目次

2.6.1 緒言 2

2.6.1 緒言

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。GA は、世界 50 ヵ国以上で販売名 Copaxone®として市販されており（2014 年 9 月現在）、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）発作が認められ、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である。

GA は、ヒト MS の実験的動物モデルである実験的自己免疫性脳脊髄炎（EAE）に対し、予防、阻害又は抑制効果を示すことが確認されている。しかし、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。

ヒトでの GA の作用機序は完全には明らかになっていないが、GA は以下の免疫反応を引き起こすことにより免疫調節作用を発揮していると考えられる：**a**）抗原提示細胞（APC）への高親和性結合、**b**）GA 反応性 APC と T 細胞の相互作用、**c**）GA 反応性 T 細胞の誘導、**d**）GA 特異的 T 細胞の損傷部位への遊走、**e**）II 型単球の形成、**f**）樹状細胞の機能の修飾、**g**）B 細胞の機能の修飾、**h**）ナチュラルキラー細胞の機能の修飾、**i**）GA の神経保護作用、**j**）免疫グロブリン反応に対する GA を介する作用。

本剤の申請効能又は効果、用法及び用量は以下のとおりである。

【効能又は効果】

多発性硬化症の再発予防

【用法及び用量】

通常、成人にはグラチラマー酢酸塩として 20mg を 1 日 1 回皮下に投与する。

目次

2.6.2 薬理試験の概要文 5
2.6.2.1 まとめ 5
2.6.2.1.1 グラチラマー酢酸塩の薬力学：多発性硬化症と実験的自己免疫性脳脊髄炎（EAE）モデル 5
2.6.2.1.2 安全性薬理試験 6
2.6.2.2 効力を裏付ける試験 6
2.6.2.2.1 急性型実験的自己免疫性脳脊髄炎に対するグラチラマー酢酸塩の作用 6
2.6.2.2.1.1 マウス 6
2.6.2.2.1.2 ラット 7
2.6.2.2.1.3 モルモット 8
2.6.2.2.1.4 ウサギ 9
2.6.2.2.1.5 ヒト以外の霊長類 10
2.6.2.2.2 慢性再発型実験的自己免疫性脳脊髄炎に対するグラチラマー酢酸塩の作用 12
2.6.2.2.2.1 マウス 12
2.6.2.2.2.2 幼若モルモット 12
2.6.2.2.3 グラチラマー酢酸塩の作用機序 12
2.6.2.2.3.1 抗原提示細胞への高親和性結合 13
2.6.2.2.3.2 APC と T 細胞の相互作用 13
2.6.2.2.3.3 GA 反応性 T 細胞の誘導 13
2.6.2.2.3.4 GA 特異的 T 細胞の損傷部位への遊走 15
2.6.2.2.3.5 II 型単球の形成 15
2.6.2.2.3.6 樹状細胞の機能の修飾 15
2.6.2.2.3.7 B 細胞の機能の修飾 15
2.6.2.2.3.8 NK 細胞の機能の修飾 16
2.6.2.2.3.9 GA による神経保護作用 16
2.6.2.2.3.10 免疫グロブリン反応に対する GA を介する作用 16
2.6.2.3 副次的薬理試験 18
2.6.2.3.1 摘出平滑筋標本 18
2.6.2.4 安全性薬理試験 20
2.6.2.4.1 中枢神経系 20
2.6.2.4.1.1 ラット Irwin 試験 20
2.6.2.4.1.2 その他の試験 20
2.6.2.4.2 心血管系 20

2.6.2.4.2.1 hERG 電流に及ぼす影響 21
2.6.2.4.2.2 ラット 21
2.6.2.4.2.3 ネコ 21
2.6.2.4.2.4 ウサギ 22
2.6.2.4.2.5 イヌ 23
2.6.2.4.2.6 サル 23
2.6.2.4.3 呼吸器系 23
2.6.2.4.3.1 ヒスタミン遊離に関する試験 24
2.6.2.5 薬力学的薬物相互作用試験 24
2.6.2.6 考察及び結論 24
2.6.2.7 図表 25
2.6.2.8 参考文献 25

表

表 2.6.2-1 様々な動物種での GA による EAE 抑制作用 6
表 2.6.2-2 雌性マウスにおける GA の皮下投与による EAE の抑制作用： 投与スケジュールによる影響 7
表 2.6.2-3 ラットにおける GA の皮下投与による EAE の抑制作用： 用量及びスケジュールによる影響 8
表 2.6.2-4 モルモットにおける GA による EAE 抑制作用の特異性 8
表 2.6.2-5 モルモット EAE に対する抑制作用の GA と MBP との比較 9
表 2.6.2-6 GA によるアカゲザル EAE の抑制 10
表 2.6.2-7 GA の 1 ヵ月間投与によるヒヒ EAE の抑制 11
表 2.6.2-8 幼若 Strain 13 モルモットにおける GA による CR-EAE の抑制及び予防 12
表 2.6.2-9 平滑筋に対する GA の影響 18
表 2.6.2-10 GA により誘発されたモルモット回腸の収縮に対する各種薬物の阻害作用 19
表 2.6.2-11 ネコ平均動脈血圧（MAP）に及ぼす GA の影響 22

図

図 2.6.2-1 GA の作用機序 17

略号一覧表

略号	略していない表現又は説明
AGT	Amino acid copolymer lacking lysine residues (alanine, glutamate and tyrosine)〔リシン残基を持たないアミノ酸コポリマー〕
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〕
BE	Basic Encephalitogenic Protein〔脳炎誘発性塩基性蛋白〕
BP	Blood Pressure〔血圧〕
CCR7	Chemokine Receptor Type 7〔CC ケモカイン受容体 7〕
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〕
CR-EAE	Chronic-relapsing EAE〔慢性再発型 EAE〕
CV	Cardiovascular〔心血管系の〕
EAE	Experimental Autoimmune Encephalomyelitis〔実験的自己免疫性脳脊髄炎〕
EC_{50}	Half maximal effective concentration〔50%有効量〕
ECG	Electrocardiogram〔心電図〕
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〕
HR	Heart Rate〔心拍数〕
ICFA	Incomplete Freund's Adjuvant〔フロイント不完全アジュバント〕
LDH	Lactate Dehydrogenase〔乳酸脱水素酵素〕
MAP	Mean Arterial Blood Pressure〔平均動脈血圧〕
MBP	Myelin Basic Protein〔ミエリン塩基性蛋白〕
MHC	Major Histocompatibility Complex〔主要組織適合遺伝子複合体〕
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〕
MSCH	Mouse Spinal Cord Homogenate〔マウス脊髄ホモジネート〕
NDGA	Nordihydroguaiaretic acid〔ノルジヒドログアヤレチン酸〕

略号	略していない表現又は説明
NOEL	No-Observed-Effect-Level〔無作用量〕
NT	Not tested〔検査せず〕
OBAA	3-(4-Octadecyl)-benzoylacrylic acid〔3-(4-オクタデシル)-ベンゾイルアクリル酸〕
PBS	Phosphate Buffered Saline〔リン酸緩衝生理食塩液〕
PD1	Programmed Death Receptor 1〔Programmed Death Receptor 1〕
PLA2	Phospholipase A2〔ホスホリパーゼ A2〕
PLP	Proteolipid Protein〔プロテオリピッド蛋白〕
RRMS	Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis〔再発寛解型多発性硬化症〕
SD	Standard Deviation〔標準偏差〕
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〕
TNBS	Trinitrobenzenesulphonic Acid〔トリニトロベンゼンスルホン酸〕
YFP	Yellow Fluorescent Protein〔黄色蛍光蛋白〕

2.6.2　薬理試験の概要文

2.6.2.1　まとめ

2.6.2.1.1　グラチラマー酢酸塩の薬力学：多発性硬化症と実験的自己免疫性脳脊髄炎（EAE）モデル

：添付資料番号 4.2.1.1-1（参考）、-2（参考）、-3（参考）、-9（参考）

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）患者の再発頻度低下、及び明確な初回臨床（神経学的）発作を認め、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である[2]。

MS は中枢神経系（CNS）の慢性炎症性疾患である。MS の発症は、ミエリン髄鞘への多巣性の炎症の侵襲、神経／軸索損傷、アストロサイトの増殖を伴うグリオーシス及び硬化斑の形成を特徴とする[2]。MS の原因は明らかになっていないが、主として T 細胞を介する自己免疫疾患であると一般に考えられている。MS の発症機序としては他に、ウイルス感染を原因とする説や、特定の遺伝的要因（遺伝子多型など）を原因とする説があり、それらの組合せが免疫機能障害の原因となり、神経変性を引き起こすと考えられている[2]。実験的自己免疫性脳脊髄炎（EAE）は、ヒト MS の実験動物モデルである。動物で MS を厳密に再現することは不可能であるが、EAE は MS の自己免疫及び炎症過程に最も近い実験モデルである[3,4,5,6]。EAE はげっ歯類から霊長類までの様々な動物種において、フロイント完全アジュバント（CFA）と混和した CNS 由来物質で免疫することにより誘導可能である。

EAE で認められる主な臨床的な症状は進行性麻痺であり、最も重症な場合には死亡に至る。また、脳内では血管周囲リンパ球浸潤及び脱髄を伴う組織学的病変が観察される。この症状は通常、抗原投与の 2～3 週間後に出現し、これに先立って組織学的損傷が見られる[6]。

EAE の自己免疫的な特徴は、以下の基準により確認されている：

a. EAE の誘導に伴い、注入物質に対する遅延型過敏反応及び感作リンパ球の活性化が通常認められること
b. CNS 由来物質の注入後に認められる組織損傷が、CNS 組織に限定されること
c. 感作リンパ球の別個体への移入で、正常レシピエントに EAE を誘導できること

上記の基準の中で自己免疫的な特徴を示す最も重要なことは、感作リンパ球の単回接種により EAE を誘導できるということである。ラット、マウスいずれの動物種でも、T 細胞集団がこの機能に関与することが示されている[7,8]。また、EAE の免疫学的性質の観点から、MBP で惹起された EAE が、特異的抗原を用いた脱感作法により抑制されるか否かが検討されている[9,10]。高用量 MBP とフロイント不完全アジュバント（ICFA）の混和物を感作前のモルモットに投与した場合には、EAE の発症が強く抑制され、また感作後に投与した場合にも EAE は強く抑制された。このような処置により有効であった物質は脳炎誘発性蛋白のみならず、その他の脳炎非誘発性の関連蛋白質（ミエリン、修飾 MBP、脳炎非誘発性の塩基蛋白、脳炎非誘発性の分解生成物）及び MBP の合成断片も然りであり、いずれも同様に EAE 発症に対して予防効果を示した。このような結果に基づいて、MBP 及びその他の脳炎非誘発性の物質を模倣して、アミノ酸の共重合によりいくつかの合成ポリペプチドが作製され、それらが EAE に対して誘導作用、抑制作用のいずれを示すかが検討された。その結果、一部の合成ポリペプチド（コポリマー）は EAE 発症に対して強い抑制効果を示した。これらの合成ポリペプチドは、様々な免疫系で MBP と交差反応を示したが、EAE を惹き起こさなかった。GA はこの一連の合成ポリペプチドの中から、MS 治療薬としての開発を進めるために選択されたものの一つである。

GA による EAE 誘導能が繰り返し調べられたが、いかなる実験条件下でも、EAE は誘導されなかった（4.2.1.1-1 及び 4.2.1.1-2）。その反対に、GA は EAE を有意に抑制することが確認された。GA の EAE 抑制作用は動物種を問わず見られ、様々な動物種（マウス、モルモット、ウサギ及びヒト以外の霊長類）において、各種の誘導抗原を用いて誘導した EAE に対する GA の抑制作用が観察されている（4.2.1.1-2、4.2.1.1-3 及び 4.2.1.1-9）。

表 2.6.2-1 に、様々な動物種での GA の EAE 抑制作用が証明された各種実験データを要約する（4.2.1.1-9）。

表 2.6.2-1　様々な動物種での GA による EAE 抑制作用

動物種	対照群		処置群	
	EAE *発症数	発症率	EAE*発症数	発症率
モルモット	37/50	74	11/50	22
ウサギ	18/26	70	5/26	19
マウス	19/26	73	6/25	24
アカゲザル	5/5	100	1/5	20
ヒヒ	6/6	100	2/9	22

* EAE の臨床症状

表に示したデータは、すべての動物種で、GA が EAE を顕著に抑制したことを示す。さらに、脳炎誘発物質の由来及び実験動物について、GA が種特異性を示さないことが確認された [11]。

2.6.2.1.2　安全性薬理試験

本項では、免疫系以外の各種生理系に対する GA の薬理作用を検討する目的で実施したラット、ネコ、イヌ、ウサギ及びサルを用いた *in vivo* 及び *in vitro* 試験を示す。初期の安全性薬理試験（4.2.1.3-4、4.2.1.3-5 及び 4.2.1.3-10）は、学術機関で実施されたため、医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準（GLP）に準拠して実施されたものでない。Life Sciences Research Israel で実施された試験のうち 1 試験（4.2.1.3-2）は GLP 適用であるが、それ以外の試験（4.2.1.3-6、4.2.1.3-7 及び 4.2.1.3-8）は GLP 非適用であった。Huntingdon Life Sciences により実施された 1 試験（4.2.1.3-9）は、GLP に準拠して実施された。

以下に示す薬理試験の概要を表 2.6.3-1 に示す。

2.6.2.2　効力を裏付ける試験

2.6.2.2.1　急性型実験的自己免疫性脳脊髄炎に対するグラチラマー酢酸塩の作用

2.6.2.2.1.1　マウス

：添付資料番号 4.2.1.1-1（参考）、-3（参考）、-4（参考）、-5（参考）、-6（参考）、-7（参考）、-8 (参考)

EAE 感受性の高い（SJL/J x BALB/C）系統の F1 ハイブリッドマウスを用いて、実験を実施した（4.2.1.1-1）。CFA と混和したマウス全脊髄ホモジネート（MSCH）で感作したマウスは、EAE の重度の臨床症状及び組織学的変化を発現した [12]。

その後の一連の試験（4.2.1.1-3、4.2.1.1-4、4.2.1.1-5、4.2.1.1-6、4.2.1.1-7 及び 4.2.1.1-8）において、GA が脳炎誘発性物質である MSCH との併用投与により、EAE を抑制することが見いださ

れた。GA の生理食塩溶液を皮下投与したときの EAE 誘導に対する GA の作用について、上記とは異なる用量及び投与スケジュールで調べた。その結果、EAE 誘導後に GA を投与した場合及び誘導当日に GA を単回投与した場合でも、EAE の臨床症状の発現が抑制された。GA の至適用量（3 mg／匹）を様々な日程で皮下投与したときの効果を表 2.6.2-2 に要約する（4.2.1.1-3 及び 4.2.1.1-8）。

表 2.6.2-2　雌性マウスにおける GA の皮下投与による EAE の抑制作用：投与スケジュールによる影響

投与回数（日）*	EAE の臨床症状		
	発症率	平均 EAE スコア（p 値）***	平均発症日（日）
対照（PBS）**	29/30	3.73 ± 0.3	11.5 ± 0.3
単回投与（第-7 日）	4/5	2.8 (0.5)	11.2
単回投与（第 0 日）	3/5	1.2 (0.023)	11.3
6 回投与（第 5～11 日）	3/5	1.0 (0.089)	11.3
6 回投与（第 11～16 日）	5/5	1.6 (0.021)	12.6
12 回投与（第 0～11 日）	3/5	0.6 (<0.010)	12.7
6 回投与（第 0、2、4、6、8、10 日）	3/5	1.0 (0.067)	12.3

PBS = リン酸緩衝生理食塩液
*　EAE は第 0 日に誘導させた。EAE 誘導前、誘導当日及び誘導後に GA を投与（3 mg 皮下投与）した。
**　対照値は、個々の実験で得られた値の集計値である。
***　0～5 点の規準で評価した：0 = 正常、1 = 尾のトーヌス低下、2 = 後肢の不全麻痺、3 = 後肢の麻痺、4 = 四肢の麻痺、5 = 死亡

結論として、GA の抑制作用が最も高かったのは、EAE 誘導後に GA を連日投与（第 0～11 日）した条件であった。GA の隔日投与も抑制傾向を示したが、連日投与の場合と比較して、その効果は弱かった。

2.6.2.2.1.2　ラット

：添付資料番号 4.2.1.1-3（参考）

Lewis ラットを CFA と混和したモルモット MBP を用いて感作し、EAE を誘導した。GA を経口、静脈内又は皮下投与し、EAE 抑制作用を調べた。以下に、GA を皮下投与した場合のラット EAE 試験の概要を示す。

様々な用量の GA のリン酸緩衝生理食塩溶液（PBS）を、様々な投与スケジュールで Lewis ラットに皮下投与し、EAE 誘導に対する抑制作用を調べた（4.2.1.1-3）。その結果、GA 5 mg を連日投与した場合に最も強い抑制作用を示した（表 2.6.2-3）。

表 2.6.2-3　ラットにおける GA の皮下投与による EAE の抑制作用：用量及びスケジュールによる影響

投与回数*（日）	平均 EAE スコア** ± SD
対照（無投与）	3.25 ± 0.4
12×1 mg（第 0～11 日）	2.8 ± 1
12×2.5 mg（第 0～11 日）	2.5 ± 0.8
12×5 mg（第 0～11 日）	0.25 ± 0.2
6×5 mg（第 0、2、4、6、8、10 日）	1.5 ± 0.5
4×5 mg（第 0、3、6、9 日）	2.8 ± 0.2

SD = 標準偏差
*　1 群あたり 4 例（雌雄）に GA を投与した。
**　EAE がピークに達した日の平均スコアを結果に表す。0～5 点の規準で評価した：0 = 正常、1 = 尾のトーヌス低下、2 = 後肢の麻痺、3 = 四肢の麻痺、4 =瀕死の状態、5 = 死亡

2.6.2.2.1.3　モルモット

：添付資料番号 4.2.1.1-2（参考）、-3（参考）、-9（参考）、-10（参考）、-11（参考）、-12（参考）、-13（参考）

モルモットにおいては、EAE を誘導させる用量の MBP と CFA の混和物の初回投与後に、ICFA と混和した GA を皮内投与した場合（4.2.1.1-2）、又は GA の生理食塩溶液を静脈内投与した場合に、EAE に対する抑制作用が認められた（4.2.1.1-12 及び 4.2.1.1-13）。また、抗原投与後 5 日以内に GA を 5 日間隔で 3 回静脈内投与をした場合に最も強い発症率の抑制作用が観察された（4.2.1.1-3）。

EAE の発症率は、対照群での 64%と比較して、GA 投与群では 22%まで低下し、また組織学的病変の発症率及び重症度も GA 投与群において低下した（表 2.6.2-4）（4.2.1.1-3）。さらに、リシン残基を持たないアミノ酸コポリマー（AGT）及び塩基性と関連のない蛋白ともに EAE に対する予防作用を全く示さなかったことから、GA の作用は特異的なものであると判断された。また、別の試験において、D-GA（GA と組成は同一であるが D 体のアミノ酸から調製したコポリマー）は、EAE に対する抑制作用を示さなかった（4.2.1.1-13）。

表 2.6.2-4　モルモットにおける GA による EAE 抑制作用の特異性

投与*	発症率		組織学的変化**		
	合計発症数	%	発症率	%	程度
対照	14/22	64	22/22	100	++, +++
GA- ロット 1	5/22	22	17/22	77	+, ++
GA - ロット 2	3/13	23	11/13	85	+, ++
MBP	2/8	25	8/8	100	+, ++
酸性コポリマーAGT	10/13	77	13/13	100	++, +++
リゾチーム	2/3	66	5/5	100	++, +++
リボヌクレアーゼ	7/13	54	12/13	92	++, +++
チトクローム C	7/10	70	10/10	100	++, +++

AGT = アラニン、グルタミン酸及びチロシン、GA = グラチラマー酢酸塩、MBP = ミエリン塩基性蛋白

*　MBP 投与の 1、6 及び 11 日目に 1 mg を 3 回投与（静脈内）。
雌雄モルモットを使用。なお、MBP 投与日を 1 日目とする。
**　組織学的変化の程度は、軽度（+）、中等度（++）、重度（+++）で評価した。

CFA と混和した脳炎誘発性塩基性物質（0.1 μg）を初回に投与して CFA と混和した脳炎誘発性塩基性物質（10 μg）を再投与するまでに GA を 3 回投与した場合、GA による予防効果が見られた（4.2.1.1-12）。EAE 誘導 5、10 及び 15 日後に GA を 3 回筋肉内投与したときに最も強い抑制作用が観察された（4.2.1.1-11）。また、Arnon らは、モルモット EAE 誘導に全脊髄のホモジネートを用いた条件でも、GA が EAE を抑制できることを示した（4.2.1.1-9）。

用量反応性試験において、GA の効果を脳炎誘発性塩基性蛋白（BE）と比較したところ、GA による EAE 抑制作用が天然の脳炎誘発性物質の効果と少なくとも同等であることが確認された（4.2.1.1-9）。さらに、精製 BE でなく全脊髄のホモジネートを EAE 誘導に用いた場合でも、GA による抑制作用が観察された。

表 2.6.2-5 に示すように、GA による EAE 抑制作用は天然の脳炎誘発性物質である MBP と少なくとも同等であった（4.2.1.1-3）。この試験において、EAE 誘導に用いた脳炎誘発性物質の投与量が、MBP のみならず GA による抑制作用にも影響を及ぼすことが明らかになった。MBP 10 μg により EAE を誘導したとき、GA は 10 μg という低用量を 3 回投与することにより抑制作用を示したが、これと同等の抑制作用を得るために、MBP 100 μg を 3 回投与する必要があった。しかし、MBP 100 μg により EAE を誘導したときには、GA 及び MBP ともに EAE を抑制しなかった[13]。

表 2.6.2-5　モルモット EAE に対する抑制作用の GA と MBP との比較

EAE 誘導	投与*	発症率				組織学的変化			
		GA		MBP		GA		MBP	
MBP 10 μg	対照	30/40	75%	14/20	70%	37/40	85%	20/20	100%
	3×1 mg	9/30	30%	4/15	27%	21/30	70%	12/15	80%
	3×100 μg	11/30	37%	7/20	35%	21/30	70%	17/19	89%
	3×10 μg	6/29	21%	15/20	75%	23/29	79%	19/20	95%
	3×1 μg	16/30	53%	8/10	80%	28/30	93%	10/10	100%
MBP 100 μg	対照	24/30	80%	15/20	75%	29/30	97%	19/20	95%
	3×1 mg	23/30	77%	15/20	75%	30/30	100%	19/20	95%
	3×5 mg	6/10	60%	n.t.	-	8/10	80%	n.t.	-
	3×10 mg	7/10	70%	n.t.	-	8/9	89%	n.t.	-

*GA 及び MBP は生理食塩溶液として、MBP 投与による EAE 誘導の 1、6 及び 11 日目に静脈内投与した。なお、MBP の初回投与日を 1 日目とする。
GA = グラチラマー酢酸塩、MBP = ミエリン塩基性蛋白、n.t. = 検査せず

2.6.2.2.1.4　ウサギ

：添付資料番号 4.2.1.1-14（参考）

New Zealand White ウサギ（雌雄）にウシ MBP 500 μg を投与して EAE を誘導した。対照群では 70%の個体に臨床症状が現れた。GA を 8 mg ずつ 3 回（EAE 誘導 1、6 及び 11 日後）静脈内投与したところ、大半の個体で EAE が抑制され、EAE の臨床症状を呈したウサギの割合は 19%に過ぎなかった（4.2.1.1-14）。

2.6.2.2.1.5 ヒト以外の霊長類

ヒト以外の霊長類は系統発生的に上記動物種よりヒトに近いのみならず、霊長類 EAE の症状もヒト MS と類似性が高いため、ヒト MS の評価モデルとしての意義がより大きい[14]。

(1) アカゲザル

：添付資料番号 4.2.1.1-15（参考）

アカゲザルにおける EAE の抑制に関する結果を表 2.6.2-6 に要約する。アカゲザルを用いた試験において、EAE による臨床症状の発現後に GA を投与したところ、症状の回復が認められた（4.2.1.1-15）。MBP の皮内投与により EAE を誘導すると、感作 16～24 日後に全例で EAE の臨床症状が発現した。GA を 15 日間連日漸減筋肉内投与（100 mg から 10 mg に漸減）したところ、GA 投与の 2 例で EAE の症状が回復したが、うち 1 例（個体番号 2）は 38 日後に再発した。対照群は急激に悪化し、症状発現後短期間で死亡した。さらに、組織学的検査では、GA 投与群のうち EAE が完全に回復した 1 例（個体番号 3）を除く全例で、脳内に EAE 病変が認められた。

表 2.6.2-6　GA によるアカゲザル EAE の抑制

群[a]	症状発現日	投与[b]	一般状態観察		組織学的損傷[e]
			疾患の経過	転帰	
1（対照群）	16	投与なし	急激な衰弱	死亡（第 20 日）	あり
2（試験群）	19	GA[d]（ICFA と混和）	5 回投与後から安定して改善	回復[c]（第 29 日）	あり
3（試験群）	20	GA[d]（ICFA と混和）	4 回投与後から安定して改善	回復（第 29 日）	なし
4（対照群）	24	ICFA 単独	状態悪化の継続	死亡（第 29 日）	あり
5（対照群）	24	ICFA 単独	状態悪化の継続	死亡（第 35 日）	あり

GA＝グラチラマー酢酸塩、ICFA＝フロイント不完全アジュバント

a　第 0 日に、CFA と混和した MBP 5 mg を全例に投与した。雌雄のサルを使用したが、発表論文に各個体の性別は明記していない。

b　臨床症状の発現日に投与を開始した。筋肉内投与を 15 日間又は死亡に至るまで連日行った。

c　個体番号 2 は第 67 日及び第 86 日に再発をきたし、その後、第 91 日に死亡した。

d　最初 7 回の GA 用量は 100 mg／匹とし、その後、50 mg、25 mg、10 mg と段階的に下げた。

e　中枢神経の病理組織学的検査を全例に実施した。EAE により死亡した 4 例（対照群 3 例及び GA 投与群で再発を繰り返した後に死亡した個体番号 2）とも、EAE に典型的な組織学的所見を示した。これら 4 例の脳内で有髄神経に富む白質領域内の淡赤色斑点、又は赤色変化（出血反応を示唆）が肉眼的に観察された。病理組織学的変化として、単核球浸潤を伴う広範な血管周囲炎が認められた。さらに、主に多形核球及び細胞残屑からなる炎症巣が実質内に確認された。これに対し、個体番号 3（GA 投与群のうち EAE が完全に回復した個体）では、CNS 内に組織学的に異常な所見は見られなかった。

(2) ヒヒ

：添付資料番号 4.2.1.1-3（参考）、-10（参考）

ヒヒを用いた試験で得られた結果を表 2.6.2-7 に要約する（4.2.1.1-10）。ヒヒに CFA と混和した MBP を皮内投与することにより EAE を誘導した（4.2.1.1-3）。臨床症状が観察された直後に、ICFA と混和した GA 10 mg を連日筋肉内投与した動物では、病態からの回復が見られたが、対

照群（ICFA 単独投与又は無投与）は急激な悪化を示し、症状発現後 3～9 日以内に死亡した。投与が奏効し EAE が完全に回復した個体を除く全例で EAE に典型的な組織学的損傷が認められ、完全回復した個体では、病理組織学的変化はなく、小さな病巣がわずかに観察されたに過ぎなかった（4.2.1.1-3 及び 4.2.1.1-10）。

表 2.6.2-7　GA の 1 ヵ月間投与によるヒヒ EAE の抑制

個体番号[a]	症状発現日	投与[b]	一般状態観察		組織学的変化[c]
			疾患の経過	転帰	
1～6	14～27	無投与又は ICFA	急激な衰弱	死亡（第 15～29 日）	+++
7	20	GA	4 回投与後から改善	回復（第 31 日）	+
8	29	GA	3 回投与後から改善	回復（第 34 日）	+
9	17	GA	8 回投与後から改善	回復（第 33 日）	n.t.
10	19	GA	5 回投与後から改善	回復（第 41 日）	n.t.
11	12	GA	4 回投与後から改善	回復（第 31 日）	n.t.
12	14	GA	5 回投与後から改善		
	92（再発）	GA	4 回投与後から改善	回復（第 116 日）	n.t.
13	21	GA	11 日目まで衰弱がみられ、その後改善		
	57（再発）	GA	2 回投与後から改善	回復（第 62 日）	+
14	30	GA	急激な衰弱	死亡（第 32 日）	+++
15	19	GA	急激な衰弱	死亡（第 25 日）	+++

GA = グラチラマー酢酸塩、ICFA = フロイント不完全アジュバント、n.t. = 検査せず

a　第 0 日に、全例に CFA と混和した MBP 5 mg を単回皮内投与した。発表論文には性別は明記されていない。

b　臨床症状の発現日に、ICFA と混和した GA 10 mg の連日筋肉内投与を開始し、15～30 日間又は死亡に至るまで投与を継続した。

c　組織学的変化の段階評価に使用した基準は、Teitelbaum が報告した原データの表（*Table 3: Suppression of EAE in Baboons by Copolymer-1*）には記載されていなかった。しかし、Teitelbaum らの検討では通常、組織学的変化の程度は、軽度（+）、中等度（++）又は重度（+++）と評価した。

2.6.2.2.2　慢性再発型実験的自己免疫性脳脊髄炎に対するグラチラマー酢酸塩の作用

2.6.2.2.2.1　マウス

：添付資料番号 4.2.1.1-16（参考）、-17（参考）

（SJL/J x BALB/C）F1 マウスに ICFA に混和した MSCH と結核菌（*Mycobacterium tuberculosis*）$H_{37}Ra$ の 1：1 混合物を 2 回皮下投与（7 日間隔）することにより慢性再発型 EAE（CR-EAE）を誘導した。これらのマウスでは、高頻度の再発を伴う重度 EAE の発症がみられた。一方、脳炎誘発性抗原のエマルジョンに GA を混和して投与（0.5 mg／匹、2 回）したマウスでは、EAE の初期症状とその後の再発の発症率がいずれも著明に低下した（4.2.1.1-16）。
（SJL/J x BALB/C）F1 マウスにおいて、2 種類の合成プロテオリピッド蛋白（PLP）ペプチド（PLP 139-151 又は PLP 178-191）のいずれか 1 種類の皮下投与によっても CR-EAE が誘導され、GA はこの CR-EAE も抑制した。脳炎誘発性抗原のエマルジョンに混和した GA（0.5 mg／匹）を単回投与したところ、EAE 誘導がほぼ完全に抑制された。PLP 139-151 と GA の併用群では、臨床症状は発現せず、PLP 178-191 と GA の併用群でも、15 例中 1 例が抗原投与後 188 日間に軽度の EAE を発症したに過ぎなかった（4.2.1.1-17）。

2.6.2.2.2.2　幼若モルモット

：添付資料番号 4.2.1.1-3（参考）、-18（参考）

CR-EAE は多くの点でヒト MS の臨床像及び病理学的特徴と類似しているため、モルモットにおいても CR-EAE モデルを作製し、GA の作用について検討した[15, 16]。

表 2.6.2-8 に示すとおり、近交系の幼若モルモットに ICFA と混和した GA を投与したところ、投与スケジュールに依存して EAE の臨床症状発現に対する強い遅延効果又は予防効果が認められた（4.2.1.1-3 及び 4.2.1.1-18）。抗原投与前又は EAE の臨床症状の発現初日から、GA を 5 日間連続皮下投与（0.5 mg／匹）したところ、GA を前投与した 12 例のうち、7 例では EAE の症状が発現せず、残る 5 例では発現が遅延し症状が極めて軽度であった。EAE の臨床症状発現後の GA 投与も有効であり、EAE の初期症状の進行を抑制した。再発は必ずしも抑制されなかったが、臨床症状、組織学的所見の両方において持続期間及び重症度が軽減された。

表 2.6.2-8　幼若 Strain 13 モルモットにおける GA による CR-EAE の抑制及び予防

	EAE の初回発作発現数	EAE の平均発現日	EAE 再発数	再発の重症度（平均値）
対照群	10/10（5 例死亡）	11.4（重度）	5/5	4.0
GA による抑制群	8/8	13.2	6/8	3.2
GA による予防（前投与）群	5/12	89.8	0/12	0

EAE＝実験的自己免疫性脳脊髄炎、GA＝グラチラマー酢酸塩
モルモットの性別は報告されなかった。グレード 0：良好、グレード 1：体重減少や尾の引きずり、グレード 2：後肢の障害、グレード 3：後肢の軽い引きずり、グレード 4：後肢の麻痺と下腹部の汚れ、グレード 5：瀕死若しくは死亡

2.6.2.2.3　グラチラマー酢酸塩の作用機序

GA による免疫調節作用については、慢性炎症疾患及び神経変性疾患の様々な動物モデルにおいて抗炎症作用のみならず、神経保護作用も示すことが明らかにされている[1,17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27]。

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（図 2.6.2-1 参照）が、GA は以下の免疫反応を引き起こすことにより免疫調節作用を発揮していると考えられる[1,2,28]。

- 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
- NK 細胞の機能の修飾
- GA による神経保護作用
- 免疫グロブリン反応に対する GA を介する作用

これらの過程を以下に概説する。

2.6.2.2.3.1 抗原提示細胞への高親和性結合

GA を皮下投与すると、GA ペプチドの大部分は局所で加水分解されるが、投与した GA の一部（未変化体又は部分的な加水分解産物）はリンパ循環に入り局所リンパ節に到達し、一部は未変化体のまま体循環に入ると考えられる[2,29]。

GA ペプチドの多様な配列は、様々な動物種及び系統由来の主要組織適合遺伝子複合体（MHC）クラス II 分子、並びに様々な遺伝的背景をもつ MS 患者由来の HLA クラス II（DR）分子の多様なアレルへの結合能を有する[24]。この「無差別な結合」により、様々な遺伝的背景をもつ多様な動物種において、各種の脳炎誘発性抗原により誘導される EAE に対し、GA が予防又は抑制効果を示すことが明らかになっている[30,31]。

APC（樹状細胞及びマクロファージ）表面の MHC クラス II 分子への GA ペプチドの最初の結合は、投与直後に投与部位及びリンパ循環で起こる可能性が最も高い。GA ペプチドは MHC II 分子に高親和性に結合し、他の抗原と競合する[32,33]。その結果として、T 細胞受容体における抗原-MHC 複合体との競合によって抗原特異的な T 細胞の活性化が阻害される。したがって、MHC II への GA の結合は、GA による免疫調節作用が始動するうえで不可欠なステップである。

最近の研究では、GA が HLA クラス I 拘束性 T 細胞応答も誘導することが明らかになっており、GA が HLA クラス Ia 又はクラス Ib 分子にも結合する可能性が示唆されている[34]。

2.6.2.2.3.2 APC と T 細胞の相互作用

CNS での急性及び慢性損傷に対する免疫応答には、獲得免疫系（T 細胞及び B 細胞）と自然免疫系（単球及び樹状細胞）の両方が関与している。したがって、GA による免疫調節作用では、APC と T 細胞の相互作用が重要な役割を果たす。最近の研究により、APC が GA の主要な標的であることが示唆されている。APC 表面の MHC 分子に GA が結合すると、GA 反応性 T 細胞が誘導される。この GA 反応性 T 細胞は、APC を抗炎症性の II 型 APC へ分化誘導し、この APC が $CD4^+CD25^+FoxP3^+$制御性 T 細胞 の形成を促進すると考えられている[35,36,37]。

2.6.2.2.3.3 GA 反応性 T 細胞の誘導

GA が免疫調節作用を示すのは、抗炎症作用と神経保護作用の両方に寄与する GA 反応性 T 細胞の誘導能を有するためである。動物モデルを用いた研究において、GA 特異的 T 細胞の移入に

より、脳炎誘発性のミエリン塩基性蛋白による EAE 誘導が阻害されることから、GA による免疫調節作用は GA 特異的 T 細胞を介することが示唆されている[38]。

GA は MBP 特異的 T 細胞に対して低親和性を示すため、弱いアゴニスト又は「改変ペプチドリガンド」として作用すると考えられる[23,33,39]。GA を反復投与すると、T 細胞受容体の変性とサイトカインプロファイルの Th2 方向へのシフトにより、抗原に対する T 細胞反応性が低下する[23,27]。したがって、自己抗原が GA 反応性 T 細胞と遭遇すると、弱いアゴニスト、すなわち改変ペプチドリガンドと類似性が高いものとして GA 反応性 T 細胞に認識されると考えられる[23,39,40,41,42]。その後、これらの T 細胞は、抑制性の Th2/Th3 サイトカインを分泌することにより、局所炎症を抑えると考えられる[1,21,43,44]。

(1) $CD4^+$ T 細胞の応答

MS 患者及び EAE モデルの研究で、GA の継続的な投与により、主として炎症誘導性の Th1 型サイトカインプロファイルから抗炎症性の Th2 型へのシフトが誘導されることが示されている[40,42,44,45,46,47,48,49,50]。これらの GA 特異的 Th2 細胞は、IL-4、IL-6、IL-10 などの抗炎症性サイトカインや BDNF の供給源となる[21,42,43,51,52]。

抗炎症性サイトカインを産生する Th2 型細胞へのシフトは、TNBS 誘発大腸炎のマウスから採取した大腸でも認められた[53]。GA 連日投与後のマウスから分離した間葉系リンパ球を、培養液中において大腸抽出物により活性化したところ、TNF-α 分泌の減少及び TGF-β 分泌の増加が認められた[53]。

GA による治療は、GA 反応性 T 細胞表面のケモカイン受容体の発現も変化させ、これらの T 細胞集団の細胞遊走に重要な影響を与えている可能性がある。GA 反応性 T 細胞が発現するケモカイン受容体は、Th2 型が優位である。GA 反応性 T 細胞は CC ケモカイン受容体 7（CCR7）の高発現により、リンパ組織への細胞遊走が促進され、その後、この免疫コンパートメント内で免疫調節作用を発揮する可能性がある[54]。

以上のように、多くの研究から、GA の免疫調節効果は GA による抗炎症性の Th2 型 T 細胞応答へのシフト誘導に起因することが示唆されている。

(2) $CD8^+$ T 細胞の応答

GA による治療は、$CD8^+$ T 細胞のサイトカインプロファイルにも変化をもたらす。未治療の MS 患者では、$CD8^+$ T 細胞の応答が著しく低下しており、GA 投与により、$CD8^+$ T 細胞が活性化され、健常者のレベルまで回復する[52]。GA による治療は、$CD8^+$ T 細胞のサプレッサー活性も増強する。GA による治療期間中には、GA 反応性 $CD4^+$ T 細胞の減少及び GA 反応性 $CD8^+$ T 細胞の増加も観察される[54]。

(3) 制御性 T 細胞の応答

自己に対する過剰な免疫反応を抑制する機能として、自然発生型の $CD4^+CD25^+FoxP3^+$制御性 T 細胞が存在する[55,56,57]。これらの制御性細胞の大幅な減少及び／又は機能不全は、MS を含むいくつかの自己免疫疾患と関連することが確認されている[58,59,60]。GA 投与は、$CD4^+CD25^+FoxP3^+$制御性 T 細胞及び制御性 T 細胞全体の形成を誘導し、それにより制御性 T 細胞サブセットの構成を正常レベルまで回復させることが示されている[61]。

GA を投与した SJL マウスにおいても、GA 特異的制御性 T 細胞は IL-10 及び IL-13 を多量に分泌するが、一方で IL-4 は少量分泌され、TGF-β、IL-17、IL-6、INF-γ及び TNF-αはほとんど分泌されなかった[62]。

近年、制御性 T 細胞サブクラスの変化が MS に関与することが示されている。例えば MS 患者では、$CD4^+CD25^+FoxP3^+CD31^+$制御性 T 細胞の割合の低下が見られる一方、$CD31^-$メモリー制御性 T 細胞の割合の上昇が見られる[63]。GA による治療は、$CD4^+CD25^+FoxP3^+CD31^+$制御性 T 細胞を増加させ、メモリー制御性 T 細胞の割合を低下させた[61]。また、GA は、Programmed Death

Receptor 1（PD1）を細胞表面に発現する制御性 T 細胞の割合を変化させることも示されている[64]。

2.6.2.2.3.4 GA 特異的 T 細胞の損傷部位への遊走

CNS における脊髄での急性及び慢性損傷に関わる細胞は、活性化ミクログリア、浸潤マクロファージ、リンパ球（T 細胞及び B 細胞）などである。EAE モデルを用いた研究において、GA 投与マウスから採取した GA 反応性 Th2 細胞を GA 無投与マウスに移入したところ、これらの細胞が GA 無投与マウスの CNS 内で確認されており、GA 反応性 T 細胞は血液脳関門を通過して CNS に集積し、MBP 自己抗原により刺激されると考えられている[21, 42, 65]。これらの Th2 細胞は炎症抑制に働く抗炎症性サイトカインと、ニューロンの生存及び組織の修復に極めて重要であるとされる神経栄養因子を分泌する[66, 67, 68, 69]。しかし、最近の研究において、GA は、抗原非依存的な機序によっても CNS の自己免疫疾患を抑制する可能性があることが示されている[37, 50, 70]。

2.6.2.2.3.5 II 型単球の形成

GA 投与は、抗原非特異的な機序によっても APC 機能を修飾する。EAE を用いた研究において、GA 投与が、IL-10 及び TGF-β の増加、並びに IL-12 及び TNF の産生減少を特徴とする抗炎症性の II 型単球の形成を促進することが示されている[64]。II 型単球は、抗原特異性に依存せず、Th2 細胞及び $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ 制御性 T 細胞の分化も誘導する[64]。

さらに正のフィードバックループが形成され、抑制性の T 細胞が APC を抗炎症性の II 型表現型へと修飾する。これらの II 型単球では、IL-10 及び TGF-βといった抗炎症性サイトカインの分泌が増加し、IL-12 及び TNF の分泌が減少する[50]。MS 患者由来の GA 反応性 T 細胞とヒトマイクログリア細胞を共培養した研究において、APC の性質が T 細胞を介して変化することが示された。この結果は、ヒト CNS 内の APC が II 型 APC へと修飾され、続いて II 型 APC が Th2 分化を誘導することを示唆している[36]。この結果とは異なり、マウス EAE モデルを用いた研究において、T 細胞欠損条件でも、GA 投与により II 型単球が誘導されることが示されている[37]。MS において、GA 投与がどのような経路によって APC 及び T 細胞の機能を変化させ得るかを正確に解明するためには、さらなる研究が必要である。

2.6.2.2.3.6 樹状細胞の機能の修飾

EAE 及び MS の発症過程では、樹状細胞がミエリン特異的 T 細胞及びナイーブ T 細胞にミエリン抗原を提示し、Th17 応答を誘導する[6]。*In vitro* では、GA はヒト樹状細胞による IL-12 及び TNF-α 産生を阻害することが示されている[35]。動物モデルにおいて、GA は骨髄由来樹状細胞による抗炎症性サイトカイン IL-10 の産生も誘導した[71]。また、ヒト樹状細胞を GA に曝露したところ、IL-4 分泌性のエフェクター Th2 細胞も誘導され、IL-10 レベルが増加した[35]。

2.6.2.2.3.7 B 細胞の機能の修飾

MS 及び EAE の発症及び抑制の両方に B 細胞が関与することを示す知見[72, 73, 74, 75, 76, 77, 78]が最近得られている。種々の B 細胞サブセットによる相反する活性としては、脱髄[75]、ミエリン蛋白に対する抗体産生[79, 80, 81, 82]、IL-10 分泌を伴う保護作用[74, 76, 77, 83]などが挙げられる。EAE 及び MS 患者を対象にした研究において、GA が B 細胞特異的サブセットのサイトカイン分泌を修飾する可能性が示されている[84, 85]。具体的には、GA と B 細胞の相互作用により、B 細胞による抗炎症性サイトカイン（IL-10、IL-4、TGF-β など）の発現が増加し、それにより炎症誘発性サイトカインの産生減少、自己反応性 T 細胞の増殖抑制及び制御性 T 細胞の分化促進が生じる可能性がある[31]。また、レシピエントマウスに GA 投与マウス由来の精製 B 細胞を移入した場合、EAE が抑制され、自己反応性 T 細胞の増殖、並びに Th1 及び Th17 細胞の形成が阻害されたが、一方 IL-10 の産生は促進された[84]。

2.6.2.2.3.8 NK 細胞の機能の修飾

NK 細胞が放出するサイトカインは、免疫応答（$CD4^+$細胞及び B 細胞）の開始及び形成に影響を与えるが、多くの研究で、MS 患者において NK 細胞の減少及び機能低下が見られることが示されている[86, 87, 88, 89, 90]。同様に、マウス EAE モデルで臨床症状を誘導する前に NK 細胞を枯渇させた場合、臨床症状の重症度がより高い再発性 EAE を誘導する[91]。最近の研究では、未熟及び成熟した自家及び同種単球由来樹状細胞に対するヒト NK 細胞の細胞溶解作用が、GA 投与により増強されることが示されている。GA 投与は、CD80、CD83、HLA-DR 又は HLA-I を発現する成熟樹状細胞の割合も低下させたが、NKG2D、NKp30 又は NKp44 を発現する NK 細胞の割合には影響を及ぼさなかった[92]。

2.6.2.2.3.9 GA による神経保護作用

動物及びヒトを対象とした研究において、GA による神経保護作用の可能性が示されている[50, 65, 69, 93]。*In vitro* 試験において、GA が T 細胞を刺激し、BDNF（ニューロンの分化及び生存、並びに各種グリア細胞の機能において重要な因子[94, 95]）などの神経栄養因子を産生させる可能性が示されている[50, 66]。GA による神経保護作用はラット EAE モデルを用いて検討され、GA 投与が網膜神経節細胞に対して保護作用をもつことが、網膜電図による神経変性及びニューロン機能の測定により示された[96]。GA による同様の作用は視神経障害モデルでも示されている。同モデルにおいて、GA 特異的 T 細胞が二次的な軸索変性を防止すると同時に、損傷部位に集積し、神経栄養因子を産生した[17]。したがって、GA は神経保護作用と免疫調節作用を併せ持つと考えられる。

EAE モデルを用いた研究において、GA 反応性 T 細胞が血液脳関門を通過し、CNS 内で治療効果を発揮することが示されている。EAE マウスでは、GA 特異的 T 細胞の移入[65]又は GA 連日投与[69]により、CNS 内での BDNF の増加が見られた。さらに、GA 投与マウスでは、無投与マウスと比較して、SMI-32 による染色性及びアミロイド前駆体蛋白の染色性の低下が見られたことから、軸索損傷が少なかったことが明らかになった[97]。GA の薬効は、ニューロン集団に黄色蛍光蛋白（YFP）を選択的に発現する YFP トランスジェニックマウスを用いた MOG 誘導 EAE モデルでの *in vivo* 試験でも見られた[69]。各種ニューロン抗原の発現量の定量により評価したところ、GA 投与マウスでは、無投与の EAE マウスと比較して、ニューロン／軸索損傷が減少することが確認された。GA 投与マウスでは、細胞の増殖、遊走及び分化の増強が見られており、GA と免疫調節、ニューロン新生及び *in situ* での治療効果が直接関連することが裏付けられた。

GA は、MS 患者でも神経保護作用を示すと推測されている。この作用は、MRI 及び磁気共鳴スペクトロスコピーによる測定で、軸索の代謝回復及び軸索損傷の予防が見られたことにより証明されている[98]。また、GA 投与患者では、MRI で描出される脳の「ブラックホール」病巣（重度の軸索破壊の発生領域）数の減少が認められている[99]。MS 患者では BDNF が低値であるが、GA 投与により正常値に回復することも示されている[100]。

2.6.2.2.3.10 免疫グロブリン反応に対する GA を介する作用

MS 患者において、GA 投与が、GA に対する細胞性免疫反応のみならず、液性免疫反応も誘導することが示されている[101]。MS 患者において GA を投与すると、タイプ 2 抗体である IgG4 の大量かつ持続的な増加が誘導される。対照的に、GA 無投与の MS 患者では、IgM、IgG1 及び IgG2 アイソタイプの産生を特徴とする GA 未感作の液性免疫を示すと考えられる[102]。IgG4 へのアイソタイプの変化は、Th2 サイトカインである IL-4 によって制御されることから、GA 投与患者では、GA 反応性 Th2 細胞の誘導に続いて、IgG4 抗体の選択的な分泌が生じると考えられる[103]。これらの結果は、GA 投与と同時に Th1 から Th2 へのシフトが起こることと一致する。

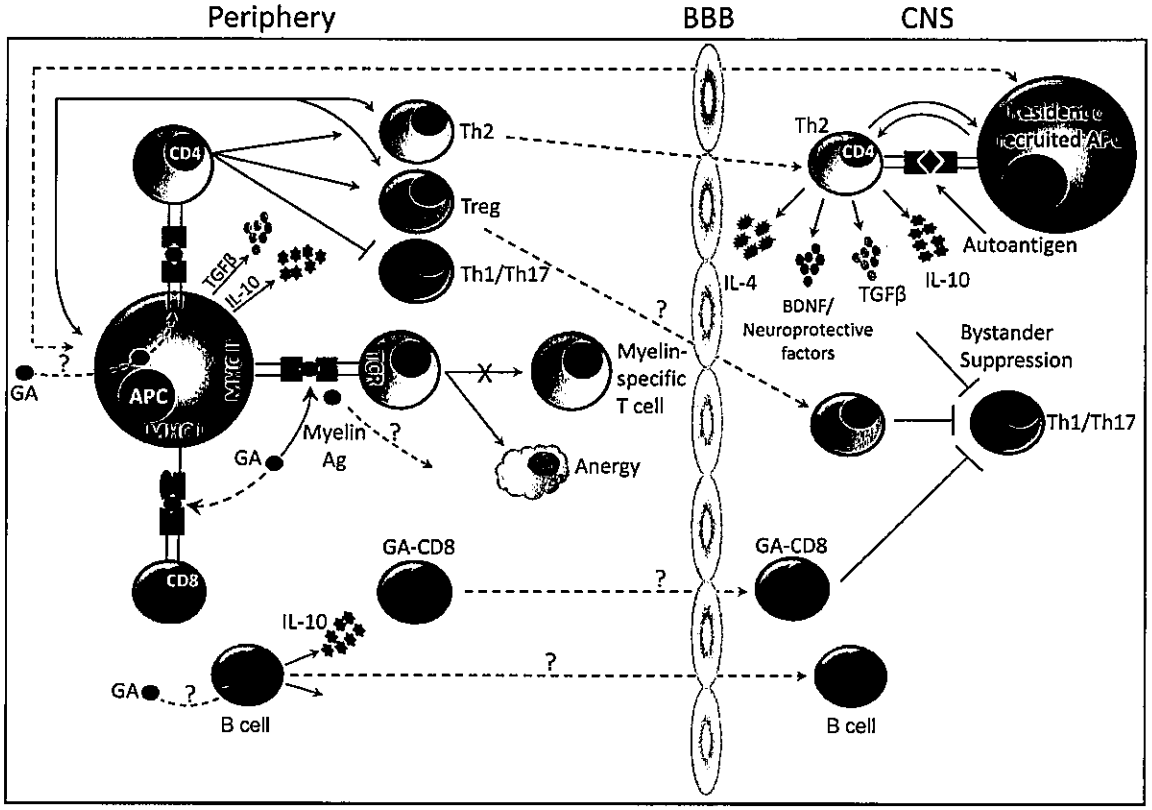


図 2.6.2-1　GA の作用機序

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。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 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。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 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 は B 細胞に対しても免疫調節作用を有することが示されている。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[32]。

2.6.2.3 副次的薬理試験

2.6.2.3.1 摘出平滑筋標本

：添付資料番号 4.2.1.2-1（参考）

3 種類の標本（モルモット回腸、モルモット気管及びラット胃底部切片）を用いて、GA が平滑筋収縮反応を誘発する可能性について、その薬理学的性質を *in vitro* で検討した（GLP 非適用）。その結果、GA は平滑筋（モルモット回腸及び気管、並びにラット胃底部切片）に対し、0.1～1.6 mg/mL の濃度で収縮反応を示した（表 2.6.2-9 に示した結果の概要を参照）。収縮反応は、ヒスタミン拮抗薬、アトロピン、アラキドン酸カスケードの阻害剤、カルシウムチャネル拮抗剤及び他のいくつかの物質により部分的に阻害された（表 2.6.2-10）。

表 2.6.2-9 平滑筋に対する GA の影響

標本	主な結果
モルモット回腸切片	収縮反応が速やか（秒単位）に引き起こされ、phasic 相と tonic 相が交互に現れた。EC_{50} は 0.4～0.8 mg/mL であった。 用量依存性かつ累積的な反応が見られた。 反応は、アトロピン、ヘパリン、ヒスタミン拮抗剤、シクロオキシゲナーゼ、リポキシゲナーゼ及び PLA2 の阻害剤、ブラジキニン（BK）2 拮抗剤、並びにカルシウムチャネル阻害剤により、様々な程度に抑制された。
モルモット気管標本	無感作動物では、濃度 1.6 mg/mL で反応は見られなかった。感作動物で得られた結果は一貫性を欠くものであり、収縮反応が見られた試験もあれば、弛緩反応が見られた試験もあった。 インドメタシン存在下では、GA は感作動物、無感作動物を問わず、濃度 1.6 mg/mL で一貫して収縮反応を引き起こした。 インドメタシンと PLA2 阻害剤でプレインキュベーションしたところ、無感作動物では GA による収縮反応が阻害された。
ラット胃底部切片	0.4～1.6 mg/mL の試験用量範囲にて、phasic 相と tonic 相の混合パターンを伴う収縮反応が見られた。 反応はアトロピンあるいはインドメタシンにより部分的に阻害された。

GA = グラチラマー酢酸塩；PLA2 = ホスホリパーゼ A2

表 2.6.2-10　GA により誘発されたモルモット回腸の収縮に対する各種薬物の阻害作用

阻害剤	濃度	作用機序	GA 濃度 (mg/mL)	%阻害率
アトロピン	0.1～1 μM	アセチルコリン拮抗剤	0.4 0.8 1.6	44 47 50
ヘパリン	50 I.U./mL	ポリアニオン	0.4 0.8 1.6	81 69 87
シメチジン	20 μM	ヒスタミン H2 拮抗剤	1.6	0
メピラミン	0.05 μM	ヒスタミン H1 拮抗剤	0.2 0.4 0.8 1.6	49 57 33 27
メピラミン＋ファモチジン	0.05 μM＋2 μM	ヒスタミン H1＋H2 拮抗剤	0.2 0.4 0.8 1.6	53 33 26 19
メピラミン＋ シメチジン	0.05 μM＋20 μM	ヒスタミン H1＋H2 拮抗剤	0.4 1.0	14 43
インドメタシン	1 μM	シクロオキシゲナーゼ阻害剤	0.4 0.8 1.6	71 51 52
ノルジヒドログアヤレチン酸（NDGA）	10 μM	リポキシゲナーゼ阻害剤	0.2 0.4 0.8 1.6	73 73 82 68
3-(4-オクタデシル)-ベンゾイルアクリル酸（OBAA）	1～4 μM	PLA2 阻害剤	0.2 0.4 0.8 1.6	- 53 47 52
Des-arg^{9} [leu^{8}]-ブラジキニン	10 μM	ブラジキニン BK1 拮抗剤	0.2 0.4 0.8 1.6	17 15 17 24
D-arg [Hyp^{3}, Thi^{5,8}, D-phe^{7}]-ブラジキニン	2 μM	ブラジキニン BK2 拮抗剤	0.2 0.4 0.8 1.6	46 50 41 5
カプサイシン	10 μM	c 線維からのオータコイド枯渇剤	0.2 0.4 0.8 1.6	24 22 29 15

表 2.6.2-10　GA により誘発されたモルモット回腸の収縮に対する各種薬物の阻害作用 (Continued)

阻害剤	濃度	作用機序	GA 濃度 (mg/mL)	%阻害率
ベラパミル	5 μM	カルシウムチャネル拮抗剤	0.2～1.6	95～100
ニフェジピン	5 μM	カルシウムチャネル拮抗剤	0.2～1.6	100
メチセルギド	10 μM	セロトニン拮抗剤	0.2 0.4 0.8 1.6	0 14 10 11
テトロドトキシン	20 μM	ナトリウムチャネル拮抗剤	0.2 0.4 0.8 1.6	9 0 7 4

GA = グラチラマー酢酸塩； PLA2 = ホスホリパーゼ A2

2.6.2.4　安全性薬理試験

2.6.2.4.1　中枢神経系

2.6.2.4.1.1　ラット Irwin 試験

：添付資料番号 4.2.1.3-1（評価）

ラットに 10、30 及び 90 mg/kg の用量で GA を皮下投与し、24 時間後まで行動観察（Irwin 法）と体温（直腸温）測定を行い、その後 6 日間一般状態を観察し、CNS に及ぼす影響を検討した（GLP 適用）。陽性対照としてジアゼパムの 15 mg/kg を強制経口投与した。その結果 GA を投与したいずれの群においても異常な行動や生理的機能の異常を示唆する所見は認められなかった。

一方、ジアゼパムを投与した動物では自発運動、探索行動及び筋緊張の低下等の行動変化と体温低下といったジアゼパム投与による典型的な変化がみられた。

2.6.2.4.1.2　その他の試験

その他 GA が CNS 機能に影響を及ぼす可能性について、単回投与及び反復投与毒性試験の一般状態及び関連する毒性評価項目（CNS 組織の器官重量、肉眼的及び組織学的検査）により評価した。イヌの 4 週間皮下投与毒性試験では、初回投与前及び投与最終週に神経学的検査を実施したが、薬剤投与に関連した影響は見られなかった（4.2.1.3-2；GLP 適用；2.6.6.3.6 参照）。ラットの 26 週間皮下投与毒性試験（4.2.3.2-2；GLP 適用；2.6.6.3.3 参照）、サルの 52 週間皮下投与毒性試験（4.2.3.2-9；GLP 適用；2.6.6.3.10 参照）などを含むマウス、ラット、イヌ及びサルを用いた GA の毒性試験では、CNS には投与に関連する毒性は見られなかった。

2.6.2.4.2　心血管系

心血管系に対する GA の影響は、CHO 細胞を用いた *in vitro* 試験、並びにラット、ウサギ、ネコ、イヌ及びサルを用いた一連の薬理試験により評価した。

2.6.2.4.2.1 hERG 電流に及ぼす影響

：添付資料番号 4.2.1.3-3（評価）

CHO-K1 細胞を用い、ホールセルパッチクランプ法により GA の hERG 電流に及ぼす影響を検討した（GLP 適用）。その結果、6 μg/mL の濃度における hERG 電流抑制率は 6.0±4.8%（n=4）であり、当該濃度では hERG 電流に影響を及ぼさないと判断した。なお当該濃度は、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。

2.6.2.4.2.2 ラット

：添付資料番号 4.2.1.3-4（参考）

本試験の目的は、無麻酔ラットを用いて、GA の静脈内投与による心血管系への影響を明らかにすることであった（GLP 非適用）。

無麻酔下で雄性 Wistar SPF ラットに GA の 10 及び 20 mg/kg を単回ボーラス静脈内投与した後、平均動脈血圧（MAP）及び心拍数（HR）を測定した。本試験では、同一ブリーダーから 2 ロットの同一系統ラットを入手し、使用した。また、ヒスタミンの血圧低下反応に対するヒスタミン受容体拮抗薬の影響を検討し、GA の血圧低下反応に対する影響と比較した。さらにヒスタミンと GA について、受容体拮抗薬処置前後での用量反応曲線を作成し、GA の影響をヒスタミンと比較した。

この他、H1 受容体拮抗薬メピラミンの効果を検討し、メピラミンと H2 受容体拮抗薬シメチジンの併用効果と比較した。また H2 受容体拮抗薬ファモチジンの効果に加え、ファモチジンとメピラミンの併用効果も検討した。

その結果、第 1 ロットのラットでは、GA の 20 mg/kg 単回投与の 112.9 秒後に MAP が最大で 20.7 mmHg 低下し、第 2 ロットのラットでは、79.6 秒後に最大で 34 mmHg の MAP 低下が見られた。GA に対する感受性は、ヒスタミンに対する感受性と同じ傾向を示した。ラットにおいては血圧低下反応に対してタキフィラキシーはほとんど見られなかった。

メピラミン（H1 受容体拮抗薬）又はファモチジン（H2 受容体拮抗薬）を投与した結果、GA 及びヒスタミンのいずれの作用も部分的に阻害されたが、メピラミンとシメチジン（H2 受容体拮抗薬）の併用投与では、完全な阻害が見られた。

以上より、GA は HR 及び呼吸数に明らかな影響を示さなかった。

2.6.2.4.2.3 ネコ

：添付資料番号 4.2.1.3-4（参考）

麻酔下ネコを用いて、GA の静脈内投与が心血管系に及ぼす影響を評価した（GLP 非適用）。

雌性 Fec Eur（Tif）ネコに GA を単回ボーラス静脈内投与した後、MAP 及び HR を測定した。また、血圧低下反応へのヒスタミン受容体拮抗薬の影響を上記ラット試験で用いたものと同様の方法により（.2.6.2.4.2.1 参照）評価した。

その結果、GA は HR に明らかな影響を示さなかった。また、GA により顕著なタキフィラキシーを伴う降圧作用（血圧低下）が誘発された。タキフィラキシーにより本来の用量反応曲線は作成できなかったが、以下の表 2.6.2-11 に示す GA の各用量で MAP 値の低下が見られた。

表 2.6.2-11　ネコ平均動脈血圧（MAP）に及ぼす GA の影響

投与量 (mg/kg)	動物数	MAP 低下量（mmHg）	
		個別値	平均値
1	3	95、5、14	38
2	3	15、14、6	15
5	6	46、84、20、79、40、46	52.5
10	2	61、61	61

変化のピークは投与後 96 秒で、おおよそ 42 分続いた。

上記で示したように、ネコにおいては GA の血圧低下反応に対して顕著なタキフィラキシーが見られた。ほとんどの例で、投与が繰り返されると反応がかなり弱くなった。例を挙げると、初回 5 mg/kg の投与後に 79 mmHg の MAP 低下を引き起こしたのに対し、54 分後の再投与では 17 mmHg しか低下しなかった。GA の投与間隔を 90 分まで延長しても最大反応まで回復しなかった。GA の投与の間にヒスタミンを投与しても、GA 投与による反応への明らかな影響はなかった。

ネコにおける GA の血圧低下反応の程度は、ヒスタミンに対する感受性と同じ傾向を示した。また、血圧低下反応は H1 又は H2 受容体拮抗薬投与により部分的に阻害され、H1 及び H2 受容体拮抗薬の併用投与によりほぼ完全に阻害された（静脈内又は皮下投与）。

GA の静脈内投与によってラットでは血圧低下反応のみが見られたが、ネコにおいては血圧上昇反応も見られた。この反応は GA の投与量に依存しており、低用量（1 及び 5 mg/kg）では、再投与した場合においても血圧上昇反応は見られなかったが、初回投与後 10 mg/kg の GA を再投与すると、血圧上昇反応が引き起こされた。20 mg/kg の反復投与を行った場合には初回投与から血圧上昇反応が見られた。この血圧上昇反応は短時間の反応で、投与約 137 秒後に血圧低下反応を伴うこともあった。ヒスタミン受容体阻害薬を用いた検討では、GA は 10 mg/kg 以下の投与であっても血圧上昇反応を引き起こした。特に H1 及び H2 受容体拮抗薬の併用投与時に顕著であり、5、10 及び 20 mg/kg の GA 投与で用量依存性が見られ、20 mg/kg の GA 投与（n=5）では最大で 59 mmHg の MAP 上昇反応を伴った。血圧低下反応に対しては顕著なタキフィラキシーが見られたが、血圧上昇反応に対してのタキフィラキシーは見られなかった。この血圧上昇反応は GA の用量と血圧低下反応の阻害の兼ね合いであると推察された。すなわち、ヒスタミン受容体を阻害していない動物に高用量の GA を反復投与すると血圧低下反応に対するタキフィラキシーが発現し、結果として本来の血圧上昇反応が顕在化したものと考えられる。

2.6.2.4.2.4　ウサギ

：添付資料番号 4.2.1.3-5（参考）

本試験の目的は、GA を静脈内投与した場合の無麻酔ウサギの心血管系に及ぼす影響を明らかにすることであった（GLP 非適用）。

雌性白色ウサギ 4 例に GA の 20 mg／匹（約 7 mg/kg）を単回ボーラス静脈内投与した後、MAP 及び HR を測定した。

その結果、投与 120 分後まで MAP 及び HR に対する影響は見られなかった。投与 2～3 時間後に軽度の MAP 低下及び HR 増加が見られたが、GA 投与に関連しないと判断された。

2.6.2.4.2.5 イヌ

：添付資料番号 4.2.1.3-6（参考）、-7（参考）、-8（参考）、-9（評価）

GA のイヌの心血管系に及ぼす影響を、皮下投与（4.2.1.3-6；GLP 非適用）及び静脈内投与（4.2.1.3-7；GLP 非適用、4.2.1.3-8；GLP 非適用及び 4.2.1.3-9；GLP 適用）で検討した。

無麻酔ビーグル犬（雌雄各 2 例）に GA 20 mg/kg を単回皮下投与した後、MAP 及び HR を測定した。その結果、GA の忍容性は良好であり、20 mg/kg 皮下投与では MAP 及び HR に対する影響は見られなかった（4.2.1.3-6）。

無麻酔ビーグル犬（雄 3 例）に GA 0.4、2、5 及び 10 mg/kg を投与した静脈内投与試験（4.2.1.3-7）では、MAP、HR、心電図（ECG）及び呼吸数を測定した。その結果、10 mg/kg で一過性の MAP 低下、5 及び 10 mg/kg で一過性の HR 減少が見られた他、10 mg/kg（3 例中 2 例）で ECG の R、S 及び T 波振幅の増加、10 mg/kg で呼吸数増加が見られた。無作用量（NOEL）は 2～5 mg/kg と判定された。

別の静脈内投与試験（4.2.1.3-8）では、無麻酔ビーグル犬（雄 3 例）に GA 0.4、2、5 、10 及び 20 mg/kg を投与し、MAP、HR、ECG 及び呼吸数を測定した。一過性の MAP 低下及び HR 減少が 10 及び 20 mg/kg の投与 5～15 分後に見られ、個体によっては最長投与 30 分後まで持続した。10 及び 20 mg/kg では、ECG の変化及び不整脈が見られた。呼吸数には GA に関連する影響は見られなかった。同試験では、NOEL は 5 mg/kg と判定された。

GA を静脈内投与したイヌで、標準的な心血管系の評価項目に加えて、冠動脈血流量及び血清酵素値も測定した（4.2.1.3-9）。麻酔下雄性ビーグル犬 4 例に GA 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）の各アイソザイムも測定した。試験の結果、最高用量（6 mg/kg）の GA 投与で、4 例中 2 例で MAP の低下が見られた。いずれの用量でも、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、生物学的に問題となる変化は誘発されなかった。

2.6.2.4.2.6 サル

：添付資料番号 4.2.3.2-8（参考）、-9（評価）

サルに GA を 28 日間及び 52 週間皮下投与した後、心電図（ECG）を記録した（それぞれ 4.2.3.2-8；GLP 非適用及び 4.2.3.2-9；GLP 適用）。28 日間試験では、サル（雌雄各 2 例）に GA 0、20、40 又は 60 mg/kg／日を投与し、投与開始前及び投与第 28 日に ECG を記録したが、投与に関連する変化は見られなかった。52 週間試験では、サル（雌雄各 4 例）に GA 0、3、10 又は 30 mg/kg／日を投与し、投与開始前及び投与第 13、26 及び 52 週に ECG を記録したが、いずれの用量でも、不整脈を含め ECG への影響は見られなかった。

2.6.2.4.3 呼吸器系

：添付資料番号 4.2.1.3-7（参考）、-8（参考）

無麻酔雄性イヌに GA 0.4、2、5、10 又は 20 mg/kg を単回静脈内投与した後、呼吸数に及ぼす影響を評価した。投与 0、5、15、30、45 及び 60 分後の時点で呼吸数を測定した。1 つの試験では 10 mg/kg（最高用量）で呼吸数の増加が引き起こされた（26 回／分から 36 回／分）（4.2.1.3-7；GLP 非適用）が、他の試験では 20 mg/kg までの用量で呼吸数の変化は見られなかった（4.2.1.3-8；GLP 非適用）。

2.6.2.4.3.1 ヒスタミン遊離に関する試験

：添付資料番号 4.2.1.3-10（参考）

ラット腹腔肥満細胞を用いて、GA がヒスタミンを直接遊離させる可能性を検討した（GLP 非適用）。0.01～500 μg/mL の濃度の GA で肥満細胞を直接刺激した。その結果、0.1 μg/mL 以上でヒスタミンが濃度依存的に遊離し、250 μg/mL での遊離率は 50%を超えていた。最高濃度（500 μg/mL）でのヒスタミン遊離率は 75%であったが、この濃度では 10～20%の細胞で細胞毒性も見られた。

2.6.2.5 薬力学的薬物相互作用試験

該当なし。

2.6.2.6 考察及び結論

効力を裏付ける試験

MS に関与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、PLP 及び 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疾患モデルである[17, 88, 89]。脳炎誘発性エピトープには顕著な種特異性があることが報告されている。MBP 又は PLP 分子の各種領域に対する感受性は、動物種により異なる（4.2.1.1-14）[91]。EAE は急性型又は慢性再発型の臨床経過を示し、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おり、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[2, 92]。

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（イスラエル）の研究者らは、合成ポリペプチドの酢酸塩である GA が、様々な動物種の EAE において、脳炎誘発性抗原の投与に対して、投与スケジュールに依存した予防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 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、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。

ヒトでの GA の作用機序は完全には明らかになっていないが、GA による免疫調節作用は、以下の過程が惹起されることによるとされている：**a**）抗原提示細胞（APC）への高親和性結合、**b**）GA 反応性 APC と T 細胞の相互作用、**c**）GA 反応性 T 細胞の誘導、**d**）GA 特異的 T 細胞の損傷部位への遊走、**e**）II 型単球の形成、**f**）樹状細胞の機能の修飾、**g**）B 細胞の機能の修飾、**h**）ナチュラルキラー細胞の機能の修飾、**i**）GA の神経保護作用、**j**）免疫グロブリン反応に対する GA を介する作用

以上、GA の効力を裏付ける試験の結果から、ヒトの MS に対する有効性が示唆される。

安全性薬理試験

CNS、呼吸器系、心血管系などの各種生理系に対する GA の有害作用の可能性を評価した。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。

GA の hERG 電流に及ぼす影響を検討したところ、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、ネコ及びイヌを用いて実施した。ラットに 10 又は 20 mg/kg を単回静脈内投与したところ、いずれの用量でも 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）。ウサギに約 7 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）。麻酔下ネコに 1、2、5 及び 10 mg/kg を単回静脈内投与した結果、BP の低下が見られ、5 mg/kg で平均 52.5 mmHg、10 mg/kg で平均 61 mmHg 低下した（4.2.1.3-4）。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）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、並びに ECG 波形の変化として一過性の R、S 及び T 波の振幅増加及び不整脈が見られた（4.2.1.3-7 及び 4.2.1.3-8）。麻酔下イヌを用いた GLP 準拠の単回投与試験では、GA 0.3～6 mg/kg 静脈内投与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）。その結果、GA の 6 mg/kg により雄 4 例中 2 例で BP 低下が引き起こされたが、HR、ECG、冠動脈血流量及び血清酵素値の変化は見られなかった。またイヌに皮下投与した場合には、20 mg/kg まで 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（4.2.1.3-6）。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）。サルでは、28 日間及び 52 週間の GA 皮下投与後、それぞれ 60 又は 30 mg/kg／日までの用量まで投与に関連する ECG の変化は見られなかった（4.2.3.2-8 及び 4.2.3.2-9）。以上のように、麻酔下イヌの GLP 非適用試験において、静脈内投与では 10 mg/kg 以上で不整脈が見られたが 6 mg/kg では異常はなく NOAEL が確認された点、臨床投与経路である皮下投与では心電図波形に異常はなかった点、また GLP 適用のサル皮下投与反復投与試験では最大 60 mg/kg/日又は 30 mg/kg/日まで QTc を含む心電図パラメータに異常はなかった点を考慮すると、臨床使用に際して本剤が不整脈を誘発する懸念は低いと考える。以上のように、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 CNS に対する作用を Irwin 法により検討したところ、90 mg/kg まで皮下投与しても異常行動や生理機能異常を示唆する所見は見られなかった（4.2.1.3-1）。その他、各動物種で実施した GLP 準拠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）。

以上、GA の安全性薬理試験の結果から、ヒトの心血管系、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。

2.6.2.7 図表

図表は必要に応じ本文中に記載した。

2.6.2.8 参考文献

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

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;70(12):1545-77.

3. Bernard CCA, Maldel TE, Mackay IR. Experimental models of human autoimmune disease: overview and prototypes. In: Rose NR MIe, editor. The autoimmune diseases II. San Diego: Academic Press; 1992:47-106.

4. Steinman L, Zamvil SS. How to successfully apply animal studies in experimental allergic encephalomyelitis to research on multiple sclerosis. Ann Neurol. 2006 Jul;60(1):12-21.

5. Farooqi N, Gran B, Constantinescu CS. Are current disease-modifying therapeutics in multiple sclerosis justified on the basis of studies in experimental autoimmune encephalomyelitis? J Neurochem. 2010;115:829-44.

6. Constantinescu CS, Farooqi N, O'Brien K, Gran B. Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) as a model for multiple sclerosis (MS). Br J Pharmacol. 2011;164:1079-1106.

7. Bernard CCA, Leydon J, Mackay IR. T cell necessity in the pathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis in mice. Eur J Immunol. 1976;6:655-60.

8. Pettinelli CB, McFarlin DE. Adoptive transfer of experimental allergic encephalomyelitis in SJL/J mice after *in vitro* activation of lymph node cells by myelin basic protein: requirement for Lyt 1+ 2- T lymphocytes. J Immunol. 1981 Oct;127(4):1420-3.

9. Einstein ER, Csejtey J, Davis WJ, Rauch HC. Protective action of the encephalitogen and other basic proteins in experimental allergic encephalomyelitis. Immunochemistry. 1968;5:567-75.

10. Arnon R, Teitelbaum D. Immunomodulation of experimental allergic encephalomyelitis. Isr J Med Sci. 1993 Feb-Mar;29(2-3):175-81.

11. Sela M, Arnon R, Teitelbaum D. Suppressive activity of Copolymer-1 in EAE and its relevance to multiple sclerosis. Bull Inst Pasteur. 1990;88:303-14.

12. Sriram S, Schwartz G, Steinman L. Administration of myelin basic protein-coupled spleen cells prevents experimental allergic encephalitis. Cellular Immunol 1983;75:378-82

13. Sela M, Teitelbaum D, Arnon R. Experimental allergic encephalomyelitis. Menarini series on immunopathology. In: Miescher PA, editor. First Symposium on Organ Specific Autoimmunity. Cremona, Italy, June 1977: Basel: Schwabe Co.; 1978. p. 9-21.

14. Sela M, Arnon R. Synthetic approaches to vaccines for infectious and autoimmune diseases. Vaccine. 1992;10(14):991-9.

15. Raine CS, Snyder DH, Valsamis MP, Stone SH. Chronic experimental allergic encephalomyelitis in inbred guinea pigs: An ultrastructural study. Labo Invest. 1974;31(4):369-80

16. Wisniewski HM, Keith AB. Chronic relapsing experimental allergic encephalomyelitis: An experimental model of multiple sclerosis. Ann Neurol. 1977 Feb;1(2):144-8

17. Kipnis J, Yoles E, Porat Z, Cohen A, Mor F, Schwartz M, et al. T cell immunity to copolymer 1 confers neuroprotection on the damaged optic nerve: possible therapy for optic neuropathies. Proc Natl Acad Sci U S A. 2000 Jun;97(13):7446-51.

18. Kipnis J, Nevo U, Panikashvili D,Alexandrovich A, Yoles E, Schwarta M, et al. Therapeutic vaccination for closed head injury. J Neurotrauma. 2003;20(6):559-69.

19. Schori H, Kipnis J, Yoles E, WoldeMussie E, Ruiz G, Schwartz M, et al. Vaccination for protection of retinal ganglion cells against death from glutamate cytotoxicity and ocular hypertension: implications for glaucoma. Proc Natl Acad Sci U S A. 2001 Mar;98(6):3398-403.

20. Teitelbaum D, Aharoni R, Arnon R, Sela M. Specific inhibition of the T-cell response to myelin basic protein by the synthetic copolymer Cop 1. Proc Natl Acad Sci U S A. 1988 Dec;85:9724-8.

21. Aharoni R, Teitelbaum D, Leitner O, Meshore A, Sela M, Arnon R. Specific Th2 cells accumulate in the central nervous system of mice protected against experimental autoimmune encephalomyelitis by copolymer 1. Proc Natl Acad Sci U S A. 2000 Oct;97(21):11472-7.

22. Putheti P, Soderstrom M, Link H, Huang YM. Effect of glatiramer acetate (Copaxone) on CD4+CD25high T regulatory cells and their IL-10 production in multiple sclerosis. J Neuroimmunol. 2003;144:125-31.

23. Hafler DA. Degeneracy, as opposed to specificity, in immunotherapy. J Clin Invest. 2002 Mar; 109(5):581-4.

24. Fridkis-Hareli M, Strominger JL. Promiscuous binding of synthetic copolymer 1 to purified HLA-DR molecules. J Immunol. 1998;160:4386-97.

25. Schwartz M. Neuroprotection as a treatment for glaucoma: pharmacological and immunological approaches. Eur J Ophthalmol. 2003;13 Suppl 3:S27-31.

26. Bakalash S, Kessler A, Mizrahi T, Nussenblatt R, Schwartz M. Antigenic specificity of immunoprotective therapeutic vaccination for glaucoma. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2003 Aug;44(8):3374-81.

27. Kipnis J, Schwartz M. Dual action of glatiramer acetate (Cop-1) in the treatment of CNS autoimmune and neurodegenerative disorders. Trends Mol Med. 2002 Jul;8(7):319-23.

28. Wolinsky JS. Glatiramer acetate for the treatment of multiple sclerosis. Expert Opin Pharmacother. 2004;5(4):875-91.

29. COPAXONE®. (glatiramer acetate) solution for subcutaneous injection: Full Prescribing Information, FDA-approved labeling. Teva Neuroscience Inc. Initial U.S. Approval: 1996. Revised [8/2012].

30. Sela M, Teitelbaum D. Glatiramer acetate in the treatment of multiple sclerosis. Expert Opin Pharmacother. 2001;2(7):1149-65.

31. Kala M, Miravalle A, Vollmer T. Recent insights into the mechanism of action of glatiramer acetate. J Neuroimmunol. 2011;235:9-17.

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

33. Ziemssen T, Schrempf W. Glatiramer acetate: mechanisms of action in multiple sclerosis. Int Rev Neurobiol. 2007;79:537-70.

34. Tennakoon DK, Mehta RS, Ortega SB, Bhoj V, Racke MK, Karandikar NJ. Therapeutic induction of regulatory, cytotoxic CD8+ T cells in multiple sclerosis. J Immunol. 2006;176:7119-29.

35. Vieira PL, Heystek HC, Wormmeester J, Wierenga EA, Kapsenberg ML. Glatiramer acetate (Copolymer-1, Copaxone) promotes Th2 cell development and increased IL-10 production through modulation of dendritic cells. J Immunol. 2003;170:4483-8.

36. Kim HJ, Ifergan I, Antel JP, Seguin R, Duddy M, Bar-Or A, et al. Type 2 monocyte and microglia differentiation mediated by glatiramer acetate therapy in patients with multiple sclerosis. J Immunol. 2004;172:7144-53.

37. Weber MS, Prod'homme T, Youssef S, Dunn SE, Rundle CD, Zamvil SS, et al. Type II monocytes modulate T cell-mediated central nervous system autoimmune disease. Nat Med. 2007 Aug;13(8):935-43.

38. Aharoni R, Teitelbaum D, Arnon R. T suppressor hybridomas and interleukin-2-dependent lines induced by copolymer 1 or by spinal cord homogenate down-regulate experimental allergic encephalomyelitis. Eur J Immunol. 1993;23:17-25.

39. Aharoni R, Teitelbaum D, Arnon R, Sela M. Copolymer 1 acts against the immunodominant epitope 82-100 of myelin basic protein by T cell receptor antagonism in addition to major histocompatibility complex blocking. Proc Natl Acad Sci U S A. 1999;96:634-9.

40. Duda PW, Schmied MC, Cook SL, Krieger JI, Hafler DA. Glatiramer acetate (Copaxone) induces degenerate, Th2-polarized immune responses in patients with multiple sclerosis. J Clin Invest. 2000 Apr;105(7):967-76.

41. Arnon R, Aharoni R. Mechanism of action of glatiramer acetate in multiple sclerosis and its potential for the development of new applications. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004 Oct;101 Suppl 2:14593-8.

42. 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 U S A. 1997 Sep;94:10821-6.

43. Ziemssen T, Kumpfel T, Klinkert WEF, Neuhaus O, Hohlfeld R. Glatiramer acetate-specific T-helper 1- and 2-type cell lines produce BDNF: implications for multiple sclerosis therapy. Brain-derived neurotrophic factor. Brain. 2002;125:2381-91.

44. Miller A, Shapiro S, Gershtein R, Kinarty A, Rawashdeh H, Lahat N, et al. Treatment of multiple sclerosis with Copolymer-1 (Copaxone): implicating mechanisms of Th1 to Th2/Th3 immune-deviation. J Neuroimmunol. 1998;92:113-21.

45. Neuhaus O, Farina C, Yassouridis A, Wiendl H, Bergh FT, Hohlfeld R, et al. Multiple sclerosis: Comparison of copolymer-1- reactive T cell lines from treated and untreated subjects reveals cytokine shift from T helper 1 to T helper 2 cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 2000 Jun;97(13):7452-7.

46. Chen M, Gran B, Costello K, Johnson K, Martin R, Dhib-Jalbut S. Glatiramer acetate induces a Th2-biased response and crossreactivity with myelin basic protein in patients with MS. Mult Scler. 2001;7:209-19.

47. Franciotta D, Zardini E, Bergamaschi R, Andreoni L, Cosi V. Interferon gamma and interleukin 4 producing T cells in peripheral blood of multiple sclerosis patients undergoing immunomodulatory treatment. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 2003;74:123-6.

48. Weder C, Baltariu GM, Wyler KA, Gober H-J, Lienert C, Duda PW, et al. Clinical and immune responses correlate in glatiramer acetate therapy of multiple sclerosis. Eur J Neurol. 2005;12:869-78.

49. Sanna A, Fois ML, Arru G, Huang Y-M, Link H, Sotgiu S, et al. Glatiramer acetate reduces lymphocyte proliferation and enhances IL-5 and IL-13 production through modulation of monocyte-derived dendritic cells in multiple sclerosis. Clin Exp Immunol. 2006;143:357-62.

50. Weber MS, Hohlfeld R, Zamvil SS. Mechanism of action of glatiramer acetate in treatment of multiple sclerosis. Neurotherapeutics. 2007 Oct;4(4):647-53.

51. Arnon R, Aharoni R. Neurogenesis and neuroprotection in the CNS-Fundamental elements in the effect of Glatiramer acetate on treatment of autoimmune neurological disorders. Mol Neurobiol. 2007;36:245-53.

52. Karandikar NJ, Crawford MP, Yan X, Ratts RB, Brenchley JM, Racke MK, et al. Glatiramer acetate (Copaxone) therapy induces CD8(+) T cell responses in patients with multiple sclerosis. J Clin Invest. 2002 Mar;109(5):641-9.

53. Aharoni R, Kayhan B, Arnon R. Therapeutic effect of the immunomodulator glatiramer acetate on trinitrobenzene sulfonic acid-induced experimental colitis. Inflamm Bowel Dis. 2005 Feb;11(2):106-15.

54. Allie R, Hu L, Mullen KM, Dhib-Jalbut S, Calabresi PA. Bystander modulation of chemokine receptor expression on peripheral blood T lymphocytes mediated by glatiramer therapy. Arch Neurol. 2005 Jun;62:889-94.

55. Kipnis J, Mizrahi T, Hauben E, Shaked I, Shevach E, Schwartz M. Neuroprotective autoimmunity: naturally occurring CD4+CD25+ regulatory T cells suppress the ability to withstand injury to the central nervous system. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002 Nov;99(24):15620-5.

56. Schwartz M, Kipnis J. Autoimmunity on alert: naturally occurring regulatory CD4(+)CD25(+) T cells as part of the evolutionary compromise between a 'need' and a 'risk'. Trends Immunol. 2002 Nov;23(11):530-4.

57. Hong J, Li N, Zhang X, Zheng B, Zhang JZ. Induction of CD4+CD25+ regulatory T cells by copolymer-I through activation of transcription factor Foxp3. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005 May;102(18):6449-54.

58. Viglietta V, Baecher-Allan C, Weiner HL, Hafler DA. Loss of functional suppression by CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with multiple sclerosis. J Exp Med. 2004 Apr;199(7):971-9.

59. Haas J, Hug A, Viehover A, Fritzching B, Falk CS, Filser A, Wildemann B, et al. Reduced suppressive effect of CD4+CD25high regulatory T cells on the T cell immune response against myelin oligodendrocyte glycoprotein in patients with multiple sclerosis. Eur J Immunol. 2005;35:3343-52.

60. Venken K, Hellings N, Broekmans T, Hensen K, Rummens J-L, Stinissen P. Natural naive CD4+CD25+CD127low regulatory T cell (Treg) development and function are disturbed in multiple sclerosis patients: recovery of memory Treg homeostasis during disease progression. J Immunol. 2008;180:6411-20.

61. Haas J, Korporal M, Balint B, Fritzching B, Schwarz A, Wildemann B. Glatiramer acetate improves regulatory T-cell function by expansion of naive CD4(+)CD25(+)FOXP3(+)CD31(+) T-cells in patients with multiple sclerosis. J Neuroimmunol. 2009;216:113-7.

62. Stern JNH, Keskin DB, Zhang H, Lv H, Kato Z, Strominger JL. Amino acid copolymer-specific IL-10-secreting regulatory T cells that ameliorate autoimmune diseases in mice. Proc Natl Acad Sci U S A. 2008 Apr;105(13):5172-6.

63. Haas J, Fritzsching B, Trubswetter P, Korporal M, Milkova L, Wildemann B, et al. Prevalence of newly generated naïve regulatory T cells (T_{reg}) is critical for T_{reg} suppressive function and determines T_{reg} dysfunction in multiple sclerosis. J Immunol 2007;179:1322-30.

64. Saresella M, Marventano I, Longhi R, Lissoni F, Trabattoni D, Clrici M, et al. CD4+CD25+FoxP3+PD1- regulatory T cells in acute and stable relapsing-remitting multiple sclerosis and their modulation by therapy. FASEB J. 2008 Oct;22:3500-8.

65. Aharoni R, Kayhan B, Eilam R, Sela M, Arnon R. Glatiramer acetate-specific T cells in the brain express T helper 2/3 cytokines and brain-derived neurotrophic factor in situ. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003 Nov;100(24):14157-62.

66. Ziemssen T, Kumpfel T, Schneider H, Klinkert EF, Neuhaus O, Hohlfeld R. Secretion of brain-derived neurotrophic factor by glatiramer acetate-reactive T-helper cell lines: Implications for multiple sclerosis therapy. J Neurol Sci. 2005;233:109-12.

67. Muhallab S, Lundberg C, Gielen AW, Lidman O, Svenningsson A, Olsson T, et al. Differential expression of neurotrophic factors and inflammatory cytokines by myelin basic protein-specific and other recruited T cells infiltrating the central nervous system during experimental autoimmune encephalomyelitis. Scand J Immunol. 2002;55:264-73.

68. Hammarberg H, Lidman O, Lundberg C, Eitayeb SY, Gielen AW, Piehl F, et al. Neuroprotection by encephalomyelitis: Rescue of mechanically injured neurons and neurotrophin production by CNS-infiltrating T and natural killer cells. J Neurosci. 2000 Jul;20(14):5283-91.

69. Aharoni R, Arnon R, Eilam R. Neurogenesis and neuroprotection induced by peripheral immunomodulatory treatment of experimental autoimmune encephalomyelitis. J Neurosci. 2005 Sep;25(36):8217-28.

70. Kantengwa S, Weber MS, Juillard C, Benkhoucha M, Fellay B, Lalive PH, et al. Inhibition of naive Th1 CD4+ T cells by glatiramer acetate in multiple sclerosis. J Neuroimmunol. 2007;185:123-9.

71. Jung S, Siglienti I, Grauer O, Magnus T, Scarlato G, Toyka K. Induction of IL-10 in rat peritoneal macrophages and dendritic cells by glatiramer acetate. J Neuroimmunol. 2004;148:63-73.

72. Wolf SD, Dittel BN, Hardardottir F, Janeway CA, Jr. Experimental autoimmune encephalomyelitis induction in genetically B cell-deficient mice. J Exp Med. 1996 Dec;184:2271-8.

73. Hjelmstrom P, Juedes AE, Fjell J, Ruddle NH. Cutting edge: B-cell-deficient mice develop experimental allergic encephalomyelitis with demyelination after myelin oligodendrocyte glycoprotein sensitization. J Immunol. 1998;161:4480-3.

74. Fillatreau S, Sweenie CH, McGeachy MJ, Gray D, Anderton SM. B cells regulate autoimmunity by provision of IL-10. Nat Immunol. 2002 Oct;3(10):944-50.

75. Bettelli E, Baeten D, Jager A, Sobel RA, Kuchroo VK. Myelin oligodendrocyte glycoprotein-specific T and B cells cooperate to induce a Devic-like disease in mice. J Clin Invest. 2006 Sep;116(9):2393-402.

76. Duddy M, Niino M, Adatia F, Hebert S, Freedman M, Bar-Or A, et al. Distinct effector cytokine profiles of memory and naive human B cell subsets and implication in multiple sclerosis. J Immunol. 2007;178:6092-9.

77. Yanaba K, Bouaziz JD, Haas KM, Poe JC, Fujimoto M, Tedder TF. A regulatory B cell subset with a unique CD1dhiCD5+ phenotype controls T cell-dependent inflammatory responses. Immunity. 2008 May;28:639-50.

78. Matsushita T, Yanaba K, Bouaziz JD, Fujimoto M, Tedder TF. Regulatory B cells inhibit EAE initiation in mice while other B cells promote disease progression. J Clin Invest. 2008 Oct; 118(10):3420-30.

79. Franciotta D, Salvetti M, Lolli F, Serafini B, Aloisi F. B cells and multiple sclerosis. Lancet Neurol. 2008 Sep;7:852-8.

80. Hedegaard CJ, Chen N, Sellebjerg F, Soelberg P, Leslie RG, Nielsen CH, et al. Autoantibodies to myelin basic protein (MBP) in healthy individuals and in patients with multiple sclerosis: a role in regulating cytokine responses to MBP. Immunology. 2009;128:e451-61.

81. Breij EC, Brink BP, Veerhuis R, Vloet R, Yan R, Dijkstra CD, et al. Homogeneity of active demyelinating lesions in established multiple sclerosis. Ann Neurol. 2008;63:16-25.

82. Lassmann H. Axonal and neuronal pathology in multiple sclerosis: what have we learnt from animal models. Exp Neurol. 2010;225:2-8.

83. Mann MK, Maresz K, Shriver LP, Tan Y, Dittel BN. B cell regulation of CD4+CD25+ T regulatory cells and IL-10 via B7 is essential for recovery from experimental autoimmune encephalomyelitis. J Immunol. 2007;178:3447-56.

84. Kala M, Rhodes SN, Piao WH, Shi Fu-D, Campagnolo DI, Vollmer TL. B cells from glatiramer acetate-treated mice suppress experimental autoimmune encephalomyelitis. Exp Neurol. 2010;221:136-45.

85. Begum-Haque S, Sharma A, Christy M, Lentini T, Ochoa-Reparaz J, Kasper LH, et al. Increased expression of B cell-associated regulatory cytokines by glatiramer acetate in mice with experimental autoimmune encephalomyelitis. J Neuroimmunol. 2010 Feb; 219 (1-2): 47-53

86. Benczur M, Petranyl GG, Palffy G, Varga M, Talas M, Hollan SR, et al. Dysfunction of natural killer cells in multiple sclerosis: a possible pathogenetic factor. Clin Exp Immunol. 1980;39:657-62.

87. Grunebaum E, Malatzky-Goshen E, Shoenfeld Y. Natural killer cells and autoimmunity. Immunol Res. 1989;8:292-304.

88. Flodstrom M, Shi FD, Sarvetnick N, Ljunggren HG. The natural killer cell - friend or foe in autoimmune disease? Scand J Immunol. 2002;55:432-41.

89. French AR, Yokoyama WM. Natural killer cells and autoimmunity. Arthritis Res Ther. 2004;6(1):8-14.

90. Baxter AG, Smyth MJ. The role of NK cells in autoimmune disease. Autoimmunity. 2002;35(1):1-14.

91. Zhang B, Yamamura T, Kondo T, Fujiwara M, Tabira T. Regulation of experimental autoimmune encephalomyelitis by natural killer (NK) cells. J Exp Med. 1997 Nov;186(10):1677-87.

92. Sand KL, Knudsen E, Rolin J, Al-Falahi Y, Maghazachi AA. Modulation of natural killer cell cytotoxicity and cytokine release by the drug glatiramer acetate. Cell Mol Life Sci. 2009;66:1446-56.

93. Aharoni R, Eilam R, Domev H, Labunskay G, Sela M, Arnon R. The immunomodulator glatiramer acetate augments the expression of neurotrophic factors in brains of experimental autoimmune encephalomyelitis mice. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005 Dec;102(52):19045-50.

94. Kerschensteiner M, Stadelmann C, Dechant G, Wekerle H, Hohlfeld R. Neurotrophic cross-talk between the nervous and immune systems: implications for neurological diseases. Ann Neurol. 2003;53:292-304.

95. Kerschensteiner M, Gallmeier E, Behrens L, Misgeld T, Wekerle H, Hohlfeld R, et al. Activated human T cells, B cells, and monocytes produce brain-derived neurotrophic factor *in vitro* and in inflammatory brain lesions: a neuroprotective role of inflammation? J Exp Med. 1999 Mar;189(5):865-70.

96. Maier K, Kuhnert AV, Taheri N, Storch MK, Williams SK, Diem R, et al. Effects of glatiramer acetate and interferon-beta on neurodegeneration in a model of multiple sclerosis: a comparative study. Am J Pathol. 2006 Oct;169(4):1353-64.

97. Gilgun-Sherki Y, Panet H, Holdengreber V, Mosberg-Galili R, Offen D. Axonal damage is reduced following glatiramer acetate treatment in C57/bl mice with chronic-induced experimental autoimmune encephalomyelitis. Neurosci Res. 2003;47:201-7.

98. Khan O, Shen Y, Caon C, Ching W, Reznar M, Hu J, et al. Axonal metabolic recovery and potential neuroprotective effect of glatiramer acetate in relapsing-remitting multiple sclerosis. Mult Scler. 2005;11:646-51.

99. Filippi M, Rovaris M, Rocca MA, Sormani MP, Wolinsky JS, Comi G. Glatiramer acetate reduces the proportion of new MS lesions evolving into "black holes". Neurology. 2001 Aug;57:731-3.

100. Azoulay D, Vachapova V, Shihman B, Miler A, Karni A. Lower brain-derived neurotrophic factor in serum of relapsing remitting MS: Reversal by glatiramer acetate. J Neuroimmunol. 2005;167:215-8.

101. Brenner T, Arnon R, Sela M, Abramsky O, Meiner Z, Teitelbaum D, et al. Humoral and cellular immune responses to Copolymer 1 in multiple sclerosis patients treated with Copaxone. J Neuroimmunol. 2001;115:152-60.

102. Farina C, Vargas V, Heydari N, Kümpfel T, Meinl E, Hohifeld R. Treatment with glatiramer acetate induces specific IgG4 antibodies in multiple sclerosis patients. J Neuroimmunol. 2002;123:188-92.

103. Basile E, Gibbs E, Aziz T, Oger J. During 3 years treatment of primary progressive multiple sclerosis with glatiramer acetate, specific antibodies switch from IgG1 to IgG4. J Neuroimmunol. 2006;177:161-6.

目次

2.6.3 薬理試験概要表 2

表

表 2.6.3-1 薬理試験：一覧表 3
表 2.6.3-2 効力を裏付ける試験 6
表 2.6.3-3 副次的薬理試験 12
表 2.6.3-4 安全性薬理試験 13
表 2.6.3-5 薬力学的薬物相互作用試験 17

2.6.3 薬理試験概要表

グラチラマー酢酸塩（GA）の薬理試験の概要を表 2.6.3-1 に示す。主要な効力を裏付ける試験、副次的薬理試験、安全性薬理試験及び薬力学的薬物相互作用試験（データが得られているもの）の要約を、それぞれ表 2.6.3-2 、表 2.6.3-3 、表 2.6.3-4 及び表 2.6.3-5 に示す。

表 2.6.3-1　薬理試験：一覧表

被験物質：グラチラマー酢酸塩

試験の種類	試験系 動物種/系統/性別	投与方法	実施施設	添付資料番号	区分
効力を裏付ける試験					
急性型 EAE	マウス /(SJL/JxBALB/C)F1	NR	ワイズマン研究所、レホボート、イスラエル	4.2.1.1-1	参考
急性型 EAE	マウス /(SJL/JxBALB/C)F1	i.v.	[redacted]	4.2.1.1-3	参考
急性型 EAE	マウス/(SJL/J)	s.c.	[redacted]	4.2.1.1-3	参考
急性型 EAE	マウス/NR	NR	[redacted]	4.2.1.1-4, 4.2.1.1-5	参考
急性型 EAE	マウス /(SJL/JxBALB/C)F1	footpads (s.c.)	[redacted]	4.2.1.1-6	参考
急性型 EAE	マウス/NR	NR	[redacted]	4.2.1.1-7	参考
急性型 EAE	マウス/(SJL/J)	s.c.	[redacted]	4.2.1.1-8	参考
急性型 EAE	ラット/Lewis	p.o.	[redacted]	4.2.1.1-3	参考
急性型 EAE	ラット/Lewis	i.v.	[redacted]	4.2.1.1-3	参考
急性型 EAE	ラット/Lewis	s.c.	[redacted]	4.2.1.1-3, 4.2.1.1-8	参考
急性型 EAE	モルモット/NR、ウサギ/NR、マウス/NR サル/アカゲ、ヒヒ	NR	NR	4.2.1.1-9	参考
急性型 EAE	モルモット/DH Albino	i.v.	ワイズマン研究所、レホボート、イスラエル	4.2.1.1-2	参考

表 2.6.3-1　　薬理試験：一覧表（Continued）

試験の種類	試験系 動物種/系統/性別	投与方法	実施施設	添付資料番号	区分
急性型 EAE	モルモット/DH Albino	i.v.	[redacted]	4.2.1.1-3, 4.2.1.1-10	参考
急性型 EAE	モルモット/Hartley	i.m.	ペンシルベニア医科大学、ペンシルベニアウィスター研究所多発性硬化症センター、フィラデルフィア、アメリカ	4.2.1.1-11	参考
急性型 EAE	モルモット/NR	i.v.	ワイズマン研究所、レホボート、イスラエル	4.2.1.1-12	参考
急性型 EAE	モルモット/DH Albino	i.v.	[redacted]	4.2.1.1-2, 4.2.1.1-3, 4.2.1.1-13, 4.2.1.1-14	参考
急性型 EAE	ウサギ/NZW	i.v.	ワイズマン研究所、レホボート、イスラエル	4.2.1.1-14	参考
急性型 EAE	サル/アカゲ	i.m.	ワイズマン研究所、レホボート、イスラエル	4.2.1.1-15	参考
急性型 EAE	ヒヒ	i.m.	ワイズマン研究所、レホボート、イスラエル	4.2.1.1-10	参考
慢性再発型 EAE	マウス/ (SJL/JxBALB/C)F1	s.c.	[redacted]	4.2.1.1-16, 4.2.1.1-17	参考
慢性再発型 EAE	モルモット/幼若 Strain 13	s.c.	ニューカースル病院、ニューカースル、イギリス、ワイズマン研究所、レホボート、イスラエル	4.2.1.1-18	参考
副次的薬理試験					
平滑筋収縮	モルモット回腸及び気管、ラット胃底部	In vitro	[redacted]	4.2.1.2-1	参考
安全性薬理試験					
CNS	ラット/ Sprague-Dawley	s.c.	[redacted]	4.2.1.3-1	評価
CNS	イヌ/ビーグル	s.c.	[redacted]	4.2.1.3-2	参考

表 2.6.3-1　　薬理試験：一覧表（Continued）

試験の種類	試験系 動物種/系統/性別	投与方法	実施施設	添付資料番号	区分
心血管系	CHO-K1 細胞	In vitro	[redacted]	4.2.1.3-3	評価
心血管系	ラット/Wistar; ネコ/Fec Eur (Tif)	i.v.	[redacted]	4.2.1.3-4	参考
心血管系	ウサギ/Albino	i.v.	[redacted]	4.2.1.3-5	参考
心血管系	イヌ/ビーグル	s.c.	[redacted]	4.2.1.3-6	参考
心血管系	イヌ/ビーグル	i.v.	[redacted]	4.2.1.3-7	参考
心血管系	イヌ/ビーグル	i.v.	[redacted]	4.2.1.3-8	参考
心血管系	イヌ/ビーグル	i.v.	[redacted]	4.2.1.3-9	評価
呼吸器系	イヌ/ビーグル	i.v.	[redacted]	4.2.1.3-7	参考
呼吸器系	イヌ/ビーグル	i.v.	[redacted]	4.2.1.3-8	参考
ヒスタミン遊離作用	ラット腹腔肥満細胞	In vitro	[redacted]	4.2.1.3-10	参考

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.v. = 静脈内；NR = 報告なし；NZW = New Zealand White；p.o. = 経口；s.c. = 皮下

表 2.6.3-2　効力を裏付ける試験

被験物質：グラチラマー酢酸塩

試験の種類	試験系	投与方法	用量 (mg/匹)	性別及び匹数/群	特記すべき所見	添付資料番号	区分
急性型 EAE	マウス/ (SJL/JxBALB/C)F1	NR	NR	NR	脳炎誘発性抗原内に Cop1 を混ぜたものを投与することにより、病態の反応を予防することができた。	4.2.1.1-1	参考
急性型 EAE	マウス/ (SJL/JxBALB/C)F1	i.v.	1	M/F; 12～14 匹	1 mg の 3 回投与（第 1、6、10 日）で、発症率に対する予防効果が再現よくみられた。	4.2.1.1-3	参考
急性型 EAE	マウス/ (SJL/J)	s.c.	0.05 ～10	F; 5 匹	GA 3 mg により最大の予防効果が見られた。 抗原投与と同時に GA を一度だけ投与したとき、EAE 誘導が有意に抑制された。	4.2.1.1-3	参考
急性型 EAE	マウス/ NR	NR	0.1～2	NR	GA の 8 ロットとも活性を示し、用量反応曲線を示した。	4.2.1.1-4, 4.2.1.1-5	参考
急性型 EAE	マウス/ (SJL/JxBALB/C)F1	footpads (s.c.)	0.25	NR; 10 匹	[redacted]で処理した GA は、その抑制活性がほぼ完全に消失した。	4.2.1.1-6,	参考
急性型 EAE	マウス/ NR	NR	NR	NR; 10～13 匹	[redacted]又は[redacted]で処理した GA は、その抑制活性がほぼ完全に消失した。	4.2.1.1-7	参考

表 2.6.3-2　効力を裏付ける試験 (Continued)

試験の種類	試験系	投与方法	用量 (mg/匹)	性別及び匹数/群	特記すべき所見	添付資料番号	区分
急性型 EAE	マウス/(SJL/J)	s.c.	0.00001 ～10	F; NR	GA 連日投与により EAE が抑制され、一定の用量範囲で用量反応関係が見られた：3 mg で最大効果が見られ、1 mg 及び 6 mg の効果は 3 mg より低く、10 mg では効果は見られなかった。 隔日投与も有効であり、一定の用量範囲で用量反応関係が見られた：3 mg で最大効果が見られ、10 mg では抑制効果が見られなかった。	4.2.1.1-8	参考
急性型 EAE	ラット/Lewis	p.o.	1 (2～3 日ごとに 5 回)	M/F; 28 匹	GA 投与により、EAE の発症率及び重症度の両方が低下した。	4.2.1.1-3	参考
急性型 EAE	ラット/Lewis	i.v.	1、2.5、5 (連日)	M/F; 4 匹	GA 5 mg の投与により、EAE の平均臨床スコアが有意に 85%低下した。	4.2.1.1-3	参考

表 2.6.3-2　効力を裏付ける試験 (Continued)

試験の種類	試験系	投与方法	用量 (mg/匹)	性別及び匹数/群	特記すべき所見	添付資料番号	区分
急性型 EAE	ラット/Lewis	s.c.	0.5～10	M/F; 4 匹	脳炎誘発性抗原の投与当日又は投与後に GA を投与したとき、EAE の臨床症状が著明に抑制された。1 回量 4 mg の GA 投与で、最も強い抑制作用が見られた。これより低用量又は高用量での抑制作用は相対的に小さかった。GA は、EAE 誘導後の連日投与で最も強い抑制作用を示した。	4.2.1.1-3 4.2.1.1-8	参考
急性型 EAE	モルモット/NR ウサギ/NR マウス/NR サル/アカゲヒヒ	NR	NR	NR	どの動物種においても EAE の発症率の低下がみられた。	4.2.1.1-9	参考
急性型 EAE	モルモット/ DH Albino	i.v.	1	NR; 10～22 匹	1 mg の 3 回投与（第 5、10、15 日又は第 1、5、10 日）で、発症率及び組織学的変化に対する予防効果が最も大きかった。	4.2.1.1-2	参考

表 2.6.3-2　効力を裏付ける試験 (Continued)

試験の種類	試験系	投与方法	用量 (mg/匹)	性別及び匹数/群	特記すべき所見	添付資料番号	区分
急性型 EAE	モルモット/ DH Albino	i.v.	0.001～1 (3 回) 又は 1～10 (3 回)	M/F; 10～40 匹	GA 10 μg 以上で、抑制作用が認められた。GA の EAE 抑制作用は MBP（BE）同程度であった。MBP 100 μg により誘導した EAE は、GA 又は MBP により抑制されなかった。	4.2.1.1-3, 4.2.1.1-10	参考
急性型 EAE	モルモット/ Hartley	i.m.	1 (3 回)	M; 5～20 匹	対照群と比較して、発症率が低下した。	4.2.1.1-11	参考
急性型 EAE	モルモット/ NR	i.v.	1 (3 回)	NR; 12～42 匹	CFA と混和した脳炎誘発性塩基性物質（0.1μg）を初回に投与して CFA と混和した脳炎誘発性塩基性物質（10μg）を再投与するまでに GA を 3 回投与した場合、GA による予防効果が見られた	4.2.1.1-12	参考
急性型 EAE	モルモット/ DH Albino	i.v.	1 (3 回)	M/F; 10～40 匹	EAE の臨床症状及び組織学的変化に対する GA の抑制作用は、その他のアミノ酸コポリマー類と比較して著しく大きかった。D 体の GA 及び AGT は活性を示さなかった。1 mg の 3 回投与で臨床症状に対する最大の予防作用がみられた。	4.2.1.1-2, 4.2.1.1-3, 4.2.1.1-13, 4.2.1.1-14	参考

表 2.6.3-2　効力を裏付ける試験 (Continued)

試験の種類	試験系	投与方法	用量 (mg/匹)	性別及び匹数/群	特記すべき所見	添付資料番号	区分
急性型 EAE	ウサギ/NZW	i.v.	8 (3 回)	NR; 26 羽	GA 投与により、EAE の発症率が対照群（70%）と比較して低下した（19%）。	4.2.1.1-14	参考
急性型 EAE	サル/アカゲ	i.m.	100×7 日間の投与後、用量を漸減（50、25 及び 10）再発例では、50×10 日間	M/F; 1～2 匹	EAE 誘導後の 2 例に GA 投与を開始したとき、臨床症状が抑制された。投与終了後、1 例が再発し、GA 投与を再開したとき、臨床症状が再び抑制された。最終的に、同個体は投与終了後に死亡した（EAE 誘導の 3 ヵ月後）。GA 投与群のもう 1 例は完全に回復し、臨床症状を示さなかった他、剖検時に脳の病理組織学的損傷はみられなかった。	4.2.1.1-15	参考
急性型 EAE	ヒヒ	i.m.	10	NR; 6～9 匹	GA (10 mg) i.m.投与により、9 例中 7 例で病態が完全に回復した（転帰＝回復）。	4.2.1.1-10	参考
慢性再発型 EAE	マウス/ (SJL/JxBALB/C)F1	s.c.	0.5 (2 回)	NR; 15 匹	脳炎誘発性抗原であるミエリンプロテオリピッド蛋白（PLP）により CR-EAE を誘導した。GA 投与により、CR-EAE の初期症状とその後の再発の発症率がいずれも著明に抑制された。	4.2.1.1-16, 4.2.1.1-17	参考

表 2.6.3-2　効力を裏付ける試験 (Continued)

試験の種類	試験系	投与方法	用量 (mg/匹)	性別及び匹数/群	特記すべき所見	添付資料番号	区分
慢性再発型 EAE	モルモット/幼若 Strain 13	s.c.	0.5 (5 回)	NR; 12 匹	GA（2.5 mg = 0.5 mg×5 日）s.c.投与により、CR-EAE の初期症状の進行は緩和であった。すなわち、12 例中 5 例では臨床症状は軽度であり再発もなく、残る 7 例は、EAE 誘導後 111 日間にわたり無症状であった。	4.2.1.1-18	参考

AGT = リジン残基を持たないアミノ酸コポリマー（アラニン、グルタミン酸及びチロシン）；CR-EAE = 慢性再発型実験的自己免疫性脳脊髄炎；DH = Dunkin Hartley；EAE = 実験的自己免疫性脳脊髄炎；F = 雌；GA = グラチラマー酢酸塩；i.m. = 筋肉内；i.v. = 静脈内；M = 雄；MBP = ミエリン塩基性蛋白；NR = 報告なし；NZW = New Zealand White；p.o. = 経口；s.c. = 皮下

表 2.6.3-3　副次的薬理試験

被験物質：グラチラマー酢酸塩

評価した器官系	試験系 動物種/系統	投与方法及び投与期間	用量 (mg/kg)	性別及び匹数/群	特記すべき所見	添付資料番号	区分
平滑筋収縮	モルモット回腸及び気管、ラット胃底部	In vitro	0.1～1.6 mg/mL	NR	全 3 種類の平滑筋標本で、収縮反応が見られた。	4.2.1.2-1	参考

NR = 報告なし

表 2.6.3-4　安全性薬理試験

被験物質：グラチラマー酢酸塩

評価した器官系	試験系 動物種/系統	投与方法及び投与期間	用量 (mg/kg)	性別及び匹数/群	特記すべき所見	GLP 適用	添付資料番号	区分
主たる安全性薬理試験								
CNS	ラット/ Sprague-Dawley	s.c.、単回	10、30、90	雄各 5 匹	Irwin 法により評価したが、異常行動や生理的機能異常を示唆する所見は見られなかった。	適用	4.2.1.3-1	評価
CNS	イヌ/ビーグル	s.c.、4 週間	2、10、20	雌雄各 3 匹	神経学的指標への影響は見られなかった。	適用	4.2.1.3-2	参考
心血管系	CHO-K1 細胞	In vitro	6 μg/mL	4 細胞	hERG 電流への影響は見られなかった。	適用	4.2.1.3-3	評価
心血管系	ラット/Wistar	i.v.	10、20	NR	無麻酔下で HR 及び呼吸数に対する影響は見られなかった。 20 mg/kg で最大の降圧作用（34 mmHg 低下）が見られた。 降圧作用はヒスタミン拮抗薬により阻害された。 タキフィラキシーは見られなかった。 NOAEL は 10 mg/kg 未満であった。	非適用	4.2.1.3-4	参考

表 2.6.3-4　安全性薬理試験（Continued）

評価した器官系	試験系 動物種/系統	投与方法及び投与期間	用量 (mg/kg)	性別及び匹数/群	特記すべき所見	GLP 適用	添付資料番号	区分
心血管系	ネコ/Fec Eur (Tif)	i.v.	1、2、5、10 20、40（ヒスタミン受容体阻害剤併用のみ）	NR	麻酔下ネコで HR に対する影響は見られなかった。 顕著なタキフィラキシーを伴った降圧作用（10 mg/kg で最大、61 mmHg 低下）が見られたが、ヒスタミン拮抗薬投与により降圧作用は消失した。 10 mg/kg の反復投与により血圧上昇反応が見られた見た。タキフィラキシーは見られなかった。 NOAEL は 1 mg/kg 未満であった。	非適用	4.2.1.3-4	参考
心血管系	ウサギ/白色種	i.v.	約 7	雌 4 匹	無麻酔ウサギでは、影響は見られなかった。	非適用	4.2.1.3-5	参考
心血管系	イヌ/ ビーグル	s.c.	20	雌雄各 2 匹	無麻酔イヌでは、GA の s.c.投与で影響は見られなかった。	非適用	4.2.1.3-6	参考
心血管系	イヌ/ ビーグル	i.v.	0.4、2、5、10	雄 3 匹	無麻酔イヌでは、GA の 10 mg/kg i.v.投与で、BP 及び HR 低下、並びに一過性の不整脈が見られた。 NOEL：2～5 mg/kg.	非適用	4.2.1.3-7	参考

表 2.6.3-4　安全性薬理試験（Continued）

評価した器官系	試験系 動物種/系統	投与方法及び投与期間	用量 (mg/kg)	性別及び匹数/群	特記すべき所見	GLP 適用	添付資料番号	区分
心血管系	イヌ/ ビーグル	i.v.	0.4、2、5、10、20	雄 3 匹	無麻酔イヌでは、GA の 10 mg/kg 及び 20 mg/kg i.v.投与で、BP 及び HR 低下、並びに一過性の不整脈が見られた。 NOEL = 5 mg/kg.	非適用	4.2.1.3-8	参考
心血管系	イヌ/ ビーグル	i.v.	0.3、1、3、6	雄 4 匹	麻酔下イヌでは、GA の 6 mg/kg i.v.投与で、4 例中 2 例で BP が低下した。いずれの用量でも、HR、ECG、冠動脈血流量及び血清酵素値の変化は見られなかった。	適用	4.2.1.3-9	評価
呼吸器系	イヌ/ ビーグル	i.v.	0.4、2、5、10	雄 3 匹	無麻酔イヌでは、GA の最高用量（10 mg/kg）の i.v.投与で、呼吸数が増加した。	非適用	4.2.1.3-7	参考
呼吸器系	イヌ/ ビーグル	i.v.	0.4、2、5、10、20	雄 3 匹	無麻酔イヌでは、最高用量（20 mg/kg）を含む全用量の i.v.投与で、呼吸数に対する影響はなかった。	非適用	4.2.1.3-8	参考

表 2.6.3-4　安全性薬理試験（Continued）

評価した器官系	試験系 動物種/系統	投与方法及び投与期間	用量 (mg/kg)	性別及び匹数/群	特記すべき所見	GLP 適用	添付資料番号	区分
補足的安全性薬理試験								
ヒスタミン遊離	ラット腹腔肥満細胞（血清）	In vitro	0.01～500 μg/mL	NR	GA により、ラット腹腔肥満細胞からのヒスタミンの直接遊離が見られた。	非適用	4.2.1.3-10	参考

BP = 血圧；CNS = 中枢神経系；ECG = 心電図；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；HR = 心拍数； i.v. = 静脈内；NOAEL = 無毒性量；NOEL = 無作用量； NR = 報告なし；s.c. = 皮下

表 2.6.3-5　薬力学的薬物相互作用試験

該当せず。