム緩衝液 (pH 6.0) / メタノール / 硫酸ナトリウム / 50 mg/mL EDTA-2Na 溶液の混合液 (700 mL / 300 mL / 7.102 g / 1 mL) を用いた (流速 0.20 mL/min)。

リングル液の灌流開始から2時間以上経過後、20分毎に3回基礎サンプルを回収した後、試験製剤または標準製剤のミルタザピンとして20 mg/kgを、あるいは溶媒を5 mL/kgの用量で経口投与した。投与直後から180分間 (20分毎に9サンプル) 透析液を回収し、透析液中のノルアドレナリン及びセロトニン濃度を同時に連続測定した。各サンプル中のモノアミン濃度は、分析開始直前に注入した標

準液 (各モノアミンとも 5.55 ng / 10  $\mu$ L) のピークエリアを基準として算出した。透析液中のノルアドレナリン及びセロトニンのピークの同定は、透析液測定前に標準液 (測定用) を測定し、標準液のピーク保持時間により行った。なお、各群の例数は5匹とした。

#### 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. 結果のまとめ

ノルアドレナリン並びにセロトニンの測定値から

100%換算値 [% of baseline : 投与前の3サンプル(絶対値)の平均値を100%とし、ポイントごとに換算]を算出し、各群で平均値及び標準誤差を算出した。

さらに、投与後0～180分間のノルアドレナリン並びにセロトニン(100%換算値)について曲線下面積(以下、AUC)を台形方式で算出し、各群で平均値及び標準誤差を算出した。

## 2. 6. 統計解析方法

ノルアドレナリン並びにセロトニン遊離量の薬剤投与0～180分間まで20分毎にプロットしたAUCについて、溶媒群に対する試験製剤群及び標準製剤群の比較にはDunnettの多重比較検定を用いた。また、試験製剤群及び標準製剤群の2群間比較検定はStudentのt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

試験製剤及び標準製剤はいずれも投与20分後からノルアドレナリン遊離量を上昇させ、溶媒群と比較してその効果は投与180分後まで持続した(図1A)。試験製剤群では投与前値に比べて最大3.3倍、標準製剤群では最大4.1倍にまでノルアドレナリン遊離量が上昇した。一方、溶媒群では明らかなノルアドレナリン遊離量の上昇は認められなかった。ノルアドレナリン遊離量を投与0～180分間まで20分毎にプロットしたAUCについては、試験製剤群では溶媒群の3.0倍、標準製剤群では2.8倍に増加し、いずれも有意な増加が認められた(図1B; 試験製剤群,  $p=0.0060$ , 標準製剤群,  $p=0.0102$ , vs 溶媒群, Dunnett検定)。なお、ノルアドレナリン遊離に対する影響は試験製剤群と標準製剤群の間に有意な差は認められなかった( $p=0.9716$ , t-検定)。

また、試験製剤及び標準製剤はいずれも投与20分後からセロトニン遊離量を上昇させ、溶媒群と比較してその効果は投与180分後まで持続した(図2A)。試験製剤群では投与前値に比べて最大2.1倍、標準製剤群では最大1.8倍にまでセロトニン遊離量が上昇した。一方、溶媒群では明らかなセロト

ニン遊離量の上昇は認められなかった。セロトニン遊離量のAUCについては、試験製剤群並びに標準製剤群ともに溶媒群の1.8倍に増加し、いずれも有意な増加が認められた(図2B; 試験製剤群,  $p=0.0380$ , 標準製剤群,  $p=0.0412$ , vs 溶媒群, Dunnett検定)。なお、セロトニン遊離に対する影響は試験製剤群と標準製剤群の間に有意な差は認められなかった( $p=0.8194$ , t-検定)。

## 4. 考 察

ミルタザピン錠「明治」は先発医薬品である抗うつ薬リフレックス<sup>®</sup>錠/レメロン<sup>®</sup>錠の後発医薬品として大蔵製薬株式会社が製造販売承認を取得した製剤であり、「後発品の生物学的同等性試験ガイドライン」に従い生物学的同等性が確認されている<sup>7)</sup>。

本試験では、試験製剤がラット海馬ノルアドレナリン並びにセロトニン遊離に及ぼす影響について、標準製剤の作用と比較検討した。その結果、試験製剤及び標準製剤それぞれの経口投与はラット海馬ノルアドレナリン並びにセロトニン遊離を有意に促進させた。なお、溶媒の経口投与は脳内ノルアドレナリン並びにセロトニン遊離に明らかな影響を及ぼさなかった。

ミルタザピンによるラット海馬ノルアドレナリン並びにセロトニン遊離の促進については、Yamauchi Mらにより腹腔内投与により検討されている<sup>3)</sup>。本試験では、臨床で用いられる製剤をラットに経口投与した。本試験で用いたミルタザピンの投与量20 mg/kgは、ヒトの血中濃度範囲を想定し設定した。ヒトでの臨床1日最大用量の45 mgを日本人(健康成人男性)に反復経口投与した場合の最高血漿中濃度(Cmax)は146 ng/mLと報告されている<sup>3)</sup>。ラット(雄)にミルタザピンを単回経口投与した場合のCmaxは、10 mg/kgで106 ng/mL、40 mg/kgで214 ng/mLであることから<sup>3)</sup>、今回の検討に用いた20 mg/kgのCmaxは140 ng/mL程度と、おおむね臨床の範囲であると推定された。

なお、本試験で設定した製剤の用量である20 mg/kgは、ミルタザピン原末を用いたラットの52週間経口反復投与毒性試験の無毒性用量<sup>3)</sup>と同じである。参考として試験製剤及び標準製剤の単回投与毒性試験を30 mg/kgで実施した結果、両製剤とも毒性所見はみられなかった<sup>8)</sup>ことから、本試験の用



量は適切であったと考えられた。

また測定部位については、ミルタザピンのノルアドレナリン遊離促進作用はいずれの脳部位でも観察されるが、セロトニン遊離については脳部位によって促進する部位と促進しない部位に分かれることが知られている<sup>5)</sup>。そこで、本試験ではミルタザピンによるノルアドレナリン並びにセロトニン遊離がともに促進される海馬を測定部位として選択した。本試験において、試験製剤及び標準製剤は同様にラット海馬ノルアドレナリン並びにセロトニン遊離を促進させたことから、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。

以上、ミルタザピン錠「明治」がラット海馬ノルアドレナリン並びにセロトニン遊離に及ぼす影響について標準製剤の作用と比較検討した。その結果、ミルタザピン錠「明治」は標準製剤と同様にノルアドレナリン及びセロトニン遊離を促進させることが確認された。

#### 5. 利益相反

本試験は、Meiji Seika ファルマ株式会社が試験計画を立案し、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、松倉スチトラ、山内美紀、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る。

#### 6. 参考文献

- 1) Sartorius N, Baghai TC, Baldwin DS, et al: Antidepressant medications and other treatments of depressive disorders: a CINP Task Force report based on a review of evidence. *Int J Neuropsychopharmacol* 2007;**10** (Suppl 1) :S1-207.
- 2) De Boer T: The pharmacologic profile of mirtazapine. *J Clin Psychiatry* 1996; **57** (Suppl 4) :19-25.
- 3) リフレックス<sup>®</sup>錠の医薬品製造承認申請資料.
- 4) リフレックス<sup>®</sup>錠 添付文書 2018年8月改訂(第14版)
- 5) Yamauchi M, Imanishi T, Koyama T: A combination of mirtazapine and milnacipran augments the extracellular levels of monoamines in the rat brain. *Neuropharmacology* 2012; **62** :2278-87.
- 6) Paxinos G, Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, second ed. Academic Press, Inc. San Diego 1986.
- 7) ミルタザピン錠「明治」添付文書 2018年8月改訂(第2版).
- 8) Meiji Seika ファルマ株式会社 社内資料. 2018.