

テクフィデラカプセル 120mg
テクフィデラカプセル 240mg

第2部（モジュール2）：CTDの概要（サマリー）

2.4 非臨床試験の概括評価

バイオジェン・ジャパン株式会社

目次

	頁
2.4.1 非臨床試験計画の概略.....	8
2.4.1.1 被験物質.....	12
2.4.2 薬理.....	13
2.4.2.1 Nrf2 経路の活性化.....	14
2.4.2.1.1 In vitro 試験.....	14
2.4.2.1.2 In vivo 試験.....	15
2.4.2.2 DMF の抗炎症作用.....	15
2.4.2.2.1 In vitro 試験.....	15
2.4.2.2.2 In vivo 試験.....	16
2.4.2.3 DMF の神経保護作用.....	17
2.4.2.3.1 In vitro 試験.....	17
2.4.2.3.2 In vivo 試験.....	17
2.4.2.4 受容体結合試験.....	18
2.4.2.5 安全性薬理試験.....	19
2.4.2.5.1 中枢神経系に対する作用.....	19
2.4.2.5.2 心血管系及び呼吸器系に対する作用.....	19
2.4.2.5.3 皮膚に対する作用（臨床）.....	20
2.4.2.6 まとめ.....	20
2.4.3 薬物動態.....	20
2.4.3.1 分析法.....	21
2.4.3.2 吸収.....	21
2.4.3.2.1 単回投与薬物動態試験.....	21
2.4.3.2.2 反復投与薬物動態試験（トキシコキネティクス試験）.....	23
2.4.3.3 分布.....	23
2.4.3.4 代謝.....	23
2.4.3.5 排泄.....	25
2.4.3.6 薬物動態学的薬物相互作用.....	25
2.4.3.7 まとめ.....	26
2.4.4 毒性.....	26
2.4.4.1 単回投与毒性.....	26
2.4.4.2 反復投与毒性.....	27
2.4.4.2.1 反復投与毒性試験における経口投与の忍容性.....	28
2.4.4.2.2 反復投与毒性試験における前胃の変化.....	29
2.4.4.2.3 反復投与毒性試験における精巣の変化.....	30
2.4.4.2.4 反復投与毒性試験における腎臓の変化.....	31
2.4.4.3 遺伝毒性.....	34

2.4.4.4	がん原性.....	34
2.4.4.4.1	胃の変化の関連性.....	35
2.4.4.4.2	精巣の変化の関連性.....	35
2.4.4.4.3	腎腫瘍の関連性.....	36
2.4.4.4.4	2年間がん原性試験における上皮小体過形成の関連性.....	39
2.4.4.4.5	第 III 相多発性硬化症 (MS) 試験及び市販後における悪性腫瘍.....	39
2.4.4.4.6	Nrf2 経路及び腫瘍発生の促進に関する文献調査.....	40
2.4.4.5	生殖発生毒性.....	42
2.4.4.5.1	受胎能.....	42
2.4.4.5.2	胚・胎児発生.....	43
2.4.4.5.3	出生前及び出生後の発生毒性.....	43
2.4.4.6	局所刺激性試験.....	44
2.4.4.7	光安全性試験.....	45
2.4.4.8	その他の毒性試験.....	45
2.4.4.8.1	毒性学的薬物相互作用試験.....	45
2.4.4.8.2	ラットにおける腎毒性バイオマーカー探索試験.....	45
2.4.4.8.2.1	ゲンタマイシンを用いた評価法開発試験.....	46
2.4.4.8.2.2	ラットを用いた 14 週間腎バイオマーカー試験.....	46
2.4.4.8.2.3	ラットを用いた腎バイオマーカーの経時変化及び可逆性.....	47
2.4.4.8.3	幼若動物を用いた試験.....	47
2.4.4.8.4	薬物乱用に関する試験.....	48
2.4.4.8.4.1	Sprague Dawley 系雄ラットを用いたフマル酸ジメチル (DMF) 自己投与試験.....	48
2.4.4.8.4.2	Sprague Dawley 系雄ラットを用いた DMF の薬物弁別試験.....	49
2.4.4.9	まとめ.....	49
2.4.5	総括及び結論.....	50
2.4.6	参考文献.....	53
2.4.7	文献レビュー.....	60
2.4.7.1	非臨床の文献調査.....	60
2.4.7.2	調査担当者.....	60
2.4.7.3	調査方法.....	60
2.4.7.4	文献一覧.....	61

表目次

	頁
表 4-1	マウス及びラットにおける DMF の急性毒性プロファイル..... 26
表 4-2	反復投与毒性試験..... 28

表 4-3	投薬に関連した腎臓の変化に対する安全域.....	32
表 4-4	DMF を用いたげっ歯類がん原性試験において腫瘍性に関連した変化.....	35
表 4-5	雄ラットにおける精巣の変化の要約.....	36
表 4-6	ラットに認められた DMF による慢性進行性腎症 (CPN) 及び腎過形成・腎腫瘍の悪化.....	38
表 4-7	マウスに認められた DMF による慢性進行性腎症 (CPN) 及び腎過形成・腎腫瘍の悪化.....	38
表 4-8	DMF で実施された生殖発生毒性試験	42

図目次

	頁	
図 1	フマル酸ジメチルの構造式.....	8
図 2	BG00012 の想定される作用機序：Nrf2 経路の活性化.....	14
図 3	ラットにおける DMF の推定代謝経路.....	25

略語・略号一覧

略号	略していない表現	
	英語	日本語
β_2 M	beta-2-microglobulin	β_2 -ミクログロブリン
ARE	antioxidant response element	抗酸化応答配列
AUC	area under the concentration-time curve	血清中濃度時間曲線下面積
AUC _{0-t}	area under the concentration-time curve from time zero to time t	0時間からt時間までの濃度-時間曲線下面積
AUC _{0-inf}	area under the concentration-time curve from time zero to infinity	0時間から無限大時間まで外挿した濃度-時間曲線下面積
BCC	basal cell carcinoma	基底細胞癌
BID	twice daily	1日2回
BLQ	below the limit of quantitation	定量限界未満
BUN	blood urea nitrogen	血中尿素窒素
CHO	Chinese hamster ovary	チャイニーズハムスター卵巣由来の
CL	clearance	クリアランス
CL/F	oral clearance	経口クリアランス
C _{max}	maximum drug concentration	最高血中濃度
CPN	chronic progressive nephropathy	慢性進行性腎症
CSF	cerebrospinal fluid	脳脊髄液
CTD	common technical document	コモン・テクニカル・ドキュメント
CYP	cytochrome P450	チトクローム P450
DG	day of gestation	妊娠日齢
DL	day of lactation	授乳日齢
DMF	dimethyl fumarate: BG12	フマル酸ジメチル : BG12
EAE	experimental autoimmune encephalomyelitis	実験的自己免疫性脳脊髄炎
FA	fumaric acid	フマル酸
FDA	Food and Drug Administration	米国食品医薬品局
FID	flame ionization detector	水素炎イオン化検出器
FOB	full observation battery	詳細な観察
GC	gas chromatography	ガスクロマトグラフィー
GC/MS	gas chromatography/mass spectrometry	ガスクロマトグラフィー/質量分析法
GLP	Good Laboratory Practice	医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準
GLOBOCAN	Global Burden of Cancer study	-
hERG	human ether-a-go-go-related gene	ヒト遅延整流性カリウムチャネル遺伝子
HIF1 α	hypoxia inducible factor 1 α	-
HPLC	high pressure liquid chromatography	高圧液体クロマトグラフィー
HPMC	hydroxypropyl methylcellulose	ヒドロキシプロピルメチルセルロース
ICH	international conference on harmonization of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use	日米 EU 医薬品規制調和国際会議
IC ₅₀	half maximal inhibitory concentration	50%阻害濃度
IL	interleukin	インターロイキン
IL-1 β	interleukin-1 β	インターロイキン-1 β
Keap1	Kelch-like ECH-associated protein 1	-
KIM-1	kidney Injury Molecule-1	-

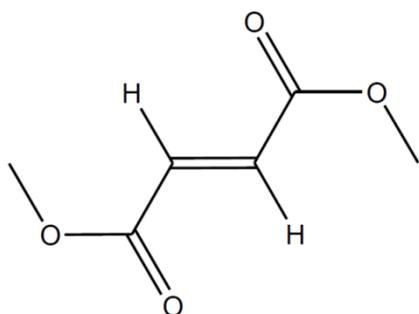
略号	略していない表現	
	英語	日本語
LC	liquid chromatography	液体クロマトグラフィー
LC/MS/MS	liquid chromatography-tandem mass spectrometry	液体クロマトグラフィータンデム質量分析
LD ₅₀	median lethal dose	50%致死量
LLOQ	lower limit of quantitation	定量限界下限
LPS	lipopolysaccharide	リポ多糖
MEF	monoethyl fumarate	フマル酸モノエチル
MMF	monomethyl fumarate	フマル酸メチル
MS	mass spectrophotometry	質量分析
MS	multiple sclerosis	多発性硬化症
MTX	methotrexate	メトトレキセート
NA	not applicable	該当せず
NAG	N-acetyl-beta-D-glucosaminidase	N-アセチルグルコサミニダーゼ
NCA	Non compartmental analysis	ノンコンパートメント解析
NF	National Formulary	国民医薬品集
NF-κB	nuclear factor κB	-
NQO1	NAD(P)H dehydrogenase (quinone 1)	-
Nrf2	nuclear factor (erythroid-derived-2)-like 2	-
P-gp	P-glycoprotein	P糖タンパク質
Ph. Eur.	EU-Pharmacopeia	欧州薬局方
PK	pharmacokinetics	薬物動態
PND	post natal day	出生後日数
PMR	Postmarketing Requirement	-
PWG	Pathology Working Group	-
QD	once daily	1日1回
QT interval	measure of the time between the start of the Q wave and the end of the T wave in the heart's electrical cycle	心電図におけるQ波の始まりからT波の終わりにいたるまでの時間
QTc	corrected (calculated) QT interval	補正QT時間
RA	rheumatoid arthritis	リウマチ性関節炎
RHD	recommended human dose	臨床推奨用量
SCC	squamous cell carcinoma	扁平上皮癌
SEER	Surveillance, Epidemiology, and End Results	
t _{1/2}	terminal elimination half life	消失半減期
TCA	tricarboxylic acid	トリカルボン酸
Th	helper T cells	ヘルパーT細胞
Th1	type 1 helper T cells	I型ヘルパーT細胞
Th17	IL-17-expressing helper T cells	IL-17産生性ヘルパーT細胞
Th2	type 2 helper T cells	II型ヘルパーT細胞
TID	3-times daily	1日3回
TK	toxicokinetics	トキシコキネティクス
TNF	tumor necrosis factor	腫瘍壊死因子
TNF-α	tumor necrosis factor-alpha	-
t _{max}	time to peak plasma concentration	最高血中濃度到達時間
ULN	upper limit of normal	正常上限 (値)
USP	United States Pharmacopeia	米国薬局方
USP/NF	The United States Pharmacopeia/The National Formulary	米国薬局方—国民医薬品集

	英語	日本語
UV	ultraviolet	紫外線
w/w	weight to weight	-

2.4.1 非臨床試験計画の概略

フマル酸ジメチル (DMF) は、フマル酸のジメチルエステル (図 1) であり、分子式 $C_6H_8O_4$ で表され、再発性の多発性硬化症 (MS) 治療薬として開発している。DMF の非臨床開発プログラムは、作用機序を解明した薬理試験、中枢神経系、呼吸器系及び心血管系に対する影響を評価した安全性薬理試験、DMF の体内動態を解析した薬物動態及び ADME 試験並びに MS の経口治療薬として推奨用量における BG00012 長期投与をサポートする非臨床安全性試験からなる。本剤の安全性は、DMF 原体を投与した非臨床データによって支持された。重要な非臨床安全性試験はいずれも DMF 原体を投与して実施された。乾癬の治療薬としてドイツで承認されている Fumaderm[®] (56% w/w DMF、並びにフマル酸モノエチルカルシウム塩、マグネシウム塩及び亜鉛塩の混合物) は、有効成分の 1 つとして DMF を含んでいる。DMF を有効成分として含んでいるため、Fumaderm を用いた毒性試験を非臨床の補助的な情報として含めた。また、DMF の薬理、薬物動態及び毒性について有用な情報となり得る公表論文の文献調査 (2.4.7 項) を行った。重要な非臨床安全性試験は、DMF を用いて GLP に準拠して実施された。

図 1 フマル酸ジメチルの構造式



多発性硬化症 (MS) は、炎症、脱髄、並びにオリゴデンドロサイト及びニューロンの喪失を特徴とする中枢神経系の慢性自己免疫性神経変性疾患である。MS は、最も多い中枢神経系の脱髄疾患であり、患者数は全世界で約 250 万人である。再発がみられる MS は最も多い病型であり、MS 患者の約 85% は比較的安定した時期 (寛解) の間における急性増悪 (再発) の発現を特徴とする再発寛解型 (RR) を呈する。

非臨床薬理試験プログラムは、*in vitro* 及び *in vivo* モデルの両方を用いた一連の包括的な探索試験を通じて、DMF の作用機序を解明することを目的として計画された。臨床製剤である BG00012 カプセルを非臨床試験で使用することは困難であるため、すべての薬理試験で BG00012 原薬である DMF を使用した。薬理試験は、DMF の薬理作用を確認し、MS の発症過程に関連する可能性のある経路に与える影響を解明するために計画された。MS の病態は多面的であり、様々な経路を経て進行する。MS では、免疫細胞の活性化及び中枢神経系への浸潤によって広範囲な細胞損傷が起こり、この大部分は反応性フリーラジカル及び炎症性刺激の異常産生・放出に起因する。これらの有毒な因子が複合して最終的に中枢神経系の細胞死が起こり、脱髄及び神経変性を生じ、疾患

及び身体機能障害が進行する。

DMF の作用に関する薬力学マーカーを特定すること及び DMF が発症過程にどのように影響するかを検討することを目的とし、これらの過程における転写活性の DMF 依存的な変化を検討した。これらの試験は、DMF 投与によって誘導又は抑制される遺伝子を同定し、MS の病態生理に結びつく分子・経路の候補を特定し、検討課題を絞るために計画された。まず、細胞によって反応性が異なるため、分子・経路の特定をより単純化するため、異種細胞株を用いた *in vitro* 試験を実施した。これらの *in vitro* 試験から、第2相抗酸化応答を制御する主要で広範な転写因子である Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 (Nrf2) を DMF が活性化することが示唆された (Itoh et al., 1999、Itoh et al., 2004、Li et al., 2009)。異種細胞株から得られた結果を組織が複雑な *in vivo* で確認するため、DMF 投与後の Nrf2 応答における組織、投与量による反応性及び経時的な遺伝子発現パターンを検討した。薬理試験は、ヒトとの Nrf2 遺伝子配列の相同性が高く、Nrf2 活性化機構が両種間で全体的に保持されており、DMF 応答の Nrf2 依存性を検討するために Nrf2 ノックアウトマウスを利用できることから、げっ歯類で検討した。その結果、*In vitro* 試験で観察された DMF による Nrf2 経路の活性化は、*in vivo* モデルで、DMF を経口投与した後の検討した全組織に観察された。

多くの文献報告から、刺激を受けた組織の抗炎症及び神経保護反応を Nrf2 経路の活性化が促進するというエビデンスが得られていることから、これらの作用を骨格として検討を行った。まず、DMF が抗炎症作用を有する可能性を一連の *in vitro* 試験及び *in vivo* 試験で検討した。*in vitro* 試験では、異種細胞培養系、並びにヒト及びマウスのマクロファージ及びアストロサイトの初代培養系を用いて、炎症性刺激に対する炎症性サイトカイン発現への DMF の影響を検討した。各実験では、より均質で同じものと見なし得る応答を得るため、一種の細胞タイプを使用し、使用する細胞は、MS の病態において役割が想定されており、免疫細胞を介した反応性が知られていることに基づいて選択された。これらの試験結果を踏まえて、ラットコラーゲン誘導関節炎モデル、並びにラット及びマウスの実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) モデル等の *in vivo* 炎症及び神経炎症モデルを用い、DMF が抗炎症作用を有する可能性を検討した。これらのげっ歯類モデルは、MS と共通点 (免疫細胞の活性化、炎症性サイトカインの放出、中枢神経系の免疫細胞浸潤、運動障害) を有する炎症を示すために選択された。また複数の試験で、げっ歯類 EAE モデルで重症度を軽減する有効性と MS 患者における有効性が関連することが報告されている (Fujino et al., 2003、Kataoka et al., 2005、Arnon R et al., 2009、Lalive et al., 2011)。必ずしもすべての MS 治療薬には当てはまらないが、EAE モデルでの有効性は、一般的に、臨床における有効性の可能性を示す妥当な指標であると考えられている。

Nrf2 経路の活性化から神経を保護する可能性を示した文献及び EAE モデルにおいて神経組織の保護作用を観察した説得力のある文献報告に基づき、DMF が神経を保護する直接的な作用を更に検討した。初期の試験では、*in vitro* で DMF に対する反応性の中枢神経系細胞タイプ特異性を検討した。ヒト及びげっ歯類のアストロサイト、オリゴデンドロサイト及びニューロンの初代培養を用いて、DMF の直接的な作用を検討し、MS の共通病理である有害な酸化ストレスから保護

する作用を検討した。これらの細胞タイプ、特にニューロンは MS 病理に特徴的な神経変性障害を受けやすいため、これらの単離細胞における DMF の作用を評価することは重要である。これらの試験で細胞保護反応が認められたことから、ラット片側線条体マロン酸注入神経毒性モデルを用いた *in vivo* 試験を実施した。この急性神経毒性モデルは、興奮毒性ニューロン喪失による脳組織病変を生じる神経変性モデルであるが炎症がほとんど関与しないモデルであるため、被験物質の直接的な神経保護作用を評価するのに適している。

さらに、マウスを用いたクプリゾン/ラパマイシンによる脱髄性神経変性モデルで DMF の神経保護作用を検討した。このモデルは、特定の MS 病理によく似た軸索病理を発現し、被験物質の神経保護作用を検討することが可能である。

安全性薬理試験は、中枢神経系、呼吸器系及び心血管系に対する DMF の影響を評価するために計画された。中枢神経系に対する安全性薬理試験は、Fumaderm (56% w/w DMF の様々な用量) を用いてマウスで実施した。心血管系に対する *in vitro* 安全性薬理試験では、DMF 及び一次活性代謝物であるフマル酸モノメチル (MMF) を用いて、分離イヌプルキンエ線維でヒト ether-a-go-go-related gene (hERG) チャンネル活性及び活動電位を解析した。心血管系及び呼吸器系に対する DMF の影響は、イヌを用いて、DMF 経口投与又は BG00012 カプセル製剤投与の 2 種の異なる試験において評価された。非げっ歯類 (イヌ及びサル) の重要な反復投与毒性試験のすべてで、心電図検査を行った。

経口剤として BG00012 を開発するため、DMF 及び一次活性代謝物である MMF の薬物動態は、マウス、ラット、イヌ及びサルを用いた単回及び反復投与試験で評価した。DMF は急速に吸収されて全身循環前に MMF に変換されるため、DMF の曝露量は MMF の曝露量を測定することによって評価した。

DMF 経口投与後の分布、代謝及び排泄は、十分に知られている。吸収部位を明らかにするため、雄ビーグル犬の十二指腸、空腸、回腸及び結腸内に直接 DMF を単回投与した。代謝及び排泄試験は、雌雄ラットに ^{14}C -DMF [(2,3- ^{14}C)フマル酸ジメチル] を用いて実施した。組織分布試験では、ラットに ^{14}C -DMF を単回経口投与した。ラットは、薬理試験及びげっ歯類の毒性試験で選択されており、DMF のプロファイルは動物種間で類似していると推測されるため、代謝、分布及び排泄試験に選択された。 ^{14}C -DMF の *in vitro* 代謝試験は、代謝プロファイルをさらに明らかにするため、マウス、ラット、イヌ、サル及びヒトの肝ミクロソーム並びにラット、サル及びヒトの肝細胞を培養して実施した。

BG00012 の製造販売承認申請を行うため、本薬 BG00012 の非臨床安全性試験プログラムにおいて以下に示す毒性試験を包括的に評価した。

1. げっ歯類及び非げっ歯類を用いた急性、亜慢性及び慢性投与毒性並びに変化の可逆性
2. ラット及びマウスの 2 年間がん原性試験、並びに遺伝毒性
3. 受胎能、胚・胎児発生、出生前及び出生後の発生並びに幼若動物への影響

4. その他の試験：毒性学的薬物相互作用、腎毒性バイオマーカー探索試験及び薬物乱用試験

非臨床安全性試験は、マウス、ラット、ウサギ、イヌ及び非ヒト霊長類で実施した。DMF は処理能力が高いエステラーゼによって代謝された後、トリカルボン酸（TCA）回路で代謝される。これらの経路はよく知られ、動物種間で保持されており、全哺乳類に共通の内因性物質が産生される。したがって、毒性試験で選択した全動物種及びヒトでは、DMF の代謝は類似していると推測され、げっ歯類については、¹⁴C-DMF を用いた ADME 試験によるラット及びヒトの代謝物の比較から同様であることが確認された。DMF の毒性のヒトでのリスクをより明らかにするため、非げっ歯類 2 種（イヌ及びサル）を用いてガイドラインに従ってプログラムを実施した。

毒性試験の多くで、DMF の 0.8% ヒドロキシプロピルメチルセルロース（HPMC）懸濁液を強制経口投与した。消化管の忍容性を改善するため、腸管上部で DMF が放出されるように腸溶性マイクロ錠の放出制御マトリックスを硬ゼラチンカプセルに充填して DMF を製剤化した。製剤（DMF カプセル製剤）は、イヌ慢性安全性試験で評価された。薬物乱用に関する試験では、DMF は懸濁液（薬物弁別試験）又は 20% Captisol 溶液（自己投与試験）で投与された。重要な非臨床試験はいずれも、代表的な臨床試験用原薬を用いて実施した。

第 III 相試験の投与頻度は、1 日 2 回（BID）及び 1 日 3 回（TID）であったため、DMF カプセル製剤の 1 日 2 回投与をイヌの重要な慢性毒性試験で評価した。1 日 1 回投与（QD）はげっ歯類及びサルを用いた毒性試験で用いられた。各反復投与毒性試験では、トキシコキネティクス（TK）パラメーターから総曝露量を評価した。

急性毒性試験はマウス及びラットを用いて実施し、DMF の単回投与における忍容性及び LD₅₀ を評価した。これらの試験はすべて、毒性評価のため LD₅₀ が求められていた ■■■ 年に実施した。反復投与毒性試験は、ICH M3（R2）ガイドラインに従ってデザインした。反復投与毒性試験はマウス、ラット、イヌ及びサルで実施した。慢性毒性試験はラット、イヌ及びサルで実施した。重要な反復投与毒性試験はいずれも、フルトキシコキネティクス（TK）パラメーター評価を含み、毒性変化の可逆性を評価するため 1 ヶ月間休薬する回復性試験期間を設定した。DMF の代謝物の 1 つにメタノールがあるが、その生成量は微量であると予測される。しかし、眼毒性（代謝性アシドーシス及び失明）の懸念があるため、メタノールによるアシドーシス及び眼毒性に対する感受性がヒトに近い動物種である非ヒト霊長類で DMF を評価するよう規制当局からリクエストを受けた。リクエスト受理当時、イヌの慢性毒性試験が既に進行中であったため、DMF の慢性毒性試験は 2 種類の非げっ歯類（イヌ及びサル）で評価した。眼毒性はカニクイザルを用いた 12 ヶ月間反復投与試験で認められなかった。メタノール及びギ酸の血漿中濃度に対照群及び DMF 群間で明らかな差は認められなかった。

ICH ガイドライン S2A 及び S2B に従って、DMF 及び一次活性代謝物 MMF を *in vitro* 遺伝毒性試験〔細菌を用いる突然変異試験（Ames 試験）及びヒト末梢血リンパ球を用いる哺乳類染色体異常誘発能試験〕で評価した。また、DMF は、哺乳類細胞（CHO 細胞）を用いる *in vitro* 突然変異試験及びラット小核試験でも評価した。2 つの *in vitro* 染色体異常試験を DMF で実施した。最初の

試験は 年 年に実施したが、本試験法の最新の基準に従って 年 年に再試験を実施した。

ICH ガイドライン S1A 及び S1B に従って、がん原性は、マウス及びラットを用いた標準的な 2 年間がん原性試験で評価した。これらの 2 年間がん原性試験の用量は、マウス及びラットを用いた 3 ヶ月間反復投与毒性試験の結果に基づいて選択した。

ICH S5 (R2) ガイドラインに従い、DMF の生殖発生毒性は、ラットを用いた標準的な雌雄受胎能試験、ラット及びウサギを用いた胚・胎児発生試験、並びにラットを用いた出生前及び出生後の発生試験で評価した。

DMF の 2 つの幼若動物試験は、計画されている小児の臨床試験を裏付けるため、ラットを用いて実施した。雄のみの幼若動物試験では、欧州における Pediatric Investigational Plan (小児調査計画) に関連して雄生殖器への影響を評価した。2 つ目の幼若動物試験は米国 FDA の Postmarketing Requirement に関連して成長、発生、神経毒性及び生殖への影響を評価するため、雌雄ラットを用いた。

DMF を関節リウマチ治療薬として開発する目的で、DMF とメトトレキサート (MTX) の 3 ヶ月間併用投与毒性試験をラット及びサルを用いて実施した。DMF は MTX の腎臓及び肝臓毒性を悪化しなかった。DMF と MTX の代謝経路は異なる。

投薬に直接関連した免疫機能を調節する変化は認められなかったため、ICH S8 ガイドラインに従って、独立した免疫毒性試験は実施しなかった。DMF 及び MMF は紫外・可視光域の光を吸収しないため、光毒性試験は実施しなかった。

毒性試験で確認された標的器官は腎臓であった。腎臓の変化を更に検討するため、臨床試験で投薬に関連する腎臓への影響を評価する非侵襲性バイオマーカーを同定するためのラットの探索的試験を実施した。

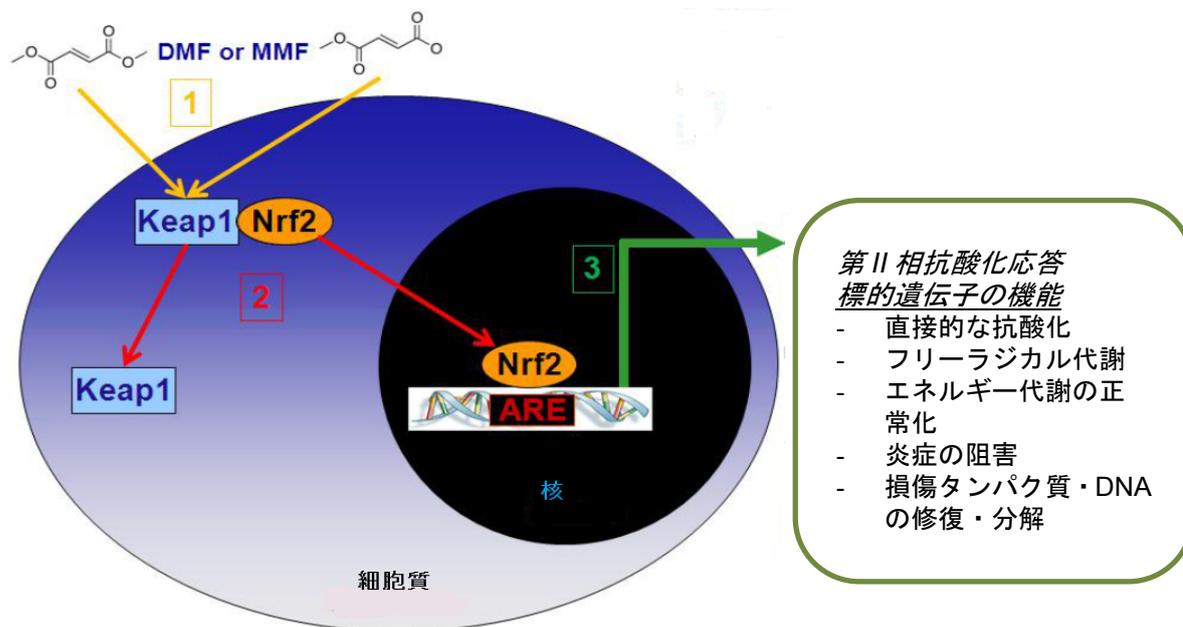
DMF は、非臨床又は臨床試験で薬物乱用を示す中枢神経系への影響を有することが示されており、米国 FDA の Postmarketing Requirement をサポートするために実施された DMF の自己投与及び薬物乱用に関する試験で薬物乱用の可能性についてのリスクは低いことが確認された。DMF の免疫毒性は、反復投与毒性試験の血液学的検査、血液生化学的検査、並びに剖検及び免疫組織の病理組織学的検査によって評価した。

全般的に、非臨床開発プログラムは広範にわたって実施されており、MS 患者に対する本剤の長期投与を裏付けるものである。

2.4.1.1 被験物質

本剤は、120 又は 240 mg の原薬 DMF を含有する腸溶性コーティングマイクロ錠をゼラチンカプセルに充填した経口投与製剤である。非臨床安全性試験に用いた原薬ロットは、臨床試験に使用した DMF の代表的なものであった ([M2.6.7.4])。原薬の規格は、非臨床試験で用いた DMF の

図2 BG00012 の想定される作用機序：Nrf2 経路の活性化



1. DMF 及び MMF は、Keap1 を修飾して Nrf2 との結合を抑制する。これにより、Nrf2 の恒常的な分解が阻害される。
 2. Nrf2 は、細胞質内に蓄積し始め、核内に移行する。
 3. Nrf2 は、ARE から転写を活性化し、抗酸化応答の発現を促進する。
- ARE : antioxidant response element、Keap1 : kelch-like ECH-associated protein 1、Nrf2 : nuclear factor (erythroid-derived-2)-like 2

2.4.2.1 Nrf2 経路の活性化

2.4.2.1.1 In vitro 試験

記載箇所：参考[M4.2.1.1-4] RSCH-2011-024、参考[M4.2.1.1-7] RSCH-2011-028、
参考[M4.2.1.1-1] RSCH-2011-020、参考[M4.2.1.1-2] RSCH-2011-021

DMF が転写を起こす薬力学的作用は、主に Nrf2 抗酸化応答経路の活性化を介していると考えられる。Nrf2 経路の活性化により、様々な炎症性ストレス及び酸化ストレスに対する細胞応答及び耐性を可能とするキーとなる分子の転写が促進される (Nguyen et al., 2003)。Nrf2 は、基底状態では、Keap1 と相互作用して細胞質内に隔離されており、Nrf2 は恒常的にユビキチン化され、プロテアソームで分解される (Itoh et al., 2004、Li and Kong, 2009)。本剤の有効成分 DMF 及び一次代謝物 MMF はいずれも、Keap1 との結合能を有し、Nrf2 との結合を抑制するように Keap1 分子構造を変化させることによって、Nrf2 を安定化し、定常状態での Nrf2 レベルを増加させる (Linker et al., 2011、試験番号 RSCH-2011-024 [M2.6.2.2.3]、試験番号 RSCH-2011-028 [M2.6.2.2.6])。その後、Nrf2 は核内に移行し、他の同種転写因子とともに、抗酸化及びストレス応答関連遺伝子の発現を広く制御している ARE と呼ばれる固有のプロモーター配列に結合することで、下流の標的遺伝子の転写を活性化する (Nguyen et al., 2003、試験番号 RSCH-2011-028 [M2.6.2.2.6])。レポーター遺伝子上流に ARE を組み込んだ細胞株は、DMF 又は MMF に反応して、レポーター遺伝子の転写が経時的及び濃度依存的に増加した (試験番号 RSCH-2011-020 [M2.6.2.2.1])。ヒト、ラ

ット及びマウスの初代培養細胞で、内因性 ARE が DMF 及び MMF 依存的に活性化され、Nrf2 の標的遺伝子として確認されている複数の遺伝子の転写及びタンパク質発現レベルが DMF 及び MMF 処理によって増加したことが確認された（試験番号 RSCH-2011-024 [M2.6.2.2.3]、試験番号 RSCH-2011-028 [M2.6.2.2.6]）。Nrf2 の mRNA 及びタンパク質レベルを減少させる siRNA を用いたところ、Nrf2 siRNA 導入によって抗酸化応答タンパク質の DMF 及び MMF 依存性の発現が抑制されたため、この過程に Nrf2 が必須であることが確認された（Linker et al., 2011、試験番号 RSCH-2011-021 [M2.6.2.2.2]、試験番号 RSCH-2011-028 [M2.6.2.2.6]）。

2.4.2.1.2 In vivo 試験

記載箇所：[M4.2.1.1-8] RSCH-2011-025、参考[M4.2.1.1-7] RSCH-2011-028、
参考[M4.2.1.1-13] RSCH-2012-024

これらの初期の試験を展開、確認するため、DMF 又は MMF 投与の in vivo 薬力学的作用を検討した。DMF を投与されたマウスは、器官及び組織によって異なる Nrf2 標的遺伝子を発現し、抗酸化応答の発現に組織依存性があることを示したことから、抗酸化応答には細胞及び組織の種類に特異性があることが示唆された（試験番号 RSCH-2011-025 [M2.6.2.3.1]、試験番号 RSCH-2011-028 [M2.6.2.2.6]）。特に中枢神経系で薬力学的作用が認められ、具体的には、DMF 投与マウスの脳に Nrf2 依存性であることが知られている NAD(P)H デヒドロゲナーゼ（キノン 1）（NQO1）遺伝子の発現が有意に増加したことが示された（試験番号 RSCH-2011-028 [M2.6.2.2.6]）。Nrf2 欠損マウス（Nrf2 の遺伝的ノックアウト、Nrf2^{-/-}）では、DMF 投与後に末梢及び中枢神経系組織で前述の薬力学的作用が認められず、DMF による遺伝子発現の変化に Nrf2 が必要であることが確認された（試験番号 RSCH-2011-025 [M2.6.2.3.1]、試験番号 RSCH-2011-028 [M2.6.2.2.6]、試験番号 RSCH-2012-024 [M2.6.2.3.6]）。さらに、このことは、Osgin1 遺伝子発現が Nrf2 によって媒介される in vivo モデルで初めて確認された。Osgin1 に関する最新の文献報告では、Osgin1 の様々なスプライスバリエントが細胞死及び細胞の生存を媒介する p53 遺伝子と相互作用することを示唆している（Hu et al., 2012）。以上、これらの試験から、DMF が Nrf2 経路を刺激し、遺伝子転写及びタンパク質発現の変化を誘導して、ストレス応答を増強することを示す説得力のあるデータが得られた。また、DMF は、MS 患者で Nrf2 依存性抗酸化遺伝子をアップレギュレートすることも示されており、ヒトに臨床薬力学的作用を示すことが確認されている（[M2.7.2.4.3]）。

2.4.2.2 DMF の抗炎症作用

2.4.2.2.1 In vitro 試験

記載箇所：参考[M4.2.1.1-5] RSCH-2011-023、参考[M4.2.1.1-6] RSCH-2012-023

フマル酸エステル（DMF を含む）は、炎症性疾患である乾癬の治療に有効性を示し、その作用は、炎症性ヘルパー T リンパ球（Th1、Th17）のダウンレギュレーション及び抗炎症性 Th2 リンパ球の増加等の免疫調節反応を介したものであると考えられている（Litjens et al., 2003）。DMF は、炎症性遺伝子の発現を減少させた後に炎症性ケモカイン及びサイトカインの発現を減少させると

同時に、抗炎症メディエーターの発現を増加させることが示されている。炎症性エンドトキシン〔リポ多糖 (LPS)〕で刺激したマクロファージ細胞株 (RAW264.7) では、DMF で前処理することによって炎症反応が抑制され、炎症性サイトカイン (TNF- α 及び IL-1 β 等) 発現が減少した (試験番号 RSCH-2011-023 [M2.6.2.2.4])。この作用はマウス骨髄由来初代培養マクロファージで確認され、DMF は LPS 刺激後の IL-1 β 及び TNF- α 発現を抑制した (試験番号 RSCH-2011-023 [M2.6.2.2.4])。論文報告で、NF- κ B を介した炎症性カスケードの活性化及び機能を阻害することによって DMF が炎症を直接抑制することが示唆されていたが (Loewe et al., 2002, Koh et al., 2011)、最近の論文報告で、この過程に Nrf2 経路の活性化が役割を担っていることが確認されている (Koh et al., 2011)。また、臨床及び非臨床データから、DMF は II 型樹状細胞の誘導及び免疫細胞の抗炎症性 Th2 フェノタイプへの偏移に役割を担っていることが示されている (Ghoreschi et al., 2011)。炎症反応の調節にも、NF- κ B に対する影響との関連性は不明であるが、Nrf2 経路の活性化が役割を担っていることが確認されている。Nrf2-/-マウスの骨髄由来マクロファージでは、LPS 刺激後の DMF 依存性のサイトカイン発現抑制が失われた (試験番号 RSCH-2011-023 [M2.6.2.2.4])。興味深いことに、Nrf2-/-マウスでも、高濃度 (10 μ M) の DMF では LPS 刺激後のサイトカイン発現抑制が認められ、DMF が Nrf2 依存性及び非依存性機序の両方を介して免疫細胞の炎症の活性化を抑制することが示唆された。マウス初代培養アストロサイト及びミクログリアでは、DMF は Nrf2 依存性に LPS 誘導性炎症マーカーを用量依存性に減少させた (試験番号 RSCH-2012-023 [M2.6.2.2.5])。

2.4.2.2.2 In vivo 試験

記載箇所: 参考[M4.2.1.1-9] RSCH-2011-026、参考[M4.2.1.1-11] RSCH-2011-029、参考[M4.2.1.1-12] RSCH-2011-030

In vitro で観察された抗炎症作用と同様に、DMF は動物モデルでも抗炎症作用を促進した。DMF はコラーゲン誘導性のラット関節炎モデルで効果を示し、DMF 投与で炎症性サイトカイン産生及び関節炎を著しく抑制した (試験番号 RSCH-2011-026 [M2.6.2.3.2])。ラットの実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) 試験では、DMF は、アストロサイト、ミクログリア及びマクロファージの活性化並びに T 細胞浸潤を有意に抑制し、脊髄の神経炎症を軽減した (試験番号 RSCH-2011-029 [M2.6.2.3.4]、試験番号 RSCH-2011-030 [M2.6.2.3.5])。以上、これらのすべての結果をまとめると、DMF が炎症性刺激に起因する炎症反応を軽減し、抗炎症シグナル伝達を促進する共通の免疫調節作用を有することが示唆された。これらの作用における Nrf2 活性化の正確な役割及び関連性は十分に解明されておらず研究中であるが、DMF は、Nrf2 依存性及び非依存性の両方の抗炎症作用機序を有する可能性がある。これらの抗炎症作用はいずれも、正確な機序は不明であるが、MS 患者の脳病変及び再発を抑制する DMF の重要な臨床効果と一致すると考えられる。

2.4.2.3 DMF の神経保護作用

2.4.2.3.1 In vitro 試験

記載箇所：参考[M4.2.1.1-7] RSCH-2011-028

活性酸素及び窒素種は酸化ストレスを引き起こし、MS 病理に関与している ([van Horsen et al., 2011](#))。中枢神経系の有糸分裂後細胞は、酸化ストレスを軽減する能力が本質的に低く、DNA、タンパク質及び脂質に損傷を受けやすい。In vitro データから、DMF 又は MMF は、抗酸化応答の増強を介して細胞内酸化還元電位を増加させることにより、すなわち細胞をプライム (有害な酸化刺激を軽減する能力をあらかじめ増加) することにより、細胞の生存促進反応 (細胞保護作用)、より具体的にはニューロンの生存促進反応 (ニューロン保護) を直接亢進することが示された (試験番号 RSCH-2011-028 [M2.6.2.2.6])。この作用機序は、フリーラジカル及び過酸化物に対する生体防御として重要な成分である細胞内グルタチオンレベルを DMF 又は MMF が増加させた試験結果から確認された (試験番号 RSCH-2011-028 [M2.6.2.2.6])。DMF 又は MMF 依存性の抗酸化応答の活性化は、複数の中枢神経系細胞 (ニューロン、アストロサイト及びオリゴデンドロサイト前駆細胞) で観察された (試験番号 RSCH-2011-028 [M2.6.2.2.6])。酸化ストレス負荷後初期の細胞生理変化の 1 つが細胞内 Ca^{2+} の異常蓄積である。これは、ミトコンドリアの Ca^{2+} ホメオスタシス及びエネルギー代謝を不安定化することによって、アポトーシスを引き起こしている可能性があり、実際に、有害な酸化刺激を一時的に負荷した後 24 時間のアストロサイト及びニューロンの生存率が有意に減少した ([Linker et al., 2011](#)、試験番号 RSCH-2011-028 [M2.6.2.2.6])。しかし酸化刺激を負荷する前に DMF 又は MMF を前処理したアストロサイトでは、 Ca^{2+} の蓄積が改善し、生存率が 60% まで改善した (試験番号 RSCH-2011-028 [M2.6.2.2.6])。この直接的な生存促進作用は、細胞ストレスに対する Nrf2 活性化による細胞保護作用及び神経保護作用を示した文献データ ([Calabrese et al., 2005](#)、[Li et al., 2005](#)、[Tran et al., 2008](#)、[Yang et al., 2009](#)、[Soane et al., 2010](#)、[Cao et al., 2010](#)) と一致した。DMF 又は MMF 依存性の細胞保護作用における Nrf2 の必要性は、Nrf2 の mRNA 及びタンパク質レベルを減少させるために Nrf2 の siRNA をトランスフェクトしたアストロサイトで検討した。Nrf2 の siRNA をトランスフェクトし、MMF で前処理した細胞が酸化ストレスに対する保護作用を示さなかったことから、MMF 依存性のニューロン保護作用には Nrf2 が必須であることが示された (試験番号 RSCH-2011-028 [M2.6.2.2.6])。

2.4.2.3.2 In vivo 試験

記載箇所：参考[M4.2.1.1-11] RSCH-2011-029、参考[M4.2.1.1-12] RSCH-2011-030、参考[M4.2.1.1-10] RSCH-2011-027、参考[M4.2.1.1-7] RSCH-2011-028、参考[M4.2.1.1-14] RSCH-2012-026

最近の試験から、DMF がマウス及びラット EAE モデルの運動機能を改善することが示された ([Schilling et al., 2006](#)、[Linker et al., 2011](#)、試験番号 RSCH-2011-029 [M2.6.2.3.4]、試験番号 RSCH-2011-030 [M2.6.2.3.5])。また、DMF 投与マウスでは、脱髄、脊髄細胞変性及び酸化による傷害の減少に加え、軸索保護の亢進が示され、DMF は MS モデル動物で神経を保護することが示唆された ([Linker et al., 2011](#)、試験番号 RSCH-2011-030 [M2.6.2.3.5])。EAE モデルの運動機能に

対する DMF の改善効果は、Nrf2^{-/-}マウスでは消失したことから、DMF の治療効果には Nrf2 経路が必須であることが示された (Linker et al., 2011)。

EAE モデルは MS に関連する複数の疾患病理を示すが、このモデルは炎症性であるため、直接的な神経保護作用を評価することは困難である。そこで、DMF の作用機序に神経保護作用を有する可能性を検討するため、マロン酸神経毒性のラットモデルを用いて試験を実施した。マロン酸はミトコンドリア酵素であるコハク酸デヒドロゲナーゼの阻害剤であり、その阻害は、ミトコンドリア機能を不安定化してエネルギー産生を不安定化し、興奮性有害ストレスに対するニューロンの感受性を高め、線条体内の病変として示される急速な神経変性を引き起こす (Fancellu et al., 2003)。DMF 投与動物は、マロン酸誘導病変の体積が有意に減少し (最大 61%)、行動反応が有意に改善し、ニューロン機能の保護が示された (試験番号 RSCH-2011-027 [M2.6.2.3.3])。これらの作用の組織学的関連性については、マロン酸損傷動物におけるニューロン特異的免疫染色によって示され、DMF 投与動物でニューロン保護作用が確認された (試験番号 RSCH-2011-027 [M2.6.2.3.3])。中枢神経系組織に対する直接的な神経保護作用を示す可能性は、MMF が血液脳関門を通過し、血漿中濃度に対する脳脊髄液 (CSF) 中の MMF 濃度が約 24%、脳組織中の MMF 濃度が約 8%であったことから裏付けられた (試験番号 RSCH-2011-027 [M2.6.2.3.3])。有効用量で CSF 中及び脳実質中で達成された MMF 濃度は、アストロサイト及びニューロンを用いた *in vitro* 試験結果に基づき、細胞及び神経保護的であると推測される (試験番号 RSCH-2011-028 [M2.6.2.2.6])。

これらの結果から、DMF がマロン酸誘導性ラット線条体病変体積を減少させ、ほとんど炎症性ではないモデルでニューロン及び行動機能を保護したことから、DMF が *in vivo* で直接的にニューロンを保護したことが示唆された。マロン酸モデルに生じる線条体病変は、ハンチントン病に生じる病変にやや類似しており、神経変性疾患であるハンチントン病の 2 種類の遺伝的モデルを用いた最近の研究から、DMF はハンチントン病病変の改善にも有効であることが示された (Ellrichmann et al., 2011)。これらのデータと様々な疾患モデル動物に Nrf2 活性化の有効性を示した多数の試験結果を併せたすべてで、DMF は Nrf2 経路活性化を介した広範な細胞及び神経保護作用を有することが示唆された (Dumont et al., 2009, Jakel et al., 2007, Chen et al., 2009, Yang et al., 2009, Vargas et al., 2008, Neymotin et al., 2011, Stack et al., 2010)。

DMF の神経保護作用は、クプリゾン/ラパマイシンによって脱髄を起こす神経変性マウスモデルで更に確認された。ヒト MS 病変の一部の側面 (脱髄による軸索切断) に類似するこのモデルでは、DMF 投与は、軸索切断の減少、有髄軸索数の増加及びミエリン超微細構造の改善を示し、有益な効果を示した (試験番号 RSCH-2012-026 [M2.6.2.3.7])。これらの結果は DMF の神経保護作用と一致し、DMF が神経保護作用を有することは、*in vitro* 及び複数のモデルの *in vivo* データを併せた頑健なエビデンスによって更に裏付けられた。

2.4.2.4 受容体結合試験

DMF 及び MMF は 10 及び 30 μM で 76 の測定系（神経関連受容体、リガンド開口性イオンチャネル及び酵素）で評価された。76 の測定系のいずれも有意な影響は認められなかった。

2.4.2.5 安全性薬理試験

2.4.2.5.1 中枢神経系に対する作用

記載箇所：参考[M4.2.1.3-1] 5350/89、参考[M4.2.1.3-2] 5348/89、参考[M4.2.1.3-3] 5356/89、参考[M4.2.1.3-4] 5351/89

BG00012 の中枢神経系に対する安全性薬理プロファイルは、Fumaderm 原薬を用いた試験から得られた ([M2.6.2.5.1])。Fumaderm 原薬は、DMF を主な有効成分（全フマル酸含量中 56%）とする混合物であり、これらの試験の結果は、DMF の薬理作用を包含する。中枢神経系に対する安全性薬理試験は、体温（試験番号 5350/89 [M2.6.2.5.1.1]）、運動量（試験番号 5348/89 [M2.6.2.5.1.2]）、侵害刺激反応（試験番号 5356/89 [M2.6.2.5.1.3]）及び睡眠時間（試験番号 5351/89 [M2.6.2.5.1.4]）に対する影響をマウスで評価した。これらの試験では、464 mg/kg までの Fumaderm（260 mg/kg までの DMF）の単回経口投与後に中枢神経系に有害な作用は認められなかった。また、マウス、ラット、イヌ及びサル毒性試験でも、最大耐量で DMF 投与に関連した神経行動学的変化及び中枢神経系組織変化は認められなかった。

2.4.2.5.2 心血管系及び呼吸器系に対する作用

記載箇所：参考[M4.2.1.3-9] PD03-19、[M4.2.1.3-10] P00012-14-04、[M4.2.1.3-5] PD03-17、[M4.2.1.3-6] PD03-21、[M4.2.1.3-7] PD03-18、[M4.2.1.3-8] PD03-22

イヌを用いた呼吸器系及び心血管系に対する安全性薬理試験は、DMF 経口懸濁液を用いて実施した（試験番号 PD03-19 [M2.6.2.5.2.5]）。その結果、投与後 24 時間の呼吸数及び呼吸波形（胸郭圧）最大値に有害な作用は認められなかった。臨床用量を超える 1000 mg/kg までの投与で、心拍数補正 QT 間隔 (QTc) に DMF の影響は認められず、心電図異常も認められなかった。DMF 及び MMF はまた、in vitro 試験で hERG チャンネル活性を阻害せず（試験番号 PD03-17 [M2.6.2.5.2.1]、試験番号 PD03-21 [M2.6.2.5.2.2]）、摘出イヌプルキンエ線維の活動電位持続時間に影響を与えなかった（試験番号 PD03-18 [M2.6.2.5.2.3]、試験番号 PD03-22 [M2.6.2.5.2.4]）。DMF 懸濁液の経口投与後、心拍数増加及び動脈圧低下が認められたが、イヌにおける嘔吐及び採血による生理学的ストレスを考慮すると、これらの所見の解釈は困難であり、DMF に直接関連した有害作用とは考えられなかった。

2 つ目のイヌの呼吸器系及び心血管系安全性薬理試験では、カプセル製剤で DMF（240 mg）を経口投与した。DMF カプセル製剤 240 mg の動脈圧、心拍数、体温、心電図及び呼吸パラメーター（呼吸数、1 回換気量、分時換気量）への影響を検討した。DMF 投与 2 時間でイヌに嘔吐並びに有害ではない心拍数のわずかな増加及びその後の RR 間隔のわずかな短縮が認められた。体重、動脈圧、体温、第 II 誘導心電図並びに呼吸パラメーター（呼吸数、1 回換気量及び分時換気量）

に影響は認められなかった。

また、心電図は非げっ歯類の重要な反復投与毒性試験で測定された。イヌ 11 ヶ月間試験及びサル 12 ヶ月間試験では、心電図検査で有害な変化は認められなかった。

2.4.2.5.3 皮膚に対する作用（臨床）

記載箇所：参考[M5.3.3.1-3] 109HV106

本剤の臨床経験では、副作用として皮膚の潮紅が確認された。健常人に本剤を投与した試験では、潮紅は血中プロスタグランジン D₂ 代謝物濃度の増加と関連し、潮紅の重症度はアスピリンの予防投与によって減少した（臨床試験番号 109HV106 CSR）。これらのデータから、DMF はニコチン酸（ナイアシン）と同様の機序を介して潮紅反応を発現する可能性があることが示唆された。MMF（DMF の一次代謝物）及びニコチン酸のいずれも、GPR109A と呼ばれる G タンパク質共役受容体を活性化する（Al-Mohaisen et al., 2010、Tang et al., 2008）。角化細胞及びランゲルハンス細胞における GPR109A 発現が皮膚の潮紅反応に関与している可能性がある。GPR109A の活性化によってプロスタグランジン合成が起こり、それによって血管平滑筋が弛緩し、血管拡張及び潮紅を起こすと考えられる（Al-Mohaisen et al., 2010、Hanson et al., 2010）。これらのデータから、MMF による潮紅はナイアシンと共通の機序を介していることが示唆されるが、MMF とナイアシンでは薬物動態、組織透過性及び受容体親和性が異なるため、潮紅の重症度及び持続期間は大きく異なる可能性がある（Tang et al., 2008、Hanson et al., 2010）。

2.4.2.6 まとめ

現在までに実施された非臨床薬理試験では、MS の多面的な病理に対応する DMF の作用機序が示されている。In vitro 及び in vivo 試験の非臨床データ並びに臨床データから、免疫調節及び神経保護の両方の作用機序のエビデンスが得られた。Nrf2 経路の活性化は、これらの作用のほとんどで必須であることが示され、DMF が抗炎症反応及び抗酸化反応を促進するという仮説において最も重要であることが示された。安全性薬理試験で中枢神経系、呼吸器系及び心血管系に直接的な有害作用は認められなかった。

2.4.3 薬物動態

主なげっ歯類及び非げっ歯類で詳細な薬物動態プロファイルを得るため、また毒性試験の TK 評価で適切に測定時点を選択するため、DMF 及び薬理活性を有する一次代謝物 MMF の PK 試験をラット及びビーグル犬で実施した（[M2.6.4.3.1]）。¹⁴C-DMF の in vitro 代謝試験をマウス、ラット、イヌ、サル及びヒトの肝ミクロソーム並びにラット、サル及びヒトの肝細胞で評価した。文献上のフマル酸代謝物の体内動態から予測される体内動態であることを確認するため、¹⁴C-DMF の吸収、分布、代謝及び排泄試験をラットで実施した。フマル酸代謝における TCA 回路の役割は文献上、十分確立しているため、TCA 回路は動物種間で普遍的に保持されていること及び動物実

験の倫理面を考慮し、非げっ歯類ではラットで実施した標識体を用いた動態試験を実施しないこととした。ヒトに¹⁴C-DMFを投与した試験結果は[M2.7.2.2.3.1]に示す。MMFの血漿蛋白結合率は毒性試験動物種（ラット、イヌ及びサル）で測定した。血漿蛋白結合率データは[M2.6.4.4.1]に示す。DMFの反復投与TKは、マウス、ラット、イヌ及びサルで検討し、毒性プログラムにおける用量の確認及び安全域の算出に用いた。

2.4.3.1 分析法

非臨床試験用に様々な生体試料測定法を開発、バリデートした（[M2.6.4.2]）。測定方法は放射能計数法、UV検出-高速液体クロマトグラフィー（HPLC/UV）法、ガスクロマトグラフィー/質量分析法（GC/MS）、水素炎イオン化検出ガスクロマトグラフィー法（GD/FID）又は液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析法（LC/MS/MS）に基づいている。上記測定法のうち、初期のラット及びイヌの単回投与薬物動態試験では、バリデートされたGC/MS又はGC/FID法を用いた。LC/MS/MSによる測定法はマウス、ラット及びイヌ血漿でバリデートされ、MMFの定量下限（LLOQ）は、50 ng/mLであり、各試験の全用量における曝露量を正確に測定するのに十分であった。これらの方法はTK試験に使用された。

LC/MS/MS法は後にDMF分析用にも開発され、MMFに対してさらに改良され、両化合物に対するLLOQは10 ng/mLであった。薬物動態解析は、XXXXXXXXXXソフトウェア（XXXXXXXXXX）、又はXXXXXX等のソフトウェアを活用した線形回帰を用いて行った。血漿中濃度データは、XXXXXXXXXXモデル（XXXXXXXXXX）によるノンコンパートメント解析（NCA）を用いて解析した。

2.4.3.2 吸収

2.4.3.2.1 単回投与薬物動態試験

記載箇所：参考[M4.2.2.2-2] 6072a/90、参考[M4.2.2.2-4] 6072b/90、参考[M4.2.2.7-1] P00012-04-09、
参考[M4.2.2.7-2] P00012-04-15、参考[M4.2.2.7-3] P00012-05-06、参考[M4.2.2.2-1] 9217/95

DMFの吸収及び排泄は、ラット及びイヌにFumaderm原薬〔成分：55.5% DMF、39.8%フマル酸モノエチル塩（MEF）〕又は個々の成分（DMF及びMEF）を単回投与して評価した（試験番号6072a/90 [M2.6.4.3.1.2]、試験番号6072b/90 [M2.6.4.3.1.4]）。Fumaderm原薬はDMFを含有するため、比較目的で本試験に含めた。経口投与後、いずれの被験物質でも血漿中にDMFは検出されず、DMFが急速にMMFに加水分解されたことが示唆された。有効成分（MMFとして測定）の吸収は、ラット及びイヌとも急速で、 t_{max} は0.5～2時間であった。MMFのクリアランスも速く、ラット及びイヌではMMFの終末半減期は1時間未満であった。血漿のほか、MMFはラットの尿、糞、皮膚、肝臓及び腎臓、並びにイヌの尿及び糞中でも測定された。その結果、MMFはラット及びイヌの尿、並びにラットの皮膚にのみ検出された。フマル酸はラット及びイヌの尿及び血漿で測定された。尿、糞、血漿中のフマル酸濃度は、いずれの被験物質を投与した場合でも生理学的範囲を超えて増加することはなかった。これらの結果は、DMFがラット腸灌流液及び腸ホモジネ

ートで速やかに代謝されたことを示した *in vitro* 試験結果と一致している。DMF の分解は、腸灌流液ではカルボキシエステラーゼ、腸ホモジネートではカルボキシ及びコリンエステラーゼによって触媒され、小腸にカルボキシ及びコリンエステラーゼが広く分布している事実と一致した。それに対し MMF は、腸灌流液及び腸ホモジネートでは比較的安定であったが、肝ホモジネートでは速やかに代謝された (Werdenberg et al., 2003)。

本剤は、胃を通過した後に腸管で放出されるようデザインされた腸溶性コーティング錠であるため、DMF 及び MMF をイヌの腸管の各部位に直接投与し、曝露量を比較する試験を実施した。雄ビーグル犬に、外科的に植え込んだポートから十二指腸、空腸、回腸又は結腸に直接 DMF を単回投与した (試験番号 P00012-04-09 [M2.6.4.3.1.5])。DMF (MMF として測定) の吸収プロファイルは、腸管の各部位間で比較的一致していたが、十二指腸及び空腸投与の曝露量 (C_{max} 及び AUC) は回腸及び結腸投与に比べて高い傾向を示した。クリアランス (CL/F) は、回腸及び結腸投与でわずかに高値であった。消失半減期は、腸管の各部位間で比較的一致しており、平均値は 0.679 ± 0.029 時間であった。以上、消化管における腸溶性コーティング錠の放出部位によって吸収及び曝露量が大きく異なるとは予測されないことが示された。

現在の市販製剤の薬物動態及び忍容性は、腸溶性コーティングマイクロ錠を 5、50、75 及び 100 mg/kg の用量でイヌに経口投与して検討した (試験番号 P00012-04-15 [M2.6.4.3.1.6])。AUC_{0-last} は、5、50 及び 100 mg/kg 群間ではほぼ用量比例的に増加した。75 mg/kg 群の AUC_{0-last} は用量比を下回ったが、75 mg/kg 群の複数例に発現した嘔吐に起因するものと考えられた。市販の腸溶性コーティングマイクロ錠はイヌで一貫した薬物動態を示し、平均 CL/F 及び消失半減期 ($t_{1/2}$) に用量依存性は認められなかった。

投与回数を減らすことが可能かどうか検討するため、徐放性製剤を開発し、イヌを用いた非臨床試験で評価した。ビーグル犬にクロスオーバー法で BG00012 市販製剤 (腸溶性コーティングマイクロ錠) 及び 5 種類の徐放性マルチパーティクルのプロトタイプを 75 mg/kg の用量で単回経口投与し、薬物動態を比較した (試験番号 P00012-05-06 [M2.6.4.3.1.7])。In vivo 薬物動態プロファイルは各製剤間で異なっていた。プロトタイプ製剤では、BG00012 市販製剤に比べて、 $t_{1/2}$ の延長、 C_{max} の低下、 t_{max} の延長を示した。市販製剤の t_{max} が約 1 時間であったのに対し、全般的に、プロトタイプ製剤の t_{max} は約 3~4 時間であった。市販製剤の $t_{1/2}$ 及び C_{max} がそれぞれ 0.517 時間及び 6.16 µg/mL であったのに対し、プロトタイプ製剤の $t_{1/2}$ 及び C_{max} はそれぞれ 0.8~3.9 時間及び 0.478~1.010 µg/mL であった。各プロトタイプ製剤のバイオアベイラビリティは市販製剤に対して 43%~64% であった。本試験から、イヌでは、現在の市販製剤がプロトタイプ製剤に比べて最も適した薬物動態及びバイオアベイラビリティ特性を有すると判断された。

MMF の吸収、分布及び排泄も、ラットに MMF 又はフマル酸モノメチルカルシウム塩 (MMF-Ca) を単回経口投与して評価した (試験番号 9217/95 [M2.6.4.3.1.1])。MMF は経口投与後速やかに吸収され、 t_{max} は投与後 0.24~0.25 時間以内に達した。消失も速やかであり、消失半減期は 1.5 時間未満であった。MMF 又は MMF-Ca 塩を単回経口投与した後の MMF 曝露量に差は認められなかった。ラットに曝露量のわずかな性差が認められ、雌の曝露量 (AUC_{0-∞}) は雄の約 1.7 倍高かった。

2.4.3.2.2 反復投与薬物動態試験（トキシコキネティクス試験）

曝露量及び用量反応関係を確認し、曝露マージンの情報を得るため、トキシコキネティクス (TK) はマウス、ラット、イヌ及びサル反復投与毒性試験及びマウス及びラットの 2 年間がん原性試験で評価した (2.4.4.2 及び 2.4.4.4 項)。DMF の反復投与薬物動態は 1 日 1 回又は 1 日 2 回 (イヌ) 投与時の TK 結果から評価した。DMF を反復投与したとき、蓄積性は低い (2 倍未満) ことが示され、総曝露量 (AUC) 及び最大曝露濃度 (急性曝露) (C_{max}) は全動物種で用量とともに増加し、一般的に用量比例的に増加した。MMF 曝露量の性差はラットでのみ認められ、雌の曝露量は雄よりやや高かった。

サルへの低用量の 1 日 1 回投与では、蓄積は認められなかった。以上、TK プログラムから、全毒性試験動物種で、曝露量は一般的に用量比例的であること、性差が限定的であること及び安全域算出に頑健なデータが得られたことが確認された。

2.4.3.3 分布

記載箇所：参考[M5.3.2.1-2] P00012-10-05、参考[M4.2.2.2-5] P00012-07-03

ラット、イヌ、サル及びヒトにおける名目濃度 50、500 及び 5000 nM での MMF の血漿蛋白非結合率を、平衡透析法によって測定した (試験番号 P00012-10-05 [M2.6.4.4.1])。MMF の血漿蛋白結合率は全動物種で低かった (非結合率が 55~100%であった)。ラット、イヌ、サル及びヒトの血漿蛋白結合率に濃度依存性は認められなかった。血漿蛋白結合率は全動物種間で同程度であり、濃度非依存的であったことから、動物種間の比較による曝露マージンの算出に影響はないと考えられた。

雌雄 Long-Evans ラットに ^{14}C -DMF (10 mg/kg) を単回経口投与したときの組織分布を検討した (試験番号 P00012-07-03 [M2.6.4.4.3.1])。 ^{14}C -DMF は経口投与後速やかに吸収され、広範囲に分布した。放射能の最高濃度到達時間は、生殖器周囲脂肪を除く全組織で、初回サンプリング時点の投与 0.5 時間後であった。消化管以外での最高濃度は、排泄器官、腺組織及び脳で観察された。明確な性差は認められず、またメラニン選択的結合性も認められなかった。血中及び血漿中消失半減期は、雄でそれぞれ 105 及び 37.3 時間、雌でそれぞれ 111 及び 47.1 時間であり、放射能の全身クリアランスは比較的緩やかであることが示された。検討した組織で異常な放射能残留は認められなかった。本試験の薬物動態及び放射能測定データから、 ^{14}C -BG00012 を 100 μCi の用量で単回経口投与するヒトの ADME 試験の実施が可能となった。 ([M2.7.2.2.3.1])。

2.4.3.4 代謝

記載箇所：参考[M4.2.2.2-5] P00012-07-03、参考[M4.2.2.4-1] P00012-12-04

^{14}C -DMF の *in vitro* 代謝試験は、マウス、ラット、イヌ、サル及びヒトの肝ミクロソーム並びに

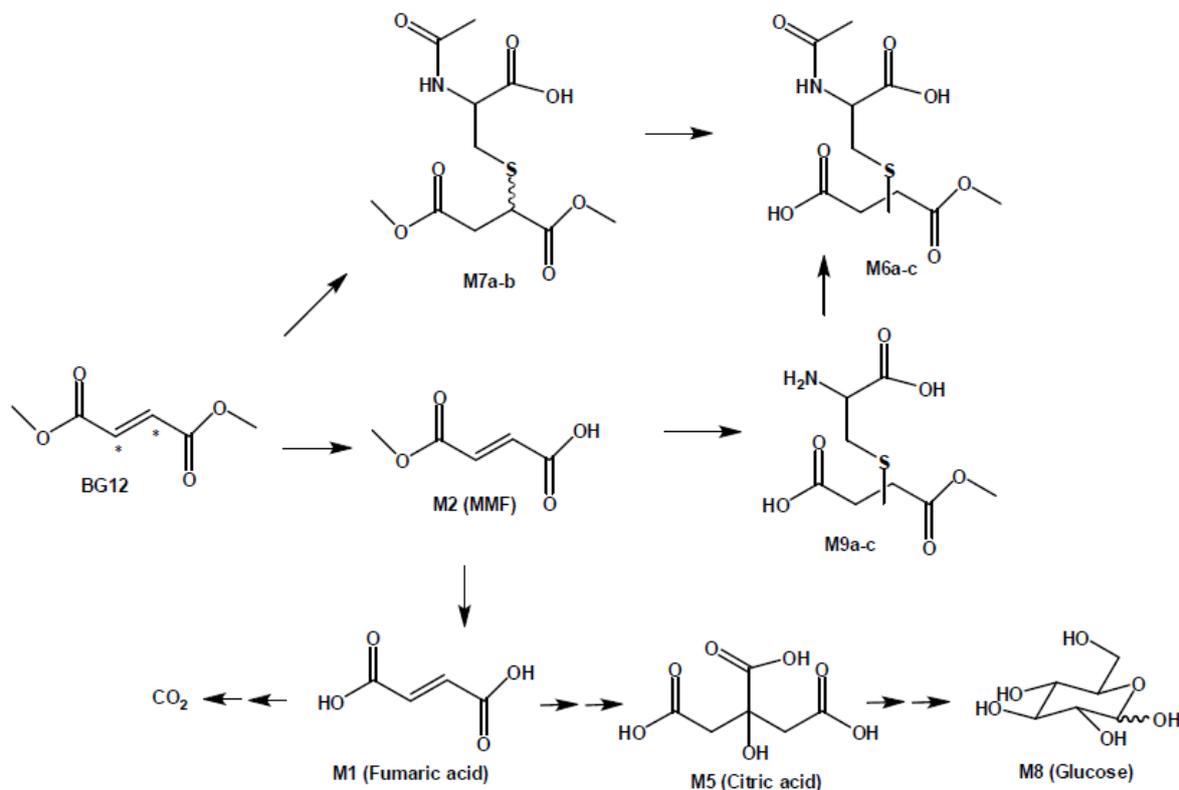
ラット、サル及びヒトの肝細胞で実施した（試験番号 P00012-12-04 [M2.6.4.5.1.1]）。DMFは非臨床動物種及びヒトの肝ミクロソームで速やかに代謝され、10分以内にMMFに完全に変換された。肝細胞浮遊培養系では、 ^{14}C -DMFは複数の経路で代謝された。ミクロソームでは ^{14}C -MMFが急速かつ優勢に生成され、 ^{14}C -DMF及び ^{14}C -MMFのグルタチオン抱合体並びにその他の微量代謝物に変換された。フマラーゼを用いたDMF、MMF及びフマル酸の*in vitro*試験では、非臨床動物種及びヒトで、MMFでもDMFでもなくフマル酸のみがフマラーゼの基質となってTCA回路に入り、 CO_2 及び水に代謝されることが示された。

ラットにおけるDMFの*in vivo*代謝は、 ^{14}C -DMFを用いた組織分布試験で検討した（試験番号 P00012-07-03 [M2.6.4.5.2]）。 ^{14}C -DMFは吸収後広く代謝され、尿中に排泄されたDMF未変化体は投与量の0.2%未満であった。主な尿中放射能成分は、コハク酸モノメチルのシステイン又はN-アセチルシステイン抱合体及びコハク酸ジメチルのシステイン又はN-アセチルシステイン抱合体であり、尿（0～48時間）中へのこれらの排泄は投与量の計10.5%（雄）及び計10.9%（雌）であった。尿中に排泄されたMMFは投与量の1.69%（雄）及び0.56%（雌）であった。

主な血漿中放射能成分はグルコースであり、血漿抽出画分の総放射能（0～72時間）に占める割合は48.8%（雄）及び47.6%（雌）であった。その他の血漿中の主な代謝物はフマル酸及びクエン酸の混合物であり、血漿抽出画分の総放射能に占める割合は計約30.2%（雄）及び計約34.7%（雌）であった。MMFが血漿中総放射能に占める割合は雌雄で0.22%以下であった。残りの血漿中放射能は数種類の微量代謝物であった。代謝プロファイルに明確な性差は認められなかった。

以上、DMFは処理能力が高いエステラーゼによって代謝された後、MMF又はDMFではなく結果的に生成したフマル酸が、遍在性でありよく知られているTCA回路に入って代謝され、内因性の代謝物を生成する。

図3 ラットにおける DMF の推定代謝経路



Data source : [M4.2.2.2-5] P00012-07-03-Appendix 7-Figure 33

2.4.3.5 排泄

記載箇所：参考[M4.2.2.2-3] 5615-554/5、参考[M4.2.2.2-5] P00012-07-03

ラットに 0.3 mg/kg の名目用量で単回経口及び静脈内投与して ¹⁴C-DMF の排泄を検討した（試験番号 5615-554/5 [M2.6.4.3.1.3]）。経口投与 96 時間後までに呼気中に総投与放射能の 68.3%及び 62.9（雌）が排泄され、尿中に 22.3（雄）及び 23.6%（雌）及び糞中に 2.36（雄）及び 3.45%（雌）が排泄された。静脈内投与 96 時間後までに呼気中に総投与放射能の 52.7（雄）及び 58.9%（雌）が排泄され、尿中に 31.2（雄）及び 39.2%（雌）及び糞中に 2.76（雄）及び 2.97%（雌）が排泄された。

ラットに 10 mg/kg の用量で単回経口投与して ¹⁴C-DMF の排泄を検討した（試験番号 P00012-07-03 [M2.6.4.6.1]）。¹⁴C-DMF 由来放射能の主な排泄経路は、¹⁴C-DMF が TCA 回路の最終代謝物 ¹⁴CO₂ として排泄された呼気 (>60%) であった。放射能は尿及び糞中にも排泄され、尿中への平均総排泄率は投与量の 21.7%（雌雄）であり、糞中への平均総排泄率は投与量の 4.39%（雄）及び 3.10%（雌）であった。

2.4.3.6 薬物動態学的薬物相互作用

MMF の CYP 誘導及び阻害試験をヒト肝細胞、ヒト肝ミクロソーム及び遺伝子組換えヒト CYP

分子種を用いて実施した ([M2.7.2.2.3.2.5])。8種類の主なヒト CYP 酵素 (CYP1A2、2B6、2C8、2C9、2C19、2D6、2E1 及び 3A4) に対する MMF の 50%阻害濃度 (IC₅₀) はいずれも 50 μM 超であった。ヒト肝細胞に *in vitro* で MMF を曝露したとき、CYP 1A2、2B6 及び 3A4 酵素活性の顕著な誘導は認められなかった。DMF は、CYP 酵素の基質ではなく、処理能力が高いエステラーゼによって代謝される。MMF はこれらの主な CYP 酵素の基質、阻害剤及び誘導剤のいずれでもないため、ヒトで MMF と他の薬剤との間で CYP 阻害又は誘導による薬物相互作用が生じる可能性は低い。

これらの *in vitro* CYP 誘導及び阻害試験の結果から、DMF の *in vivo* 非臨床薬物相互作用試験は実施しなかった。

P 糖タンパク質 (P-gp) を介したジゴキシン輸送の DMF 又は MMF による阻害活性をヒト P-gp 発現 LLC-PK1 細胞単層培養を用いて検討した[M2.7.2.2.3.2.4]。MMF による P-gp 誘導活性は、肝臓組織提供者 3 例から採取した初代培養ヒト肝細胞で評価した[M2.7.2.2.3.2.4]。試験結果から DMF 及び MMF は P-gp を誘導又は阻害しないことが示された。

2.4.3.7 まとめ

DMF は非臨床試験動物種の消化管から速やかに吸収され、MMF に変換される。¹⁴C-DMF の主な排泄経路は、CO₂ としての呼気であり、次いで尿であった。DMF 及び一次代謝物である MMF は代謝によって速やかに排泄され、腎排泄の関与は少ない。DMF は処理能力が高いエステラーゼによって代謝された後、よく知られている TCA 回路に関与する酵素によって代謝され、全哺乳類に共通する内因性化合物を生成する。代謝プロファイルに明確な性差は認められなかった。ヒトで確認された代謝物はすべてラットでも検出された。

2.4.4 毒性

2.4.4.1 単回投与毒性

記載箇所：参考[M4.2.3.1-1] PD05-27、参考[M4.2.3.1-2] PD05-24、参考[M4.2.3.1-3] PD05-25、
参考[M4.2.3.1-4] PD05-26

DMF の急性毒性プロファイルは、ラット及びマウスを用いた LD₅₀ の推定を含んでおり、316 から 4640 mg/kg の用量で強制経口又は腹腔内 (IP) 投与によって評価された ([M2.6.6.2])。これらのデータの要約を表 4-1 に示す。PK 評価は急性毒性試験では行わなかった。これらの単回投与毒性試験から、その後のげっ歯類を用いた反復投与毒性試験の用量設定を補助する単回投与の忍容性が確認された。

表 4-1 マウス及びラットにおける DMF の急性毒性プロファイル

動物種/投与経路	無毒性量 (mg/kg)	概略の致死量、LD ₅₀ (mg/kg)	
		雄	雌

マウス/強制経口	316	1200	1340
マウス/腹腔内	316	920	990
ラット/強制経口	681	3220	2630
ラット/腹腔内	316	910	910

Data source : [M4.2.3.1-1] PD05-27-Table 1, [M4.2.3.1-2] PD05-24-Table 1, [M4.2.3.1-3] PD05-25-Table 1, [M4.2.3.1-4] PD05-26-Figure 1, Figure 2

非げっ歯類における DMF の急性毒性として、イヌ 3 週間用量漸増／忍容性試験（試験番号 P00012-05-04 [M2.6.6.3.3.1]）で 25 mg/kg 1 日 1 回から 100 mg/kg 1 日 1 回に漸増した最初の 4 日間投与中の 1 日 1 回漸増用量の毒性及びカニクイザル 14 日間投与試験（試験番号 P00012-05-07 [M2.6.6.3.4.1]）で初回投与後の毒性を評価した。イヌでは、50 mg/kg 以上の単回用量で嘔吐、摂餌量の減少及び体重減少が認められた。サルでは、75 mg/kg までの単回投与に十分な忍容性が認められた。

2.4.4.2 反復投与毒性

以下の DMF の反復投与毒性試験を実施した。

- マウス（2年間のバイオアッセイの用量設定試験）、ラット（亜慢性及び慢性毒性試験）、イヌ（亜慢性毒性試験）及びサル（忍容性及び慢性毒性試験）の経口懸濁液
- イヌの経口カプセル製剤（忍容性及び慢性）

試験の概要を表 4-2 に、詳細を [M2.6.6.3] に示す。

表 4-2 反復投与毒性試験

試験番号	動物種	投与期間	GLP 適用	投与量 (mg/kg)	経口投与法	無毒性量 [無影響量] (mg/kg)
P00012-04-02	マウス	28 日間	適	0, 50, 100, 250, 400	強制/懸濁液	100 (雌のみ) - (雄) ^a
P00012-04-10	マウス	3 ヶ月	適	0, 50, 200, 400	強制/懸濁液	- ^a
P00012-04-01	ラット	3 ヶ月	適	0, 50, 100, 250, 500	強制/懸濁液	- ^a
P00012-04-06	ラット	6 ヶ月	適	0, 25, 100, 200	強制/懸濁液	- ^a
P00012-05-04	イヌ	3 週間	非適用	25, 50, 75, 100 QD 37.5, 50, 62.5 BID	経口/カプセル	NA ^d
P00012-04-05	イヌ	4 週間	適	0, 50, 100, 250	強制/懸濁液	- ^a
P00012-05-05	イヌ	11 ヶ月	適	0, 25, 75/50 ^b (12.5, 25, 37.5 mg/kg BID)	経口/カプセル	5
P00012-05-07	サル	2 週間	非適用	0, 5, 25, 75/100/125 ^c	強制/懸濁液	NA
P00012-05-08	サル	12 ヶ月	適	0, 5, 25, 75	強制/懸濁液	[5]

Data source : [M4.2.3.2-1] P00012-04-02-SUMMARY, [M4.2.3.2-2] P00012-04-10-10.4.2 Justification of Dose Level Selection, [M4.2.3.2-3] P00012-04-01-CONCLUSION, [M4.2.3.2-4] P00012-04-06-SUMMARY, [M4.2.3.2-5] P00012-05-04, [M4.2.3.2-6] P00012-04-05, [M4.2.3.2-7] P00012-05-05-SUMMARY, [M4.2.3.2-8] P00012-05-07, [M4.2.3.2-9] P00012-05-08-Conclusions

^a無毒性量は最低投与量における前胃の変化のため求められなかった。

^b投与量は、不妊性のため 75 から 50 mg/kg に減量された。

^c投与量は、忍容性を検討するため 75 から 125 mg/kg に増量した。

^dNA : 忍容性試験のため該当せず

マウス及びラットの反復投与毒性試験における無毒性量は、全投与群で前胃にげっ歯類に特異的な変化が認められたため特定されなかった。反復投与毒性試験における標的器官として、前胃（マウス及びラット）、精巣（ラット及びイヌ）及び腎臓（マウス、ラット、イヌ及びカニクイザル）が特定された。これら反復投与毒性変化を以下に要約する。これらの反復投与毒性試験は GLP に準拠して実施された。

2.4.4.2.1 反復投与毒性試験における経口投与の忍容性

記載箇所 : [M4.2.3.2-3] P00012-04-01、[M4.2.3.2-6] P00012-04-05、[M4.2.3.2-7] P00012-05-05、

参考[M4.2.3.2-8] P00012-05-07

ラットを用いた 3 ヶ月間反復投与毒性試験では、DMF の経口投与は 500 mg/kg/日の用量における忍容性が不良であり、この投与群は早期終了された（試験番号 P00012-04-01 [M2.6.6.3.2.1]）。

イヌを用いた 4 週間反復投与毒性試験では、DMF 懸濁液の経口投与は、100 mg/kg/日を超える用

量で認められた持続的嘔吐のため、忍容性が不良であった(試験番号 P00012-04-05 [M2.6.6.3.3.2])。イヌを用いた 11 ヶ月間慢性毒性試験は、臨床カプセル製剤の投与 1 週間目に持続的嘔吐及び体重減少のため、高用量群の用量を 75 mg/kg/日から 50 mg/kg/日に減量した(試験番号 P00012-05-05 [M2.6.6.3.3.3])。投与 1 週間目の 75 mg/kg/日群の体重は、プラセボ対照群と比較して、雄で約 16%、雌で約 12.3%減少した。カニクイザルを用いた 2 週間忍容性試験では、カニクイザルにおける DMF の経口投与による最大耐量が 75 mg/kg/日と確認された(試験番号 P00012-05-07 [M2.6.6.3.4.1])。

2.4.4.2.2 反復投与毒性試験における前胃の変化

記載箇所：[M4.2.3.2-2] P00012-04-10、[M4.2.3.2-3] P00012-04-01、[M4.2.3.2-4] P00012-04-06

前胃(無腺胃)は、マウス及びラットを用いた DMF の毒性試験で標的器官として確認された(試験番号 P00012-04-10 [M2.6.6.3.1.2]、P00012-04-01 [M2.6.6.3.2.1]、P00012-04-06 [M2.6.6.3.2.2])。前胃の変化が全 DMF 投与群で認められたことから、無毒性量は特定できなかった。高頻度で認められた変化は、胃重量の増加、過形成、角化亢進、炎症及び潰瘍であり、両動物種とも完全な可逆性又は可逆的傾向が認められた。ラットにおける 3 ヶ月間反復投与毒性試験で高用量群の雄 30 例中 1 例及び高用量群の雌 30 例中 1 例の前胃に扁平上皮癌が認められた。

げっ歯類の前胃は、刺激作用を促進する様々な生体異物又は生理的動揺によって増殖性病変又は癌が形成される可能性があり、感受性が高い部位と考えられる(Wester and Kroes, 1988, Miwa et al., 1994)。食道に直接つながる無腺部の前胃は、げっ歯類及び反芻類に認められ、ヒト、非ヒト霊長類、その他の非げっ歯類哺乳動物では、解剖学的又は機能的に前胃に相当する組織はない(Proctor et al., 2007)。これら後者の動物種における食道の重層扁平上皮はげっ歯類の前胃と組織学的に類似しているが、大きな違いもあるげっ歯類の前胃は角化扁平上皮であるが、非げっ歯類哺乳動物の食道は非角化扁平上皮である(Proctor et al., 2007)。組織学的に類似点があるにもかかわらず、非げっ歯類哺乳動物(イヌ及びサル)に DMF を長期投与しても、食道及び腸管に有害な作用は認められなかった。さらに、臨床では、本剤は、食道又は胃ではなく、腸管内で分解されて DMF が放出されるようデザインされた腸溶性コーティングマイクロ錠として投与される。以上、解剖学的又は機能的に前胃に相当する組織がヒトにはないこと、また、イヌ及びサルを用いた慢性毒性試験では食道及び胃腸管に刺激性変化が認められないことから、げっ歯類の前胃に認められた変化とヒトでのリスクの関連性は非常に低いことが示される。

作用機序の観点から、げっ歯類では、既知の Nrf2 活性化剤であるブチルヒドロキシアニソールを高用量で投与したマウスに類似した前胃病変が認められており(Moch, 1988)、また、Nrf2 抑制性のアダプタータンパク質である Keap1 の遺伝子欠損により Nrf2 を恒常的に活性化しているマウスで食道及び前胃に重度の角化亢進が認められている(Wakabayashi, 2003)。これらのデータを、Nrf2 活性化剤である DMF による前述の変化と合わせると、前胃は Nrf2 活性化に対する感受性が高く、毒性反応が促進される可能性が考えられる。

前胃は、げっ歯類及び反芻類の食餌を保持・貯蔵する器官であることを考慮する必要がある、

摂食飼料及び経口投与物質は、前胃の細胞と接触している時間が長くなる。非常に高濃度の被験物質の長時間曝露（吸収、初回通過代謝及び生体内分布の前）は、比較的生理学的な一過性の全身曝露条件では生じない細胞及び組織の反応を促進する可能性がある。本剤投与後に高濃度のDMFに直接長時間曝露される可能性のある組織又は器官はヒトには存在しないため、ヒトに消化管病変及び消化管癌を生じる可能性との関連性及びリスクは極めて低いと判断された。

2.4.4.2.3 反復投与毒性試験における精巣の変化

記載箇所：[M4.2.3.2-7] P00012-05-05、[M4.2.3.5.1-1] P00012-04-03

精巣の変化は、C57BL6 マウス 28 日間毒性試験及びラット・イヌを用いた長期毒性試験で認められた。

マウスにおける精巣の変化は DMF 毒性試験に用いた 2 系統のうち 1 系統にのみ認められた。C57BL6 マウス 28 日間毒性試験では精巣及び精巣上体の精子肉芽腫が全投与量で認められた。C57BL6 より汎用されている CD-1 マウスのより長期の 13 週間試験及び 2 年間がん原性試験では、これらの精巣変化は認められなかった。C57BL6 の精巣変化は、CD-1 マウスでは認められない系統特異的な変化であった。

イヌを用いた 11 ヶ月間毒性試験（試験番号 P00012-05-05 [M2.6.6.3.3.3]）では、精巣及び精巣上体の重量の減少は、病理組織学的検査により、臨床推奨用量（RHD）の約 3 倍の曝露量で精巣に認められた精細管の変性及び RHD の約 7 倍の曝露量で精巣上体に認められた精液減少症と関連性が認められた。これらの変化は、体重減少の認められたイヌ、特に投与開始後最初の数週間で初期体重の 15%以上の体重減少が認められた高用量群で認められた。精巣の変化は、飢餓、熱ストレス、外科処置、又は局所傷害と関連して雄イヌに好発する変化であるため（Russell et al., 1990）、直接的な精巣毒性と混同される可能性がある（Goedken, 2008）。精巣の変化は、28 日間の休薬期間後に両投与群で発現率／程度が減少したことから、投与中止により回復する傾向が示唆された。DMF に関連した変化はサルに認められなかった。

軽微から軽度の多巣性間（ライディヒ）細胞過形成がラットを用いた雄授胎能試験（試験番号 P00012-04-03 [M2.6.6.6.1]）で DMF 群の精巣に認められたが、精子形成及び受胎能に対する有害な作用は認められなかった。投与に関連した間細胞の過形成は、投与期間が 6 ヶ月までの成熟ラットの他の反復投与毒性試験及び幼若ラットの反復投与毒性試験（試験番号 P00012-12-02 [M2.6.6.6.6.1]）では認められなかった。ラットを用いた 2 年間がん原性試験では精細管の変性並びに間細胞の過形成及び腺腫が認められた。これらの考察は 2.4.4.2 項に示す。

精巣の変化は、イヌの精巣に認められた可逆的な変化（RHD の 3～7 倍の曝露マージン）、イヌにおける精巣の変化に伴う交絡的な体重減少、サルでは精巣の変化が認められなかったこと、及びラットでは受胎能に影響が認められなかったことから、ヒトでのリスク評価に関連するものとは判断されなかった。雄授胎能試験において、ラットの精子形成に生物学的に投与と関連性のある変化は認められなかった。精巣の変化は、雄生殖器への DMF の影響に注目した幼若動物試験で

は認められなかった。幼若動物の生殖器は毒物に対する感受性が高いため、幼若ラットの雄生殖器に DMF の影響が認められなかったことはヒトでのリスクが低い可能性を示す。

2.4.4.2.4 反復投与毒性試験における腎臓の変化

記載箇所：[M4.2.3.2-3] P00012-04-01、[M4.2.3.2-4] P00012-04-06、[M4.2.3.2-7] P00012-05-05、
[M4.2.3.2-9] P00012-05-08

反復投与毒性試験（[M2.6.6.3]）では、マウス（重量のみ）、ラット、イヌ及びサル（*Macaca mulatta*）の腎臓に DMF に関連した変化が認められた。尿細管に関連した変化及び非尿細管に関連した変化は、投与期間及び動物種により広範であったが、尿細管上皮の再生は反復投与毒性試験に用いた全動物種で認められた。

反復投与毒性試験で DMF に関連して腎臓に認められた変化の可逆性は、ラット、イヌ及びサルを用いた 6～12 ヶ月間投与を行った慢性毒性試験（試験番号 P00012-04-06 [M2.6.6.3.2.2]、試験番号 P00012-05-05 [M2.6.6.3.3.3]及び試験番号 P00012-05-08 [M2.6.6.3.4.2]）でも、休薬（1 ヶ月間の回復期間）によって明らかに認められた。サルを用いた 12 ヶ月間慢性毒性試験では、回復性試験の高用量群（曝露量は RHD の約 6 倍）の雄 2 例に間質の線維化が認められた（試験番号 P00012-05-08 [M2.6.6.3.4.2]）。

ラットを用いた 3 ヶ月間反復投与毒性試験（試験番号 P00012-04-01 [M2.6.6.3.2.1]）では、軽微～軽度の尿細管の好塩基性変化の発現率に用量依存的な増加が認められた。本試験で腎臓に認められた変化は、用量依存的な変化であると判断されたものの、尿細管に対する DMF の直接的な作用であるのか、慢性進行性腎症が DMF によって促進された結果によるものかどうかは不明であった。ラットを用いた 6 ヶ月間反復投与毒性試験（試験番号 P00012-04-06 [M2.6.6.3.2.2]）では、雄に加齢性腎症の発現率／程度の増加と関連した腎臓重量の用量依存的な増加が認められた。腎症に典型的に関連しないその他の腎臓の変化として、皮質尿細管の変化〔びまん性拡張（雄のみ）、硝子滴沈着、上皮細胞の核又は細胞の肥大、分節性上皮再生〕及びボーマン嚢壁側上皮細胞の肥大が認められ、雄では発現率／程度の両方の増加が認められた。回復性試験で認められた DMF に関連した腎臓の変化の種類及び程度は、投与終了時に認められた変化と全般的に類似していたが、発現率は一部の投与群で減少した。腎臓の変化は、RHD と同程度の曝露量で認められた。表 4-3 に示すように、DMF に関連した腎臓の変化が認められなかった曝露量は RHD 未満であった。

表 4-3 投薬に関連した腎臓の変化に対する安全域

動物種 試験番号 試験の種類	投与 期間	腎臓の変化	無毒性量(mg/kg) ^a			動物の AUC _{0-t} (µg·hr/mL)			AUC に基づく安全域 ^{ab} 480 mg BG00012/日 (240 mg BID)
			雄	雌	雌雄 ^c	雄	雌	平均	
ラット P00012-04-06 毒性試験	6 ヶ月 間	腎症	25 ^d	25 ^d	25 ^d	2.4	4.1	3.3	0.39
		皮質尿細管の変化	25 ^d	25 ^d					
		尿細管上皮の再生	25 ^d	25 ^d					
イヌ P00012-05-05 毒性試験	11 ヶ月 間	皮質尿細管の変化	5 ^d	5 ^d	5 ^d	5.7	7.0	6.4	0.77
		尿細管上皮の再生	5	75/50					
		皮質実質萎縮	5 ^c	25					
		腎乳頭炎症細胞浸潤	25	25					
		腎乳頭尿路上皮過形成	5 ^d	5					
カニクイザル P00012-05-08 毒性試験	12 ヶ月 間	尿細管上皮の再生	25	5	5	2.3	2.7	2.5	0.30
		尿細管上皮の単細胞壊死	5	5					
		間質性線維化 ^c	75/50	75/50					
マウス P00012-05-03 がん原性試験	2 年間	腺腫/癌 ^e	75	200	75	9.8	10.8	10.3	1.25
ラット P00012-04-11 がん原性試験	2 年間	尿細管腺腫/癌 ^e	150	50	50 ^f	8.7	16.6	12.7	1.5
		尿細管腺腫/癌 (PWG 見解) ^e	150	150	150 ^g	30.8	37.6	34.24	4.15

Data source :

[M4.2.3.2-4] P00012-04-06- Appendix P-Section II, Appendix S-Table 3

[M4.2.3.2-7] P00012-05-05-Appendix 20-Table 3, Appendix 22-Table 2

[M4.2.3.2-9] P00012-05-08- Appendix I—Table 6, Appendix F-Table 2A, Table 2B, Table 2C

[M4.2.3.4.1-1] P00012-05-03 -Appendix 20-Table 4, Appendix 14-Table 1

[M4.2.3.4.1-2] P00012-04-11- Appendix 13-Section 1, Appendix 14-Table 5.2.1, Appendix 19-Table 4

[M5.3.3.3-1] 109HV108-Table 5

^a 変化はこの用量で有害とは考えられなかった。

^b 臨床試験番号 109HV108 240 mg BID の日本人の平均 AUC_{0-24hr}=8.235 mg·hr/L を用いて計算した。

^c 投薬と関連した影響が認められなかった雌雄の最高用量 (mg/kg)

^d 試験における最低用量を示した。最低用量でも変化が認められた。

^e 腺腫/癌は合算で解析された。

^f 癌 (悪性腫瘍) の発現が認められなかった用量

^g PWG 及び統計解析評価によって確定された無毒性量

イヌを用いた 11 ヶ月間毒性試験 (試験番号 P00012-05-05 [M2.6.6.3.3.3]) では、腎皮質尿細管の拡張 (びまん性)、皮質内側の尿細管上皮細胞の肥大、尿細管上皮の分節性再生、皮質実質の萎縮、腎乳頭の炎症細胞浸潤及び腎乳頭尿路上皮細胞の過形成等、DMF 投薬に関連した組織学的変化が腎臓に認められた。腎臓に認められた変化の発現率/程度は、1 ヶ月間の休薬期間後には低下が認められたことから、回復傾向が示唆された。

サルを用いた 12 ヶ月間毒性試験では、投薬に関連した変化は腎臓に限定された (試験番号 P00012-05-08 [M2.6.6.3.4.2])。雌雄腎臓の平均重量は、単細胞壊死及び皮質尿細管上皮細胞の再

生の病理組織学的変化と関連して増加した。4週間の休薬期間後に病理組織学的検査で腎臓に認められた変化は最終剖検時と類似していたが、一部の投与群で発現率／程度が減少したことから、回復傾向が示唆された。しかし、回復性試験の高用量群の雄2例で軽度～中等度の間質の線維化が認められ、軽度～中等度の尿細管萎縮を伴っていた。雄2例中1例で腎線維化はBUN及びクレアチニンの増加と関連した。

動物で尿細管に変化が認められたことから、DMFを用いてラットにおける腎損傷バイオマーカーを検討する探索的試験を実施した(2.4.4.8.2項)。これらの試験より、ラットでは早期に発症した腎症のため複雑な結果となったが、ラットにおけるDMFの投与初期に関連した腎臓の変化と尿中アルブミンが関連する可能性が示された。

以上、動物へのDMFの反復経口投与後、腎臓は複数の動物種の用量、投与期間及び動物種に依存した標的臓器であった。腎尿細管の再生は全動物種に共通して認められ、可逆性であることが示された。全般的に、イヌ及びサル腎臓の変化(試験番号P00012-05-05 [M2.6.6.3.3.3]及び試験番号P00012-05-08 [M2.6.6.3.4.2])は、反復投与の中止により可逆的な傾向を示した。腎臓の変化の曝露マージンは低かったが、臨床試験では類似した腎障害の徴候はなかった。

全般に、現在の市販後データでは本剤がヒトの腎尿細管に対する直接的な毒性と関連するエビデンスは得られていない。このことは臨床開発プログラムで観察されたことと一致する。それでもなお、腎障害は可能性のある重要なリスクのままであり、綿密な市販後調査は継続して行う。血液生化学的検査(クレアチニン及びBUN等)及び腎機能及び障害の高感度で特異的なマーカー(尿中マイクロアルブミン及び β 2ミクログロブリン)を含む尿検査を含めて広範な腎臓のモニタリングを本剤開発期間の臨床試験において行った。血清クレアチニンの軽度の低下及び蛋白尿の発現率の軽度の増加(240 mg TID)が本剤投与で観察されている。これらの変化は臨床的に意義のある腎臓の後遺症とは関連しなかった。プラセボ対照MS試験で推算糸球体濾過量(eGFR)の新たに完了した解析では、投与の最初の4週間以内にプラセボと比べて本剤投与でeGFRの軽度の増加が認められ、2年間の観察期間の終了まで持続したことから、本剤は腎機能に有害な影響がないことが示唆された(臨床試験109MS303)。また、ミクログロブリン(近位尿細管障害の高感度のバイオマーカー)への影響が認められなかったことから本剤の4年間投与で進行性腎尿細管障害のエビデンスはなかった。

乾癬治療に用いられるFumadermはフマル酸ジメチル(56% w/w)及び3つの有効成分(フマル酸モノエチルカルシウム塩、マグネシウム塩及び亜鉛塩)を含有する。DMFは活性代謝物フマル酸モノメチル(MMF)に代謝され、3つのフマル酸モノエチル(カルシウム塩、マグネシウム塩及び亜鉛塩)はフマル酸モノエチル(MEF)に代謝される。本剤とFumadermは成分が異なるが、本剤は単一の有効成分DMFを含有する。Fumadermの市販後データは、腎不全、急性腎不全又は腎機能不全の様々な基本語(PT)にコーディングされた重篤な腎症例数は極めて少なく、バックグラウンド発現率以内であった。これらの症例のほとんどで入手可能なデータが限られていることから、腎不全なのか腎機能障害なのか、病変の程度、高血圧、脱水又は併存疾患の有無等の交絡因子が全般的に存在するか否かについて確認することは困難である。

2.4.4.3 遺伝毒性

記載箇所：[M4.2.3.3.1-1] 5403/89、[M4.2.3.3.1-3] 5405/89、[M4.2.3.3.1-4] 5407/89、[M4.2.3.3.1-5] P00012-04-16、[M4.2.3.3.1-2] P00012-08-02、[M4.2.3.3.1-6] P00012-08-03

ICH S2A ガイドライン及び S2B に準拠して、DMF は *in vitro* 及び *in vivo* 遺伝毒性試験で評価された。また、MMF も *in vitro* 試験で評価された。

DMF は、細菌及び哺乳類細胞を用いた変異原性試験のいずれでも陰性であった (Ames 及び V79 細胞、試験番号 5403/89 [M2.6.6.4.1]、試験番号 5405/89 [M2.6.6.4.3])。DMF に関して培養ヒト末梢血リンパ球における 2 種類の染色体異常試験を実施し、同様の結果を得た (試験番号 5407/89 [M2.6.6.4.4]、試験番号 P00012-04-16 [M2.6.6.4.5])。いずれの試験でも、染色体異常は、代謝活性化系の非存在下、DMF の細胞毒性濃度でのみ観察された。DMF は *in vivo* ラット小核試験で陰性であった。一次代謝物 MMF は、細胞毒性濃度では、細菌 (Ames) 変異原性試験で陰性及び培養ヒト末梢血リンパ球における染色体異常試験で陽性であった (試験番号 P00012-08-02 [M2.6.6.4.2]、試験場号 P00012-08-03 [M2.6.6.4.6])。DMF 及び MMF の *in vitro* 試験における染色体異常陽性は、細胞毒性濃度 (分裂指数 50%未満、細胞生存率低下) でのみ観察され、被験物質の遺伝毒性の可能性を示すものではない。

完了した遺伝毒性試験の結果から、DMF 及び MMF は遺伝毒性を示さなかった。

2.4.4.4 がん原性

記載箇所：[M4.2.3.4.1-1] P00012-05-03、[M4.2.3.4.1-2] P00012-04-11

2年間がん原性試験は、ラット及びマウスを用いて DMF の 1 日 1 回強制経口投与によって実施した ([M2.6.6.5])。ICH の S1C ガイドラインに準拠して、これらの試験における高用量は、各げっ歯類における 3 ヶ月間毒性試験の結果に基づいて選択した。ラットがん原性試験では、150 mg/kg/日及び 100 mg/kg/日群の雄は、生存率が低かったため、それぞれ投与 86 週目及び 88 週目に打ち切られた。マウス試験では、投与は、高用量群 (600 mg/kg/日) で投与 6~8 日目に毒性により中断された。投与 9 日目に用量を 400 mg/kg/日に減量して投与は再開され、生存率の減少により、3 週間早く (投与 101 週目) 打ち切られた。DMF 投与に関連した発がん性は、ラット及びマウスで前胃、精巢 (ラット) 及び上皮小体 (ラット、腎不全に起因したものと考えられる) 及び腎臓に認められた。2年間げっ歯類がん原性試験の結果の概要を表 4-4 に示す。

表 4-4 DMF を用いたげっ歯類がん原性試験において腫瘍性に関連した変化

部位	ラット (雄/雌)					マウス (雄/雌)				
	0	25	50	100	150	0	25	75	200	600/400 ^a
腎臓 尿細管腺腫	0/0	0/0	1/0	1/0	0/2 ^c	1/0	2/0	0/0	5/2	3/4 ^b
腎臓 尿細管癌	0/0	0/0	0/0	0/1	0/2 ^c	0/0	0/0	2/0	4 ^b /0	3 ^b /1
胃 乳頭腫	0/0	22 ^b /11 ^b	24 ^b /21 ^b	46 ^b /31 ^b	49 ^b /24 ^b	0/1	1/0	3/3	12 ^b /6	14 ^b /16 ^b
胃 線維肉腫	-	-	-	-	-	0/0	0/0	0/0	0/0	1/2
胃 癌	0/0	5 ^b /1	18 ^b /4	51 ^b /30 ^b	58 ^b /48 ^b	0/0	1/1	0/1	2/5 ^b	6 ^b /12 ^b
胃 平滑筋肉腫	-	-	-	-	-	0/0	0/0	0/0	0/0	3/3
上皮小体 腺腫 ^d	0/0	0/0	1/0	0/0	3/0	-	-	-	-	-
精巣 間細胞腺腫	3	3	2	9 ^b	19 ^b	-	-	-	-	-

Data source : [M4.2.3.4.1-1] P00012-05-03-Appendix 14-Table 1, Appendix 15-Table 5.2.1, Appendix 15-Table 5.2.2, [M4.2.3.4.1-2] P00012-04-11-Appendix 13-Section 1, Appendix 14-Table 7.1, Appendix 14-Table 7.2

^a9 日目投与開始時の忍容性のため、投与量は 600 mg/kg/日から 400 mg/kg/日に減量された。

^b対照群との pair-wise 比較による統計的有意差

^c対照群との pair-wise 比較による腺腫及び癌合算の統計学的有意差

^d腎不全に起因する (Silver et al., 1997)

2.4.4.4.1 胃の変化の関連性

前胃の腫瘍は、(1) ヒトの胃にはげっ歯類の前胃に相当する器官が存在せず、(2) 反復投与毒性試験における非げっ歯類のヒトと関連する組織に変化が認められず、(3) 本剤は、酸性 pH での薬剤の放出を抑制し、小腸上部への曝露が制限されている放出制御製剤であるため、げっ歯類に特異的であり、ヒトでのリスクには関連しないと判断された。2.4.4.2.2 項で考察したように、ヒトとげっ歯類の間には解剖学的及び生理学的差異が存在するため、前胃で認められた腫瘍性変化をヒトでのリスク評価を目的として解釈することは困難である。Proctor et al., 2007 により考察されているように、前胃上皮の慢性刺激に関連した前胃腫瘍、特に反復強制経口投与により発生するものは、ヒトのリスクには関連しない。

2.4.4.4.2 精巣の変化の関連性

記載箇所 : [M4.2.3.2-10] P00012-07-02

ラットでは、間細胞 (ライディヒ細胞) 過形成の程度・発現率の増加及び間細胞腺腫の発現率の増加が精細管上皮の変性及び萎縮と共に DMF を投与した雄に認められた。ラットに観察された精巣の増殖性変化はラットに特異的であり、そのためヒトへのリスクに対する懸念は限定的であると判断された。同様の変化は、マウス 2 年間がん原性試験では観察されなかった。この変化は、ラットの 6 ヶ月間毒性試験又はマウスの 3 ヶ月間毒性試験のいずれにも観察されなかった。サルの 1 年間慢性毒性試験では、DMF 投与に関連した変化は精巣又は精巣上体に観察されなかった。イヌの 11 ヶ月慢性毒性試験では、精巣病変 (精細管変性、巨細胞及び精巣上体の精子減少) が観

察されたが、イヌにおける変化は体重減少に起因するものであり、増殖性変化ではなく、4週間の休薬期間終了時には回復傾向が観察された。

表 4-5 雄ラットにおける精巣の変化の要約

試験	DMF の投与量 (mg/kg/日)	生殖器の変化
12 週間幼若毒性	50, 140, 375	精巣の変化なし
13 週間毒性	50, 100, 250, (500)	精巣の変化なし (500 mg/kg 群は 7 日目に終了した)
26 週間毒性	25, 100, 200	精巣の変化なし
受胎能	75, 250, 375	75 mg/kg 以上で多巢性間細胞過形成
3 ヶ月間併用毒性	100	精巣の変化なし
2 年間がん原性	25, 50, 100, 150	100 mg/kg 以上で精巣の変性、精巣上体の萎縮、間細胞の過形成及び腺腫

げっ歯類はヒト及び他の動物種と比べて間細胞腫を発生しやすい。このげっ歯類固有の感受性は、ラットの間細胞における黄体形成ホルモン (LH) 受容体の過多や、視床下部-下垂体-性腺軸における負のフィードバック機構を介した LH の産生過剰によって、LH 刺激の小さな変化に対する感受性が高まる機序を介したものである。ラットでは多数の環境要因、食物及び医薬品によってアンドロゲンシグナリングが低下すると、間細胞の増殖性病変を発生させることが知られているが、ヒトは、ラットと比べて、LH 活性の変動に対する感受性が低いと考えられる (Cook 1999)。とくに、精巣の変化は、感受性がより高い週齢で雄生殖器系への影響に注目した雄幼若ラット毒性試験では認められなかった。

ヒトでは精巣間細胞腫瘍はまれ (0.00004%) であり、ほとんどの場合、良性であり、性索間質細胞に由来する。前立腺癌治療中に精巣を摘出された患者及び市販後調査からの疫学データでは、検出頻度のバイアスを補正しても間細胞腫瘍の増加は認められていない (Cook et al., 1999, Clegg et al., 1997)。また、ラットに間細胞腫瘍を誘発する低特異性又は低活性の抗アンドロゲン薬 (例；シメチジン、アトルバスタチン、カルシウムチャネルブロッカー等) に対する疫学データは、曝露患者における間細胞腫瘍の増加は裏付けられていない。

MS 患者は最大 4 年間まで本剤投与を受けている。この曝露期間はヒトにおける悪性腫瘍の評価に十分ではないが、精巣に関連する有害事象の発現率は低く (1%未満)、プラセボ投与と同様であった。精巣に関連する有害事象の重症度は軽度で投与との関連性なしと判断された。さらに、精巣腫瘍の有害事象は報告されていない。

2.4.4.4.3 腎腫瘍の関連性

記載箇所：[M4.2.3.4.1-2] P00012-04-11、[M4.2.3.4.1-1] P00012-05-03

がん原性試験では、少数のマウス及びラットが DMF の生涯投与後に腎腫瘍を発生した。病理組織学的評価の追加評価結果から、ラット及びマウスの腎尿細管上皮に DMF による細胞毒性は認められなかった。遺伝毒性がないことと合わせて細胞毒性がないことから、DMF がラット又はマウスの腎臓に直接的ながん原性の影響を示す可能性は低いことが示唆される。その代わり、両動物種で、げっ歯類に特異的な加齢性腎疾患である慢性進行性腎症（CPN）と生物学的に意義のある増殖性腎病変の間に関連性が認められた。マウス及びラットに最もよくみられる腎臓の変化は腎症である。知られている作用機序に基づき、DMF の生涯経口投与によるげっ歯類における低頻度の腎腫瘍は CPN の悪化に起因したものと考えられた。CPN はげっ歯類に特異的であり、ヒト又は他の非げっ歯類には関連しないため、ヒトに腎腫瘍が発生する可能性は低いと考えられる。動物における腎臓の変化に関する曝露マージンは低かったが、現在までの臨床経験では、本剤投与被験者はプラセボ投与被験者に比べて腎臓の有害事象のリスクが高くなかった。動物における腎毒性及びがん原性並びにこれらのヒトでの関連性は以下で更に考察する。

DMF のラット 2 年間がん原性試験では、腎腫瘍は、加齢性疾患である CPN の DMF による悪化の結果として発生したと考えられた。このことは、ラットがん原性試験で採取された腎臓切片の国際 Pathology Working Group（PWG）による独立した病理組織学的再評価結果によって裏付けられた。本試験では、CPN に起因する死亡率の増加が高用量の雄に認められた。CPN は、ラットに高頻度で発現する加齢性腎疾患であり、がん原性試験の解釈を困難にする可能性がある（Seely and Hard, 2008）。CPN は、初期では他の要因によって発現する尿細管変性と組織学的に類似しており、進行期では尿細管腫瘍発現率のわずかな増加と関連している。腎臓のげっ歯類発がんモデルでは、生体異物による傷害は、代償的再生と共に、腫瘍発生において自然発生的な加齢性腎症と相まって影響すると推定される。DMF 投与後のラットの腎臓に、代償的再生と一致して細胞増殖マーカー Ki67 発現の増加が観察された（2.4.4.8.2.2 項）。ラットでは、腎過形成及び腎腫瘍の両発現率は、CPN の発現率／程度の増加と関連した（表 4-6）。

ラットにおける腺腫及び癌を含む多くの増殖性病変は、形態学的に自然発生性（両染性の空胞化）で投与に関連しないと判定された。PWG の再評価結果では、ラットがん原性試験報告書の評価結果で報告された投与に関連した尿細管過形成及び腫瘍から両染性の空胞化を除いて評価された。

げっ歯類と非げっ歯類の間には、がん原性リスクの評価時に考慮すべき毒性変化及びそれに続発する諸変化に差異がある（Cohen et al., 2003）。ラットでは、加齢性腎症の悪化が腎腫瘍発生に関連する可能性が高い。げっ歯類の加齢性腎症に相当する疾患がヒトにはみられないため（Hard et al., 2009）、ラットの腎腫瘍とヒトでのリスクの関連性は低いと考えられる。

表 4-6 ラットに認められた DMF による慢性進行性腎症（CPN）及び腎過形成・腎腫瘍の悪化

性別	雄					雌				
投与量 (mg/kg/日)	0	25	50	100	150	0	25	50	100	150
腎症 (合計)	68	75	75	75	75	49	55	68	69	73
重症度平均スコア ^a	2.04	2.71	3.16	3.52	3.53	0.95	1.32	1.84	2.44	3.24
腎臓 尿細管 過形成	0	5	5	15	11	0	0	4	4	9
重症度平均スコア ^a	0.0	0.11	0.13	0.44	0.35	0.0	0.0	0.11	0.05	0.21
腎臓 尿細管腺腫	0	0	1	1	0	0	0	0	0	2
腎臓 尿細管癌	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2

Data source : [M4.2.3.4.1-2] P00012-04-11-Appendix 13-Section 1, Appendix 13-Section 2

^a重症度スコア : 0 = なし、1 = 軽微、2 = 軽度、3 = 中等度、4 = 重度

マウスの特に雄では、腎尿細管上皮細胞過形成及び腎腫瘍の発現に関連した DMF 投与による加齢性腎症の重症度の増悪も観察された。しかし、増悪の程度はラットの場合ほど顕著ではなかった。マウスにおける増悪は、表 4-7 に示すように、重症度グレードごとに発現率を表した場合に最も明らかであった。

高用量群では、投与量の減量前に早期死亡例がみられたため、当該群の腎症発現動物数が低くなっている可能性があることに注意する必要がある。雌マウスでは、腎症の発現率/重症度は雄ほど明確ではなく、腎腫瘍の発現率の有意な増加に必要な DMF の用量は 400 mg/kg/日であり、200 mg/kg/日の用量で発現率が増加した雄と比べて高かった。

表 4-7 マウスに認められた DMF による慢性進行性腎症（CPN）及び腎過形成・腎腫瘍の悪化

性別	雄					雌				
投与量 (mg/kg/日)	0	25	75	200	400 ^a	0	25	75	200	400 ^a
腎症 (合計)	68	69	72	72	58	69	70	72	69	66
重症度平均スコア ^b	2.19	2.19	2.33	2.92	2.78	2.07	1.71	2.01	1.93	2.20
腎症 (軽微)	18	14	8	3	2	13	34	14	21	13
腎症 (軽度)	21	30	35	12	19	41	25	45	34	29
腎症 (中等度)	27	23	26	45	27	12	8	11	12	22
腎症 (重度)	2	2	3	12	10	3	3	2	2	2
腎臓 尿細管 過形成	1	7	16	40	15	0	7	8	13	13
重症度平均スコア ^b	0.01	0.13	0.25	0.71	0.32	0.0	0.12	0.11	0.23	0.27
腎臓 尿細管腺腫	1	2	0	5	3	0	0	0	2	4
腎臓 尿細管癌	0	0	2	4	3	0	0	0	0	1

Data source : [M4.2.3.4.1-1] P00012-05-03-Appendix 14-Table 1

^a死亡例の発現により 600 mg/kg/日の投与量は投与 6 日目に中止され、投与 9 日目に 400 mg/kg/日の投与量で再開された。

^b重症度スコア : 0 = なし、1 = 軽微、2 = 軽度、3 = 中等度、4 = 重度

ラットと同様に、加齢性腎症の悪化がマウスにおける腎腫瘍発生に関連している可能性が高い。2年間がん原性試験における腺腫及び癌の独立した専門家の国際 PWG による再評価で、直接的な細胞毒性が組織学的に認められないことが示されたことから、間接的な機序が腎尿細管腫瘍の発生に関与していることが示唆される。腎尿細管の増殖性変化の発生率増加は、加齢性腎症の重症度増加と密接に関連しており、DMF に直接的な細胞毒性及び遺伝毒性がないことを踏まえると、このことは腎症の重症度増加がマウスにおける腎腫瘍発生の背景となっていることを示す。マウスの加齢性自然発生性慢性進行性腎症は、実験ラットでよく報告されている加齢性腎疾患である CPN と形態的に類似している。高用量の DMF で腎症の重症度が高くなる動物が多いことから、DMF 投与は加齢性腎症を悪化させる。慢性腎症はげっ歯類特異的であるため、マウスにおける慢性腎症の悪化による腎腫瘍は、ヒトとの関連性がほとんどないか又はないと考えられる。

2.4.4.2.4 項に考察したように、現在まで、DMF 投与被験者では、腎臓又は尿事象のリスクは増加していない。したがって、げっ歯類特異的な腎症の影響及び本剤投与 MS 患者では DMF に関連した尿細管への影響がみられないことから、げっ歯類に観察された腎腫瘍とヒトでのリスクの関連性は低いと考えられる。

2.4.4.4.4 2 年間がん原性試験における上皮小体過形成の関連性

ラットでは、上皮小体過形成の発現率にわずかな増加が DMF 投与群に認められ、雄 4 例が上皮小体腺腫を発生した。これは腎不全によるものと考えられる。ラットでは、進行性腎症はカルシウム及びリン酸のホメオスタシスの腎性の動揺を引き起こし、これが上皮小体ホルモン (PTH) の持続的な産生過剰を誘発し、上皮小体のびまん性過形成及び腺腫を発生させる (Silver et al., 1997)。

2.4.4.4.5 第 III 相多発性硬化症 (MS) 試験及び市販後における悪性腫瘍

MS の海外プラセボ対照試験 (臨床試験番号 109MS301 及び 109MS302 の 2 年間の併合成績) では、悪性腫瘍の全発現率は低く、本剤群とプラセボ群間で発現率は類似していた (プラセボで 1% 未満、240 mg BID で 1% 未満、240 mg TID で 1% 未満)。アジア地域及び他の国々で実施した 109MS305 試験 (パート 1) では、プラセボ群の 1 例のみに悪性疾患が報告された。[M2.7.4.2.3.7.1]

本剤投与患者で報告された悪性腫瘍の種類と発現率は米国一般集団及び臨床開発プログラムで観察されたものと類似している。本剤の臨床試験 (完了した試験及び進行中の長期継続試験) における悪性腫瘍の総発現率 [基底細胞癌 (BCC) 及び扁平上皮癌 (SCC) を除く] は US Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) プログラム及び Global Burden of Cancer Study (GLOBOCAN) における悪性腫瘍の総発現率と比較して低かった。入手可能なデータに基づき、本剤投与と関連して悪性腫瘍のリスクが増加することを示唆するエビデンスはない。悪性腫瘍は中核医薬品リスク管理計画 (RMP) に重要な潜在的リスクとして含まれており、通常の医薬品安全性監視手順に

従って綿密なモニタリングを継続する予定である。

2.4.4.4.6 Nrf2 経路及び腫瘍発生の促進に関する文献調査

記載箇所：[M4.2.3.2-3] P00012-04-01、参考[M4.2.2.2-2] 6072a/90、参考[M4.2.2.2-4] 6072b/90、
[M5.3.3.2-1]109MS101、参考[M4.2.1.1-4] RSCH-2011-024、[M4.2.1.1-8] RSCH-2011-025

Nrf2 経路の活性化は腫瘍発生の促進と関連しているが、エビデンスの重み付けから、ヒトにおいて DMF 投与の結果生じると期待される当該経路活性化の程度は、腫瘍発生を促進するには十分ではないことが示唆されている。Nrf2 に関する文献報告では、経路の活性化の程度により、その活性化の有益な効果と有害な効果の両方が確認されている (DeNicola et al., 2011, Maher and Yamamoto, 2010, Baird and Dinkova-Kostova, 2011)。Nrf2 経路は、動物種間で高度に保持されており、解毒及び酸化ストレスに対する保護作用に重要な経路である。Nrf2 依存性タンパク質の発現は、毒物及び発がん物質の除去に重要である。結果的に、Nrf2 経路の活性化は毒物又は発がん物質への曝露に対する保護作用を生じる (Lau et al., 2008)。Nrf2 経路は、細胞保護の多くの異なる重要な側面を制御する能力を有しているが、活性化が低すぎる場合には毒性への感受性が高くなり腫瘍発生が促進される可能性がある一方で、Nrf2 の活性化が過剰に亢進し、腫瘍細胞内に下流遺伝子が発現過剰している場合には、過形成が起こり腫瘍発生が促進される可能性がある (Lau et al., 2008, Maher and Yamamoto, 2010)。Nrf2 経路の恒常的な活性化は、ヒト及び動物で確認されている遺伝的及びエピジェネティックな機構から生じる可能性がある。その結果生じる抗酸化反応の高レベルの活性化は、発生中の腫瘍に酸化ストレスに対するより高い抵抗性を与える適応機構を介して、腫瘍発生を促進することが示されている (Lau et al., 2008)。Nrf2 制御タンパク質である Keap1 又は Nrf2 自身に変異が確認されており、これらの変異は経路の恒常的な活性化を引き起こし、肺、頭部、頸部、食道及び皮膚における腫瘍発現と関連している (Taguchi et al., 2011, Hayes and McMahon, 2009)。

Nrf2 の過剰な活性化の影響は、フマル酸ヒドラターゼ欠損症として知られる希少遺伝疾患でも注目されている。フマル酸ヒドラターゼは、フマル酸のリンゴ酸への変換に関与している酵素であり、この反応は TCA 回路の極めて重要な過程である。フマル酸ヒドラターゼ欠損症患者は、フマル酸を代謝できないため、フマル酸の組織中濃度が著しく増加し (腫瘍組織では正常値の 500 倍まで、Pollard et al., 2005)、2 型乳頭状腎細胞がん及びおそらく成人間 (ライディヒ) 細胞腫瘍等、数種の腫瘍を発生しやすくする (Launonen et al., 2001, Tomlinson et al., 2002, Lehtonen et al., 2006, Alam et al., 2003, Carvajal-Carmona et al., 2006)。これらの研究では、これらの患者由来の事実上すべての腫瘍は、野生型フマル酸ヒドラターゼ遺伝子の体細胞不活性化が生じ、野生型酵素活性は通常 10%未満に低下しており (Alam et al., 2003)、腫瘍組織でフマル酸濃度が約 500 倍増加した (Pollard et al., 2005) ことが示された。

細胞内のフマル酸レベルの著しい増加が腫瘍発生を促進する機構は不明である。発がん性の HIF1 α 経路の活性化によるものであることを示す報告もあるが (Isaacs et al., 2005, Pollard et al., 2005, Pollard et al., 2007, Sudarshan et al., 2007)、恒常的に高いフマル酸濃度が Nrf2 経路を高度に活性

化し、上述の Nrf2 又は Keap 1 変異と類似した腫瘍発生の促進を生じるという HIF1 α が関与しない機序を提唱する文献報告もある (Ooi et al., 2011、Adam et al., 2011)。250 mg/kg/日の用量で DMF を 3 ヶ月間投与したラット (臨床用量曝露の約 3 倍、AUC) の腎臓の転写プロファイリングからは、HIF1 α 転写活性化遺伝子のアップレギュレーションは示されなかった (試験番号 P00012-04-01 [M2.6.6.3.2.1])。

腫瘍発生を促進する機序であるかどうかにかかわらず、本剤による Nrf2 経路の活性化の程度は有益であるが有害ではない必要がある。1) DMF 投与後のフマル酸の組織中濃度及び 2) Nrf2 経路の恒常的な活性化に対する DMF 投与による Nrf2 活性化の程度を踏まえると、上記の因子がヒトの腫瘍発生に関連する可能性は低い。本剤投与患者における組織中のフマル酸濃度は直接測定されていないが、他のデータから推測することが可能である。ラット及びイヌに DMF を単回投与した後、尿、糞及び血漿中フマル酸濃度は生理学的範囲を超えて増加することはなく (試験番号 6072a/90 [M2.6.4.3.1.2]、試験番号 6072b/90 [M2.6.4.3.1.4])、フマル酸ヒドラターゼ欠損症患者から採取した腫瘍組織中の報告されたフマル酸濃度約 72,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Pollard et al., 2005) と比較して、投与患者における血漿中の最高 MMF 濃度は約 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ である (C_{max} 、試験番号 109MS101 [M2.7.2.3.3.2])。投与された薬剤すべてが (240 mg BID) フマル酸として組織中に分布したとしても、フマル酸は半減期が短いため、フマル酸濃度はフマル酸ヒドラターゼ欠損症に関連した腫瘍組織中濃度よりも著しく低いと概算される。DMF 投与がこの希少疾患における腫瘍に関連したフマル酸曝露に近づくとは予測されないため、DMF が Nrf2 経路を活性化させる程度は著しく低いと予想される。

最後に、DMF の非臨床試験データは、投与後の薬物濃度が Nrf2 経路の最大活性化に必要な濃度をはるかに下回っていることを示している。Nrf2 経路は活性化のダイナミックレンジが大きく、in vitro 試験における幅広い MMF 濃度範囲で濃度比例的及び依存的な活性化 (0.4~65 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 試験番号 RSCH-2011-024 [M2.6.2.2.3])、及び in vivo 試験における幅広い DMF 経口用量範囲で用量比例的及び依存的な組織中の活性化 (15~500 mg/kg ; 推定血漿中 C_{max} は、2~32 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 試験番号 RSCH-2011-025 [M2.6.2.3.1]) が観察されている。これらの試験では試験用量で Nrf2 活性化レベルのプラトーを確認できなかったことから、恒常的な活性化のレベルは、試験用量又は濃度における到達レベルを超え、神経変性疾患のヒト及び動物モデルの臨床用量 (240 mg BID) 及び曝露量を超えることが示唆される。したがって、本剤投与患者における Nrf2 活性化の程度は、Nrf2 経路の恒常的な活性化により到達される活性化の程度より著しく低いことが予想される。1日2回の本剤投与から予想されるパルス状の活性化及び MMF の 1 時間未満の短い消失半減期を考え合わせると、遺伝的又はエピジェネティックな Nrf2 経路の恒常的な活性化又はフマル酸ヒドラターゼ欠損症における慢性的な過剰フマル酸曝露により生じるような常時活性化されたままの状態が、本剤投与によって持続する可能性は低いと考えられる。

高レベルの Nrf2 活性化が腫瘍発生を促進するにもかかわらず、過去 10 年間の多くの試験がこの経路の活性化による化学発がん抑制作用を報告していることは興味深い (Kwak and Kensler, 2010)。Nrf2 活性化により生体異物を解毒する能力が亢進するため、たばこの煙にみられるよう

な推測上の発がん物質は発がん性カスケードを開始する前に中和される可能性がある (Boutten et al., 2011)。また、複数の非臨床試験で、DMF が黒色腫の増殖及び転移を抑制することが示されており (Valero et al., 2010、Loewe et al., 2006)、現在この領域における臨床試験が検討されている。

2.4.4.5 生殖発生毒性

生殖発生毒性評価は DMF の強制経口投与によりラット及びウサギで実施された (表 4-8)。雌雄受胎能試験はラット、胚・胎児発生試験は妊娠ラット及びウサギ、出生前及び出生後の発生試験はラットを用いて評価した。ウサギは、全哺乳類に共通する遍在性の代謝経路 (エステラーゼ及び TCA 回路) による DMF の生殖発生に及ぼす影響を評価するのに適した動物種である。これらの試験における曝露は、フル TK プロファイル (ウサギ発生毒性試験) 又は投与後曝露の 1 時点での確認のいずれかにより評価された。雄の受胎能試験では曝露解析を行わなかった。しかし、他の GLP 毒性試験で同様に投与された雄ラットの曝露データでかなり補完可能である。反復投与毒性試験と同様に、生殖毒性試験で認められた DMF に関連した変化は、胃腸系に対する局所変化、すなわちラットにおける母動物の体重減少、体重増加抑制及び摂餌量減少、これらに付随した胎児体重減少、骨化遅延 (発生変化を考慮) 並びにウサギの流産率の増加であった。これらの変化はすべて、DMF 懸濁液の強制経口投与に起因する二次的な母動物毒性の結果であると考えられ、腸溶性コーティングカプセルを投与するヒトでは影響は緩和されると考えられる。

表 4-8 DMF で実施された生殖発生毒性試験

試験番号	動物種 試験の種類	投与量 (mg/kg)	投与期間
P00012-04-03	Sprague Dawley ラット 雄授胎能	0, 75, 250, 375	70 日間 + 同居期間
P00012-10-01	Sprague Dawley ラット 雌受胎能	0, 25, 100, 250	21 日間 同居前+ DG7
P00012-06-02	Sprague Dawley ラット 胚・胎児発生	0, 25, 100, 250	11 日間 DG7~DG17
P00012-06-01	New Zealand White ウサギ 胚・胎児発生	0, 25, 75, 150	13 日間 DG7~DG19
P00012-09-02	Sprague Dawley ラット 出生前及び出生後の発生	0, 25, 100, 250	35 日間 DG7~DL20

DG : 妊娠日齢、DL : 授乳日齢

2.4.4.5.1 受胎能

記載箇所 : 参考[M4.2.3.5.1-1] P00012-04-03、[M4.2.3.5.1-2] P00012-10-01

DMF は雌雄ラット受胎能のいずれにも有害な影響を示さなかった（試験番号 P00012-04-03 [M2.6.6.6.1]、試験番号 P00012-10-01 [M2.6.6.6.2]）。雄では、軽微～軽度の間細胞過形成が全用量で精巣に観察されたが、受胎能パラメーターへの影響はみられなかった。雌では、体重減少、体重増加抑制及び摂餌量減少が高用量で観察された。高用量群で、14日間当たりの性周期の平均回数が有意に減少し、発情休止期が雌 5 例で延長したが、これらの変化は受胎能又は生存胚数に影響は及ぼさなかった。ラットの受胎能に関する無毒性量は雄で 375 mg/kg/日（109HV108 臨床試験における日本人被験者の曝露量 AUC に基づく安全域は 2 倍）及び雌で 100 mg/kg/日（4 倍）と判断された。また、幼若ラット毒性試験で、発育期間中の DMF 投与による受胎能の変化は認められなかった（試験番号 P00012-14-02 [2.6.6.6.6.2]）。

2.4.4.5.2 胚・胎児発生

記載箇所：[M4.2.3.5.2-1] P00012-06-02、[M4.2.3.5.2-2] P00012-06-01

DMF の胚・胎児発生試験はラット及びウサギで実施された。これらの試験における DMF 用量は、Fumadarm 原薬を用いて実施された試験データに基づいて設定された。いずれの動物種でも胎児奇形は認められなかった。

ラットでは、全ラット試験で観察された DMF に関連した変化と同様に、母動物で体重増加抑制及び摂餌量減少が観察された（試験番号 P00012-06-02 [M2.6.6.6.3]）。高用量では、これらの変化に、胎児の体重減少及び胎児の変異（中足及び後肢指骨の骨化の有意な減少）の増加を伴った。これらの変化は、母動物への毒性に起因し、新生児の成長及び生存には影響を与えないと予測される。また、これらの変化は発生変異と考えられ、胎児奇形は認められなかった。ラット母動物に関する無毒性量は 25 mg/kg/日と判断された。高用量の曝露量で胎児体重の減少及び胎児変異の増加が観察されたことから、発生に関する無毒性量は 100 mg/kg/日と判断された。発生に関する無毒性量 100 mg/kg/日は 109HV108 臨床試験の日本人被験者で RHD（240 mg BID）の約 4 倍の曝露量である。

妊娠ウサギでは、DMF の経口投与は、75 mg/kg/日以上用量、すなわち約 7 倍に相当する曝露量で、体重減少及び体重増加抑制が観察され、150 mg/kg/日の用量、すなわち 109HV108 臨床試験の日本人被験者における用量 240 mg の 1 日 2 回投与の約 16 倍に相当する曝露量で、母動物への毒性により流産率の増加（20%）が認められた。ウサギ母動物に関する無毒性量は 25 mg/kg/日と判断された。胎児発生への影響は認められず、発生に関する無毒性量は高用量である 150 mg/kg/日と判断された（試験番号 P00012-06-01 [M2.6.6.6.4]）。

2.4.4.5.3 出生前及び出生後の発生毒性

記載箇所：[M4.2.3.5.3-1] P00012-09-02

出生前及び出生後の発生毒性試験（試験番号 P00012-09-02 [M2.6.6.6.5]）の用量は、DMF のラット胚・胎児発生試験における忍容性データに基づいて選択された。本試験の高用量は母動物毒

性（体重減少）がみられることが予想された。F0 世代ラットで、体重減少及び体重増加の一過性の抑制が、前胃における剖検所見と共に観察されたが、この結果は、同様の用量の他のラット反復投与試験の結果と一致している。

出生児に観察された唯一の DMF に関連した影響は、高用量における体重の有意な減少であり、その他の自然分娩及び胎児観察に変化は認められなかった。250 mg/kg/日群で、離乳時の F1 世代雄で体重が有意に減少したことを反映して、包皮分離日が有意に遅延した（溶媒対照群で平均日数 47.1 日に対して、高用量群で 49.7 日）。250 mg/kg/日群で、包皮分離日の平均体重は、雄で対照群と比較して減少し（対照群よりも 5%の減少）、膣開口は F1 世代雌ラットでは 250 mg/kg/日まで遅延しなかった。

F1 世代雌雄ラットで、受動的回避行動試験で評価された学習、短期記憶、長期記憶、及び反応抑制に統計学的に有意又は生物学的意義のある差は認められなかった。水迷路試験で、雄の 1 及び 2 回目セッションにおける潜時は、250 mg/kg/日群で、対照群と比較して有意に増加した。完了に身体運動が必要になる水迷路試験の潜時における影響は、250 mg/kg/日群の雄の成長遅延と関連し、母動物への影響によるものであった。発育遅延の認められた 250 mg/kg/日の F1 雄に水迷路完了時間（潜時）の有意差が認められたが、母動物への影響によるものと判断された。運動能力への依存性が少ない受動的回避行動試験に変化が認められなかったことから裏付けられた。また、25 mg/kg/日以上群の雌における 2 回目セッション中の学習基準に達するまでの試行数に有意な増加が認められた（ $P \leq 0.05 \sim P \leq 0.01$ ）。しかし、誤反応数には有意差が認められず、2 回目セッションで成功した試行数が減少した全群で記憶は同等であった。F1 世代の雌雄ラットで評価された交尾及び受胎能パラメーターに関しては、統計学的に有意な又は生物学的に重要な影響は観察されなかった。さらに、幼若ラット毒性試験における神経行動学的検査〔詳細な観察（FOB）、驚愕反応、運動量及び Biel 型水迷路〕により、DMF は神経行動学的機能に影響を与えないことが裏付けられた（試験番号 P00012-14-02 [2.6.6.6.6.2]）。生殖毒性試験の現在最良の実施法に従って、出生前及び出生後の発生試験における出生児に薬物が検出されなかったため、乳汁分析は行わなかった。非臨床における乳汁分析は変動が大きく、ヒトの状態を反映せず、ヒトのリスク管理に対する貢献度は大きくないというのが現在の業界見解である。

DMF の生殖発生への影響は、受胎能試験、胚・胎児発生毒性試験及び出生前及び出生後の発生毒性試験により全般的に評価された。その結果、DMF に催奇形性はなく、雌雄受胎能に影響を与えないことが示された。認められた変化（胎児体重減少、骨化遅延、発育並びに雄の性成熟の遅延及び流産の増加）は、母動物の毒性用量でのみ認められたことから、ヒトでのリスクとなる可能性は低いと考えられる。

2.4.4.6 局所刺激性試験

独立した局所刺激性試験は実施しなかったが、局所刺激性は DMF の経口投与毒性試験の全試験で評価された。DMF を懸濁液として経口投与した後、マウス及びラットで前胃に影響が認められた。イヌ又はカンクイザルの食道又は胃腸管に DMF の直接的な影響は認められなかった。本剤

は、ゼラチンカプセルに腸溶性コーティングマイクロ錠を充填したものであり、皮膚及び粘膜表面と直接相互作用するリスクは低いと考えられる。腸粘膜への放出及び腸粘膜に対する刺激性についてはイヌ及びサルとの反復毒性試験で十分に評価された。

2.4.4.7 光安全性試験

DMF は半減期が短く、眼及び有色皮膚に分布・蓄積せず、メラニン結合性を示さず、DMF 及び代謝物である MMF は、光反応性の懸念となる波長 (290 nm~700 nm) の範囲外の 209.9 nm で単一の UV 波長に吸収性を示すため、光毒性を示す条件に当てはまらない。また、網膜変性はマウス 2 年間がん原性試験の DMF 投与群で認められたものの対照群でも認められ、他のマウス (3 ヶ月)、ラット (3 及び 6 ヶ月)、イヌ (11 ヶ月)、サル (12 ヶ月) 並びにラットがん原性試験) における眼科学的検査及び病理組織学的検査で眼に変化は認められなかった。以上、DMF は光毒性を示す条件に当てはまらないため、光安全性試験を実施しなかった。

2.4.4.8 その他の毒性試験

2.4.4.8.1 毒性学的薬物相互作用試験

記載箇所：[M4.2.3.2-10] P00012-07-02、[M4.2.3.2-11] P00012-07-01

ラット及びサルを用いて DMF とメトトレキサート (MTX) の 3 ヶ月間併用投与毒性試験を実施した (試験番号 P00012-07-02 [M2.6.6.8.1.1]、P00012-07-01 [M2.6.6.8.1.2])。DMF 及び MTX の代謝経路は異なるが、毒性の標的器官は共通している。これらの試験ではいずれの化合物による影響にも悪化は認められなかったことから、安全性を裏付ける情報が得られた。

2.4.4.8.2 ラットにおける腎毒性バイオマーカー探索試験

臨床用量における曝露量と近似した曝露量で全毒性試験動物種に腎毒性が観察されたため、臨床試験で腎臓の早期変化を検出するためのバイオマーカーの有用性を考慮すると、DMF に関連した初期の腎障害と関連する非侵襲性バイオマーカーを特定することが、ヒトのリスクを評価するために非常に重要であると判断した。したがって、DMF の腎毒性の有望な非侵襲性バイオマーカーを検討するため、ラットを用いた探索試験を実施した。これらの試験の実施時、偶然ではあるが、Critical Path Institute の Predictive Safety Testing Consortium (PSTC) が FDA 及び EMEA に非臨床及び臨床評価で尿中バイオマーカーの推奨を支持するデータを提出していた (Dieterle et al., 2010)。探索試験では、PSTC が推奨した尿細管損傷の尿中バイオマーカーのうち、尿中アルブミン、 β -N アセチルグルコサミニダーゼ (NAG)、 β 2 ミクログロブリン (β 2M) 及び KIM-1 の 4 種類を評価した。また、この試験では、細胞増殖マーカーである Ki-67 による腎臓の免疫組織化学的評価も行った。DMF 特異的な影響から加齢性腎症による影響を排除するため、げっ歯類の加齢による影響が現れない比較的短期間の投与により DMF の腎毒性をより良く明らかにすることが重要であった。また、短期間の投与で病変を確認できた場合は、休薬による可逆性を明らかにし、第 III 相臨床試験に適切なモニタリング方法を組み込めるように、腎臓の病理組織学的変化が認め

られる前又は同時に毒性を検出できる非侵襲性かつ信頼できるマーカーが存在するかどうか検討することが重要であった。これらの試験の詳細は[M2.6.6.8.2]に示す。

2.4.4.8.2.1 ゲンタマイシンを用いた評価法開発試験

記載箇所：参考[M4.2.3.7.7-1] PD08-03

最初の非 GLP14 日間パイロット試験の目的は、既知の腎毒性陽性物質であるゲンタマイシンと関連する尿細管毒性の尿中バイオマーカーを検討することであった（試験番号 PD08-03 [M2.6.6.8.2.1]）。また本試験では、DMF による腎障害が早期に発生するか否かを検討するため、比較的高用量の DMF の短期投与も行った（250 mg/kg の 1 日 1 回強制経口投与、又は比較のため、1 日の投与量が同じ 83 mg/kg の 1 日 3 回強制経口投与）。期待通り、ゲンタマイシンは、14 日間投与期間後に BUN、クレアチニン及び腎臓重量を有意に変化させた。また、4 種類の尿蛋白マーカーすべてが対照値に比べて増加した。ゲンタマイシンを投与したラットの腎臓の病理組織学的評価では、広範で軽度～中等度の尿細管障害が主に皮質全体の近位尿細管、並びにこれより低い程度で皮髄境界部に沿った直尿細管及び集合管に認められた。この変化は、障害に応答した細胞増殖の増加に一致した Ki-67 陽性細胞数の有意な増加（溶媒対照群と比較して）を伴った。

一方、DMF の 14 日間投与で血清 BUN、クレアチニン、又は腎臓の絶対及び相対重量に有意な変化は認められなかった。DMF の初回投与後、尿量及び尿比重に急性の変化が認められたが、投与 8 及び 14 日目ではこれらの変化は認められなかった。尿蛋白マーカーでは、初回投与（250 mg/kg）後のみ、NAG 及び KIM-1 のわずかな一過性の増加が認められた。これらのパラメーターの増加が、部分的に、投与 1 日目に記録された尿量減少又は尿細管機能に対する急性の影響によるものであるか否かは不明である。

DMF に特異的な組織学的所見として、主として腎皮質の外側 2/3 の領域の近位尿細管に軽微～軽度の多巢性の核肥大が認められた。この変化は、しばしば核クロマチンの辺縁化及び核小体の不明瞭化を伴う 1 個以上の角状ないしブロック状の核を有する近位尿細管上皮細胞を特徴とした。ゲンタマイシンの投与後に認められた尿細管細胞変性、壊死又はその他の尿細管障害の徴候は認められなかった。また、14 日間の投与期間後の腎皮質又は尿細管の Ki-67 細胞染色では、DMF 投与による溶媒対照群からの有意な増加は認められなかった。総合すると、ラットに DMF を 14 日間投与した後の病理組織学的変化及び尿蛋白マーカーの評価は、腎毒性が認められなかったことと一致している。

本試験では、尿中アルブミン、NAG、β2M 及び KIM-1 の変化は、既知の腎毒性物質であるゲンタマイシンによる尿細管損傷と関連した。また、本試験の用量及び投与方法では、DMF に関連した腎変化の発現には 14 日間を超える期間を要することが示された。

2.4.4.8.2.2 ラットを用いた 14 週間腎バイオマーカー試験

記載箇所：[M4.2.3.2-12] P00012-08-01

本 GLP 試験の目的は、ラットで尿中アルブミン、 β 2M 又は KIM-1 が DMF による腎障害と関連するかどうかを検討することであった（試験番号 P00012-08-01 [M2.6.6.8.2.2]）。

腎臓に DMF に関連した初期段階の変化が起こると予測されたことから、本試験の試験期間は 14 週間に設定した。高用量の 250 mg/kg/日は、雄ラットを用いた受胎能試験で尿細管再生が認められた。他の 2 用量は 100 mg/kg 1 日 1 回及び 50 mg/kg 1 日 2 回とした。この試験では、病理組織学的検査として腎臓の標準的なヘマトキシリン・エオジン染色及び Ki67 の免疫組織化学染色を行った。

本試験では、DMF の 14 週間投与により、雄に分節性尿細管上皮の再生が認められたが、雌には認められなかった。病理組織学的病変と関連して、Ki67 免疫染色陽性の増加、及び尿中アルブミン濃度の増加が認められた。尿中アルブミンの増加は、投与 42 日目の早期に認められた。4 週間の休薬期間後には、Ki67 免疫染色陽性は減少し、分節性尿細管再生が回復する傾向がみられた。しかし、尿中アルブミン濃度は、完全には回復しなかった。本試験は、尿中アルブミンがラットにおける DMF による腎障害のバイオマーカーとして確認され、重要な結果が得られた。

2.4.4.8.2.3 ラットを用いた腎バイオマーカーの経時変化及び可逆性

記載箇所：参考[M4.2.3.7.7-2] P00012-09-01

本試験の目的は、リアルタイムに腎障害を評価するバイオマーカーとして尿中アルブミンを用い、DMF による腎病変の投与中止後の可逆性を検討することであった（試験番号 P00012-09-01 [M2.6.6.8.2.3]）。ラットに 100 mg/kg/日の DMF を 71 日間投与し、3 日間休薬後、剖検実施 24 時間前の投与 75 日目に最終投与を行った。投与中止時期を決定するため、尿中アルブミンを繰り返し測定した。本試験では、全例（対照群及び投与群）に CPN が発症し、また DMF に関連した組織学的変化は比較的わずかであり、可逆性に関して評価することはできなかった。

CPN の発症及び DMF による腎臓の変化がわずかであったことにより本試験結果は交絡しているが、この試験に用いたラットは、ばらつきはあったものの尿中アルブミンが増加しており、この変化は尿細管再生の病理組織学的変化に先行する初期変化であることが確認された。

2.4.4.8.3 幼若動物を用いた試験

記載箇所：[M4.2.3.5.4-1] P00012-12-02、[M4.2.3.5.4-2] P00012-14-02

小児臨床試験を裏付ける目的で、2 つの独立した幼若動物を用いた試験をラットで実施した。最初の試験（試験番号 P00012-12-02）は、DMF 投与後にマウス、ラット及びイヌに認められた精巣及び精巣上体の変化に対する幼若動物の感受性を検討するための幼若雄ラットの試験であった。本試験は、欧州 Pediatrics Investigational Plan (PIP) Commitment に従って小児の臨床試験をサポートするために実施された。幼若雄動物の出生後 (PND) 28~92 に DMF 経口懸濁液を投与した後、MMF 曝露量は用量依存性に増加し、蓄積は認められなかった。投与期間のラットの年齢は、発生

及び中枢神経系の発達においてヒトの 10～18 歳に等しい。前胃の変化と関連した可能性がある摂餌量及び体重の減少が 50 mg/kg/日以上で認められた。包皮分離の遅延が 375 mg/kg/日で認められた。包皮分離の遅延はラットの出生前及び出生後の発生毒性試験で認められたものと類似し、ホルモン動態の影響ではなく、体重減少と関連した。剖検時に、主に胃の刺激性変化並びにリンパ節及び腎臓の腫大が認められた。本試験の主な目的は雄生殖器に対する影響を検討することであり、変化は 375 mg/kg/日（雄生殖器に関する無毒性量）まで認められなかった。

2 番目の試験（試験番号 P00012-14-02）は FDA の Postmarketing Requirement (PMR) をサポートするために実施され、雌雄幼若ラットにおける成長、発生、神経毒性及び生殖に対する DMF 長期経口投与の影響を検討するため実施した。本試験は、一般状態、体重、摂餌量、臨床病理検査（血液、血液生化学及び尿）、PND 94 の TK パラメーター、発生検査（包皮分離及び腔開口）、一過性（PND 83～85）及び持続的（PND 139～141）の神経行動学的検査〔詳細な観察（FOB）、驚愕反応、運動量、学習・記憶/Biel 型水迷路〕、生殖機能検査（性周期、交尾、PND 4 までの分娩観察及び精子形成）、神経組織、骨密度測定及び長骨測定を含む病理組織学的検査並びに尿中マイクロアルブミン等の項目を評価した。投与から休薬期間にかけて最高用量まで DMF 投与に関連した死亡又は死亡状態は認められなかった。雌幼若動物からの出生児にも、成長、死亡率及び一般状態に DMF 投与に関連した影響は認められなかった。最高用量群に平均摂餌量の減少及び平均体重増加の抑制が認められた。本試験では性成熟の遅延は認められなかった（雄のみの幼若ラット試験で体重減少からの二次的影響が包皮分離日の遅延に認められた高用量より低い用量）。最高用量雄の椎骨及び大腿骨全体で、骨塩量及び骨密度に回復性で中等度の減少も認められた。臨床病理学的変化は、雌雄幼若動物に認められた血清クロールの減少及び尿量の増加のみであった。前胃の肥厚及び扁平上皮過形成は全 DMF 投与群に認められた。腎重量の増加は、尿細管上皮の硝子滴の増加及び尿細管変性の病理組織学的変化を伴って認められた。休薬後は、これらの変化のうち前胃の扁平上皮過形成のみがより低い発現率・程度で認められた。

2.4.4.8.4 薬物乱用に関する試験

BG00012 投与による薬物乱用の可能性を評価する 3 つの試験を米国 FDA による Postmarketing Requirement に従って実施した。このうち 1 試験は DMF 及び MMF の 76 の包括的な *in vitro* 受容体結合活性で、受容体及びリガンド開口性イオンチャンネル及び酵素活性に影響する可能性を検討した。DMF 及び MMF はこれら神経学的に関連性のある受容体、イオンチャンネル及び酵素のいずれに対しても意義のある相互作用は認められなかった

他の 2 試験は、DMF を用いて *in vivo* ラットで実施した自己投与試験及び薬物弁別試験である。詳細を以下に示す。

2.4.4.8.4.1 Sprague Dawley 系雄ラットを用いたフマル酸ジメチル（DMF）自己投与試験

本 GLP 試験の目的は、DMF の報酬・強化効果を検討することであった。本試験では、雄ラットに強化効果及び薬物乱用傾向が既知のコカインでレバーを押す訓練を行った。訓練後、コカインを置換し、ラットに自己投与試験の 0.625、1.25 及び 2.5 mg/kg/回の DMF にアクセスできるようにした（試験番号 P00012-13-07 [M2.6.6.8.3.1]）。生理食塩液自己静脈内投与回数と比較して、自己静脈投与回数に明らかな差は認められなかった。以上より、DMF は 2.5 mg/kg/回まで自己投与行動を維持しないと判断された。

2.4.4.8.4.2 Sprague Dawley 系雄ラットを用いた DMF の薬物弁別試験

記載箇所：[M4.2.3.7.4-2] P00012-14-01

本 GLP 試験の目的は、DMF の自覚効果を検討することであった。本試験では、対照薬（コカイン）又は溶媒のいずれかの投与に応じて雄ラットに 2 つのレバーのうち 1 つを押す訓練を行った。すなわち、向精神作用を有する薬剤を弁別するように訓練を行った。コカイン又は生理食塩液の腹腔内投与の弁別訓練後、ラットは 0.025、0.1 及び 1.0 mg/kg の陽性対照アンフェタミンの腹腔内投与又は 25、100 及び 125 mg/kg の DMF の経口懸濁液を投与した。投与後、動物は薬物弁別試験を行うチャンバーに収容された。陽性対照アンフェタミンは、対照薬物の置換に用量依存性の増加を示した。DMF は対照薬物の置換に失敗し、250 mg/kg までほぼ生理食塩液置換レベルであった。したがって、DMF は 250 mg/kg まで薬物弁別刺激効果を有さなかった。

2.4.4.9 まとめ

DMF の非臨床安全性プログラムは ICH ガイドラインに準拠して実施され、MS 治療薬としての本剤の製造販売承認申請を十分にサポートするものである。前胃、精巣及び腎臓が本薬の標的器官として確認された。DMF に関連した変化に対する安全域は狭いが、種特異性（前胃、精巣及び腎腫瘍）並びに尿細管障害のモニタリングが可能であることによって補われる。現在の市販後データでは本剤が腎尿細管に対する直接的な毒性と関連するエビデンスは得られていない。このことは臨床開発プログラムで観察されたことと一致する。それでもなお、腎障害は可能性のある重要なリスクのままであり、綿密な市販後調査は継続して行う予定である。悪性腫瘍は中核医薬品リスク管理計画（RMP）に重要な潜在的リスクとして含まれており、通常の医薬品安全性監視手順に従って綿密なモニタリングを継続する予定である。

2.4.5 総括及び結論

臨床有効性及び安全性データに加え、非臨床薬理、薬物動態、TK、ADME 及び毒性試験は、MS 患者に 240 mg の本剤を安全に 1 日 2 回経口投与するための妥当性を示す。

非臨床試験では DMF の以下が示された。

1. 細胞保護作用及び抗炎症作用の詳細な検討から、これらの作用は部分的に Nrf2 経路の活性化によって媒介されるが、Nrf2 経路以外の作用機序も関与する可能性がある。
2. 薬物動態及び代謝の検討から、経口投与後速やかに MMF に代謝され、さらにフマル酸に代謝された後、処理能力の高い TCA 回路を介して排泄される。
3. 包括的な一連の前臨床安全性試験から、安全性プロファイルが詳細に評価された。

非臨床試験全体から、MS 患者における本剤使用の安全性及び薬理学的根拠の両面を裏付ける十分なエビデンスが得られた。

MS の発症機序は多面的であり、複数の経路を経て進行する。免疫細胞が活性化され、中枢神経系に浸潤すると、細胞障害が広がり、最終的に細胞死を起し、脱髄、神経変性を起こして発症、身体機能障害が進行する。薬理試験結果から、MS の治療に本剤を使用する科学的根拠となる DMF の薬力学的作用が示された。DMF の正確な作用機序は十分に明らかにされていないが、これらの試験は、多面的に MS の発症機序を検討し、DMF が末梢及び中枢神経系細胞・組織で抗炎症作用及び神経保護作用の両者を直接的に促進することを示した。MS の疾患を進行させることが知られている経路に対するこれらの作用は、MS 患者に対する治療ベネフィットを高め、既承認薬とは異なる新たな治療法となることが期待される。

前胃及び精巣の変化は、ヒトでのリスクにおける懸念が低いと判断された。

前胃の炎症及び腫瘍は、げっ歯類に特異的であると考えられた。げっ歯類の前胃に類似する組織が非げっ歯類（イヌ及びサル）及びヒトの咽頭及び食道の上皮細胞にみられるが、11～12 ヶ月までの試験でイヌ又はサルのこれらの組織に、DMF に関連した変化は認められなかった。げっ歯類の前胃に相当する器官はヒトの胃にはなく（Proctor et al., 2007）、臨床製剤は酸性環境（すなわち胃）で放出されないよう特別にデザインされているため、げっ歯類の前胃の変化は、ヒトでの安全性に関する懸念が限られている。

精巣の変化は、以下の点でヒトでのリスクにおける懸念が限定されていると判断された。(1) 組織パターンが異なっているラット及びイヌでの影響は、作用機序が関連しない可能性が高いこと、(2) イヌで観察された精細管変性は、重度の体重減少によるものであり、直接的な薬理又は毒性作用ではなく栄養不良による影響であったと示唆されること（Russell et al., 1990）、及び (3) CD-1 マウス及びサルでは精巣への影響が認められなかったこと。ラットでは、精巣間細胞過形成及び精巣の腺腫が認められた。精巣腫瘍がヒトに関連しない可能性を示唆する複数の根拠として以下が挙げられる。(1) 本剤の経口投与で予測される精巣の曝露量は低いこと、(2) アンドロゲン経路

を阻害する生体異物に一致する様々な変化が認められたこと、(3) アンドロゲン経路を阻害する生体異物の生涯曝露により精巣間細胞腺腫を発現するラットの感受性はヒトに関連しない機序を介していること、(4) イヌ及びサル の 1 年間慢性毒性試験で間細胞増殖が認められなかったこと、並びに (5) マウスの 2 年間がん原性試験で類似変化が認められなかったこと。したがって、本剤投与がヒトの精巣への影響に関するリスクを有する可能性は低い。

腎臓の変化は複数の動物種で観察され、ヒトの臨床用量における曝露量と比較して安全域が狭かった。ラットを用いた DMF の探索試験では、尿中アルブミンが腎障害の非侵襲性バイオマーカーとして確認され、第 III 相臨床試験にバイオマーカーとして尿中マイクロアルブミン及び β 2-ミクログロブリンが組み込まれた。本剤投与被験者で腎臓又は泌尿器有害事象発現リスクの増加はなかった。本剤群で、蛋白尿の発現率にわずかな増加が認められたが、この増加は臨床的意義はないと考えられた ([M2.7.4.2.3.6.7])。腎腫瘍は、2 年間がん原性試験でマウス及びラットに低発生率で認められた。DMF 及び MMF に遺伝毒性は認められず、尿細管における直接的な細胞毒性は認められず、マウス及びラットで腎症の発現率及び重症度スコアの用量比例性の増加が認められたため、加齢性腎症の悪化が DMF 投与による腎障害を進行させた要因であった可能性が高い。Hard et al., 2009 によってレビューされているように、げっ歯類で加齢性腎症の悪化によって腎腫瘍を促進する化合物は、ヒトでのリスク評価から除外されるべきである。腎腫瘍の独立した再評価では、国際 PWG は、DMF がげっ歯類特異的な腎症を悪化させる作用を有し、この作用によりげっ歯類の腎腫瘍が発生したと判断した。本剤投与を受けた MS 患者には DMF に直接関連した腎臓への影響が認められなかったため、ヒトでのリスク評価に対するげっ歯類腫瘍の関連性は低いと考えられる。

全体として、臨床開発プログラム及び市販後の現在のデータでは、本剤が腎尿細管に直接的な毒性と関連するエビデンスは示されていない。それでもなお、腎障害は可能性のある重要なリスクのままであり、綿密な市販後調査は継続して行う。悪性腫瘍は中核医薬品リスク管理計画 (RMP) に重要な潜在的リスクとして含まれており、通常の医薬品安全性監視手順に従って綿密なモニタリングを継続する予定である。

DMF は受胎能への影響が認められず、ラット及びウサギでは発生毒性を示さないと考えられた。DMF 投与は、母動物の体重減少とそれに起因する流産頻度の増加 (ウサギ)、胎児体重の減少、胎児奇形は起こさないが胎児四肢の骨化数の減少 (胎児変異) (ラット)、及び包皮分離の遅延 (雄ラット) と関連した。

幼若動物試験では、胃の刺激性と関連した体重減少による二次的影響の可能性のある包皮分離の遅延が認められた。雄幼若動物試験では、雄生殖器への影響は認められなかった。2 番目の幼若動物試験では、主に前胃及び腎臓に成熟動物と同様の毒性変化が認められた。最高用量で、幼若動物に生殖、性成熟及び神経行動毒性は認められなかった。

DMF の薬物乱用試験 (in vitro 神経学的受容体結合、自己投与及び薬物弁別) では、本剤の薬物乱用リスクが低いことが示された。

以上、DMF は半減期が短く、主として TCA 回路を介した細胞呼吸によって代謝され、その大部分は呼気中に排泄される。DMF は、非臨床試験では神経保護作用及び抗炎症作用の両方を有することが示された。非臨床安全性試験では、腎臓が標的器官として最も多くの試験で確認された。腎毒性の正確な機序は十分に明らかにされていないが、リスク因子及び機序は、本剤長期投与後のヒトの場合と動物で大きく異なっている。さらに、腎尿細管障害はモニタリング可能であり、臨床及び市販後状況で腎臓の重篤な毒性はみられていない。非臨床試験結果及びヒトにおける効果と安全性の評価より、MS 患者に 1 日 2 回 240 mg の本剤経口投与の妥当性が裏付けられた。

2.4.6 参考文献

Adam J, Hatipoglu E, O'Flaherty L, et al. Renal cyst formation in Fh1-deficient mice is independent of the Hif/Phd pathway: roles for fumarate in KEAP1 succination and Nrf2 signaling. *Cancer Cell* 2011; 20(4): 524-537. [M4.3-1]

Alam NA, Rowan AJ, Wortham ND, et al. Genetic and functional analyses of FH mutations in multiple cutaneous and uterine leiomyomatosis, heredity leiomyomatosis and renal cancer, and fumarate hydratase deficiency. *Hum Mol Genet* 2003; 12(11): 1241-1252. [M4.3-2]

Al-Mohaissen MA, Pun SC, Frohlich JJ. Niacin: from mechanisms of action to therapeutic uses. *Mini Rev Med Chem* 2010; 10(3): 204-217. [M4.3-3]

Arnon R, Aharoni R. Neuroprotection and neurogeneration in MS and its animal model EAE effected by glatiramer acetate. *J Neural Transm* 2009; 116(11): 1443-1449. [M4.3-6]

Baird L, Dinkova-Kostova AT. The cytoprotective role of the Keap1-Nrf2 pathway. *Arch Toxicol* 2011; 85(4): 241-272. [M4.3-7]

Boutten A, Goven D, Artaud-Macari E, et al. NRF2 targeting: a promising therapeutic strategy in chronic obstructive pulmonary disease. *Trends Mol Med* 2011; 17(7): 363-371. [M4.3-9]

Calabrese V, Colombrita C, Guagliano E, et al. Protective effect of carnosine during nitrosative stress in astroglial cell cultures. *Neurochem Res* 2005; 30(6-7): 797-807. [M4.3-10]

Cao X, Xiao H, Zhang Y, et al. 1, 5-Dicaffeoylquinic acid-mediated glutathione synthesis through activation of Nrf2 protects against OGD/reperfusion-induced oxidative stress in astrocytes. *Brain Res* 2010; 1347: 142-148. [M4.3-11]

Carvajal-Carmona LG, Alam NA, Pollard PJ, et al. Adult Leydig cell tumors of the testis caused by germline fumarate hydratase mutations. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91(8): 3071-3075. [M4.3-12]

Chen PC, Vargas MR, Pani AK, et al. Nrf2-mediated neuroprotection in the MPTP mouse model of Parkinson's disease: Critical role for the astrocyte. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009; 106(8): 2933-2938. [M4.3-15]

Clegg ED, Cook J.C, Chapin RE, et al. Leydig cell hyperplasia and adenoma formation: mechanisms and relevance to humans. *Reprod Toxicol* 1997; 11(1): 107-121. [M4.3-18]

Cohen SM, Meek ME, Klaunig JE, et al. The human relevance of information on carcinogenic modes of action: overview. *Crit Rev Toxicol* 2003; 33(6): 581-589. [M4.3-19]

Cook JC, Klinefelter GR, Hardisty JF, et al. Rodent Leydig cell tumorigenesis: a review of the physiology, pathology, mechanism, and relevance to humans. *Crit Rev Toxicol* 1999; 29(2): 169-261. [M4.3-20]

DeNicola GM, Karreth FA, Humpton TJ, et al. Oncogene-induced Nrf2 transcription promotes ROS detoxification and tumorigenesis. *Nature* 2011; 475(7354): 106-109. [M4.3-22]

Dieterle F, Sistare F, Goodsaid F, et al. Renal biomarker qualification submission: A dialog between the FDA-EMEA and Predictive Safety Testing Consortium. *Nat Biotechnol* 2010; 28(5): 455-462. [M4.3-23]

Dumont M, Willie E, Calingasan NY, et al. Triterpenoid CDDO-methylamide improves memory and decreases amyloid plaques in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurochem* 2009; 109(2): 502-512. [M4.3-24]

Ellrichmann G, Petrasch-Parwez E, Lee DH, et al. Efficacy of fumaric acid esters in the R6/2 and YAC128 models of Huntington's disease. *PLoS One* 2011; 6(1): e16172. [M4.3-25]

Fancellu R, Armentero MT, Nappi G, et al. Neuroprotective effects mediated by dopamine receptor agonists against malonate-induced lesion in the rat striatum. *Neurol Sci.* 2003; 24(3): 180-181. [M4.3-27]

Fujino M, Funeshima N, Kitazawa Y, et al. Amelioration of experimental autoimmune encephalomyelitis in Lewis rats by FTY720 treatment. *J Pharmacol Exp Ther* 2003; 305(1): 70-77. [M4.3-28]

Ghoreschi K, Brück J, Kellerer C, et al. Fumarates improve psoriasis and multiple sclerosis by inducing type II dendritic cells. *J Exp Med* 2011; 208(11): 2291-2303. [M4.3-30]

GLOBOCAN. Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2013; 2012 v1.0. Available from: <http://globocan.iarc.fr>, accessed on May 7, 2014. [M4.3-31]

Goedken MJ, Kerlin RL, Morton D. Spontaneous and age-related testicular findings in beagle dogs. *Toxicol Pathol* 2008; 36(3): 465-471. [M4.3-32]

Hanson J, Gille A, Zwykiel S, et al. Nicotinic acid- and monomethyl fumarate-induced flushing involves GPR109A expressed by keratinocytes and COX-2 dependent prostanoid formation in mice. *J Clin Invest* 2010; 120(8): 2910-2919. [M4.3-34]

Hard GC, Johnson KJ, Cohen SM. A comparison of rat chronic progressive nephropathy with human renal disease-implications for human risk assessment. *Crit Rev Toxicol* 2009; 39(4): 332-346. [M4.3-35]

Hayes JD, McMahon M. NRF2 and KEAP1 mutations: permanent activation of an adaptive response in cancer. *Trends Biochem Sci* 2009; 34(4): 176-188. [M4.3-39]

Hu J, Yao H, Gan F, et al. Interaction of OKL38 and p53 in regulating mitochondrial structure and function. *PLoS One* 2012; 7(8): e43362. [M4.3-41]

Isaacs JS, Jung YJ, Mole DR, et al. HIF overexpression correlates with biallelic loss of fumarate hydratase in renal cancer: novel role of fumarate in regulation of HIF stability. *Cancer Cell* 2005; 8(2): 143-153. [M4.3-43]

Itoh K, Wakabayashi N, Katoh Y, et al. Keap1 repressed nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain. *Genes Dev* 1999; 13(1): 76-86. [M4.3-44]

Itoh K, Tong KI, Yamamoto M. Molecular mechanism activating Nrf2-Keap1 pathway in regulation of adaptive response to electrophiles. *Free Radic Biol Med* 2004; 36(10): 1208-1213. [M4.3-46]

Jakel RJ, Townsend JA, Kraft AD, et al. Nrf2-mediated protection against 6-hydroxydopamine. *Brain Res* 2007; 1144:192-201. [M4.3-47]

Kataoka H, Sugahara K, Shimano K, et al. FTY720, sphingosine 1-phosphate receptor modulator, ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis by inhibition of T cell infiltration. *Cell Mol Immunol* 2005; 2(6): 439-448. [M4.3-50]

Koh K, Kim J, Jang YJ, et al. Transcription factor Nrf2 suppresses LPS-induced hyperactivation of BV-2 microglial cells. *J Neuroimmunol* 2011; 233(1-2): 160-167. [M4.3-53]

Kwak MK, Kensler TW. Targeting NRF2 signaling for cancer chemoprevention. *Toxicol Appl Pharmacol* 2010; 244(1): 66-76. [M4.3-54]

Lalive PH, Neuhaus O, Benkhoucha M, et al. Glatiramer acetate in the treatment of multiple sclerosis: Emerging concepts regarding its mechanism of action. *CNS Drugs* 2011; 25(5): 401-414. [M4.3-55]

Lau A, Villeneuve NF, Sun Z, et al. Dual roles of Nrf2 in cancer. *Pharmacol Res* 2008; 58(5-6): 262-270.

[M4.3-56]

Launonen V, Vierimaa O, Kiuru M, et al. Inherited susceptibility to uterine leiomyomas and renal cell cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98(6): 3387-3392. [M4.3-57]

Lehtonen HJ, Kiuru M, Ylisaukko-Oja SK, et al. Increased risk of cancer in patients with fumarate hydratase germline mutation. *J Med Genet* 2006; 43(6): 523-526. [M4.3-58]

Li J, Johnson D, Calkins M, et al. Stabilization of Nrf2 by tBHQ confers protection against oxidative stress-induced cell death in human neural stem cells. *Toxicol Sci* 2005; 83(2): 313-328. [M4.3-59]

Li W, Kong AN. Molecular mechanisms of Nrf2-mediated antioxidant response. *Mol Carcinog* 2009; 48(2): 91-104. [M4.3-60]

Linker RA, Lee DH, Ryan S, et al. Fumaric acid esters exert neuroprotective effects in neuroinflammation via activation of the Nrf2 antioxidant pathway. *Brain* 2011; 134(Pt 3): 678-692. [M4.3-61]

Litjens NH, Nibbering PH, Barrois AJ, et al., Beneficial effects of fumarate therapy in psoriasis vulgaris patients coincide with downregulation of type 1 cytokines. *Br J Dermatol* 2003; 148(3): 444-451. [M4.3-62]

Loewe R, Holnthoner W, Gröger M, et al. Dimethylfumarate inhibits TNF-induced nuclear entry of NF-kappa B/p65 in human endothelial cells. *J Immunol* 2002; 168(9): 4781-4787. [M4.3-64]

Loewe R, Valero T, Kremling S, et al. Dimethylfumarate impairs melanoma growth and metastasis. *Cancer Res* 2006; 66(24): 11888-11896. [M4.3-65]

Maher J, Yamamoto M. The rise of antioxidant signaling--the evolution and hormetic actions of Nrf2. *Toxicol Appl Pharmacol* 2010; 244(1): 4-15. [M4.3-66]

Miwa K, Segawa M, Takano Y, et al. Induction of oesophageal and forestomach carcinomas in rats by reflux of duodenal contents. *Br J Cancer* 1994; 70(2): 185-189. [M4.3-68]

Moch RW. Forestomach lesions induced by butylated hydroxyanisole and ethylene dibromide: a scientific and regulatory perspective. *Toxicol Pathol* 1988; 16(2): 172-183. [M4.3-69]

Neymotin A, Calingasan NY, Wille E, et al. Neuroprotective effect of Nrf2/ARE activators, CDDO ethylamide and CDDO trifluoroethylamide, in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Free Radic Biol Med* 2011; 51(1): 88-96. [M4.3-70]

Nguyen T, Sherratt PJ, Pickett CB. Regulatory mechanisms controlling gene expression mediated by the antioxidant response element. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2003; 43: 233-260. [M4.3-71]

Ooi A, Wong JC, Petillo D, et al. An antioxidant response phenotype shared between hereditary and sporadic type 2 papillary renal cell carcinoma. *Cancer Cell* 2011; 20(4): 511-523. [M4.3-73]

Pollard PJ, Brière JJ, Alam NA, et al. Accumulation of Krebs cycle intermediates and over-expression of HIF1alpha in tumors which result from germline FH and SDH mutations. *Hum Mol Genet* 2005; 14(15): 2231-2239. [M4.3-75]

Pollard PJ, Spencer-Dene B, Shukla D, et al. Targeted inactivation of fh1 causes proliferative renal cyst development and activation of the hypoxia pathway. *Cancer Cell* 2007; 11(4): 311-319. [M4.3-76]

Proctor DM, Gatto NM, Hong SJ, et al. Mode-of-action framework for evaluating the relevance of rodent forestomach tumors in cancer risk assessment. *Toxicol Sci* 2007; 98(2): 313-326. [M4.3-78]

Russell LD, Ettlin RA, Sinha Hikim AP, et al. In histological and histopathological evaluation of the testis. Cache River Press, Clearwater, FL. 1990; pp. 1-40. [M4.3-80]

Schilling S, Goelz S, Linker R, et al. Fumaric acid esters are effective in chronic experimental autoimmune encephalomyelitis and suppress macrophage infiltration. *Clin Exp Immunol* 2006; 145(1): 101-107. [M4.3-81]

Seely JC, Hard GC. Chronic progressive nephropathy (CPN) in the rat: review of pathology and relationship to renal tumorigenesis. *J Toxicol Pathol* 2008; 21(4): 199-205. [M4.3-82]

Serfilippi LM, Pallman DR, Gruebbel MM, et al. Assessment of retinal degeneration in outbred albino mice. *Comp Med* 2004; 54(1): 69-76. [M4.3-84]

Silver J, Sela SB, Naveh-Many T. Regulation of parathyroid cell proliferation. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 1997; 6(4): 321-326. [M4.3-86]

Soane L, Li Dai W, Fiskum G, et al. Sulforaphane protects immature hippocampal neurons against death caused by exposure to hemin or to oxygen and glucose deprivation. *J Neurosci Res* 2010; 88(6): 1355-1363. [M4.3-87]

Stack C, Ho D, Wille E, et al. Triterpenoid CDDO-ethyl amide and CDDO-trifluoroethyl amide improve the

behavioral phenotype and brain pathology in a transgenic mouse model of Huntington's disease. *Free Radic Biol Med* 2010; 49(2): 147-158. [M4.3-89]

Sudarshan S, Linehan WM, Neckers L. HIF fumarate hydratase in renal cancer. *Br J Cancer* 2007; 96(3): 403-407. [M4.3-90]

Surveillance, Epidemiology and End Results (SEER) Program. SEER Data, 1973-2011. National Cancer Institute. Available from: <http://seer.cancer.gov/>. [M4.3-91]

Taguchi K, Motohashi H, Yamamoto M. Molecular mechanisms of the Keap1-Nrf2 pathway in stress response and cancer evolution. *Genes Cells* 2011; 16(2): 123-140. [M4.3-92]

Tang H, Lu JY, Zheng X, et al. The psoriasis drug monomethylfumarate is a potent nicotinic acid receptor agonist. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; 375(4): 562-565. [M4.3-93]

Tomlinson IP, Alam NA, Rowan AJ, et al. Germline mutations in FH predispose to dominantly inherited uterine fibroids, skin leiomyomata and papillary renal cell cancer. *Nat Genet* 2002; 30(4): 406-410. [M4.3-95]

Tran TA, McCoy MK, Sporn MB, et al. The synthetic triterpenoid CDDO-methyl ester modulates microglial activities, inhibits TNF production, and provides dopaminergic neuroprotection. *J Neuroinflammation* 2008; 5: 14 [M4.3-97]

Valero T, Steele S, Neumüller K, et al. Combination of dacarbazine and dimethylfumarate efficiently reduces melanoma lymph node metastasis. *J Invest Dermatol* 2010; 130(4): 1087-1094. [M4.3-99]

van Horsen J, Witte ME, Schreiber G, et al. Radical changes in multiple sclerosis pathogenesis. *Biochim Biophys Acta*. 2011; 1812(2): 141-150. [M4.3-100]

Vargas MR, Johnson DA, Sirkis DW, et al. Nrf2 activation in astrocytes protects against neurodegeneration in mouse models of familial amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurosci* 2008; 28(50): 13574-13581. [M4.3-101]

Wakabayashi N, Itoh K, Wakabayashi J, et al. Keap1-null mutation leads to postnatal lethality due to constitutive Nrf2 activation. *Nat Genet* 2003; 35(3): 238-245. [M4.3-102]

Werdenberg D, Joshi R, Wolfram S, et al. Presystemic metabolism and intestinal absorption of antipsoriatic fumaric acid esters. *Biopharm Drug Dispos* 2003; 24(6): 259-273. [M4.3-103]

Wester PW, Kroes R. Forestomach carcinogens: pathology and relevance to man. *Toxicol Pathol* 1988; 16(2): 165-171. [M4.3-104]

Yang C, Zhang X, Fan H, et al. Curcumin upregulates transcription factor Nrf2, HO-1 expression and protects rat brains against focal ischemia. *Brain Res* 2009; 1282: 133-141. [M4.3-106]

2.4.7 文献レビュー

2.4.7.1 非臨床の文献調査

多発性硬化症 (MS) の治療を適応とするフマル酸ジメチルに関する公表論文を評価するために文献調査を実施した。■■■年 ■月 ■日に ENTREZ-PUBMED より文献データベース : Medline, TOXLINE, Hazardous Substance Database を調査した。

2.4.7.2 調査担当者

氏名 : ■■■■■■■■■■■■

職名 : Principal Consultant, Toxicology

所属 : Regulatory Strategy, Consulting and Submissions

会社名 : ■■■■■■■■■■

2.4.7.3 調査方法

調査 1-MEDLINE

Dimethyl Fumarate OR DimethylFumarate

Limits: Animals

Result: 47 unique citations identified.

調査 2-MEDLINE

Fumarates [MESH Major Heading]

Limits: Animals

Result: 191 unique citations identified.

調査 3-TOXLINE

Dimethyl Fumarate

Limits: Exclude MEDLINE citations

Result: 12 unique citations identified

調査 4-Hazardous Substance Database (有害物質データベース)

Dimethyl Fumarate

Result: 12 unique citations identified.

結果

4つのデータベースから合計 248 報の文献が得られた。そのうち 242 報は主にフマル酸ジメチルの薬理学又はフマル酸の有機化合物誘導体に集中していた。フマル酸ジメチルの薬物動態試験の 1 論文、フマル酸又は誘導体の毒性試験の 5 論文があった。

2.4.7.4 文献一覧

文献調査によって得られた文献リストを以下に示す。モジュール 2 で引用されている文献はイタリック体で示している。

Abe Y, Aoyagi A, Hara T, et al. Pharmacological characterization of RS-1259, an orally active dual inhibitor of acetylcholinesterase and serotonin transporter, in rodents: possible treatment of Alzheimer's disease. *J Pharmacol Sci* 2003; 93(1): 95-105.

Agnew DA, Skarsgard LD. Chemical radiosensitization of anoxic mammalian cells: effect of cell concentration. *Radiat Res* 1974; 57(2): 246-259.

Akao M, Kuroda K. Inhibitory effect of fumaric acid on hepatocarcinogenesis by thioacetamide in mice. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 1990; 38(7): 2012-2014.

Anonymous. In brief: Another three-drug combination for hypertension. *Med Lett Drugs Ther* 2011; 53(1361): 28.

Artinian SB, Al Lafi SM, Boutary SS, et al. Assessment of glucagon-like peptide-1 analogue and renin inhibitor on the binding and regulation of GLP-1 receptor in type 1 diabetic rat hearts. *Exp Diabetes Res* 2011; 2011: 489708.

Asanuma N, Iwamoto M, Hino T. Effect of the addition of fumarate on methane production by ruminal microorganisms in vitro. *J Dairy Sci* 1999; 82(4): 780-787.

Athyros VG, Mikhailidis DP, Kakafika AI, et al. Angiotensin II reactivation and aldosterone escape phenomena in renin-angiotensin-aldosterone system blockade: is oral renin inhibition the solution? *Expert Opin Pharmacother* 2007; 8(5): 529-535.

Autor AP, Bonham AC, Thies RL. Toxicity of oxygen radicals in cultured pulmonary endothelial cells. *J Toxicol Environ Health* 1984; 13(2-3): 387-395.

Azizi M, Frank M, Steichen O, et al. [Advantages and limitations of renin inhibition with aliskiren][Article in French]. *Ann Pharm Fr* 2011; 69(3): 142-150.

Barchowsky A, Dudek EJ, Treadwell MD, et al. Arsenic induces oxidant stress and NF-kappa B activation in cultured aortic endothelial cells. *Free Radic Biol Med* 1996; 21(6): 783-790.

Beauchemin KA, McGinn SM. Methane emissions from beef cattle: Effects of fumaric acid, essential oil, and canola oil. *J Anim Sci* 2006; 84(6): 1489-1496.

Begleiter A, Leith MK, Thliveris JA, et al. Dietary induction of NQO1 increases the antitumour activity of mitomycin C in human colon tumours in vivo. *Br J Cancer* 2004; 91(8): 1624-1631.

Begleiter A, Sivananthan K, Curphey TJ, et al. Induction of NAD(P)H quinone: oxidoreductase1 inhibits carcinogen-induced aberrant crypt foci in colons of Sprague-Dawley rats. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2003; 12(6): 566-572.

Berta E, Andrásosfzky E, Bersényi A, et al. Effect of inorganic and organic manganese supplementation on the performance and tissue manganese content of broiler chicks. *Acta Vet Hung* 2004; 52(2): 199-209.

Biaglow JE, Ayene IS, Koch CJ, et al. Radiation response of cells during altered protein thiol redox. *Radiat Res* 2003; 159(4): 484-494.

Biaglow JE, Varnes ME, Clark EP, et al. The role of thiols in cellular response to radiation and drugs. *Radiat Res*. 1983; 95(3): 437-455.

Bickley HC, Little JW, Blevins TJ. Effects of short-term lathyrogen treatment on rupture strength of healing wounds. *J Dent Res* 1966; 45(5): 1409-1412.

Blank R, Mosenthin R, Sauer WC, et al. Effect of fumaric acid and dietary buffering capacity on ileal and fecal amino acid digestibilities in early-weaned pigs. *J Anim Sci* 1999; 77(11): 2974-2984.

Blatnik M, Frizzell N, Thorpe SR, et al. Inactivation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase by fumarate in diabetes: formation of S-(2-succinyl)cysteine, a novel chemical modification of protein and possible biomarker of mitochondrial stress. *Diabetes* 2008; 57(1): 41-49.

Bock D, Philipp S, Wolff G. Therapeutic potential of selectin antagonists in psoriasis. *Expert Opin Investig Drugs* 2006; 15(8): 963-979.

Boros EE, Bigham EC, Boswell GE, et al. Bis- and mixed-tetrahydroisoquinolinium chlorofumarates: new ultra-short-acting nondepolarizing neuromuscular blockers. *J Med Chem* 1999; 42(6): 1114.

Buczko W, Hermanowicz JM. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of aliskiren, an oral direct renin inhibitor. *Pharmacol Rep* 2008; 60(5): 623-631.

Callaway TR, Martin SA. Effects of organic acid and monensin treatment on in vitro mixed ruminal microorganism fermentation of cracked corn. *J Anim Sci* 1996; 74(8): 1982-1989.

Campbell DJ. Aliskiren therapy will have minimal effect on intracellular renin of renin-producing cells. *Hypertension* 2009; 53(2): e17.

Carro MD, Ranilla MJ. Influence of different concentrations of disodium fumarate on methane production and fermentation of concentrate feeds by rumen micro-organisms in vitro. *Br J Nutr* 2003; 90(3): 617-623.

Castelain M. Globalisation and allergy. *Eur J Dermatol* 2011; 21(4): 472-478.

Cavallini L, Lucchetti G. [Effect of bencyclane fumarate on brain metabolism in the rat--in vitro study][Article in French]. *Boll Chim Farm.* 1977; 116(8): 473-483.

Chick WL, Weiner R, Cascareno J, et al. Influence of Krebs-cycle intermediates on survival in hemorrhagic shock. *Am J Physiol* 1968; 215(5): 1107-1110.

Choi HJ, Lee SY, Cho Y, et al. Inhibition of vesicular monoamine transporter enhances vulnerability of dopaminergic cells: Relevance to Parkinson's disease. *Neurochem Int* 2005; 46(4): 329-335.

Chung CB, Kwon JH, Shim SC, et al. Photochemistry of conjugated polyacetylenes: (2 plus 2) photocycloaddition of 1-phenyl-1,3,5-hexatriynes with some olefins. *Photochem Photobiol* 1993; 58(2): 159-163.

Cohen NC. Structure-based drug design and the discovery of aliskiren (Tekturna): perseverance and creativity to overcome a R&D pipeline challenge. *Chem Biol Drug Des* 2007; 70(6): 557-565.

Cross SA, Cook DR, Chi AW, et al. Dimethyl fumarate, an immune modulator and inducer of the antioxidant response, suppresses HIV replication and macrophage-mediated neurotoxicity: a novel candidate for HIV neuroprotection. *J Immunol* 2011; 187(10): 5015-5025.

Dantchev D, Dantchev-Urbain M. [Behavior of certain pyrimidine compounds, of fumaric acid and of maleic acid in regard to the protection of erythrocytes of rabbits poisoned by phenylhydrazine][Article in French]. *CR Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D* 1967; 264(11): 1467-1470.

de Haan P, von Blomberg-van der Flier BM, de Groot J, et al. The risk of sensibilization and contact urticaria upon topical application of fumaric acid derivatives. *Dermatology* 1994; 188(2): 126-130.

de Jong R, Bezemer AC, Zomerdijk TP, et al. Selective stimulation of T helper 2 cytokine responses by the anti-psoriasis agent monomethylfumarate. *Eur J Immunol* 1996; 26(9): 2067-2074.

Dechend R, Shagdarsuren E, Gratzke P, et al. Low-dose renin inhibitor and low-dose AT(1)-receptor blocker therapy ameliorate target-organ damage in rats harbouring human renin and angiotensinogen genes. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 2007; 8(2): 81-84.

Desai DH, Amin S. Synthesis of a hapten to be used in development of immunoassays for trans-3'-hydroxycotinine, a major metabolite of cotinine. *Chem Res Toxicol* 1991; 4(5): 524-527.

Dethlefsen LA, Lehman CM, Biaglow JE, et al. Toxic effects of acute glutathione depletion by buthionine sulfoximine and dimethylfumarate on murine mammary carcinoma cells. *Radiat Res* 1988; 114(2): 215-224.

Dickens BF, Weglicki WB, Li YS, et al. Magnesium deficiency in vitro enhances free radical-induced intracellular oxidation and cytotoxicity in endothelial cells. *FEBS Lett* 1992; 311(3): 187-191.

Digby T, Leith MK, Thliveris JA, et al. Effect of NQO1 induction on the antitumor activity of RH1 in human tumors in vitro and in vivo. *Cancer Chemother Pharmacol* 2005; 56(3): 307-316.

Djian C, Ponchet M, Cayrol JC. Nematocidal properties of carboxylic acids and derivatives. *Pesticide Biochem Physiol* 1994; 50(3): 229-239.

Dong YF, Liu L, Lai ZF, et al. Aliskiren enhances protective effects of valsartan against type 2 diabetic nephropathy in mice. *J Hypertens* 2010; 28(7): 1554-1565.

Dragun D, Hegner B. Limitations of targeting rate-limiting step of renin-angiotensin-aldosterone system in experimental chronic allograft nephropathy. *Transplantation* 2011; 92(9): 975-976.

Duffy S, So A, Murphy TH. Activation of endogenous antioxidant defenses in neuronal cells prevents free radical-mediated damage. *J Neurochem* 1998; 71(1): 69-77.

Dunbar RL, Gelfand JM. Seeing red: flushing out instigators of niacin-associated skin toxicity. *J Clin Invest* 2010; 120(8): 2651-2655.

Durand RE, Olive PL. Flow cytometry techniques for studying cellular thiols. *Radiat Res* 1983; 95(3): 456-470.

Ebrahimia SH, Mohini M, Singhal KK, et al. Evaluation of complementary effects of 9, 10-anthraquinone

and fumaric acid on methanogenesis and ruminal fermentation in vitro. *Arch Anim Nutr* 2011; 65(4): 267-277.

Edmond MS, Izquierdo OA, Baker DH. Feed additive studies with newly weaned pigs: efficacy of supplemental copper, antibiotics and organic acids. *J Anim Sci* 1985; 60(2): 462-469.

Ellrichmann G, Petrasch-Parwez E, Lee DH, et al. Efficacy of fumaric acid esters in the R6/2 and YAC128 models of Huntington's disease. PLoS One 2011; 6(1): e16172.

Elsaesser W, Gilbert E, Eberle SH. [Contribution to the characterization and identification of low molecular weight organic substances in biologically treated effluent][Article in German]. *Z Wasser-Abwasser Forsch* 1992; 25(2): 82-91.

Feinman L, Cohen S, Becker EL. The effect of fumaropimaric acid on delayed hypersensitivity and cutaneous Forssman reactions in the guinea pig. *J Immunol* 1970; 104(6): 1401- 1405.

Feldman DL, Jin L, Xuan H, et al. Effects of aliskiren on blood pressure, albuminuria, and (pro)renin receptor expression in diabetic TG(mRen-2)27 rats. *Hypertension* 2008; 52(1): 130-136.

Feldt S, Maschke U, Dechend R, et al. The putative (pro)renin receptor blocker HRP fails to prevent (pro)renin signaling. *J Am Soc Nephrol* 2008; 19(4): 743-748.

Fernandez JM, Molinuevo MS, Cortizo MS, et al. Development of an osteoconductive PCL-PDIPF-hydroxyapatite composite scaffold for bone tissue engineering. *J Tissue Eng Regen Med* 2011; 5(6): e126-e135.

Fischer LJ, Hamburger SA. Impaired insulin release after exposure of pancreatic islets to autooxidizing dihydroxyfumarate. *Endocrinology* 1981; 108(6): 2331-2335.

Fischer LJ, Hamburger SA. Dimethylurea: a radical scavenger that protects isolated pancreatic islets from the effects of alloxan and dihydroxyfumarate exposure. *Life Sci* 1980; 26(17): 1405-1409.

Fontoura P, Garren H. Multiple sclerosis therapies: molecular mechanisms and future. *Results Probl Cell Differ* 2010; 51: 259-285.

Friling RS, Bensimon A, Tichauer Y, et al. Xenobiotic-inducible expression of murine glutathione S-transferase Ya subunit gene is controlled by an electrophile-responsive element. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87(16): 6258-6262.

Funderburk WH, Foxwell MH, Johnson DN, et al. Analgetic activity of alpha-1-(1-methyl-3-pyrrolidinyl)-1-phenylpropyl propionate fumarate (AHR-1767). *Arch Int Pharmacodyn Ther* 1969; 178(2): 446-456.

Furtado S, Abramson D, Simhkay L, et al. Subcutaneous delivery of insulin loaded poly(fumaric-co-sebacic anhydride) microspheres to type 1 diabetic rats. *Eur J Pharm Biopharm* 2006; 63(2): 229- 236.

Gadomska-Nowak M, Szule B, Ryszka F. Comparison of penetration rates of magnesium through the rat ileum for selected organic salts. *Pharmazie* 2001; 56(12): 972-973.

García-Caballero M, Marí-Beffa M, Medina MÁ, et al. Dimethylfumarate inhibits angiogenesis in vitro and in vivo: a possible role for its antipsoriatic effect? *J Invest Dermatol* 2011; 131(6): 1347-1355.

García-Martínez R, Ranilla MJ, Tejido ML, et al. Effects of disodium fumarate on in vitro rumen microbial growth, methane production and fermentation of diets differing in their forage: concentrate ratio. *Br J Nutr* 2005; 94(1): 71-77.

Gardner AF. Distribution of alkaline phosphatase in the healing incisor alveolus following implantation of BAPN-anorganic bone. Distribution of alkaline phosphatase in odontogenic tissues. *Aust Dent J* 1968; 13(4): 282-290.

Garrard LJ, Mathis JM, Raushel FM. Substrate-induced inactivation of argininosuccinate lyase by monofluorofumarate and difluorofumarate. *Biochemistry* 1983; 22(16): 3729-3735.

Geyer MA, Swerdlow NR, Lehmann-Masten V, et al. Effects of LU-111995 in three models of disrupted prepulse inhibition in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 1999; 290(2): 716-724.

Ghashghaenia M, Bobbala D, Wieder T, et al. Targeting glutathione by dimethylfumarate protects against experimental malaria by enhancing erythrocyte cell membrane scrambling. *Am J Physiol Cell Physiol* 2010; 299(4): C791-C804.

Giacobini E, Marchisio C. The action of tricarboxylic acid cycle intermediates and glutamate on the impulse activity and respiration of the crayfish stretch receptor neurone. *Acta Physiol Scand* 1966; 66(1): 58-66.

Giesting DW, Easter RA. Effect of protein source and fumaric acid supplementation on apparent ileal digestibility of nutrients by young pigs. *J Anim Sci* 1991; 69(6): 2497-2503.

Giesting DW, Roos MA, Easter RA. Evaluation of the effect of fumaric acid and sodium bicarbonate addition on performance of starter pigs fed diets of different types. *J Anim Sci* 1991; 69(6): 2489-2496.

Giesting DW, Easter RA. Response of starter pigs to supplementation of corn-soybean meal diets with organic acids. *J Anim Sci* 1985; 60(5): 1288-1294.

Giraldo LA, Ranilla MJ, Tejido M, et al. Influence of exogenous fibrolytic enzymes and fumarate on methane production, microbial growth and fermentation in Rusitec fermenters. *Br J Nutr* 2007; 98(4): 753-761.

Glimcher MJ, Friberg UA, Orloff S, et al. The role of the inorganic crystals in the solubility characteristics of collagen in lathyrtic bone. *J Ultrastruct Res* 1966; 15(1): 74-86.

Gordon GB, Prochaska HJ, Yang LY. Induction of NAD(P)H:quinone reductase in human peripheral blood lymphocytes. *Carcinogenesis* 1991; 12(12): 2393-2396.

Gross O, Girgert R, Rubel D, et al. Renal protective effects of aliskiren beyond its antihypertensive property in a mouse model of progressive fibrosis. *Am J Hypertens* 2011; 24(3): 355- 361.

Guiso G, Caccia S. Distribution of the methylpiperazinopyridobenzoxazepine derivative JL13, a potential antipsychotic, in rat brain. *J Pharm Pharmacol* 2001; 53(3): 317-321.

Gujaeva EL, Ostashkina NM, Kondalenko VF, et al. Different pathways for mitogenic and enzyme induction signal transduction by cytochrome P450 inducers. *Biochemistry (Mosc)* 1999; 164(8): 929- 932.

Gullapalli N, Bloch MJ, Basile J. Renin-angiotensin-aldosterone system blockade in high-risk hypertensive patients: current approaches and future trends. *Ther Adv Cardiovasc Dis* 2010; 4(6): 359-373.

Habibi J, Whaley-Connell A, Hayden MR, et al. Renin inhibition attenuates insulin resistance, oxidative stress, and pancreatic remodeling in the transgenic Ren2 rat. *Endocrinology* 2008; 149(11): 5643-5653.

Hagedorn M, Kalkoff KW, Kiefer K G, et al. [Fumaric acid monoethylester: effect on DNA-synthesis and preliminary findings in experimental studies in animals (author's transl)][Article in German] *Arch Dermatol Res* 1975; 254(1): 67-73.

Hanson J, Gille A, Zwykiel S, et al. Nicotinic acid- and monomethyl fumarate-induced flushing involves GPR109A expressed by keratinocytes and COX-2-dependent prostanoid formation in mice. J Clin Invest 2010; 120(8): 2910-2919.

Hardin CD, Lazzarino G, Tavazzi B, et al. Myocardial metabolism of exogenous FDP is consistent with transport by a dicarboxylate transporter. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001; 281(6): H2654-H2660.

Hassel B, Bråthe A, Petersen D. Cerebral dicarboxylate transport and metabolism studied with isotopically labelled fumarate, malate and malonate. *J Neurochem* 2002; 82(2): 410-419.

Heiligenhaus A, Li H, Schmitz A, et al. Improvement of herpetic stromal keratitis with fumaric acid derivate is associated with systemic induction of T helper 2 cytokines. *Clin Exp Immunol* 2005; 142(1): 180-187.

Heiligenhaus A, Li H, Wasmuth S, et al. Influence of dimethylfumarate on experimental HSV-1 necrotizing keratitis. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2004; 242(10): 870-877.

Held KD, Hopcia KL. Role of protein thiols in intrinsic radiation protection of DNA and cells. *Mutat Res* 1993; 299(3-4): 261-269.

Held KD, Epp ER, Awad S, et al. Postirradiation sensitization of mammalian cells by the thiol-depleting agent dimethyl fumarate. *Radiat Res* 1991; 127(1): 75-80.

Held KD, Epp ER, Clark EP, et al. Effect of dimethyl fumarate on the radiation sensitivity of mammalian cells in vitro. *Radiat Res* 1988; 115(3): 495-502.

Hockwin O, Korte I, Breuer R, et al. [In vitro incubation of lenses. Model for testing substrate utilization of substances of the energy metabolism, demonstrated with bencyclane-hydrogen- fumarate (author's transl).][Article in German]. *Albrecht Von Graefes Arch Klin Exp Ophthalmol* 1978; 207(3): 169-180.

Hohenegger M, Vermes M, Sadjak A, et al. Nephrotoxicity of fumaric acid monoethylester (FA ME). *Adv Exp Med Biol* 1989; 252: 265-272.

Hosokawa N, Momose I, Sekizawa R, et al. New strobilurins O and P from a mushroom. *J Antibiot (Tokyo)* 2000; 53(3): 297-300.

Howard CG, Mullins JJ, Mitchell KD. Direct renin inhibition with aliskiren normalizes blood pressure in Cyp11a1-Ren2 transgenic rats with inducible angiotensin II-dependent malignant hypertension. *Am J Med Sci* 2011; 341(5): 383-387.

Imanishi T, Tsujioka H, Ikejima H, et al. Renin inhibitor aliskiren improves impaired nitric oxide bioavailability and protects against atherosclerotic changes. *Hypertension* 2008; 52(3): 563-572.

Initial Submission: Toxicity Tests on Diethyl Fumarate and Dimethyl Fumarate with Cover Letter Dated 101592 EPA/OTS; Doc #88-920009858.

Ino J, Kojima C, Osaka M, et al. Dynamic observation of mechanically-injured mouse femoral artery reveals an antiinflammatory effect of renin inhibitor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009; 29(11): 1858-1863.

Isomae K, Morimoto S, Hasegawa H, et al. Effects of T-82, a novel acetylcholinesterase inhibitor, on impaired learning and memory in passive avoidance task in rats. *Eur J Pharmacol* 2003; 28; 465(1- 2): 97-103.

Iwai M, Kanno H, Tomono Y, et al. Direct renin inhibition improved insulin resistance and adipose tissue dysfunction in type 2 diabetic KK-A(y) mice. *J Hypertens* 2010; 28(7): 1471-1481.

Jones SB, Brooks JD. Modest induction of phase 2 enzyme activity in the F-344 rat prostate. *BMC Cancer* 2006; 6: 62.

Kasprzak L, Milewski S, Gumieniak J, et al. The influence of serum proteins on biological activity of anticandidal peptides containing N3-(4-methoxyfumaryl)-L-2,3-diaminopropanoic acid. *J Chemother* 1992; 4(2): 88-94.

Ke CY, Lee CC, Lee CJ, et al. Aliskiren ameliorates chlorhexidine digluconate-induced peritoneal fibrosis in rats. *Eur J Clin Invest* 2010; 40(4): 301-309.

Kelly DJ, Zhang Y, Moe G, et al. Aliskiren, a novel renin inhibitor, is renoprotective in a model of advanced diabetic nephropathy in rats. *Diabetologia* 2007; 50(11): 2398-2404.

Kempen DH, Kruyt MC, Lu L, et al. Effect of autologous bone marrow stromal cell seeding and bone morphogenetic protein-2 delivery on ectopic bone formation in a microsphere/poly (propylene fumarate) composite. *Tissue Eng Part A* 2009; 15(3): 587-594.

Kirlin WG, Cai J, DeLong MJ, et al. Dietary compounds that induce cancer preventive phase 2 enzymes activate apoptosis at comparable doses in HT29 colon carcinoma cells. *J Nutr* 1999; 129(10): 1827-1835.

Kirchgessner M, Roth FX, Tschierschwitz A, et al. [Nutritive effect of fumaric acid on growth and body composition of rats][Article in German]. *Z Tierphysiol Tierernahr Futtermittelkd* 1982; 47(4):175-186.

Kirchgessner M, Roth FX. [Digestibility and balance of proteins, energy and several minerals in fumaric acid

supplementation in piglets][Article in German]. *Z Tierphysiol Tierernahr Futtermittelkd* 1980; 44(4-5): 239-246.

Kirchgessner M, Roth FX. [Effect of fumaric acid on nutrient and energy metabolism][Article in German]. *Z Tierphysiol Tierernahr Futtermittelkd* 1978; 41(2): 71-76.

Komlós E, Petöcz LE. [Data to the pharmacology of 1-benzyl-1-(3'-dimethylamino-propoxy)-cycloheptane fumarate (EGYT-201)][Article in Hungarian]. *Orv Hetil* 1968; 109(21): Suppl: 8-12.

Kupriyanov VV, Saks VA. The effect of succinate, malonate and fumarate on the phosphorylating system of the submitochondrial particles. *FEBS Lett* 1972; 24(1): 131-133.

Kuroda K, Akao M. Inhibitory effect of fumaric acid on 3'-methyl-4-(dimethylamino)azobenzene-induced hepatocarcinogenesis in rats. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 1989; 37(5): 1345-1346.

Kuroda K, Terao K, Akao M. Inhibitory effect of fumaric acid on hepatocarcinogenesis by thioacetamide in rats. *J Natl Cancer Inst* 1987; 79(5): 1047-1051.

Kuroda K., Akao M, Terao K. Fumaric acid enhances DNA synthesis of rat hepatocytes by counteracting the toxicities of mitomycin C and aflatoxin B1. *Jpn J Cancer Res* 1986; 77(8): 750-758.

Kuroda K, Terao K, Akao M. Inhibitory effect of fumaric acid on 3-methyl-4'-(dimethylamino)-azobenzene-induced hepatocarcinogenesis in rats. *J Natl Cancer Inst* 1983; 71(4): 855-857.

Kuroda K, Kanisawa M, Akao M. Inhibitory effect of fumaric acid on forestomach and lung carcinogenesis by a 5-nitrofuranyl naphthyridine derivative in mice. *J Natl Cancer Inst* 1982; 69(6):1317-1320.

Kuroda K, Teranishi S, Akao M. Toxicity of mitomycin C and anti-intoxication by fumaric acid in liver and kidney cellular fine structure. *Gann* 1982; 73(4): 656-660.

Kuroda K, Akao M. Reduction by fumaric acid of side effects of mitomycin C. *Biochem Pharmacol* 1980; 29(20): 2839-2844.

Kuroda K, Akao M. Inhibitory effect of fumaric acid and dicarboxylic acids on gastric ulceration in rats. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 1977; 226(2): 324-330.

Kusen' SI, Solohub LI, Olexyn HO, et al. [Enzymes of glycolysis and pentosephosphate shunt during early

embryogenesis of the loach and the effect of glucose, lactate and fumarate on fertilized oocytes][Article in Ukrainian]. Ukr Biokhim Zh 1975; 47(4): 448-452.

Lahti A, Maibach HI. Contact urticaria from diethyl fumarate. Contact Dermatitis 1985; 12(3): 139-140.

Laplante A, Vincent G, Poirier M, et al. Effects and metabolism of fumarate in the perfused rat heart. A 13C mass isotopomer study. Am J Physiol 1997; 272(1 Pt 1): E74-E82.

Leclercq-Meyer V, Marchand J, Malaisse WJ. An arginine-like effect of the "fumarate + glutamate + pyruvate" mixture on glucagon release. Life Sci 1977; 20(7): 1193-1198.

Lehoczki Z. [Study of chronic toxicity of Halidor][Article in Hungarian]. Orv Hetil 1968; 109(21): Suppl: 14-17.

Lewandowski KU, Cattaneo MV, Gresser JD, et al. Effect of a poly(propylene fumarate) foaming cement on the healing of bone defects. Tissue Eng 1999; 5(4): 305-316.

Lien CA, Savard P, Belmont M, et al. Fumarates: unique nondepolarizing neuromuscular blocking agents that are antagonized by cysteine. J Crit Care 2009; 24(1): 50-57.

Liesegang A, Ursprung R, Gasser J, et al. Influence of dietary phosphorus deficiency with or without addition of fumaric acid to a diet in pigs on bone parameters. J Anim Physiol Anim Nutr (Berl) 2002; 86(1-2): 1-16.

Lin SX, Lisi L, Dello Russo C, et al. The anti-inflammatory effects of dimethyl fumarate in astrocytes involve glutathione and haem oxygenase-1. ASN Neuro 2011; 3(2): e00055.

Lindahl E, Strindberg L, Philipsson C. Functional meaning of an ATP-dependent membrane reaction in mammalian spermatozoa. Exp Cell Res 1972; 72(1): 164-168.

Linker RA, Lee DH, Ryan S, et al. Fumaric acid esters exert neuroprotective effects in neuroinflammation via activation of the Nrf2 antioxidant pathway. Brain 2011; 134(Pt 3): 678-692.

Linker RA, Lee DH, Stangel M, et al. Fumarates for the treatment of multiple sclerosis: potential mechanisms of action and clinical studies. Expert Rev Neurother 2008; 8(11): 1683-1690.

Liu L, Qi M, Wang P, et al. High-performance liquid chromatographic method for the bioequivalence evaluation of desloratadine fumarate tablets in dogs. J Pharm Biomed Anal 2004; 34(5): 1013-1019.

Lo Balbo A, Gotelli MJ, MacCormack WP, et al. Contact dermatitis caused by dimethylfumarate in Argentina. *Clin Toxicol (Phila)* 2011; 49(6): 508-509.

Loewe R, Valero T, Kremling S, et al. Dimethylfumarate impairs melanoma growth and metastasis. Cancer Res 2006; 66(24): 11888-11896.

Lu H, Rateri DL, Feldman DL, et al. Renin inhibition reduces hypercholesterolemia-induced atherosclerosis in mice. *J Clin Invest* 2008; 118(3): 984-993.

López S, Valdés C, Newhold CJ, et al. Influence of sodium fumarate addition on rumen fermentation in vitro. *Br J Nutr* 1999; 81(1): 59-64.

MacDonald MJ, Fahien LA, Mertz RJ, et al. Effect of esters of succinic acid and other citric acid cycle intermediates on insulin release and inositol phosphate formation by pancreatic islets. *Arch Biochem Biophys* 1989; 269(2): 400-406.

Machon U, Büchold C, Stempka M, et al. On-bead screening of a combinatorial fumaric acid derived peptide library yields antiplasmodial cysteine protease inhibitors with unusual peptide sequences. *J Med Chem* 2009; 52(18): 5662-5672.

Mahmoudi M, Simchi A, Imani M, et al. An in vitro study of bare and poly(ethylene glycol)-co-fumarate-coated superparamagnetic iron oxide nanoparticles: A new toxicity identification procedure. *Nanotechnology* 2009; 20(22): 225104.

Mathews JL, Peng X, Xiong W, et al. Characterization of a novel bivalent morphinan possessing kappa agonist and micro agonist/antagonist properties. *J Pharmacol Exp Ther* 2005; 315(2): 821-827.

McGinn SM, Beauchemin KA, Coates T, et al. Methane emissions from beef cattle: effects of monensin, sunflower oil, enzymes, yeast, and fumaric acid. *J Anim Sci* 2004; 82(11): 3346-3356.

Meili-Butz S, Niermann T, Fasler-Kan E, et al. Dimethyl fumarate, a small molecule drug for psoriasis, inhibits Nuclear Factor-kappaB and reduces myocardial infarct size in rats. *Eur J Pharmacol* 2008; 586(1-3): 251-258.

Milenković M, Arsenović-Ranin N, Vucićević D, et al. Beneficial effects of dimethyl fumarate on experimental autoimmune myocarditis. *Arch Med Res* 2008; 39(7): 639-646.

Miller AC, Gafner J, Clark EP, et al. Posttranscriptional down-regulation of ras oncogene expression by

inhibitors of cellular glutathione. *Mol Cell Biol* 1993; 13(7): 4416-4422.

Moed H, Stoof TJ, Boorsma DM, et al. Identification of anti-inflammatory drugs according to their capacity to suppress type-1 and type-2 T cell profiles. *Clin Exp Allergy* 2004; 34(12): 1868-1875.

Moharrehg-Khiabani D, Blank A, Skripuletz T, et al. Effects of fumaric acids on cuprizone induced central nervous system de- and remyelination in the mouse. *PLoS One* 2010; 5(7): e11769.

Mondadori C, Buerki H, Borkowski J, et al. CGS 5649 B, a new compound, reverses age-related cognitive dysfunctions in rats. *Behav Neural Biol* 1992; 57(2): 149-156.

Mugelli A, Cerbai E, Barbieri M, et al. Cellular electrophysiological aspects of myocardial protection. *Pharmacol Res* 1995; 31(3-4): 243-249.

Munday R, Smith BL, Munday CM. Effect of inducers of DT-diaphorase on the haemolytic activity and nephrotoxicity of 2-amino-1, 4-naphthoquinone in rats. *Chem Biol Interact* 2005; 155(3): 140-147.

Munday R, Smith BL, Munday CM. Effect of inducers of DT-diaphorase on the toxicity of 2-methyl- and 2-hydroxy-1, 4-naphthoquinone to rats. *Chem Biol Interact* 1999; 123(3): 219-237.

Murphy TH, Yu J, Ng R, et al. Preferential expression of antioxidant response element mediated gene expression in astrocytes. *J Neurochem* 2001; 76(6): 1670-1678.

Müller DN, Derer W, Dechend R. Aliskiren--mode of action and preclinical data. *J Mol Med (Berl)* 2008; 86(6): 659-662.

Nakano K, Obo F. Purification of the agent inducing lipid peroxidation with dihydroxyfumaric acid in rat liver mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun* 1980; 93(4): 1127- 1131.

Nakano K, Obo F. Dihydroxyfumaric acid induced lipid peroxidation in rat liver microsomes. *Biochem Biophys Res Commun* 1979; 89(4): 1239-1244.

Nisbet DJ, Callaway TR, Edrington TS, et al. Effects of the dicarboxylic acids malate and fumarate on *E. coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* typhimurium populations in pure culture and in mixed ruminal microorganism fermentations. *Curr Microbiol* 2009; 58(5): 488-492.

O'Dell BL, Elsdon DE, Thomas J, et al. Inhibition of the biosynthesis of the cross-links in elastin by a lathyrogen. *Nature* 1966; 209(5021): 401-402.

Oh BH. Aliskiren, the first in a new class of direct renin inhibitors for hypertension: Present and future perspectives. *Expert Opin Pharmacother* 2007; 8(16): 2839-2849.

Palatini P. Fumarate is the cause of the apparent ping-pong kinetics of dopamine beta-hydroxylase. *Biochem Int* 1985; 11(4): 565-572.

Papadopoulou A, D'Souza M, Kappos L, et al. Dimethyl fumarate for multiple sclerosis. *Expert Opin Investig Drugs* 2010; 19(12): 1603-1612.

Park SJ, Park HJ, Kim SJ, et al. Suppression of the TRIF-dependent signaling pathway of toll-like receptors by (E)-isopropyl 4-oxo-4-(2-oxopyrrolidin-1-yl)-2-butenate. *BMB Rep* 2011; 44(7): 468-472.

Park SJ, Kang SH, Kang YK, et al. Inhibition of homodimerization of toll-like receptor 4 by 4-oxo-4-(2-oxo-oxazolidin-3-yl)-but-2-enoic acid ethyl ester. *Int Immunopharmacol* 2011; 11(1): 19-22.

Patten JD, Waldroup PW. Use of organic acids in broiler diets. *Poult Sci* 1988; 67(8): 1178-1182.

Pellmar TC, Roney D, Lepinski DL. Role of glutathione in repair of free radical damage in hippocampus in vitro. *Brain Res* 1992; 583(1-2): 194-200.

Pellmar TC, Lepinski DL. Electrophysiological consequences of exposure of hippocampal slices to dihydroxyfumarate, a generator of superoxide radicals. *Brain Res* 1992; 569(2): 189-198.

Pereira MA, Barnes LH, Rassman VL, et al. Use of azoxymethane-induced foci of aberrant crypts in rat colon to identify potential cancer chemopreventive agents. *Carcinogenesis* 1994; 15(5): 1049-1054.

Phillips LM, Wang Y, Dai T, et al. The renin inhibitor aliskiren attenuates high-glucose induced extracellular matrix synthesis and prevents apoptosis in cultured podocytes. *Nephron Exp Nephrol* 2011; 118(3): e49-59.

Pilz B, Shagdarsuren E, Wellner M, et al. Aliskiren, a human renin inhibitor, ameliorates cardiac and renal damage in double-transgenic rats. *Hypertension* 2005; 46(3): 569-576.

Pimenta E, Oparil S. Renin inhibitors: novel agents for renoprotection or a better angiotensin receptor blocker for blood pressure lowering?" *Cardiol Clin* 2008; 26(4): 527-535.

Pirgozliev V, Murphy TC, Owens B, et al. Fumaric and sorbic acid as additives in broiler feed. *Res Vet Sci* 2008; 84(3): 387-394.

Ploetz C, Janssen H, Zakzewicz A, et al. Fumarate in the preservation solution aggravates chronic allograft nephropathy. *J Surg Res* 2011; 166(2): 306-313.

Porreca F, Vanderah TW, Guo W, et al. Antinociceptive pharmacology of N-[[4-(4,5-dihydro-1H-imidazol-2-yl)phenyl]methyl]-2-[2-[[[(4-methoxy-2,6-dimethyl phenyl) sulfonyl]methylamino]ethoxy]-N-methylacetamide, fumarate (LF22-0542), a novel nonpeptidic bradykinin B1 receptor antagonist. *J Pharmacol Exp Ther* 2006; 318(1): 195-205.

Prochaska HJ, Fernandes CL. Elevation of serum phase II enzymes by anticarcinogenic enzyme inducers: markers for a chemoprotected state? *Carcinogenesis* 1993; 14(12): 2441-2445.

Pöss J, Werner C, Lorenz D, et al. The renin inhibitor aliskiren upregulates pro-angiogenic cells and reduces atherogenesis in mice. *Basic Res Cardiol* 2010; 105(6): 725-735.

Radecki SV, Juhl MR, Miler FR. Fumaric and citric acids as feed additives in starter pig diets: effect on performance and nutrient balance. *J Anim Sci* 1988; 66(10): 2598-2605.

Rakusan D, Kujal P, Kramer HJ, et al. Persistent antihypertensive effect of aliskiren is accompanied by reduced proteinuria and normalization of glomerular area in Ren-2 transgenic rats. *Am J Physiol Renal Physiol* 2010; 299(4): F758-F766.

Rao CV, Rivenson A, Kelloff GJ, et al. Chemoprevention of azoxymethane-induced colon cancer by ascorbylpalmitate, carbenoxolone, dimethylfumarate and p-methoxyphenol in male F344 rats. *Anticancer Res* 1995; 15(4): 1199-1204.

Rao KS, Mishra SH. Antihepatotoxic activity of monomethyl fumarate isolated from *Fumaria indica*. *J Ethnopharmacol* 1998; 60(3): 207-213.

Rodríguez-Penas D, Feijóo-Bandín S, Lear PV, et al. Aliskiren affects fatty-acid uptake and lipid-related genes in rodent and human cardiomyocytes. *Biochem Pharmacol* 2011; 82(5): 491-504.

Rooney GE, Knight AM, Madigan NN, et al. Sustained delivery of dibutyl cyclic adenosine monophosphate to the transected spinal cord via oligo [(polyethylene glycol) fumarate] hydrogels. *Tissue Eng Part A* 2011; 17(9-10): 1287-1302.

Rostami-Yazdi M, Clement B, Schmidt TJ, et al. Detection of metabolites of fumaric acid esters in human urine: implications for their mode of action. *J Invest Dermatol* 2009; 129(1): 231-234.

Roth FX, Kirchgessner M, Grassmann E, et al. [Mineral and trace element content of rats with dietary fumaric acid supplement][Article in German]. *Z Tierphysiol Tierernahr Futtermittelkd* 1982; 48(1-2): 16-20.

Rubant SA, Ludwig RJ, Diehl S, et al. Dimethylfumarate reduces leukocyte rolling in vivo through modulation of adhesion molecule expression. *J Invest Dermatol* 2008; 128(2): 326-331.

Rusai K, Schmaderer C, Hermans JJ, et al. Direct renin inhibition in a rat model of chronic allograft injury. *Transplantation* 2011; 92(9): 999-1004.

Sadjak A, Supanz S, Egger G. [The nephrotoxic effect of fumaric acid derivatives][Article in German]. *Dtsch Med Wochenschr* 1991; 116(12): 478.

Sandor M, Harris J, Mathiowitz E. A novel polyethylene depot device for the study of PLGA and P(FASA) microspheres in vitro and in vivo. *Biomaterials* 2002; 23(22): 4413-4423.

Schilling S, Goelz S, Linker R, et al. Fumaric acid esters are effective in chronic experimental autoimmune encephalomyelitis and suppress macrophage infiltration. Clin Exp Immunol 2006; 145(1): 101-107.

Schlegelmilch R, Krug A, Wolf HU. Mutagenic activity of acetonitrile and fumaronitrile in three short term assays with special reference to autoinduction. *J Appl Toxicol* 1988; 8(3): 201-209.

Schmerbach K, Pfab T, Zhao Y, et al. Effects of aliskiren on stroke in rats expressing human renin and angiotensinogen genes. *PLoS One* 2010; 5(11): e15052.

Schmidt MM, Dringen R. Fumaric acid diesters deprive cultured primary astrocytes rapidly of glutathione. *Neurochem Int* 2010; 57(4): 460-467.

Schupp N, Schinzel R, Heidland A, et al. Genotoxicity of advanced glycation end products: involvement of oxidative stress and of angiotensin II type 1 receptors. *Ann N Y Acad Sci* 2005; 1043: 685-695.

Sebök B, Bonnekoh B, Geisel J, et al. Antiproliferative and cytotoxic profiles of antipsoriatic fumaric acid derivatives in keratinocyte cultures. *Eur J Pharmacol* 1994; 270(1): 79-87.

Sebök B, Szabados T, Kerényi M, et al. Effect of fumaric acid, its dimethylester, and topical antipsoriatic drugs on epidermal differentiation in the mouse tail model. *Skin Pharmacol* 1996; 9(2): 99-103.

Seid RC Jr, Sakmar TP. A differential labelling model for determining the number of catalytically essential

carboxyl groups in fumarase. *Biochim Biophys Acta* 1981; 662(2): 196-201.

Sepehrdad R, Frishman WH, Stier CT Jr, et al. Direct inhibition of renin as a cardiovascular pharmacotherapy: focus on aliskiren. *Cardiol Rev* 2007; 15(5): 242-256.

Shimizu I, Kawashima K, Ishii D, et al. Effects of AH-9700, (+)-pentazocine, DTG and oxybutynin on micturition in anesthetized rats with acetone-induced cystitis. *Life Sci* 2001; 69(14): 1691-1697.

Siragy HM. Rationale for combining a direct renin inhibitor with other renin- angiotensin system blockers. Focus on aliskiren and combinations. *Cardiovasc Drugs Ther* 2011; 25(1): 87-97.

Skinner JT, Izat AL, Waldroup PW. Research note: fumaric acid enhances performance of broiler chickens. *Poult Sci* 1991; 70(6): 1444-1447.

Slabý A, Zák A. [Renin, prorenin, and the direct renin inhibitor aliskiren][Article in Czech]. *Cas Lek Cesk* 2010; 149(2): 55-60.

Solti F, Krasznai I, Iskum M, et al. [Effect of Halidor on the redistribution of the minute volume][Article in Hungarian]. *Orv Hetil* 1968; 109(21): Suppl: 24-25.

Solti F. [Study of the action of Halidor on the circulation in the extremities][Article in Hungarian]. *Orv Hetil* 1968; 109(21): Suppl: 21-24.

Sosunov EA, Gainullin RZ, Danilo P Jr, et al. Electrophysiological effects of LU111995 on canine hearts: in vivo and in vitro studies. *J Pharmacol Exp Ther* 1999; 290(1): 146-152.

Spencer SR, Wilczak CA, Talalay P. Induction of glutathione transferases and NAD(P)H:quinone reductase by fumaric acid derivatives in rodent cells and tissues. *Cancer Res* 1990; 50(24): 7871-7875.

Saessen JA, Li Y, Richart T. Oral renin inhibitors. *Lancet* 2006; 368(9545): 1449-1456.

Stangel M, Moharregh-Khiabani D, Linker RA, et al. [Fumaric acid and its esters in the treatment of multiple sclerosis: studies and effects][Article in German]. *Nervenarzt* 2008; 79(2): 212-217.

Stucchi P, Cano V, Ruiz-Gayo M, et al. Aliskiren reduces body-weight gain, adiposity and plasma leptin during diet-induced obesity. *Br J Pharmacol* 2009; 158(3): 771-778.

Su JY, Duffy S, Murphy TH. Reduction of H₂O₂-evoked, intracellular calcium increases in the rat

N18-RE-105 neuronal cell line by pretreatment with an electrophilic antioxidant inducer. *Neurosci Lett* 1999; 273(2): 109-112.

Sureshkumar KK, Vasudevan S, Marcus RJ, et al. Aliskiren: clinical experience and future perspectives of renin inhibition. *Expert Opin Pharmacother* 2008; 9(5): 825-837.

Sureshkuma KK. Renin inhibition with aliskiren in hypertension: focus on aliskiren/hydrochlorothiazide combination therapy. *Vasc Health Risk Manag* 2008; 4(6): 1205-1220.

Takimoto K, Lindahl R, Pitot HC. Regulation of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-inducible expression of aldehyde dehydrogenase in hepatoma cells. *Arch Biochem Biophys* 1992; 298(2): 493-497.

Tanaka M, Akahori M, Goto H. [The pharmacological profile and clinical findings on aliskiren (Rasilez tablet), direct renin inhibitor][Article in Japanese]. *Nihon Yakurigaku Zasshi* 2010; 135(4): 159-168.

Tanimoto T, Onodera K, Hosoya T, et al. Schizostatin, a novel squalene synthase inhibitor produced by the mushroom, *Schizophyllum commune*. I. Taxonomy, fermentation, isolation, physico-chemical properties and biological activities. *J Antibiot (Tokyo)* 1996; 49(7): 617-623.

Taylor A, Hess JJ, Maffly RH. On the effects of tricarboxylic acid cycle intermediates on sodium transport by the toad bladder. *J Membr Biol* 1974; 15(4): 319-329.

Thanos CG, Liu Z, Reineke J, et al. Improving relative bioavailability of dicumarol by reducing particle size and adding the adhesive poly(fumaric-co-sebacic) anhydride. *Pharm Res* 2003; 20(7): 1093-1100.

Thiessen A, Schmidt MM, Dringen R. Fumaric acid dialkyl esters deprive cultured rat oligodendroglial cells of glutathione and upregulate the expression of heme oxygenase 1. *Neurosci Lett* 2010; 475(1): 56-60.

Thorne RLZ, Waller GR, McPherson JK, et al. Autotoxic effects of old and new wheat straw in conventional-tillage and no-tillage wheat soil. *Bot Bull Acad Sin (Taipei)* 31(1): 35-50.

Timmer MD, Shin H, Horch RA, et al. In vitro cytotoxicity of injectable and biodegradable poly(propylene fumarate)-based networks: unreacted macromers, cross-linked networks, and degradation products. *Biomacromolecules* 2003; 4(4): 1026-1033.

Tschierschwitz A, Grassmann E, Kirchgessner M, et al. [Effect of fumaric acid supplements on the activity of liver enzymes (GOT, GPT, SUCCDH) with varying supply of energy and protein to growing rats][Article in German]. *Z Tierphysiol Tierernahr Futtermittelkd* 1982; 48(5): 253-259.

Uresin Y, Mehtar Bozkurt M, Sabirli S, et al. Aliskiren, the future of renin-angiotensin system blockade? *Expert Rev Cardiovasc Ther* 2007; 5(5):835-849.

Vaidyanathan S, Camenisch G, Schuetz H, et al. Pharmacokinetics of the oral direct renin inhibitor aliskiren in combination with digoxin, atorvastatin, and ketoconazole in healthy subjects: the role of P-glycoprotein in the disposition of aliskiren. *J Clin Pharmacol* 2008; 48(11): 1323-1338.

Valero T, Steele S, Neumüller K, et al. Combination of dacarbazine and dimethylfumarate efficiently reduces melanoma lymph node metastasis. *J Invest Dermatol* 2010; 130(4): 1087-1094.

van Esch JH, van Veghel R, Garrelds IM, et al. Handle region peptide counteracts the beneficial effects of the Renin inhibitor aliskiren in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 2011; 57(4): 852-858.

van Esch JH, Moltzer E, van Veghel R, et al. Beneficial cardiac effects of the renin inhibitor aliskiren in spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens* 2010; 28(10): 2145-2155.

van Zijderveld SM, Dijkstra J, Perdok HB, et al. Dietary inclusion of diallyl disulfide, yucca powder, calcium fumarate, an extruded linseed product, or medium-chain fatty acids does not affect methane production in lactating dairy cows. *J Dairy Sci* 2011; 94(6): 3094-3104.

Vandermeeren M, Janssens S, Borgers M, et al. Dimethylfumarate is an inhibitor of cytokine-induced E-selectin, VCAM-1, and ICAM-1 expression in human endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 234(1): 19-23.

Vanourková Z, Kramer HJ, Husková Z, et al. Despite similar reduction of blood pressure and renal ANG II and ET-1 levels aliskiren but not losartan normalizes albuminuria in hypertensive Ren-2 rats. *Physiol Res* 2010; 59(3): 339-345.

Wakkee M, Thio HB. Drug evaluation: BG-12, an immunomodulatory dimethylfumarate. *Curr Opin Investig Drugs* 2007; 8(11): 955-962.

Walz OP, Pallauf J. Retention and utilization of amino acids in piglets fed ad libitum or restrictively diets supplemented with organic acids. *Arch Tierernahr* 1997; 50(3): 227-238.

Wang K, Cai L, Hao F, et al. Distinct cell responses to substrates consisting of poly(ϵ -caprolactone) and poly(propylene fumarate) in the presence or absence of cross-links. *Biomacromolecules* 2010; 11(10): 2748-2759.

Wang L, Lin S. [Induction of quinone reductase and glutathion-s-transferase by dimethyl fumarate in rats][Article in Chinese]. *Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi* 1999; 33(6): 366-368.

Wang S, Kempen DH, Simha NK, et al. Photo-cross-linked hybrid polymer networks consisting of poly(propylene fumarate) and poly(caprolactone fumarate): controlled physical properties and regulated bone and nerve cell responses. *Biomacromolecules* 2008; 9(4): 1229-1241.

Wang X, Doherty GP, Leith MK, et al. Enhanced cytotoxicity of mitomycin C in human tumour cells with inducers of DT-diaphorase. *Br J Cancer* 1999; 80(8): 1223-1230.

Weaver CM, Martin BR, Costa NM, et al. Absorption of calcium fumarate salts is equivalent to other calcium salts when measured in the rat model. *J Agric Food Chem* 2002; 50(17): 4974-4975.

Werdenberg D, Joshi R, Wolfram S, et al. Presystemic metabolism and intestinal absorption of antipsoriatic fumaric acid esters. Biopharm Drug Dispos 2003; 24(6): 259-273.

Westermann D, Riad A, Lettau O, et al. Renin inhibition improves cardiac function and remodeling after myocardial infarction independent of blood pressure. *Hypertension* 2008; 52(6): 1068-1075.

Whaley-Connell A, Nistala R, Habibi J, et al. Comparative effect of direct renin inhibition and AT1R blockade on glomerular filtration barrier injury in the transgenic Ren2 rat. *Am J Physiol Renal Physiol* 2010; 298(3): F655-661.

Whitehead LF, Douglas AE. Metabolite comparisons and the identity of nutrients translocated from symbiotic algae to an animal host. *J Exp Biol* 2003; 206(Pt 18): 3149-3157.

Wierinckx A, Breve J, Mercier D, et al. Detoxication enzyme inducers modify cytokine production in rat mixed glial cells. *J Neuroimmunol* 2005; 166(1-2): 132-143.

Wilms H, Sievers J, Rickert U, et al. Dimethylfumarate inhibits microglial and astrocytic inflammation by suppressing the synthesis of nitric oxide, IL-1beta, TNF-alpha and IL-6 in an in-vitro model of brain inflammation. J Neuroinflammation 2010; 7: 30.

Wilson DM, Keshari KR, Larson PE, et al. Multi-compound polarization by DNP allows simultaneous assessment of multiple enzymatic activities in vivo. *J Magn Reson* 2010; 205(1): 141- 147.

Wolfram S, Bisang B, Grenacher B, et al. Transport of tri- and dicarboxylic acids across the intestinal brush

border membrane of calves. *J Nutr* 1990; 120(7): 767-774.

Wood JM, Schnell CR, Cumin F, et al. Aliskiren, a novel, orally effective renin inhibitor, lowers blood pressure in marmosets and spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens* 2005; 23(2): 417-426.

Wood JM, Maibaum J, Rahuel J, et al. Structure-based design of aliskiren, a novel orally effective renin inhibitor. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 308(4): 698-705.

Wood MA, Hess ML. The effects of dihydroxyfumarate on isolated rabbit papillary muscle function: evidence for an iron dependent non-hydroxyl radical mechanism. *Mol Cell Biochem* 1987; 78(2): 161-167.

Yamamoto E, Kataoka K, Dong YF, et al. Aliskiren enhances the protective effects of valsartan against cardiovascular and renal injury in endothelial nitric oxide synthase-deficient mice. *Hypertension* 2009; 54(3): 633-638.

Yamamoto S, Sugahara S, Ikeda K, et al. Amelioration of collagen-induced arthritis in mice by a novel phosphodiesterase 7 and 4 dual inhibitor, YM-393059. *Eur J Pharmacol* 2007; 559(2-3): 219-226.

Yamamoto S, Sugahara S, Ikeda K, et al. Pharmacological profile of a novel phosphodiesterase 7A and -4 dual inhibitor, YM-393059, on acute and chronic inflammation models. *Eur J Pharmacol* 2006; 550(1-3): 166-172.

Yamamoto S, Sugahara S, Naito R, et al. The effects of a novel phosphodiesterase 7A and -4 dual inhibitor, YM-393059, on T-cell-related cytokine production in vitro and in vivo. *Eur J Pharmacol* 2006; 541(1-2): 106-114.

Yamazoe Y, Tsubaki M, Matsuoka H, et al. Dimethylfumarate inhibits tumor cell invasion and metastasis by suppressing the expression and activities of matrix metalloproteinases in melanoma cells. *Cell Biol Int* 2009; 33(10): 1087-1094.

Yoshikawa T, Mine Y, Morikage K, et al. Pharmacological profile of AS-9705, a novel benzotriazolecarboxamide derivative, as a gastroprokinetic agent with potent anti-emetic activity. *Arzneimittelforschung* 2003; 53(2): 98-106.

Yun SM, Kang SH, Lee AN, et al. Suppression of Toll-like receptor 2 or 4 agonist-induced cyclooxygenase-2 expression by 4-oxo-4-(2-oxo-oxazolidin-3-yl)-but-2-enoic acid ethyl ester. *Int Immunopharmacol* 2010; 10(2): 163-168.

Zeevalk GD, Gluck M, Nicklas WJ. Oxidative stress glutathione and acute toxicity in retina due to excitotoxicity or energy impairment. J Neurochem 1998; 70(Suppl. 1): S58.