目次

2.4 非臨床試験の概括評価 3
2.4.1 非臨床試験計画概略 3
2.4.2 薬理試験 9
2.4.3 薬物動態試験 11
2.4.4 毒性試験 12
2.4.4.1 単回投与毒性試験 15
2.4.4.2 反復投与毒性試験 15
2.4.4.2.1 3ヵ月以下の試験 15
2.4.4.2.2 3ヵ月を超える試験 15
2.4.4.3 遺伝毒性試験 16
2.4.4.4 がん原性試験 16
2.4.4.4.1 マウスのがん原性試験 17
2.4.4.4.2 ラットのがん原性試験 17
2.4.4.5 生殖発生毒性試験 18
2.4.4.6 局所刺激性試験 18
2.4.4.7 抗原性試験 19
2.4.4.8 免疫毒性試験 20
2.4.5 総括及び結論 20
2.4.5.1 有効性及び作用機序の評価 20
2.4.5.2 安全性の評価 21
2.4.5.2.1 安全性薬理試験 21
2.4.5.2.2 毒性試験 21
2.4.6 参考文献 22

表

表 2.4-1 GA の非臨床試験の概要 4
表 2.4-2 GA の毒性試験の概要 12

図

図 2.4-1 グラチラマー酢酸塩の作用機序 10

略号一覧表

略号	略していない表現又は説明
ALP	Alkaline Phosphatase〔アルカリホスファターゼ〕
ALT	Alanine Aminotransferase〔アラニンアミノトランスフェラーゼ〕
APC	Antigen Presenting Cell(s)〔抗原提示細胞〕
BBB	Blood Brain Barrier〔血液脳関門〕
BDNF	Brain Derived Neurotrophic Factor〔脳由来神経栄養因子〕
BP	Blood Pressure〔血圧〕
CDMS	Clinically Definite Multiple Sclerosis〔診断確実（臨床的）な多発性硬化症〕
CFA	Complete Freund's Adjuvant〔フロイント完全アジュバント〕
CHO	Chinese Hamster Ovary〔チャイニーズハムスター卵巣〕
CNS	Central Nervous System〔中枢神経系〕
COP-1	Copolymer-1〔コポリマー-1〕
CPK	Creatine Phosphokinase〔クレアチンホスホキナーゼ〕
DH	Dunkin Hartley〔Dunkin Hartley〕
EAE	Experimental Autoimmune Encephalomyelitis〔実験的自己免疫性脳脊髄炎〕
ECG	Electrocardiogram〔心電図〕
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay〔酵素免疫測定法〕
GA	Glatiramer Acetate〔グラチラマー酢酸塩〕
GLP	Good Laboratory Practice〔医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施基準〕
hERG	Human Ether-a-go-go Related Gene〔ヒト遅延整流性カリウムイオンチャネル遺伝子〕
HPLC	High Performance Liquid Chromatography〔高速液体クロマトグラフィー〕
HR	Heart Rate〔心拍数〕
IC/ic/i.c.	Intracaudal〔尾静脈内〕
IM/im/i.m.	Intramuscular〔筋肉内〕
IP/ip/i.p.	Intraperitoneal〔腹腔内〕
IV/iv/i.v.	Intravenous〔静脈内〕
LDH	Lactate Dehydrogenase〔乳酸脱水素酵素〕
MBP	Myelin Basic Protein〔ミエリン塩基性蛋白〕
MOG	Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein〔ミエリンオリゴデンドロサイト糖蛋白〕
MS	Multiple Sclerosis〔多発性硬化症〕
MTD	Maximum Tolerated Dose〔最大耐量〕
NA	Not Applicable〔該当せず〕
NOAEL	No-Observed-Adverse-Effect-Level〔無毒性量〕
NZW	New Zealand White〔ニュージーランド白色種〕
PD	Pharmacodynamic〔薬力学〕
PK	Pharmacokinetic〔薬物動態〕
PLP	Proteolipid Protein〔プロテオリピッド蛋白〕
PO/po/p.o.	Per os (oral)〔経口〕
RRMS	Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis〔再発寛解型多発性硬化症〕
SC/sc/s.c.	Subcutaneous〔皮下〕
SD	Sprague-Dawley〔Sprague-Dawley〕
TGF-β	Transforming Growth Factor-β〔トランスフォーミング成長因子β〕
Th1	Type-1 helper T cell〔1型ヘルパーT細胞〕
Th2	Type-2 helper T cell〔2型ヘルパーT細胞〕
TK	Toxicokinetic〔トキシコキネティクス〕

2.4 非臨床試験の概括評価

グラチラマー酢酸塩（GA）は、多発性硬化症（MS）の発症に関与する自己抗原の一つであるミエリン塩基性蛋白（MBP）の構造を基に 4 種類のアミノ酸（L-グルタミン酸、L-アラニン、L-チロシン及び L-リシン）から合成したポリペプチド混合物である[1]。GA は、再発寛解型 MS（RRMS）患者の再発頻度を低下させ、また明確な初回臨床（神経学的）発作が発症し、診断確実（臨床的）な MS（CDMS）を発症するリスクが高い患者の治療を適応とする病態修飾薬として、世界 50 ヵ国以上で承認されている[2]。GA の臨床での投与経路は皮下（s.c.）投与である。

2.4.1 非臨床試験計画概略

GA の非臨床安全性試験が計画されたのは ICH の規制ガイダンスが作成される前であり、本概括評価に引用する初期の試験の中には、現行の規制に従って実施されていないものもある。主な毒性試験は、GLP 及び規制ガイドラインに適合させて実施した。

GA の効力を裏付ける試験は、様々な動物種を用いた実験的自己免疫性脳脊髄炎（EAE）モデルにて実施した（2.6.2.2 参照）。標準的な安全性薬理試験の評価項目（中枢神経系、呼吸器系、心血管系）を評価した他（2.6.2.4 参照）、GA の PK 試験も実施した（2.6.4 参照）。GA の安全性プロファイルは、単回及び反復投与毒性試験、遺伝毒性試験、がん原性試験、生殖発生毒性試験及び抗原性試験からなる一連の毒性試験で評価した（2.6.6 参照）。

表 2.4-1 に GA の非臨床試験を要約する。

表 2.4-1　　GA の非臨床試験の概要

試験の種類	試験の区分	試験期間又は下位区分	投与経路	動物種/系統	試験の参考文献（添付資料番号）
薬理試験	効力を裏付ける試験	急性型 EAE	NR	マウス/(SJL/JxBALB/c)F1	Lando et al., 1979（4.2.1.1-1 参考）
		急性型 EAE	i.v.	マウス/(SJL/JxBALB/c)F1	Teitelbaum et al.,1995（4.2.1.1-3 参考）
		急性型 EAE	s.c.	マウス/(SJL/J)	Teitelbaum et al.,1995（4.2.1.1-3 参考）
		急性型 EAE	NR	マウス/(SJL/JxBALB/c)F1	[redacted]試験（4.2.1.1-4 参考）， [redacted]試験（4.2.1.1-5 参考）
		急性型 EAE	footpads (s.c.)	マウス/(SJL/JxBALB/c)F1	[redacted]試験（4.2.1.1-6 参考）
		急性型 EAE	NR	マウス/NR	[redacted]試験（4.2.1.1-7 参考）
		急性型 EAE	s.c.	マウス/(SJL/J)	Teitelbaum et al.,1995（4.2.1.1-3 参考）， [redacted]試験（4.2.1.1-8 参考）
		急性型 EAE	i.v., p.o.	ラット/Lewis	Teitelbaum et al.,1995（4.2.1.1-3 参考）
		急性型 EAE	s.c.	ラット/Lewis	Teitelbaum et al.,1995（4.2.1.1-3 参考）， [redacted]試験（4.2.1.1-8 参考）
		急性型 EAE	NR	モルモット/NR、ウサギ/NR、マウス/NR、サル/アカゲ、ヒヒ	Arnon 1981（4.2.1.1-9 参考）
		急性型 EAE	i.v.	モルモット/DH Albino	Teitelbaum et al., 1971（4.2.1.1-2 参考）
		急性型 EAE	i.v.	モルモット/DH Albino	Teitelbaum et al.,1995（4.2.1.1-3 参考）， Arnon and Teitelbaum, 1980（4.2.1.1-10 参考）
		急性型 EAE	i.m.	ヒヒ	Arnon and Teitelbaum, 1980（4.2.1.1-10 参考）
		急性型 EAE	i.m.	モルモット/Hartley	Lisak et al., 1983（4.2.1.1-11 参考）
		急性型 EAE	i.v.	モルモット/NR	Teitelbaum et al., 1972（4.2.1.1-12 参考）
		急性型 EAE	i.v.	モルモット/DH Albino	Webb et al., 1976（4.2.1.1-13 参考）， Teitelbaum et al., 1973（4.2.1.1-14 参考）

表 2.4-1　GA の非臨床試験の概要（Continued）

試験の種類	試験の区分	試験期間又は下位区分	投与経路	動物種/系統	試験の参考文献（添付資料番号）
		急性型 EAE	i.v.	ウサギ/NZW	Teitelbaum et al., 1973（4.2.1.1-14 参考）
		急性型 EAE	i.m.	サル/アカゲ	Teitelbaum et al., 1974（4.2.1.1-15 参考）
		慢性再発型 EAE	s.c.	マウス/(SJL/JxBALB/c)F1	Teitelbaum et al., 1996（4.2.1.1-16 参考），[redacted]試験（4.2.1.1-17 参考）
		慢性再発型 EAE	s.c.	モルモット/幼若 Strain 13	Keith et al., 1979（4.2.1.1-18 参考）
	副次的薬理試験	平滑筋収縮	In vitro	モルモット回腸及び気管、ラット胃底部	[redacted]試験（4.2.1.2-1 参考；GLP 非適用）
	安全性薬理試験	CNS	s.c.	ラット/ SD	[redacted]試験（4.2.1.3-1 評価；GLP 適用）
		CNS	s.c.	イヌ/ビーグル	[redacted]試験（4.2.1.3-2 参考；GLP 適用）
		心血管系	In vitro	CHO-K1 細胞	[redacted]試験（4.2.1.3-3 評価；GLP 適用）
		心血管系	i.v.	ラット/Wistar; ネコ/Fec Eur (Tif)	[redacted]試験（4.2.1.3-4 参考；GLP 非適用）
		心血管系	i.v.	ウサギ/Albino	[redacted]試験（4.2.1.3-5 参考；GLP 非適用）
		心血管系	s.c.	イヌ/ビーグル	[redacted]試験（4.2.1.3-6 参考；GLP 非適用）
		心血管系	i.v.	イヌ/ビーグル	[redacted]試験（4.2.1.3-7 参考；GLP 非適用）
		心血管系	i.v.	イヌ/ビーグル	[redacted]試験（4.2.1.3-8 参考；GLP 非適用）
		心血管系	i.v.	イヌ/ビーグル	[redacted]試験（4.2.1.3-9 評価；GLP 適用）
		呼吸器系	i.v.	イヌ/ビーグル	[redacted]試験（4.2.1.3-7 参考；GLP 非適用）
		呼吸器系	i.v.	イヌ/ビーグル	[redacted]試験（4.2.1.3-8 参考；GLP 非適用）
		ヒスタミン遊離	In vitro	ラット腹腔肥満細胞	[redacted]試験（4.2.1.3-10 参考；GLP 非適用）
薬物動態試験	吸収	PK、単回投与	s.c.	マウス/SJL/J x Balb/c	[redacted]（4.2.2.2-1 参考；GLP 非適用）
		PK、単回投与	i.v., s.c., i.m., p.o.	ラット/ SD	[redacted]（4.2.2.2-2 参考；GLP 非適用）

表 2.4-1　GA の非臨床試験の概要（Continued）

試験の種類	試験の区分	試験期間又は下位区分	投与経路	動物種/系統	試験の参考文献（添付資料番号）
		PK、単回投与	s.c.	ラット/ SD	[redacted] (4.2.2.2-3 参考；GLP 非適用)
		PK、反復投与	s.c.	ラット/ SD	[redacted] (4.2.2.2-4 参考；GLP 適用)
		PK、単回投与	s.c.	イヌ/ビーグル	[redacted] (4.2.2.2-5 参考；GLP 非適用)
		PK、単回投与	s.c.	ラット/ SD；サル/カニクイ	[redacted] (4.2.2.2-6 参考；GLP 非適用)
	分布	分布、単回投与	i.v., i.p.	マウス	[redacted] (4.2.2.3-1 参考；GLP 非適用)
		分布、単回投与	s.c.	マウス/SJL/J x Balb/c	[redacted] (4.2.2.2-1 参考；GLP 非適用)
		分布、単回投与	i.v., s.c., i.m., p.o.	ラット/SD	[redacted] (4.2.2.2-2 参考；GLP 非適用)
		蛋白結合	In vitro	ヒト血漿蛋白	[redacted] (4.2.2.3-2 参考；GLP 非適用)
	代謝	代謝、in vitro	In vitro	ラット組織ホモジネート	[redacted] (4.2.2.4-1 参考；GLP 非適用)
		代謝、in vitro	In vitro	ヒト組織ホモジネート	[redacted] (4.2.2.4-2 参考；GLP 非適用)
		代謝、in vivo	i.v., s.c.	ラット/SD	[redacted] (4.2.2.4-3 参考；GLP 非適用)
	排泄	排泄、単回投与	i.v., i.p.	マウス	[redacted] (4.2.2.3-1 参考；GLP 非適用)
毒性試験	単回投与及び反復投与毒性	単回投与	i.m.	マウス/ICR	[redacted] (4.2.3.1-1 参考；GLP 非適用)
		単回投与	s.c.	ラット/SD	[redacted] (4.2.3.1-2 参考；GLP 適用)
		単回投与	i.v.	ラット/Lewis	[redacted] (4.2.3.1-3 参考；GLP 非適用)
		単回投与	i.v.	ラット/SD	[redacted] (4.2.3.1-4 参考；GLP 適用)
		単回投与	i.v.	ラット/SD	[redacted] (4.2.3.1-5 参考；GLP 適用)
		単回投与	i.v.	ラット/SD	[redacted] (4.2.3.1-6 参考；GLP 適用)
		単回投与	i.m., s.c..	イヌ/ビーグル	[redacted] (4.2.3.1-7 参考；GLP 非適用)
		13 週間反復投与	s.c.	マウス/ICR	[redacted] (4.2.3.2-1 評価；GLP 適用)
		4 週間反復投与	s.c.	ラット/SD	[redacted] (4.2.3.2-2 参考；GLP 適用)
		26 週間反復投与（重要な試験）	s.c.	ラット/SD	[redacted] (4.2.3.2-3 評価；GLP 適用)

表 2.4-1　GA の非臨床試験の概要（Continued）

試験の種類	試験の区分	試験期間又は下位区分	投与経路	動物種/系統	試験の参考文献（添付資料番号）
		6 ヵ月間反復投与	i.m., s.c.,	ラット/SD	[redacted]（4.2.3.2-4 参考；GLP 非適用）
		6 ヵ月間反復投与	i.m.	ウサギ/系統の報告なし	[redacted]（4.2.3.2-5 参考；GLP 非適用）
		4 週間反復投与	s.c.	イヌ/ビーグル	[redacted]（4.2.1.3-1 参考；GLP 適用）
		36 日間反復投与	s.c.	イヌ/ビーグル	[redacted]（4.2.3.2-6 参考；GLP 非適用）
		90 日間反復投与	s.c.	イヌ/ビーグル	[redacted]（4.2.3.2-7 参考；GLP 非適用）
		28 日間反復投与	s.c.	サル/カニクイ	[redacted]（4.2.3.2-8 評価；GLP 適用）
		52 週間反復投与（重要な試験）	s.c.	サル/カニクイ	[redacted]（4.2.3.2-9 評価；GLP 適用）
	遺伝毒性及びがん原性	細菌を用いる復帰突然変異試験	In vitro	ネズミチフス菌及び大腸菌株	[redacted]（4.2.3.3.1-1 評価；GLP 適用）
		哺乳類細胞を用いる遺伝子突然変異試験	In vitro	マウスリンフォーマ L5178Y $TK^{+/-}$細胞	[redacted]（4.2.3.3.1-2 評価；GLP 適用）
		哺乳類細胞を用いる染色体異常試験	In vitro	ヒト末梢血リンパ球 (男性供血者)	[redacted]（4.2.3.3.1-3 評価；GLP 適用）
		哺乳類細胞を用いる染色体異常試験	In vitro	ヒト末梢血リンパ球 (女性供血者)	[redacted]（4.2.3.3.1-4 評価；GLP 適用）
		小核試験	i.p.	マウス/ICR	[redacted]（4.2.3.3.2-1 評価；GLP 適用）
		マウスの 100 週間投与試験	s.c.	マウス/ICR	[redacted]（4.2.3.4.1-1 評価；GLP 適用）
		ラットの 104 週間投与試験	s.c.	ラット/SD	[redacted]（4.2.3.4.1-2 評価；GLP 適用）
	生殖発生毒性	受胎能及び一般生殖能試験	s.c.	ラット/SD	[redacted]（4.2.3.5.1-1 参考；GLP 適用）
		胚・胎児発生に関する試験	s.c.	ラット/SD	[redacted]（4.2.3.5.2-1 参考；GLP 適用）
		胚・胎児発生に関する試験	s.c.	ウサギ/NZW	[redacted]（4.2.3.5.2-2 参考；GLP 適用）
		周産期及び授乳期投与試験	s.c.	ラット/SD	[redacted]（4.2.3.5.3-1 参考；GLP 適用）
	その他の試験	抗原性試験	s.c.	モルモット/Hartley	[redacted]（4.2.3.7.1-1 参考；GLP 適用）

表 2.4-1　GA の非臨床試験の概要（Continued）

試験の種類	試験の区分	試験期間又は下位区分	投与経路	動物種/系統	試験の参考文献（添付資料番号）
		抗原性試験	s.c.	マウス/BALB/c 及び C3H/He	[redacted] (4.2.3.7.1-1 参考；GLP 適用)

CNS = 中枢神経系； DH = Dunkin Hartley；EAE = 実験的自己免疫性脳脊髄炎； i.m. = 筋肉内；i.p. = 腹腔内；i.v. = 静脈内；NR = 報告なし；NZW = New Zealand White；PD = 薬力学；PK = 薬物動態；p.o. = 経口；s.c. = 皮下；SD = Sprague-Dawley

2.4.2 薬理試験

MS に関する発症機序の解明及び有効な治療法の研究には、ヒト MS の実験的動物モデルである EAE が盛んに利用されている。EAE は、フロイント完全アジュバント（CFA）と混和した CNS 由来物質、すなわち精製した脳炎誘発性蛋白（MBP、プロテオリピッド蛋白［PLP］及びミエリンオリゴデンドロサイト糖蛋白［MOG］）や、これらの蛋白の脳炎誘発性ペプチド断片を注入することにより、様々な動物種に誘導できる神経学的な自己免疫性疾患モデルである[3,4]。EAE は、急性型又は慢性再発型の臨床経過を反映した実験的動物モデルであり、MHC クラス II 分子と結合した脳炎誘発性抗原を認識する $CD4^+$ 自己反応性 T 細胞が介在すると考えられている。このような自己反応性細胞は CNS 内に移行し、発症過程に介在する[5]。

合成ポリマー及びコポリマーの免疫学的性質の基礎研究を行っていたワイズマン研究所の研究者らは、合成ポリペプチドの酢酸塩である GA が、脳炎誘発性抗原での感作に対する投与スケジュールに依存して、様々な動物種での EAE に対して予防、阻害又は抑制効果を示すことを発見した。さらなる研究の結果、GA はマウス、ラット、モルモット、ウサギなどの動物種において急性型 EAE の臨床症状及び組織学的病変の両方に対し、抑制又は予防効果を示した。最も重要なことには、ヒト以外の霊長類での EAE において、臨床症状発現後に GA の連日投与を開始した場合、生存率が改善し、臨床症状及び組織学的病変が改善した。GA 混合物の活性配列は特定されていないが、様々な脳炎誘発性エピトープにより誘導される EAE を GA が有効に治療できることから、GA の「複数のエピトープをもつ」という性質が活性発現に極めて重要と考えられている。

GA が MS に治療効果を示す根拠として、いくつかの機序が提唱されている（図 2.4-1 参照）。GA は下記の多様な作用を示すことにより免疫調節作用を発揮すると考えられる（2.6.2.2.3 参照）。：

- 抗原提示細胞（APC）への高親和性結合
- GA 反応性 APC と T 細胞の相互作用
- GA 反応性 T 細胞の誘導
- GA 特異的 T 細胞の損傷部位への遊走
- II 型単球の形成
- 樹状細胞の機能の修飾
- B 細胞の機能の修飾
- ナチュラルキラー細胞の機能の修飾
- GA の神経保護作用
- 免疫グロブリン反応に対する GA を介する作用

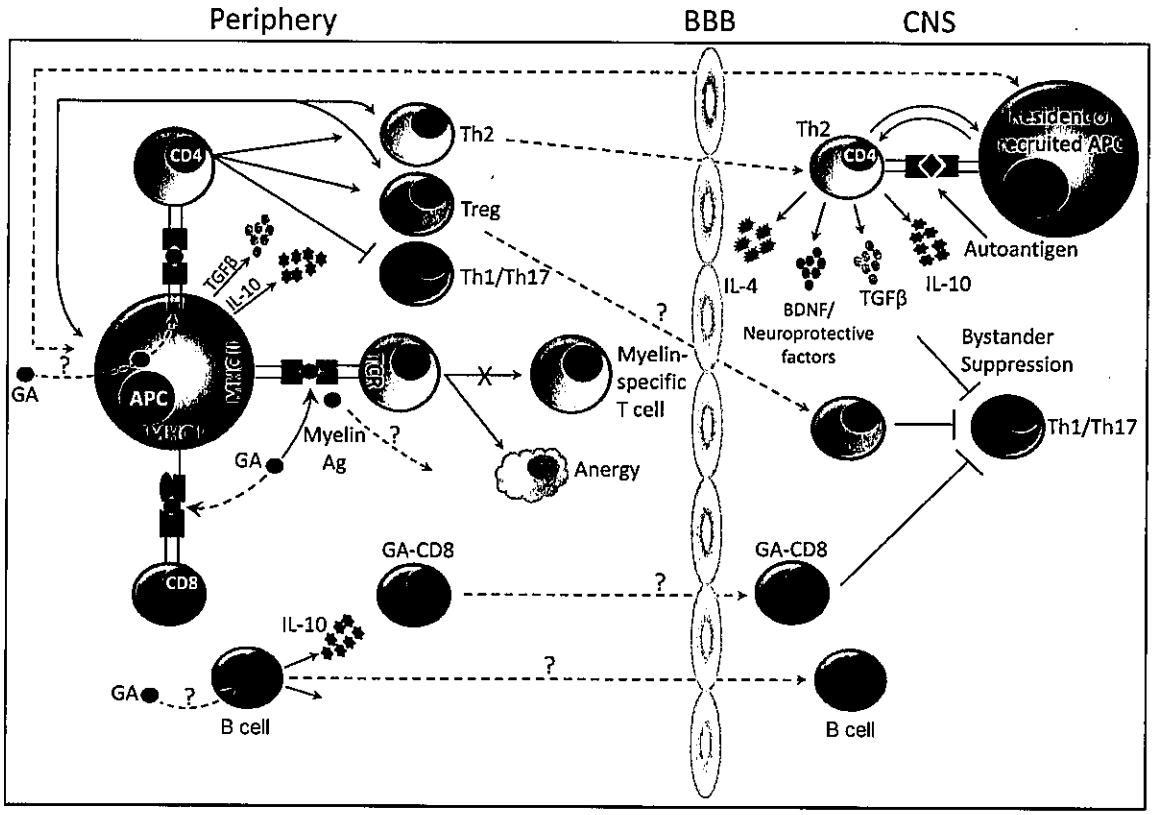


図 2.4-1　　グラチラマー酢酸塩の作用機序

GA は、IL-10 及びトランスフォーミング成長因子 β（TGF-β）を主に産生する抗炎症性 II 型 APC の形成を促進する。GA は皮下投与後、リンパ節内の APC 表面に存在する MHC 分子に結合する。その結果、GA はミエリン反応性 T 細胞の活性化を阻害するか、これらの細胞を免疫不応答状態にする。また、II 型 APC はナイーブ $CD4^+$ T 細胞に遭遇すると、T 細胞を Th2 細胞及び FoxP3+制御性 T 細胞へと選択的に分化させる。type II APC（II 型 APC）及び Th2／制御性 T 細胞は、T 細胞由来の抗炎症性サイトカインが APC の type II（II 型）への分化を誘導するという正のフィードバックで、相互に形成を促進する可能性がある。血液脳関門を通過した Th2 細胞は CNS 内の局所で再活性化され、抗炎症性サイトカイン及び神経栄養因子を分泌し、周囲の炎症誘発環境を弱めると考えられている（「バイスタンダー抑制」）。T 細胞由来のサイトカインは常在性又は動員された APC の type II（II 型）への分化を促進すると考えられるため、CNS 内でも APC と T 細胞間にフィードバックループが形成される可能性がある。また、GA 投与は GA 反応性 $CD8^+$細胞の誘導と関連し、また最近の研究結果では、GA が B 細胞でも免疫調節作用を有する可能性が示されている。これらの細胞が CNS に移行するか否かは、いまだ明らかになっていない[6]。

CNS、呼吸器系、心血管系などの一連の安全性薬理試験を実施し、GA の各種生理系に対する有害作用の可能性について評価した。さらに、ヒスタミン遊離に対する GA の影響を検討する *in vitro* 試験も実施した。

hERG 試験では、ヒトに 20 mg を皮下投与した際の最大血中濃度（Cmax）の約 30 倍に相当する 6 μg/mL の濃度においても GA は hERG 電流に影響を及ぼさなかった（4.2.1.3-3）。

GA が血圧（BP）及び心拍数（HR）に及ぼす影響を検討する単回投与試験を、ラット、ウサギ、ネコ及びイヌで実施した。ラットに 10 又は 20 mg/kg を単回静脈内（i.v.）投与したところ、両用量で BP 低下が見られたが、HR に対する影響は見られなかった（4.2.1.3-4）。ウサギに

20 mg/kg を単回静脈内投与したところ、BP 及び HR に対する薬剤投与に関連した影響は見られなかった（4.2.1.3-5）。麻酔下ネコ（4.2.1.3-4）に GA を 1、2、5 及び 10 mg/kg の用量で単回静脈内投与したところ、BP の低下が認められた。BP は 5 mg/kg で平均 52.5 mmHg、10 mg/kg で平均 61 mmHg 低下した。初回投与後に 10 mg/kg を再投与すると血圧上昇反応が見られ、20 mg/kg を再投与すると、初回投与からの血圧上昇反応が見られた。この血圧上昇は短時間の反応であり、その後にしばしば血圧低下反応を伴った。この試験では、HR に対する影響は見られなかった。イヌでは、0.4～20 mg/kg の静脈内投与後に BP、HR 及び心電図（ECG、II 誘導の記録）評価を実施した。その結果、10 mg/kg 以上で、一過性の BP 低下及び HR 減少が認められた（4.2.1.3-7 及び 4.2.1.3-8）。イヌでは 20 mg/kg を皮下投与しても、BP 及び HR に対する薬剤投与に関連した影響は認められなかった（4.2.1.3-6）。これらの影響に関する検討の結果、GA の影響はヒスタミン遊離作用に関連するものであり、ヒスタミン拮抗薬の前投与により抑制できることが示された（4.2.1.3-4）。

麻酔下イヌを用いた GLP 適用の単回投与試験では、GA の心血管系に対する有害作用の可能性を評価した（4.2.1.3-9）。雄性ビーグル犬 4 例に、GA の 0.3、1、3 及び 6 mg/kg（投与液量 0.2 mL/kg）を速度 0.5 mL／分で静脈内投与した。心血管系の評価項目は、収縮期、拡張期及び平均血圧、HR、心拍出量、冠動脈血流量、冠動脈抵抗及び ECG とした。その他に、血清中の乳酸脱水素酵素（LDH）及びクレアチンホスホキナーゼ（CPK）アイソザイムも測定した。その結果、最高用量（6 mg/kg）の GA 投与により、4 例中 2 例で平均動脈圧の低下が認められた。いずれの用量においても、GA により HR、平均冠動脈血流量、冠動脈抵抗、ECG、並びに血清中 LDH 及び CPK 値に、生物学的に意義ある変化はなかった。サルでは、28 日間又は 52 週間の GA 皮下投与後、それぞれ 60 又は 30 mg/kg／日までの用量で、投与に関連する ECG の変化は見られなかった（4.2.3.2-8 及び 4.2.3.2-9）。以上、GA は催不整脈作用は有さないが、ヒスタミン遊離作用に起因すると推察される血圧・心拍数への影響が懸念される。しかしこれらの影響は皮下投与時には認められず静脈内に大量投与した場合に限られることから、臨床適用経路の皮下投与である限りは同様の症状が発現する懸念はないと考えられる。万一血管内に大量に誤投与された場合にはその懸念は否定できないが、イヌの静脈内投与試験における無作用量は 3～5 mg/kg であることから、臨床使用においてそれほどの大量の GA が血管内に誤投与される可能性は低いと思われる。

ラット Irwin 試験では、90mg/kg までの GA を単回皮下投与し一般行動パラメータ（Irwin テスト）及び体温を 24 時間観察したところ、行動異常も生理学的機能の変化も認められなかった（4.2.1.3-1）。各動物種で実施した GLP 適用の毒性試験において、CNS に関連する毒性作用は見られなかった。また、イヌの静脈内投与試験において呼吸器系に対する明らかな有害作用は見られなかった（4.2.1.3-7 及び 4.2.1.3-8）。

ヒスタミン遊離活性を、*in vitro* 培養系で検討した。雄性 Sabra ラットの腹腔肥満細胞を、様々な濃度の GA に曝露した（4.2.1.3-10）。高濃度域で濃度依存的なヒスタミン遊離が認められたが、治療用量の皮下投与後に、全身濃度がこのような高値に達する可能性は低い。検討した最高濃度 500 μg/mL では、ヒスタミン含有量の 75%以上が遊離した。この濃度では、10～20%の細胞で細胞毒性が認められた。

以上の GA の安全性薬理試験の結果から、GA をヒトに皮下投与した場合、心血管系、呼吸器系及び CNS に対するリスクは軽微であることが示唆されるが、血管内に大量に誤投与された場合には血圧及び心拍数への影響が発現する可能性があることに留意すべきである。

2.4.3　薬物動態試験

GA の薬物動態（PK）プロファイルは、マウス、ラット、イヌ及びサルを用いた GLP 非適用の試験、並びにラット及びサルを用いた GLP 適用試験にて評価した。病態モデルマウスとの比較試験では正常動物及び EAE 動物モデルを使用し、皮下投与後の GA の PK プロファイルを検討した。GA の PK プロファイルはラットでは、皮下、静脈内、筋肉内又は経口投与にて評価し、イヌ及びサルでは皮下投与にて評価した。ラット及びサルを用いた GLP 適用の反復投与毒性試

験では、トキシコキネティクス（TK）解析も実施しており、これらの試験については該当する毒性試験の項でも考察した（2.6.6.3 参照）。

投与動物の血漿中 GA の検出には、2 種類の方法を使用した。[^{125}I]-GA を使用した際に放射能を検出する方法、及び酵素免疫測定（ELISA）法が用いられた。しかしながら、両測定法は特異性が不十分であった。これは、類縁関係にある様々な長さ及び配列のポリペプチドで構成される GA の複雑な性質に起因している。いずれの測定法も、GA とその高分子量の分解生成物を識別できないために、正確な曝露量を求めるための方法としては適さないと判断された。さらに、放射能を検出する方法については GA から遊離したヨウ素が各種臓器や巨大分子に二次的に取り込まれた放射能についても検出されることも問題であった。しかし、投与後に速やかに分解される GA の基本的性質はこれらの方法によっても十分に検証されている（4.2.2.2-3；2.6.4.2 も参照）。

特異性を有する競合阻害 ELISA 法を用いた試験から得られた結果においても、皮下投与された GA が速やかに吸収され、数時間以内に血液中濃度が定量下限未満まで低下することが確認された。

その他の PK パラメータ（分布容積、消失速度定数など）は、主として分解生成物又は[^{125}I]-GA からの遊離ヨウ化物を検出して求められたものであるため、これらのパラメータ値について考察する意義は低い。

血液中では、[^{125}I]-GA の大半はヒト血清蛋白との結合型として存在し、アルブミン及び α_1-酸性糖蛋白との高い結合率を示した。この高い結合率は、GA が見かけ上、血漿中で安定であることの要因と考えられる。皮下投与された[^{125}I]-GA は投与部位から速やかに吸収され、その後体内で低分子物質へと速やかに分解される。分解された分子から遊離した放射性ヨウ素は巨大分子と結合するため、分解生成物の体内動態を明らかにすることは困難であると考えられる。抗原提示細胞表面の MHC 複合体への結合が、GA の作用機序の一部として提唱されている。したがって、白血球への[^{125}I]-GA の高い親和性は提唱されている GA の免疫調節作用に関与すると考えられる。

GA はその構造から推測されるように、蛋白消化（加水分解、アミノ基転移、脱アミノ化など）により、アミノ酸へと分解されることが示唆されている（2.6.4.5 参照）。末梢、特に皮下（投与部位）で速やかに分解されるため、GA は低いバイオアベイラビリティを示すが、低いバイオアベイラビリティと GA の有効性は直接関与しない。なぜなら、GA は皮下組織に豊富に存在する免疫応答細胞に影響を及ぼす免疫調節薬であることから、GA の全身曝露は薬効発現にとって必須でないと考えられるためである。

[^{125}I]-GA をマウスに投与すると放射能は主に尿中に排泄されたが、これは遊離したヨウ素が尿中に排泄されたためと考えられる（2.6.4.6 参照）。ほとんどの高分子量のペプチドと同様に未変化の GA は分子量が大きいため、GA そのものは腎糸球体でろ過されないと考えられる。

2.4.4　毒性試験

毒性試験の概要を表 2.4-2 に示す。その内訳は、げっ歯類及び非げっ歯類を用いた単回投与毒性試験及び反復投与毒性試験（サルでは 1 年間）、遺伝毒性試験、マウス及びラットを用いたがん原性試験、ラット及びウサギを用いた生殖発生毒性試験、並びに抗原性試験である。

表 2.4-2　GA の毒性試験の概要

試験の種類	試験期間又は区分	投与経路	動物種 (系統)	被験化合物	試験番号（GLP 準拠の有無）
単回投与毒性	単回投与	i.m.	マウス (ICR)	GA	4.2.3.1-1 (GLP 非適用：参考)

表 2.4-2　GA の毒性試験の概要（Continued）

試験の種類	試験期間又は区分	投与経路	動物種 (系統)	被験化合物	試験番号 (GLP 準拠の有無)
	単回投与	s.c.	ラット (SD)	GA	4.2.3.1-2 (GLP 適用：参考)
	単回投与	i.v.	ラット (Lewis)	GA	4.2.3.1-3 (GLP 非適用：参考)
	単回投与	i.v.	ラット (SD)	GA	4.2.3.1-6 (GLP 適用：参考)
	単回投与	i.m.、 s.c.	イヌ (ビーグル)	GA	4.2.3.1-7 (GLP 非適用：参考)
反復投与毒性	13 週間反復投与	s.c.	マウス (ICR)	GA	4.2.3.2-1 (GLP 適用：評価)
	4 週間反復投与	s.c.	ラット (SD)	GA	4.2.3.2-2 (GLP 適用：参考)
	26 週間反復投与（重要な試験）	s.c.	ラット (SD)	GA	4.2.3.2-3 (GLP 適用：評価)
	6 ヵ月反復投与	i.m.、 s.c.	ラット (SD)	GA	4.2.3.2-4 (GLP 非適用：参考)
	6 ヵ月反復投与	i.m.	ウサギ (系統の報告なし)	GA	4.2.3.2-5 (GLP 非適用：参考)
	4 週間反復投与	s.c.	イヌ (ビーグル)	GA	4.2.1.3-1 (GLP 適用：参考)
	36 日間反復投与	s.c.	イヌ (ビーグル)	GA	4.2.3.2-6 (GLP 非適用：参考)
	90 日間反復投与	s.c.	イヌ (ビーグル)	GA	4.2.3.2-7 (GLP 非適用：参考)
	28 日間反復投与	s.c.	サル (カニクイ)	GA	4.2.3.2-8 (GLP 適用：評価)
	52 週間反復投与（重要な試験）	s.c.	サル (カニクイ)	GA	4.2.3.2-9 (GLP 適用：評価)
遺伝毒性	細菌を用いる復帰突然変異試験	NA	ネズミチフス菌及び大腸菌株	GA	4.2.3.3.1-1 (GLP 適用：評価)
	哺乳類細胞を用いる遺伝子突然変異試験	NA	マウスリンフォーマ L5178Y/TK$^{+/-}$細胞	GA	4.2.3.3.1-2 (GLP 適用：評価)
	哺乳類細胞を用いる染色体異常試験	NA	ヒト末梢血リンパ球 (男性供血者)	GA	4.2.3.3.1-3 (GLP 適用：評価)

表 2.4-2　GA の毒性試験の概要（Continued）

試験の種類	試験期間又は区分	投与経路	動物種 (系統)	被験化合物	試験番号（GLP 準拠の有無）
	哺乳類細胞を用いる染色体異常試験	NA	ヒト末梢血リンパ球 (女性供血者)	GA	4.2.3.3.1-4 (GLP 適用：評価)
	小核試験	i.p.	マウス (ICR)	GA	4.2.3.3.2-1 (GLP 適用：評価)
がん原性	マウスの 100 週間投与試験	s.c.	マウス (ICR)	GA	4.2.3.4.1-1 (GLP 適用：評価)
	ラットの 104 週間投与試験	s.c.	ラット (SD)	GA	4.2.3.4.1-2 (GLP 適用：評価)
生殖発生毒性	受胎能及び一般生殖能試験	s.c.	ラット (SD)	GA	4.2.3.5.1-1 (GLP 適用：参考)
	胚･胎児発生に関する試験	s.c.	ラット (SD)	GA	4.2.3.5.2-1 (GLP 適用：参考)
	胚･胎児発生に関する試験	s.c.	ウサギ (NZW)	GA	4.2.3.5.2-2 (GLP 適用：参考)
	周産期及び授乳期投与試験	s.c.	ラット (SD)	GA	4.2.3.5.3-1 (GLP 適用：参考)
その他の試験	抗原性試験	s.c.	モルモット (Hartley)	GA	4.2.3.7.1-1 (GLP 適用：参考)
	抗原性試験	s.c.	マウス (BALB/c 及び C3H/He)	GA	4.2.3.7.1-1 (GLP 適用：参考)

GA = グラチラマー酢酸塩；GLP = 医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準；i.m. = 筋肉内；i.p. = 腹腔内；i.v. = 静脈内；NA = 該当せず；NZW = New Zealand White；s.c. = 皮下；SD = Sprague-Dawley

2.4.4.1 単回投与毒性試験

マウス、ラット及びイヌを用いて実施した GA の単回投与毒性試験において、これらの動物種での GA の忍容性は良好であることが示された（2.6.6.2 参照）。

ラットを用いた静脈内投与による単回投与毒性試験（4.2.3.1-6）において、40 mg/kg では異常が見られなかった一方、200 mg/kg では数例で一般状態が急激に悪化し死亡した。

ラットへの単回皮下投与後、GA は良好な忍容性を示し（4.2.3.1-2）、400 mg/kg 皮下投与の 14 日後まで毒性作用は見られなかった。

2.4.4.2 反復投与毒性試験

2.4.4.2.1 3 ヵ月以下の試験

ラット（4.2.3.2-2；2.6.6.3.2 参照）及びビーグル犬（4.2.1.3-2；2.6.6.3.6 参照）を用いて、4 週間の皮下投与毒性試験を実施した。用量は、ラットでは 0、2、10、20 及び 40 mg/kg／日、イヌでは 0、2、10 及び 20 mg/kg／日に設定した。

ラットの試験では、投与第 11～20 日に、皮膚及び耳の発赤、並びに顔面及び鼻の腫脹が散発的に見られた。用量依存性がなかったこと、また、その他の試験で同様の徴候が見られなかったことから、これらは投与に関連する変化ではないことが示唆された。イヌでは、投与第 3 週以降に投与部位の掻破傷が認められた。本所見は GA 投与群の全例及び対照群の雌 1 例で認められ、その発生率には用量相関が見られた。試験終了前の検査時に、投与部位の腫脹が 20 mg/kg／日群の雌雄各 3 例中各 1 例、10 mg/kg／日群の雌 3 例中 2 例及び雄 3 例中 1 例で認められた。掻破傷の二次的影響と考えられる局所の脱毛も、20 mg/kg／日群の雌雄各 1 例で認められた。4 週間投与後に実施した眼科学的検査では、タペタムと非タペタムの境界における反射亢進が、20 mg/kg／日群の雌雄各 1 例、10 mg/kg／日群の雄 2 例で認められた。これに関連する組織学的変化が見られなかったこと、また、タペタムの反射亢進は無処置イヌでも高頻度に認められることから、毒性学的意義はないと考えられた。ラットでは、赤血球数、アルカリフォスファターゼ（ALP）、アラニンアミノトランスフェラーゼ（ALT）、アルブミン及び α_2-グロブリンに、イヌでは、α_1-グロブリン及び γ-グロブリンに極軽微だが統計学的に有意な変化が見られたが、これらはいずれも毒性学的意義があるとは判断されなかった。投与部位における局所反応の組織学的変化が両動物種の全投与群で認められた。

結論として、ラット及びイヌでの 4 週間の GA の皮下投与の忍容性は良好であり、唯一両動物種において見られた主要な病理組織学的所見は、投与部位の局所炎症性変化の悪化であった。ラットを用いた 4 週試験では、NOAEL は雌雄ともに 40 mg/kg／日（240 mg/m^2／日）と判断した。イヌを用いた 4 週の試験では、NOAEL は雌雄ともに 20 mg/kg／日（400 mg/m^2／日）と結論した。

2.4.4.2.2 3 ヵ月を超える試験

GA 皮下投与による慢性毒性は、ラットの 6 ヵ月間連日投与（4.2.3.2-3；2.6.6.3.3 参照）及びカニクイザルの 1 年間連日投与（4.2.3.2-9；2.6.6.3.10 参照）により評価した。GA はアカゲザルやヒヒを含むヒト以外の霊長類における EAE モデルで生存率を高め、臨床症状及び組織学的変化の改善に有効であることが確認されていることから、GA の評価に適した非げっ歯類としてカニクイザルを選択した。

ラットでは 6 ヵ月間、サルでは 1 年間にわたり、30 mg/kg／日までの連日皮下投与で検討した。ラットにおける全身性の毒性に関する NOAEL は雌雄ともに 30 mg/kg／日（180 mg/m^2／日）であると判断した。サルでの投与量は、28 日間の用量設定試験（4.2.3.2-8）で、60 mg/kg／日ではより長期にわたる投与により投与部位に許容できない刺激及び炎症が生じることが示唆されたことから、30 mg/kg／日に設定した。これらの試験では、毒性学的意義が極めて低い所見（体重

増加のわずかな減少、臨床検査項目での偶発的で軽微な変化など）が散見されたが、これらの所見には試験間で一貫性がなく、臨床的又は病理学的検査で関連する変化がなかった。したがって、全投与群での投与部位反応を除き、ラットの 30 mg/kg／日以下及びサルの 10 mg/kg／日以下の用量では全身性の毒性所見は見られなかった。30 mg/kg／日を 1 年間投与したサル 2 例で、骨髄の活動性濾胞形成、軽微で限局性の類線維素性動脈病変が認められた。したがって、サル 1 年間投与試験における全身性の毒性に関する NOAEL は、10 mg/kg／日（120 mg/m^2／日）と判断された。

サル 10 mg/kg／日群の雌 1 例は、重度の食欲不振及び急激な状態悪化のため、第 14 週に殺処分された。詳細な剖検及び組織の組織学的検査を実施したが、瀕死となった原因の説明となるような病理学的変化は確認されなかった。したがって、この動物の重度の衰弱は、炎症病変の併発と急性ストレスが重なったことによる状態悪化の結果であると結論づけられた。

ラットの慢性毒性試験において、全投与群で投与部位の障害の重症度が用量依存的に増したが、低用量では良好な忍容性を示し、投与部位障害の発生率は極めて低く、重篤な障害の発生率も低かった。サルにおいては、10 mg/kg／日を超える用量群では、過剰な免疫刺激の徴候がいくつか認められた。低用量（3 mg/kg）群は極めて良好な忍容性を示し、投与部位の障害の頻度及び重症度は極めて低かったものの、対照群と比較するとわずかに高かった。したがって、いわゆる「無作用」量は確認できなかった。投与部位障害は投与患者でも認められるが、概ね忍容性は良好である。臨床上の忍容性を勘案すると、動物への長期投与後の投与部位変化に関して「無作用」量を判定する必要はないと判断した。

2.4.4.3 遺伝毒性試験

GA の遺伝毒性は、細菌を用いる復帰突然変異試験（4.2.3.3.1-1；2.6.6.4.1.1 参照）、哺乳類細胞を用いる遺伝子突然変異試験（4.2.3.3.1-2；2.6.6.4.2.1 参照）、2 回の *in vitro* 染色体異常試験（4.2.3.3.1-3 及び 4.2.3.3.1-4；2.6.6.4.2.2 及び 2.6.6.4.2.3 参照）及びマウス小核試験（4.2.3.3.2-1；2.6.6.4.3.1 参照）で評価した。復帰突然変異試験及び哺乳類細胞を用いる遺伝子突然変異試験は陰性であった一方、第 1 回の染色体異常試験では、1 濃度ポイントで異常頻度のわずかな上昇が認められた。第 2 回の染色体異常試験は確認試験であり、第 1 回試験の擬陽性の結果が誤りであることが証明された。LD_{50} の約 60%に相当する 140 mg/kg を腹腔内投与したマウスの骨髄細胞において、染色体異常もその他の異常も発生しなかった。遺伝毒性試験の標準的組み合わせから得られた成績を総合的に評価すると、GA は遺伝毒性を有さないと判断される。

2.4.4.4 がん原性試験

GA が変異原性を示さなかったこと、また、GA の薬理学的プロファイルから、慢性的な細胞傷害又は細胞増殖の誘発性、若しくは刺激ホルモンの分泌促進作用はないと考えられることを勘案しても、GA のような薬剤（ポリペプチド混合物）についてはがん原性試験は特に要求されない。さらに、GA 又はその分解生成物（ペプチド又はアミノ酸）と、発がん性が既知又は疑われる物質との間の構造的類似性を示唆する知見はない。慢性毒性試験中に検査したいずれの組織においても、投与に関連する前癌病変は観察されていない。しかし、FDA からの実施要請に応じて、また米国におけるフェーズ 4 コミットメントの一環としてげっ歯類を用いて 2 つのがん原性試験を実施した。

ラット及びマウスを用いて、連日皮下投与によるがん原性試験を実施した。用量は、0、3、15、30 及び 60 mg/kg／日（マウス；4.2.3.4.1-1）及び 0、3、7.5、15 及び 30 mg/kg／日（ラット；4.2.3.4.1-2）に設定した。これらの試験の最大用量は、先行する毒性試験で主に投与部位障害の重症度に基づき判定した最大耐量（MTD）とした。これらの MTD は、体重換算での比較で臨床用量の 100 倍（ラット）及び 200 倍（マウス）であり、体表面積換算での比較で両動物種とも臨床用量の約 15 倍であった。

2.4.4.4.1 マウスのがん原性試験

マウスのがん原性試験開始に先立ち、同系統のマウスに 0、20、40 及び 60 mg/kg を連日皮下投与する 13 週間の用量設定試験（4.2.3.2-1 ; 2.6.6.3.1 参照）を実施した。試験終了前に 5 例が死亡した（対照群の雄 1 例、40 mg/kg／日群の雄 1 例及び 60 mg/kg／日群の雌 3 例）。詳細な剖検及び組織学的検査では、これらのマウスの死因又は死亡に関与した可能性がある要因は特定できなかった。全身毒性の証拠は認められなかったが、対照群及び GA 投与群で投与部位に重篤度が低い炎症性及び線維性変化が見られた。投与部位の変化（特に皮筋の進行性ミオパチー）から、60 mg/kg／日を超える用量では、がん原性試験の期間中に許容できない重篤な変化を引き起こすと予想された。したがって、マウスのがん原性試験では、60 mg/kg／日を最高用量に設定した。

その後、60 mg/kg／日を最高用量をとして、マウスの 80 週間（当初予定）がん原性試験（4.2.3.4.1-1 ; 2.6.6.5.1.1 参照）を開始した。投与開始後 8 週間に高い死亡率が認められた。投与第 2～8 週に、計 56 例（対照群の雌雄各 1 例を含む）が死亡した。死亡例の大多数は GA 投与群であったが、明らかな用量依存性は見られなかった。

第 4 週までに死亡した 40 例は、同じ動物ロット由来の予備マウスで置き換えた。そのため、本試験に割り付けたマウスの一部は、試験開始 2～4 週間後に投与を開始した。投与に関連する死亡率がこのように異常に高かった原因は特定できなかった。しかし、組織学的に免疫系の刺激を示す所見が認められたことから、ある種の過敏反応が関与した可能性が示唆された。

同一ロットの GA を用いて同時に実施したラットのがん原性試験、並びに先に実施したイヌ及びサルの反復投与毒性試験では、死亡は発生しなかった。したがって、投与開始初期の多数の死亡は、マウスにおける特異的な何らかの過敏反応の結果であると推察される。

投与期間初期に原因不明の死亡が見られたものの、第 8 週以降の死亡率は明らかに低下した。本試験は当初計画した 80 週間を超えて継続し、投与開始 100 週間後に終了した。対照群を含む全群で、投与部位の変化として筋膜炎／線維化、皮筋のミオパチー及び肥大を主な特徴とした局所刺激に起因する病理組織学的所見が認められた。特に GA 投与群の雄では、投与部位の変化の発生率及び重症度は明らかに用量依存的に上昇した。

60 mg/kg／日群の雄では、第 80 週以降、投与部位の皮膚における皮下肉腫の発生率は統計学的に有意に上昇した。しかし、長期間の連日皮下投与により、高い局所濃度の化学物質により誘発される細胞傷害性損傷への代償性反応として過形成が生じ、その結果皮膚の肉腫の発生率が上昇することはげっ歯類では一般的な現象である[7]。投与との関連が疑われるその他の種類の腫瘍は見られなかった。

2.4.4.4.2 ラットのがん原性試験

ラットのがん原性試験（4.2.3.4.1-2 ; 2.6.6.5.1.2 参照）における最高用量（30 mg/kg／日）は、過去のラットへの長期皮下投与後に認められた投与部位反応を考慮し設定した。雌動物への投与は、生存率の基準を満たすため、97 週間で終了した。Sprague-Dawley 系の雌は乳がんを発症しやすいため、この系統の雌のがん原性試験が早期終了されることはよく知られている[8,9]。いずれの用量群においても、十分な例数の雌が第 97 週まで投与されたため、第 97 週に雌の試験を終了したことにより、本試験は無効とならなかった。雄動物への投与は 104 週間継続した。最高用量（30 mg/kg／日）群の雄における死亡率は、対照群の雄と比較して高かった。このような影響が明らかになったのは第 92 週以降であり、最高用量群の雄における死亡率は 68%であったのに対し、対照群の雄では 48%であった。このような死亡率上昇は、最高用量群で慢性進行性腎症の発生率及び重症度が上昇したことに関連する可能性が高いと考えられる。

15 及び 30 mg/kg／日群の雄では、慢性進行性腎症（研究施設で飼育されるラットで加齢に伴って一般に見られる病変）の重症度に明らかな悪化が認められたため、全身性の毒性に関する NOAEL は 7.5 mg/kg／日（45 mg/m^2／日）と判定された。GA 投与群の雄で慢性進行性腎症の悪化が見られたのは、GA の分解ペプチドによる腎臓の過負荷に要因があると考えられる。雄

ラットの腎臓は、このような過負荷に対する感受性が特に高いことが知られている[10]。免疫複合体の沈着に基づく慢性進行性腎症である可能性は、免疫組織化学的分析及び電子顕微鏡検査によって否定された。

投与部位の組織学的変化として、最長 104 週間の連日皮下投与による外傷に起因する線維化及び炎症が、対照群を含む全群で認められた。しかし、GA 投与群では、重症度及び発生率の明らかな増悪化が見られ、いわゆる「無作用」量は確認できなかった。最高用量群の雄では、副腎の良性褐色細胞腫の発生率に統計学的に有意な増加（$p<0.046$）が見られた。しかし、その発生率は、試験実施施設における無処置の正常雄ラットの背景データ範囲内であった。この系統の雄では、このような腫瘍性変化の自然発生率が高いことが報告されている[11]。ラットへの GA 投与は、腫瘍の発生率、種類及び分布に影響を及ぼさなかった。

マウス及びラットの試験の結果、GA はがん原性を有さないと判断された。さらに、現行の規格に適合するロットの被験物質を使用した場合、不純物／分解生成物、及び本剤調製時に使用された微量の化学物質は、いずれもがん原性を示さないことが示された。

2.4.4.5 生殖発生毒性試験

生殖発生毒性試験としては、ラットを用いた受胎能及び一般生殖能試験（4.2.3.5.1-1；2.6.6.6.1.1 参照）、胚・胎児発生に関する試験（4.2.3.5.2-1；2.6.6.6.2.1 参照）、並びに周産期及び授乳期投与試験（4.2.3.5.3-1；2.6.6.6.3.1 参照）のほか、ウサギを用いた胚・胎児発生に関する試験（4.2.3.5.2-2；2.6.6.6.2.2 参照）を実施した。

ラットの受胎能及び一般生殖能試験の結果では、受胎能及び初期胚発生に及ぼす影響に加えて、雌 F0 動物に交配前 2 週から妊娠期間及び授乳期を通して離乳後の剖検時まで投薬し、F1 出生児を生殖能の評価のために交配して F2 出生児の離乳までの発育を観察し、F1 出生児の生殖機能への影響も評価した。いずれの用量においても雌雄親動物及び F1 動物の生殖機能への影響はみられず、雌雄親動物に対する生殖機能以外への影響に関する GA の NOAEL は、6 mg/kg／日（36 mg/m^2／日）と判定された。本試験では、雌雄ラットで検討した生殖パラメータに関する無作用量（NOEL）は、36 mg/kg／日（216 mg/m^2／日）であると判定された。

胚・胎児発生に関する試験は、ラット及びウサギを用いて実施した。妊娠 6～15 日（ラット）又は妊娠 6～19 日（ウサギ）の母動物に GA を皮下投与した結果、いずれの動物種においても、37.5 mg/kg／日（それぞれ 225 及び 450 mg/m^2／日に相当）までの用量で催奇形性及び胎児毒性の所見は認められなかった。

周産期及び授乳期投与試験では、妊娠 15 日から分娩後 21 日までの妊娠期及び授乳期のラットに対し、36 mg/kg／日を最高用量として GA を皮下投与したところ、母動物は投与に起因する毒性の徴候及び一般状態を示さなかった。同腹児数、出生前及び出生後生存率、並びに性比は投与による影響を受けなかったが、GA 投与群の母動物からの出生児は、体重増加量が対照群と比較して軽度だが有意な低値を示した。出生児行動検査では、出生児の行動に対する GA の影響は認められなかった。母動物及び出生児の剖検所見では、投与に起因する肉眼的変化は見られなかった。

以上のように、生殖発生毒性試験では交尾行動に対する影響は認められず、胎児死亡、胎児の異常及び出生後の障害を引き起こすと考えられる影響も見られなかった。

2.4.4.6 局所刺激性試験

本剤を用いた局所刺激性試験は、それ自体を目的とした試験としては実施されていない。しかし、注目すべき所見としては、サルを用いた 52 週間毒性試験（4.2.3.2-9；2.6.6.3.10 参照）の期間中、30 mg/kg／日群で重度の局所反応が認められたため投与部位を変更したところ、感作性を示唆する徴候は見られなかったことが挙げられる。

ラットを用いた 26 週間反復投与毒性試験（4.2.3.2-3；2.6.6.3.3 参照）では、全投与群で投与部位の障害が認められ、重症度が用量依存的に増した。同様に、サルを用いた 52 週間反復投与毒

性試験では投与部位で慢性線維性炎症の重症度が増したため、病理組織学的な判定基準ではいわゆる「無作用」量を確認できなかった。慢性毒性の評価で設定した最低用量（3 mg/kg／日）は、予定臨床用量の 10 倍に相当し、臨床的に良好な忍容性を示しているだけでなく、認められた組織学的変化も軽微であった。臨床上の忍容性を考慮すると、動物への長期皮下投与後の投与部位の変化に関して「無作用」量を求める必要はないと判断される。

2.4.4.7　抗原性試験

GA は、ヒトを含むすべての試験動物種で抗原性を示した。GA の抗原性は、ペプチド性であることに起因すると考えられ、反復投与毒性試験の期間中に抗 GA 抗体の産生が見られた。

ラットを用いた 26 週間皮下投与毒性試験（4.2.3.2-3；2.6.6.3.3 参照）の期間中、投与開始 1、3 及び 6 ヵ月後に血漿を採取し、抗 GA 抗体の有無を RIA 法により分析した。全般的にみて、抗 GA 抗体価は投与開始 1～3 ヵ月後にピークとなり、6 ヵ月後には低下を示した。サルでは、52 週間の皮下投与毒性試験（4.2.3.2-9；2.6.6.3.10 参照）の期間中、第 4、13、26、39 及び 52 週に抗 GA 抗体価を測定した。GA 投与群の全例で抗 GA 抗体の産生反応が認められ、ほとんどの場合、第 13 週における反応が最大であった。抗体価と GA 投与量の間に相関は見られなかった。第 13 週と第 52 週の抗 GA 抗体価を比較したところ、反応の強さ及び持続性ともに著しい個体差が認められた。数例では、抗体価が持続的に高値を示した。抗 GA 抗体の産生は GA を投与された患者の多くでも認められたがいずれも中和活性は認められず、抗 GA 抗体の産生に伴う治療効果の消失又は有害作用は認められなかった。アナフィラキシー様反応が報告されることはまれであり、臨床的に重大な続発症は認められていない。

モルモット及びマウスを用いた能動全身アナフィラキシー及び受動皮膚アナフィラキシー試験（4.2.3.7.1-1；2.6.6.8.1 参照）においても、GA の抗原性が確認された。同試験では、GA 投与動物の血清をレシピエント動物に皮内投与すると皮膚アナフィラキシー反応が誘発されたが、IgE 関与でなく IgG 関与の反応であることが示唆された。モルモット及びマウスは IgE やある種の IgG のいずれに対しても感受性を示すのに対し、ヒトでは IgE がアナフィラキシー誘発抗体としての役割を果たすことから、ヒトでのリスク評価における上記結果の毒性学的意義は乏しいと考えられる。

マウスのがん原性試験では、GA の反復投与により I 型アレルギーに関連すると考えられる死亡率上昇が見られた。このような死亡率上昇は投与初期のみに見られ、8 週以降は死亡率が低下した。ラット、イヌ及びサルでは、同様の反応は見られなかった。マウスとヒトの免疫系には本質的な差異が存在するため、マウスの結果をヒトに外挿することは適当ではないと考えられる。

免疫複合体が形成される可能性も評価するため、慢性毒性試験及びがん原性試験において腎臓における免疫複合体の沈着について検査した。

慢性毒性試験では擬陽性結果が得られた。ラットの慢性毒性試験では、GA の最高用量（30 mg/kg／日）群の 40 例（雌雄各 20 例）中雄 3 例で、腎糸球体が GA の免疫組織染色陽性を伴う軽度の C3 染色陽性を示したが、IgG 染色は陰性であった。サルを用いた反復投与毒性試験では、最高用量（30 mg/kg／日）群の 8 例中 2 例で、GA 沈着を示唆する軽微な免疫組織化学的反応性が認められ、1 例では C3 に対する反応性も見られたが、IgG との共局在は見られなかった。

しかし、ラットを用いた 2 年間のがん原性試験では、いずれの動物でも腎糸球体に GA、IgG 又は C3 沈着の徴候は見られなかった。また超薄切片を作製し電子顕微鏡で観察したが、免疫複合体の沈着の徴候も見られなかった。

以上のデータから、抗 GA 抗体の産生は免疫複合体の沈着を伴わないことが示され、また、ラット慢性毒性試験での擬陽性結果は、より長期のがん原性試験で再現されなかったことより、その毒性学的意義は乏しいと考えられる。

2.4.4.8 免疫毒性試験

GA は免疫調節作用を有するペプチドであるため、慢性毒性試験において免疫系に対する毒性の有無を確認するためのパラメータを追加した。これらの検討から、臨床用量では GA が免疫毒性作用を示す可能性は極めて低いという主張を裏付ける明らかな結果が得られたので、以下に要約する。

ラット及びサルを用いた慢性毒性試験において、30 mg/kg／日までの用量では免疫抑制作用が認められないことが確認された。同様に、GA は抗原性を有することが判明しているにもかかわらず、慢性毒性試験の期間中に急性又は遅延型過敏反応の発現は見られなかった。

GA は、自己免疫疾患が重要な役割を果たすと考えられている患者への投与が予定されている。また、GA は免疫調節作用を示すことから、GA 投与により自己免疫が新たに誘導又は増強される可能性の有無を確認する必要がある。投与量 0、3、10 及び 30 mg/kg／日で実施したラットを用いた 26 週間毒性試験では、GA 投与群で抗核抗体、抗二本鎖 DNA 抗体及び抗ヒストン抗体の増加は見られなかった。同じ用量域で実施したサルを用いた 52 週間試験では、抗一本鎖 DNA 抗体及び抗二本鎖 DNA 抗体、並びに抗ヒストン抗体の軽度の増加が見られたが、抗核抗体の増加は見られなかった。これらの反応は低く、かつ一貫性を示さず、また GA 投与群のサルで自己免疫疾患を示唆する明らかな臨床的又は病理学的所見は見られなかった。

これまでに得られているデータ及び治療目的で使用されているその他のペプチド性化合物の臨床経験に基づき、推奨される投与条件下で GA を投与される患者で免疫毒性が生じる可能性は極めて低いと判断した。

安全性薬理試験、反復投与毒性試験、生殖発生毒性試験、遺伝毒性試験及びがん原性試験から得られた GA の非臨床データを総合すると、RRMS 患者で既に確認されている GA の臨床安全性プロファイルの範囲を超えてヒトで危惧すべき副作用を誘発する可能性は低いと判断した。

2.4.5 総括及び結論

GA は、世界 50 ヵ国以上で RRMS 患者の治療薬として市販されている製剤 Copaxone®の有効成分である。近年では、MS を示唆する初回臨床発作が発症した患者にも適応が拡大された。GA の薬理学的、毒性学的及び臨床特性は、開発段階で実施された一連の試験及び海外の多くの国々での市販後経験により詳細に検討され、裏付けられている。

2.4.5.1 有効性及び作用機序の評価

GA は、脳炎誘発性抗原の投与に対応した投与スケジュールに依存して、様々な動物種に誘導した EAE（ヒト MS の実験動物モデル）に対して予防、阻害又は抑制効果を示すことが確認された。加えて、科学文献として過去数年間に発表された多くの研究において、GA の免疫調節作用が、慢性炎症疾患及び神経変性疾患の様々な動物モデルで抗炎症作用のみならず、神経保護作用をもたらすことが明らかにされている（2.6.2.2.3 参照）。

ヒトにおける GA の作用機序は完全には明らかになっていない（2.6.2.2.3 参照）。前臨床及び臨床薬理試験での成績を総合すると、GA の作用機序（抗炎症、髄鞘再生及び神経保護［軸索消失の予防］）は、MS の発症に関与する主な病理学的機序に対応している[2]。

GA の薬理作用は他の多くの皮下投与薬剤とは異なっている。GA は皮下投与後、より低分子量のペプチド及び遊離アミノ酸へと局所で分解されるため、GA 又はその代謝物の血清中濃度は低く、検出が難しい。しかし、GA が抗炎症作用を示すために、GA 又はその代謝物が体循環中に存在する必要はない。マウスの試験において、GA 及び血清ではなく、GA 特異的 T 細胞を移入することにより、GA の免疫調節作用を、移入されたマウスで再現できることが示された[12]。

動物及び健康被験者で実施した PK 試験での ELISA 及び HPLC 法を用いて得られた結果は、患者に臨床用量の GA を皮下投与したとき、その大部分が局所（皮下組織内）で加水分解されるという仮説を裏付けている。しかし、投与して短時間後（1 時間以内）においては、ELISA 法で GA 反応性抗体により認識される比較的大きい GA 断片が、体循環中で検出される場合がある。

投与された GA の一部（未変化体又は部分的な加水分解物）はリンパ循環に入り、さらに所属リンパ節に到達、又は体循環に入ると推定される。GA の 20 mg を連日皮下投与すると、GA 反応性抗体の産生が誘導され、約 3 ヵ月後にピークに達した後、徐々に減少・安定化する。GA 反応性抗体は IgG 型であり（IgG_1 抗体が IgG_2 抗体より多かった）、IgE 型の抗体は検出されなかった。

GA の臨床効果は主として、GA 反応性 T リンパ球の 1 型ヘルパーT（Th1）細胞から 2 型ヘルパーT（Th2）細胞へのシフトを介すると考えられる。活性化された GA 反応性 Th2 細胞は CNS に移行し、抗炎症性サイトカインを放出することにより、「バイスタンダー抑制」と呼ばれる機序によって近傍の炎症性細胞の機能を抑制する。また、これらの細胞は、脳由来神経栄養因子（BDNF）などの神経栄養物質を分泌し、これらの物質が CNS 内で神経保護作用をもたらすと考えられる。

以上、一連の非臨床薬理試験で確認された GA の薬効プロファイルは、RRMS 治療薬としての GA の有効性を支持するものと考える。

2.4.5.2 安全性の評価

2.4.5.2.1 安全性薬理試験

ラット、ウサギ、ネコ及びイヌを用いた心血管系に対する GA の影響を検討する試験を、静脈内投与及び皮下投与により実施した。高用量 GA の静脈内投与により、ラット（10～20 mg/kg）、ネコ（1～10 mg/kg）及びイヌ（10～20 mg/kg）で用量依存的な降圧作用が引き起こされた。この降圧作用は、ヒスタミン受容体拮抗薬の前投与により減弱したことから、ヒスタミン遊離を介すると考えられた。

その他 GA の一連の安全性薬理試験を実施した結果、患者の CNS、心血管系及び呼吸器系に対するリスクは軽微であることが示されたが、血管内に大量に誤投与された場合には血圧及び心拍数への影響が発現する可能性があることに留意すべきである。

2.4.5.2.2 毒性試験

単回投与では、ラットへの 400 mg/kg 皮下投与で GA は良好な忍容性を示し、毒性は見られなかった。ラットへの 200 mg/kg 静脈内投与直後には、一般状態への影響や死亡例が見られたが、40 mg/kg では死亡例はなく、一過性の振戦が 1 例で見られたのみであった。

GA の連日皮下投与による慢性及び亜慢性毒性試験では、ラットは最長 6 ヵ月間、サルは最長 1 年間にわたり、30 mg/kg／日までの用量で良好な全身忍容性を示した。一貫して認められた所見は投与部位の炎症反応のみであり、ほとんどの試験において用量制限毒性であったため、ラット、サル両動物種における MTD は、投与部位の炎症反応に基づき 30 mg/kg／日と判定された。慢性毒性試験の終了時に、高用量（10 及び 30 mg/kg／日）を長期投与したラット及びサルの一部で腎糸球体への免疫複合体の沈着を疑わせる擬陽性の免疫組織染色所見が見られた。しかし、より長期のラット 2 年間がん原性試験で腎臓の電子顕微鏡的検査及び免疫染色を実施したが、糸球体への免疫複合体の沈着は認められず、上記擬陽性結果は再現されなかった。この結果及び一連の反復投与毒性試験での結果から、患者への GA 投与により免疫複合体が関与する腎障害の危険性が高まることはないと考えられる。

ラット（最長 104 週間）及びサル（最長 52 週間）では、反復皮下投与後の全身毒性に関する NOAEL は、それぞれ 7.5 及び 10 mg/kg／日（それぞれ 45 及び 120 mg/m^2／日に相当）と判定された。ラットでは、これより高用量を 104 週間投与した雄で、糸球体腎炎の発生率が上昇した。10 mg/kg／日より高用量を投与したサルでは、過剰な免疫刺激の徴候がいくつか認められた。

GA は、細菌を用いる復帰突然変異試験（Ames 試験）、L5178Y 細胞を用いる *in vitro* マウスリンフォーマ試験、及び培養ヒトリンパ球を用いる 2 回の *in vitro* 染色体異常試験において、遺伝子突然変異を誘発しなかった。また、マウスを用いる *in vivo* 小核試験において、骨髄細胞において染色体異常誘発性を示さなかった。

腫瘍発生率に対する GA 皮下投与の影響は、マウス及びラットを用いた 2 つの生涯投与試験で評価した。マウスを用いた 100 週間がん原性試験では、60 mg/kg／日（mg/m^{2}換算で臨床用量の 15 倍に相当）を最高用量として GA を皮下投与した。高用量（60 mg/kg／日）群の雄で、投与部位における線維肉腫の発生率が上昇したが、このような発生率上昇は、雌及びこれより低用量群（30 mg/kg／日以下）の雄では認められなかった。これらの肉腫は、皮膚の一部に刺激物質を反復投与することにより誘発される皮膚損傷に関連するものであった。その他の腫瘍の発生率上昇は見られなかった。ラットの 2 年間がん原性試験では、GA の 30 mg/kg／日（mg/m^{2}換算で臨床用量の約 15 倍）までの皮下投与で腫瘍の発生率上昇は見られなかった。

生殖発生毒性試験において、親動物に毒性をもたらす用量を最高用量に設定したところ、GA はラット及びウサギで胚及び胎児毒性を示さず、ラットで受胎能及び生殖能に影響せず、ラットで出生前及び出生後の発生に影響を及ぼさなかった。患者では、妊娠期及び授乳期における GA の安全性は確認されていないが、動物試験ではいかなる毒性も見られなかった。

推定される GA の作用機序は、生体の免疫系を介するものであるため、一般に受け入れられ、なおかつ妥当性が確認されている一連の免疫毒性評価を、ラット及びサル皮下投与毒性試験に組み込み、体液性及び細胞性免疫毒性を検討した。

ラットを用いた 26 週間試験及びサルを用いた 52 週間試験の投与期間中に、GA 反復皮下投与後の GA 反応性抗体の産生を RIA 法で検討した。GA 投与群の大半の動物で IgE ではなく IgG 型の抗体産生が見られ、抗体価はおよそ 3 ヵ月後にピークとなった後、6 ヵ月後には低下した。いずれの動物種においても、抗体価と GA 投与量の間に相関は見られず、反応の強さ及び持続性ともに著しい個体差が認められた。

ラット及びサルを用いた慢性毒性試験では、最高 30 mg/kg／日までの用量において、リンパ球サブセット、免疫グロブリンの組成、並びに胸腺、脾臓及びリンパ節の組織像に異常は見られなかった。また、GA の抗原性が判明しているにもかかわらず、急性及び遅延型過敏反応の発現は見られなかった。モルモットを用いた能動全身アナフィラキシー及び同種受動皮膚アナフィラキシー試験、並びにマウスを用いた異種受動皮膚アナフィラキシー試験は陽性であったが、これらは IgE 関与でなく IgG 関与の反応であることが示唆された。モルモット及びマウスは IgE やある種の IgG のいずれに対しても感受性を示すのに対し、ヒトでは IgE がアナフィラキシー誘発抗体としての役割を果たすことから、ヒトでのリスク評価における上記結果の毒性学的意義は乏しいと考えられる。

マウスを用いたがん原性試験では、GA の反復投与により I 型アレルギーに関連すると考えられる死亡率上昇が認められた。しかし、本剤の投与に関して集積した年間 100 万人[13]を超えるヒトでの安全性データによると、アナフィラキシー様反応が報告されることは極めてまれであり、臨床的に重大な続発症も認められていない。

以上、一連の非臨床安全性試験で確認された GA の安全性プロファイルは、RRMS 治療薬としての GA の臨床使用を支持するものと考える。

2.4.6 参考文献

1. Dhib-Jalbut S. Glatiramer acetate (Copaxone) therapy for multiple sclerosis. Pharmacol Ther. 2003 May; 98(2):245-55.

2. Carter NJ, Keating GM. Glatiramer acetate: a review of its use in relapsing-remitting multiple sclerosis and in delaying the onset of clinically definite multiple sclerosis. Drugs. 2010 Aug 20; 40(12):1545-77.

3. Bernard C, Maldel T, Mackay I. Experimental models of human autoimmune disease: overview and prototypes. In Rose NRM, editor. The autoimmune diseases II. San Diego: Academic Press; 1992.

4. Kerlero de Rosbo N, Mendel I, Ben-Nun A. Chronic relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis with a delayed onset and an atypical clinical course, induced in PL/J mice by myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG)-derived peptide: preliminary analysis of MOG T cell epitopes. Eur J Immunol. 1995 Apr; 25(4):985-93.

5. Zamvil SS, Steinman L. The T lymphocyte in experimental allergic encephalomyelitis. Annu Rev Immunol. 1990; 8:579-621.

6. Lalive PH, Neuhaus O, Benkhoucha M, Burger D, Hohlfeld R, Zamvil SS, et al. Glatiramer acetate in the treatment of multiple sclerosis: emerging concepts regarding its mechanism of action. CNS Drugs. 2011 May; 25(5): 401-14.

7. Le Calvez S, Perron-Lepage M-F, Burnett R. Subcutaneous microchip-associated tumours in B6C3F1 mice: A retrospective study to attempt to determine their histogenesis. Exp Toxicol Pathol 2006; 57:255–65.

8. Baldrick P. Carcinogenicity evaluation: comparison of tumor data from dual control groups in the Sprague-Dawley rat. Toxicol Pathol 2005; 33:283–91.

9. McMartin DN, Sahota PS, Gunson DE, et al. Neoplasms and related proliferative lesions in control Sprague-Dawley rats from carcinogenicity studies: historical data and diagnostic considerations. Toxicol Pathol 1992; 20(2):212-25.

10. Hard GC, Johnson KJ, Cohen SM. A comparison of rat chronic progressive nephropathy with human renal disease—implications for human risk assessment. Critical Reviews in Toxicology 2009; 39(4): 332–46.

11. Tannenbaum A, Vesselinovitch SD, Maltoni C, et al. Multipotential carcinogenicity of urethan in the Sprague-Dawley rat. Cancer Res 1962; 22:1362-71.

12. Aharoni R, Teitelbaum D, Sela M, Arnon R. Copolymer 1 induces T cells of the T helper type 2 that crossreact with myelin basic protein and suppress experimental autoimmune encephalomyelitis. Proc Natl Acad Sci USA. 1997 Sep; 94(20):10821-6.

13. Johnson KP. Glatiramer acetate for treatment of relapsing-remitting multiple sclerosis. Expert Rev Neurother. 2012; 12(4):371-84.