献血ベニロン - Ⅰ静注用 500 mg
献血ベニロン - Ⅰ静注用 1000 mg
献血ベニロン - Ⅰ静注用 2500 mg
献血ベニロン - Ⅰ静注用 5000 mg

医薬品製造販売承認事項一部変更承認申請

2.6　非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.1　緒言

ＫＭバイオロジクス株式会社

2.6.1　緒言

「GLOBULIN-S」（成分名：スルホ化人免疫グロブリン G、被験薬名：GGS；以下、「本剤」という）は、人免疫グロブリンの鎖間ジスルフィド結合を選択的にスルホ化し、免疫グロブリン分子の Fc フラグメント活性を保持したまま補体の異常な活性化を抑制する完全分子型の静注用人免疫グロブリン製剤である。本剤は帝人ファーマ株式会社が創案し、ＫＭバイオロジクス株式会社（「一般財団法人化学及血清療法研究所」より承継）との共同開発により本邦で初めて製剤化された静注用免疫グロブリン（Intravenous Immunoglobulin: IVIg）である。現在、「献血ベニロン®-Ｉ」としてＫＭバイオロジクス株式会社が製造し、本邦で帝人ファーマ株式会社が販売している。本剤は、昭和 54 年（1979 年）5 月 22 日に「低又は無ガンマグロブリン血症」及び「重症感染症における抗生物質との併用」を適応として、2,500～5,000 mg の点滴静注又は直接静注にて製造承認を得た。その後、「特発性血小板減少性紫斑病（他剤が無効で著明な出血傾向があり、外科的処置又は出産など一時的止血管理を必要とする場合）」、「川崎病の急性期（重症であり、冠動脈障害の発生の危険がある場合）」、「ギラン・バレー症候群（急性増悪期で歩行困難な重症例）」及び「好酸球性多発血管炎性肉芽腫症における神経障害の改善（ステロイド剤が効果不十分な場合に限る）」を適応として、それぞれ 200～400 mg/kg 体重/日、5 日間、200 mg/kg 体重/日、5 日間及び 2,000 mg/kg 体重、1 回、400 mg/kg 体重/日、5 日間の用法・用量にて効能・効果が追加された。

視神経炎は、視神経の細胞が炎症により障害を受けておこる脱髄性の視機能障害である。原因不明の特発性視神経炎以外に、多発性硬化症（Multiple Sclerosis: MS）及び視神経脊髄炎（Neuromyelitis Optica: NMO）由来の視神経炎などが存在する [1)]。MS 患者に発症する視神経炎では、中枢神経の髄鞘蛋白質又はオリゴデンドロサイトを標的とした自己免疫応答が免疫病態の中心であると考えられている [2)]。一方、NMO 患者に発症する視神経炎では、アストロサイト上に発現しているアクアポリン 4（Aquaporin 4: AQP4）に対する自己抗体（抗 AQP4 抗体）が補体や細胞を介してアストロサイトの障害とそれに引き続く神経の炎症及び脱髄を引き起こす。抗 AQP4 抗体陽性例は視力予後不良であり、抗 AQP4 抗体陽性視神経炎として定義されている [3)]。

これまで、抗 AQP4 抗体陽性の NMO 患者血清を曝露したラットを用いて、視神経障害と関連する網膜神経節細胞（Retina Ganglion cell: RGC）に対する GGS の効果を検討した NMO モデルに関する公表論文が 1 報 [4)]報告されている。しかし、視神経の病理組織学的解析から GGS の有効性を検討した報告はない。

そこで今回、MS などの中枢神経系炎症性脱髄疾患の動物モデルとして知られ、視神経炎を発症する実験的自己免疫性脳脊髄炎（Experimental Autoimmune Encephalomyelitis: EAE）モデル、EAE を強化免疫した実験的自己免疫性視神経炎（Experimental Autoimmune Optic Neuritis: EAON）モデルを用いて、GGS の視神経炎抑制効果を病理組織学的に検討した。

なお、薬物動態試験及び毒性試験に関しては、用法・用量が既承認時の範囲内であることから、今回の新効能に関する追加試験の実施は必要ないと判断し、新たな試験は実施しなかった。

本剤の予定する効能・効果及び用法・用量は以下の通りである。

1.　効能・効果

視神経炎の急性期（ステロイド剤が効果不十分な場合）

2.　用法・用量

通常、1 日にスルホ化人免疫グロブリン G 400 mg（8 mL）/kg 体重を 5 日間点滴静注する。

参考文献

1）遠藤　高生, 不二門　尚, 森本　壮, 三村　治, 西田　幸二. 抗アクアポリン 4 抗体陽性視神経炎の臨床調査. 日眼会誌. 2014; 118: 751-758.　［4.3-1］

2）多発性硬化症・視神経脊髄炎診療ガイドライン 2017. 医学書院. 2017.　［4.3-2］

3）抗アクアポリン 4 抗体陽性視神経炎診療ガイドライン. 日眼会誌. 2014; 118: 446-460.　［4.3-3］

4）Nobuyoshi S, Kanamori A, Matsumoto Y, Nakamura M. Rescue effects of intravenous immunoglobulin on optic nerve degeneration in a rat model of neuromyelitis optica. Jpn J Ophthalmol. 2016; 60: 419-23.　［4.3-4］

献血ベニロン - Ⅰ静注用 500 mg
献血ベニロン - Ⅰ静注用 1000 mg
献血ベニロン - Ⅰ静注用 2500 mg
献血ベニロン - Ⅰ静注用 5000 mg

医薬品製造販売承認事項一部変更承認申請

2.6　非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.2　薬理試験の概要文

ＫＭバイオロジクス株式会社

目次

2.6.2　薬理試験の概要文 5
2.6.2.1　まとめ 5
2.6.2.2　効力を裏付ける試験 7
2.6.2.3　副次的薬理試験 19
2.6.2.4　安全性薬理試験 19
2.6.2.5　薬力学的薬物相互作用試験 19
2.6.2.6　考察及び結論 19
2.6.2.7　図表 19
2.6.2.8　参考文献 20

略号一覧表

略号	英名	日本語
ADCC	Antibody-dependent Cell-mediated Cytotoxicity	抗体依存性細胞介在性傷害
AQP4	Aquaporin 4	アクアポリン 4
CDC	Complement-dependent Cytotoxicity	補体依存性細胞傷害
CD8	Cluster of Differentiation 8	CD8（T 細胞受容体の共受容体として働く膜貫通糖タンパク質）
C3a, C3b	Complement 3a, Complement 3b	補体 C3a, C3b
DMSO	Dimethyl Sulfoxide	ジメチルスルホキシド
EAE	Experimental Autoimmune Encephalomyelitis	実験的自己免疫性脳脊髄炎
EAON	Experimental Autoimmune Optic Neuritis	実験的自己免疫性視神経炎
Fc	Fc fragment of immunoglobulin molecules (crystallizable fragment)	免疫グロブリン分子の Fc フラグメント（結晶化可能部位）
FcRn	Neonatal Fc Receptor	胎児性 Fc 受容体
GFAP	Glial Fibrillary Acidic Protein	グリア線維性酸性蛋白質
GGS	Freeze-dried sulfonated human normal immunoglobulin	一般名：乾燥スルホ化人免疫グロブリン 成分名：スルホ化人免疫グロブリン G 治験成分記号：GLOBULIN-S
HE 染色	Hematoxylin Eosin staining	ヘマトキシリン・エオジン染色
IFNγ	Interferon γ	インターフェロン γ
IgG	Immunoglobulin G	免疫グロブリン G
IL-1	Interleukin 1	インターロイキン 1
IL-2	Interleukin 2	インターロイキン 2
IL-17	Interleukin 17	インターロイキン 17
IVIg	Intravenous Immunoglobulin	静注用免疫グロブリン
MAC	Membrane Attack Complex	膜侵襲複合体
MBP	Myelin Basic Protein	ミエリン塩基性蛋白質
MMP2/9	Matrix Metalloproteinase 2/9	マトリックスメタロプロテアーゼ 2/9
MOG	Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein	ミエリンオリゴデンドロサイト糖蛋白質
MS	Multiple Sclerosis	多発性硬化症
NF	Neurofilament	ニューロフィラメント
NK 細胞	Natural Killer cell	ナチュラルキラー細胞
NKT 細胞	Natural Killer T cell	ナチュラルキラーT 細胞
NMO	Neuromyelitis Optica	視神経脊髄炎
RGC	Retina Ganglion cell	網膜神経節細胞
S1P	Sphingosine-1-phosphate	スフィンゴシン-1-リン酸
Th1 細胞	Helper T 1 cell	Th1 細胞（ヘルパーT 細胞の亜群）
Th17 細胞	Helper T 17 cell	Th17 細胞（ヘルパーT 細胞の亜群）

略号一覧表（続き）

略号	英名	日本語
TNF-α	Tumor Necrosis Factor α	腫瘍壊死因子 α
Treg 細胞	Regulatory T cell	制御性 T 細胞

2.6.2　薬理試験の概要文

2.6.2.1　まとめ

MS などの中枢神経系炎症性脱髄疾患の動物モデルとして知られ、視神経炎を発症する EAE モデル、EAE を強化免疫した EAON モデルを用いて、GGS の視神経炎抑制効果を病理組織学的に検討した。その結果、GGS は両モデルの視神経において抗炎症作用及び脱髄抑制作用、EAE モデルの視神経において軸索保護作用を有することが示された。また、EAON マウスでは GGS が用量依存的に臨床症状スコアを抑制することを確認した。

NMO モデルと考えられる抗 AQP4 抗体陽性 NMO 患者血清を曝露したラットでは、視神経障害の指標となりうる RGC の密度、ニューロフィラメント（Neurofilament: NF）の低下を GGS はいずれも抑制したと報告されている [1)]。

以上より、GGS は視神経炎の発症原因となる MS 及び NMO の各モデルにおいて薬効を示したことから、視神経炎患者において有効性が期待される。

なお、MS 及び NMO 由来の視神経炎の発症機序、各視神経炎に対する GGS の作用メカニズムは、文献情報より以下の通りと想定される。

MS 由来の視神経炎に関しては、中枢神経系炎症性脱髄疾患の動物モデルである EAE の研究などから、急性期病巣形成には髄鞘抗原に対して特異的に反応するインターフェロン γ（IFNγ）産生性の Th1 細胞及びインターロイキン 17（IL-17）産生性の Th17 細胞が主役をなすと考えられており、末梢で活性化された Th1/Th17 細胞が中枢神経内へ浸潤し病巣を形成する仮説が広く受け入れられている [2)]。すなわち、①末梢で活性化した Th1/Th17 細胞が血管内皮を通過し血管周囲腔へ侵入する、②そこで抗原提示細胞が提示する髄鞘抗原に反応する Th1/Th17 細胞のみが再活性化される、③再活性化された Th1/Th17 細胞は IL-17 又は IFNγ を産生するほか、マトリックスメタロプロテアーゼ 2/9（MMP2/9）などの作用により、グリア境界膜を破壊して中枢神経実質内へ侵入する、④実質内へ侵入した Th1/Th17 細胞はミクログリア又は樹状細胞などの抗原提示細胞によって抗原提示を受けさらに活性化した結果、炎症性サイトカイン及びケモカインを産生し、ミクログリア及びマクロファージなどの炎症性細胞を動員して炎症性脱髄病巣を形成する [3)]。また、B 細胞、CD8 陽性 T 細胞、ナチュラルキラー（NK）細胞、ナチュラルキラーT （NKT）細胞、好中球、好酸球などの関与も報告されている [4, 5)]。

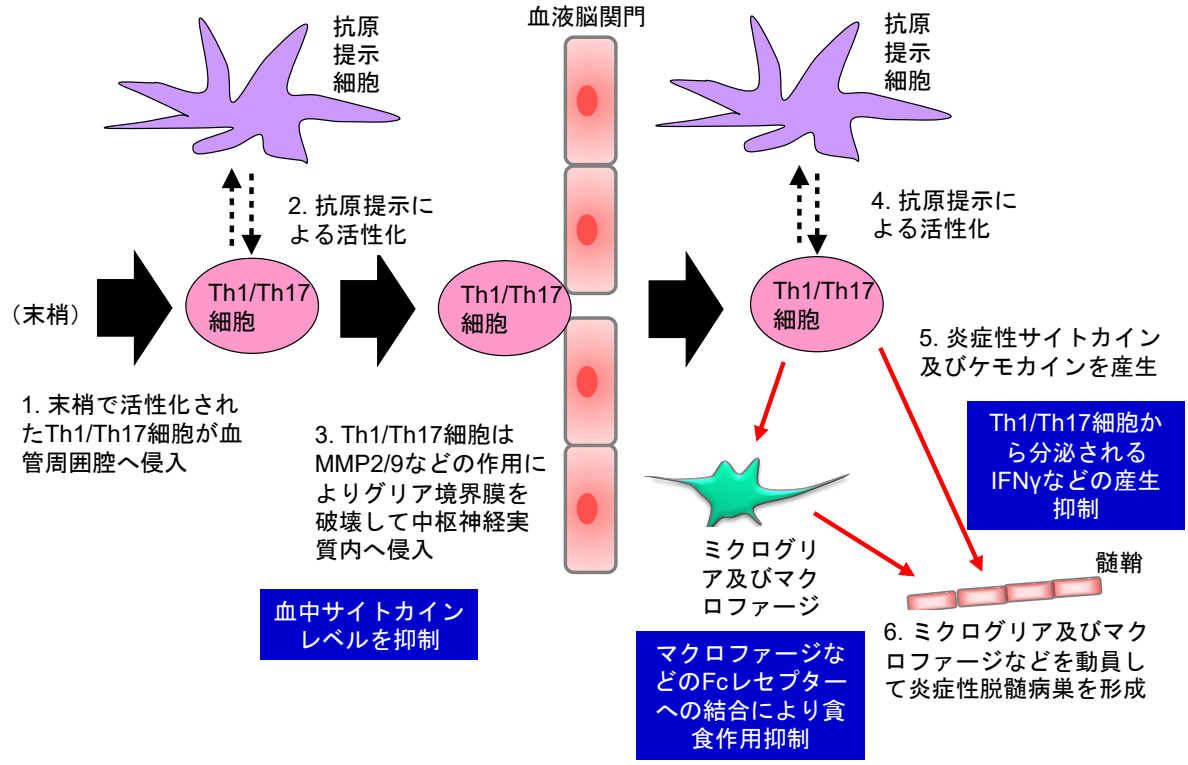
GGS の MS に対する作用機序は明らかではないが、主に以下の機序が想定される [6, 7)]。

- T 細胞に対する作用：Th1 細胞から分泌されるインターロイキン 2（IL-2）及び IFNγ の産生を抑制する。
- Fc レセプターを介した作用：マクロファージなどの貪食細胞上の Fc レセプターに結合し、飽和することによりオプソニン化を阻害し、貪食細胞の活性化を抑制する。
- サイトカインに対する作用：血中におけるインターロイキン 1（IL-1）及び腫瘍壊死因子 α（TNF-α）などのサイトカインレベルを抑制する。

最近では、IVIg の制御性 T（Treg）細胞誘導 [8, 9)]、MMP2/9 活性化抑制 [10)]、スフィンゴシン-1-リン酸（S1P）受容体発現低下による細胞遊走抑制 [11)]、などの作用も報告されている。

その他、B 細胞及び抗体などに対する IVIg の作用として以下の報告がある [6, 7]。

- 自己抗体の異化亢進作用：エンドサイトーシスにより細胞内に取り込まれた IgG はリソソームに運搬されて分解されるが、胎児性 Fc 受容体（FcRn）に結合した IgG は異化を受けずに循環血液中に戻される。GGS により血中 IgG 濃度が上昇すると FcRn が飽和することにより IgG の異化が亢進し、自己抗体が減少すると考えられる。
- 抗イディオタイプ抗体を介した作用：GGS には多様なイディオタイプを持つ抗体、若しくはこれに対する抗イディオタイプ抗体を多数含む。こうした抗イディオタイプ抗体による自己抗体の中和が病態軽減に作用すると考えられる。
- 補体活性化抑制：組織傷害を引き起こす膜侵襲複合体（Membrane Attack Complex: MAC）の形成を阻害する。補体活性化経路で重要な C3b の活性化を抑制する。



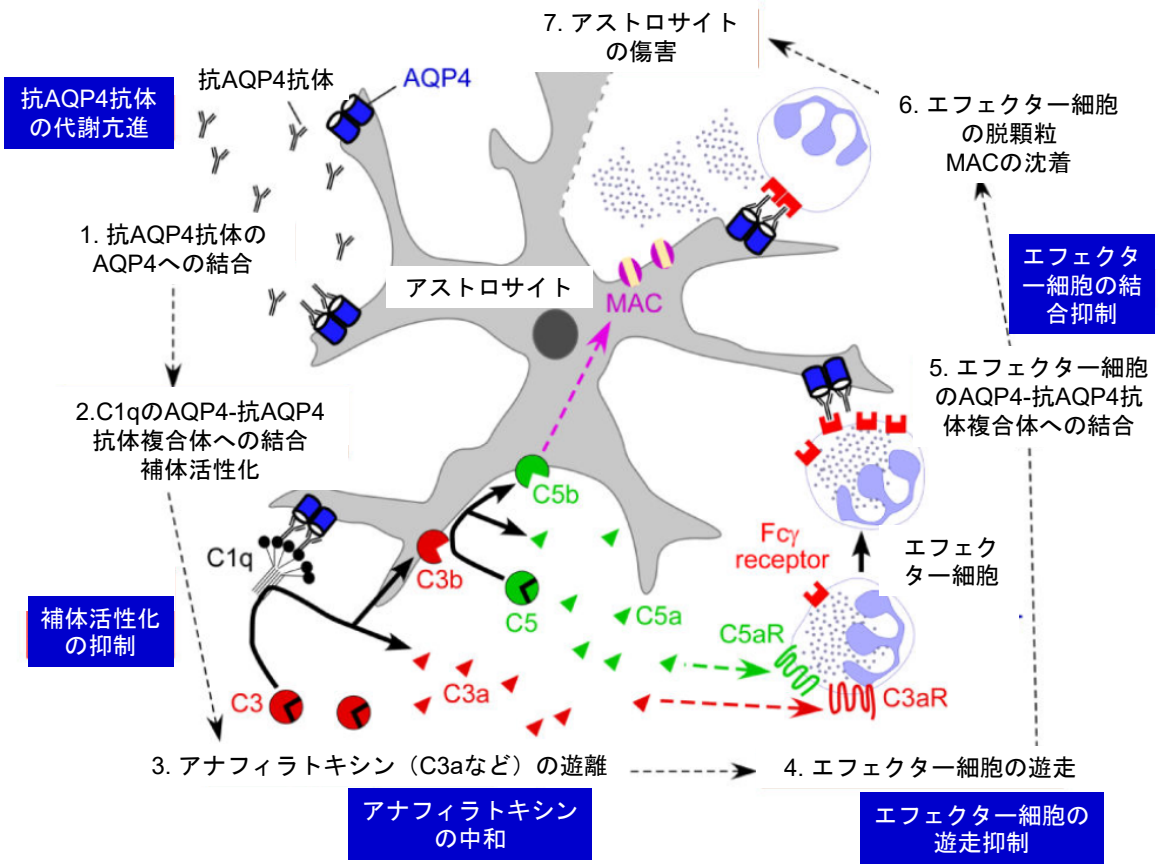
1.-6.は病態発症メカニズム　　青のボックス：GGS の作用メカニズム（主要な作用のみ）

図 2.6.2-1　MS 由来視神経炎における GGS の作用メカニズム（仮説）

NMO 由来の視神経炎に関しては、血液脳関門のアストロサイトの足突起に豊富に存在している水チャネル AQP4 に対する自己抗体（抗 AQP4 抗体）が、補体や細胞を介してアストロサイトの障害とそれに引き続く神経の炎症及び脱髄を引き起こすことが知られている [2]。抗体による細胞傷害メカニズムには、①抗体の結合により補体の活性化が生じ、MAC が形成され細胞膜破壊を生じる補体依存性細胞傷害（Complement-dependent Cytotoxicity: CDC）と、②結合抗体の Fc 部分に NK 細胞又はマクロファージなどのエフェクター細胞上の Fc 受容体が結合することにより、細胞傷害性物質の放出を誘導する抗体依存性細胞介在性傷害（Antibody-dependent Cell-

mediated Cytotoxicity: ADCC）の二つの機序が想定されている[12]。最近、自己抗体として抗 AQP4 抗体以外にミエリンオリゴデンドロサイト糖蛋白質（Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein: MOG）抗体が陽性の NMO の報告が相次いでおり[13]、それ以外に未知の自己抗体が関わる可能性も考えられる。

ヒト免疫グロブリンは CDC 及び ADCC を軽減することが培養細胞系で示されている[14]。GGS により NMO を軽減するメカニズムとして、抗 AQP4 抗体の代謝促進、補体活性化の抑制、アナフィラトキシン（C3a など）の中和、エフェクター細胞の遊走抑制、エフェクター細胞の AQP4-抗 AQP4 抗体複合体への結合阻害などが挙げられる[14]。



1.-7.は病態発症メカニズム　　青のボックス：GGS の作用メカニズム

図 2.6.2-2　NMO 由来視神経炎における GGS の作用メカニズム（仮説、参考文献 14）より引用、一部改変）

2.6.2.2　効力を裏付ける試験

2.6.2.2.1　　実験的自己免疫性視神経炎（EAON）マウスにおける臨床症状改善作用[15]

［概要表 2.6.3.2；報告書 4.2.1.1-1（1301341）］

中枢神経系炎症性脱髄疾患の動物モデルである EAE では、実験動物にミエリン塩基性蛋白質

（Myelin Basic Protein: MBP）又は髄鞘構成蛋白質である MOG などをアジュバントとともに免疫することにより、中枢神経系への炎症性細胞の浸潤を起因として、尾や後肢麻痺などの神経障害が惹起される。その症状並びに病理所見の類似性から、MS の発症機序及び MS 治療薬の研究に有用な急性期動物モデルとして広く用いられている [16]。但し、本モデルでは視神経炎の発症率が 60% から 70%のため、より高頻度に発症するように MOG ペプチド抗原に DMSO を混和させて強化免疫し、80%から 90%の発症率となる EAON モデルが確立された [17]。EAE における GGS の臨床症状スコアの有効性は既に報告されており [9]、今回 EAON において GGS の臨床症状を評価した。

（方法）

C57BL/6J マウス（8 週齢、雌）に、MOG 35 残基から 55 残基に相当するペプチド MOG_{35-55}、結核菌の死菌、フロイント完全アジュバント及び DMSO を混和してエマルジョンを作製し、マウスの首回り皮下に免疫した。免疫時及び免疫 2 日後に百日咳毒素を腹腔内投与した。免疫時より生理食塩液、GGS 100、200、400 及び 800 mg/kg を 5 日間腹腔内投与した。

臨床症状評価には以下の EAE スコアを用いた。

0：正常、1：尾の緊張低下、2：尾の緊張完全消失、3：軽い歩行異常、4：片後肢麻痺、5：両後肢麻痺、6：両後肢麻痺および片前肢麻痺、7：四肢麻痺、8：瀕死、9：死亡

発症日、発症日数、最大スコア、得られたスコアの値を合計した累積スコア（Area under the curve: AUC）を算出後、Shirley-Williams の多重比較検定を実施した。

（結果）

生理食塩液投与群に対し、GGS 投与群は EAON モデルにおける発症日、発症日数、最大スコア、AUC いずれも有意に抑制した。また、その効果は GGS の投与量に依存していた［図 2.6.2-3］。

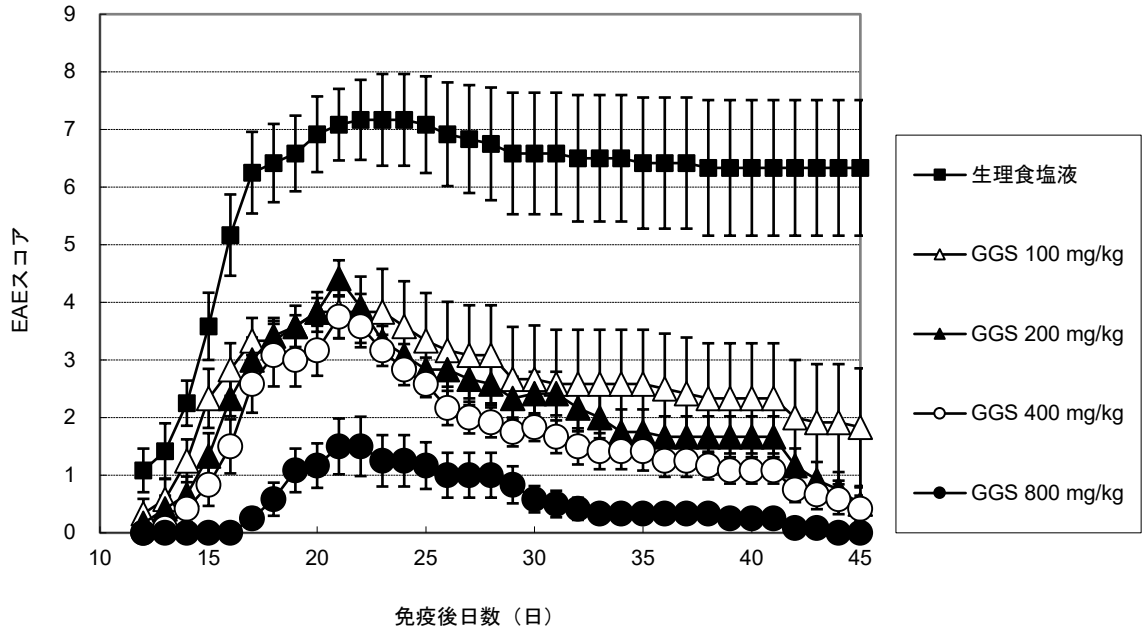


図 2.6.2-3　EAON マウスにおける臨床症状評価

グラフは平均値±標準誤差（各群 12 例）．各群の発症日、発症日数、最大スコア、AUC を Shirley-Williams の多重比較検定で解析した結果、生理食塩液投与群に対し、GGS 投与群（100-800 mg/kg）はいずれの項目も有意に抑制した（p<0.05）．

2.6.2.2.2　実験的自己免疫性脳脊髄炎（EAE）及び実験的自己免疫性視神経炎（EAON）マウスにおける視神経病態改善作用 [15)]

［概要表 2.6.3.2；報告書 4.2.1.1-2（B2-18001）］

EAE 及び EAON マウスにおいて、視神経炎に対する GGS の抑制効果を病理組織学的に評価した。

（方法）

EAON マウスの病態作製方法は 2.6.2.2.1 と同様であり、EAE マウスの病態作製では、EAON マウス免疫時に用いたエマルジョンから DMSO を除いたものを脇腹皮下に免疫した。いずれのモデルにおいても免疫時より生理食塩液、GGS 800 mg/kg を 5 日間腹腔内投与した。免疫後 14 日及び 21 日に視神経を採取してホルマリン固定し、ヘマトキシリン・エオジン（HE）染色、Klüver-Barrera 染色、Bodian 染色、さらに抗 Iba1 抗体、抗 MBP 抗体及び抗グリア線維性酸性蛋白質（Glial Fibrillary Acidic Protein: GFAP）抗体を用いた免疫組織学的染色の各視神経標本を作製した。HE 染色標本は、炎症性細胞浸潤の程度をスコアリングした。HE 染色以外の染色標本は、標本面積及び染色面積を計測し、標本面積に対する染色面積の割合（%）を算出後、生理食塩液投与群に対する GGS 投与群の平均値の差に関して Mann-Whitney U 検定を実施した。

（結果）

HE 染色では、EAE 及び EAON 群とも無処置群と比較して、免疫後 14 及び 21 日いずれも炎症性細胞浸潤を主体とした病変が認められ、視神経炎が惹起されていることが確認された。EAE

及び EAON 群とも生理食塩液投与群と比較して、GGS 投与により免疫後 14 及び 21 日いずれも有意に炎症が抑制された［図 2.6.2-4］。

炎症性細胞浸潤の詳細な検討のため、ミクログリアの特異的マーカーである Iba1 の免疫染色を実施した。EAE 及び EAON 群とも無処置群と比較して、免疫後 14 及び 21 日いずれも Iba1 陽性の面積の割合が増加した。EAE 及び EAON 群とも生理食塩液投与群と比較して、GGS 投与により免疫後 14 日に有意に Iba1 陽性の面積の割合が減少した［図 2.6.2-5］。

脱髄の検討のため、髄鞘を染色する Klüver-Barrera 染色を実施した。EAE 及び EAON 群とも無処置群と比較して、免疫後 14 及び 21 日いずれも Klüver-Barrera 陽性の面積の割合が減少した。EAE 群において生理食塩液投与群と比較して、GGS 投与により免疫後 14 及び 21 日いずれも有意に Klüver-Barrera 陽性の面積の割合が増加した［図 2.6.2-6］。

脱髄の詳細な検討のため、髄鞘形成を担うオリゴデンドロサイトの特異的マーカーである MBP の免疫染色を実施した。EAE 及び EAON 群とも無処置群と比較して、免疫後 14 及び 21 日いずれも MBP 陽性の面積の割合が減少した。EAON 群において生理食塩液投与群と比較して、GGS 投与により免疫後 21 日に有意に MBP 陽性の面積の割合が増加した［図 2.6.2-7］。

軸索損傷を検討するため、軸索などを染色する Bodian 染色を実施した。EAE 群は無処置群と比較して、免疫後 14 及び 21 日いずれも Bodian 陽性の面積の割合が減少した。EAE 群において生理食塩液投与群と比較して、GGS 投与により免疫後 14 日及び 21 日いずれも有意に Bodian 陽性の面積の割合が増加した［図 2.6.2-8］。

GGS のアストロサイトへの影響を検討するため、アストロサイトの特異的マーカーである GFAP の免疫染色を実施した。EAE 群において生理食塩液投与群と比較して、GGS 投与により免疫後 21 日に有意に GFAP 陽性の面積の割合が減少した［図 2.6.2-9］。

EAE 及び EAON マウスにおいて、視神経炎に対する GGS の抑制効果を病理組織学的に評価した。その結果、GGS は両モデルの視神経において抗炎症作用及び脱髄抑制作用、EAE モデルの視神経において軸索保護作用を有することが示された。

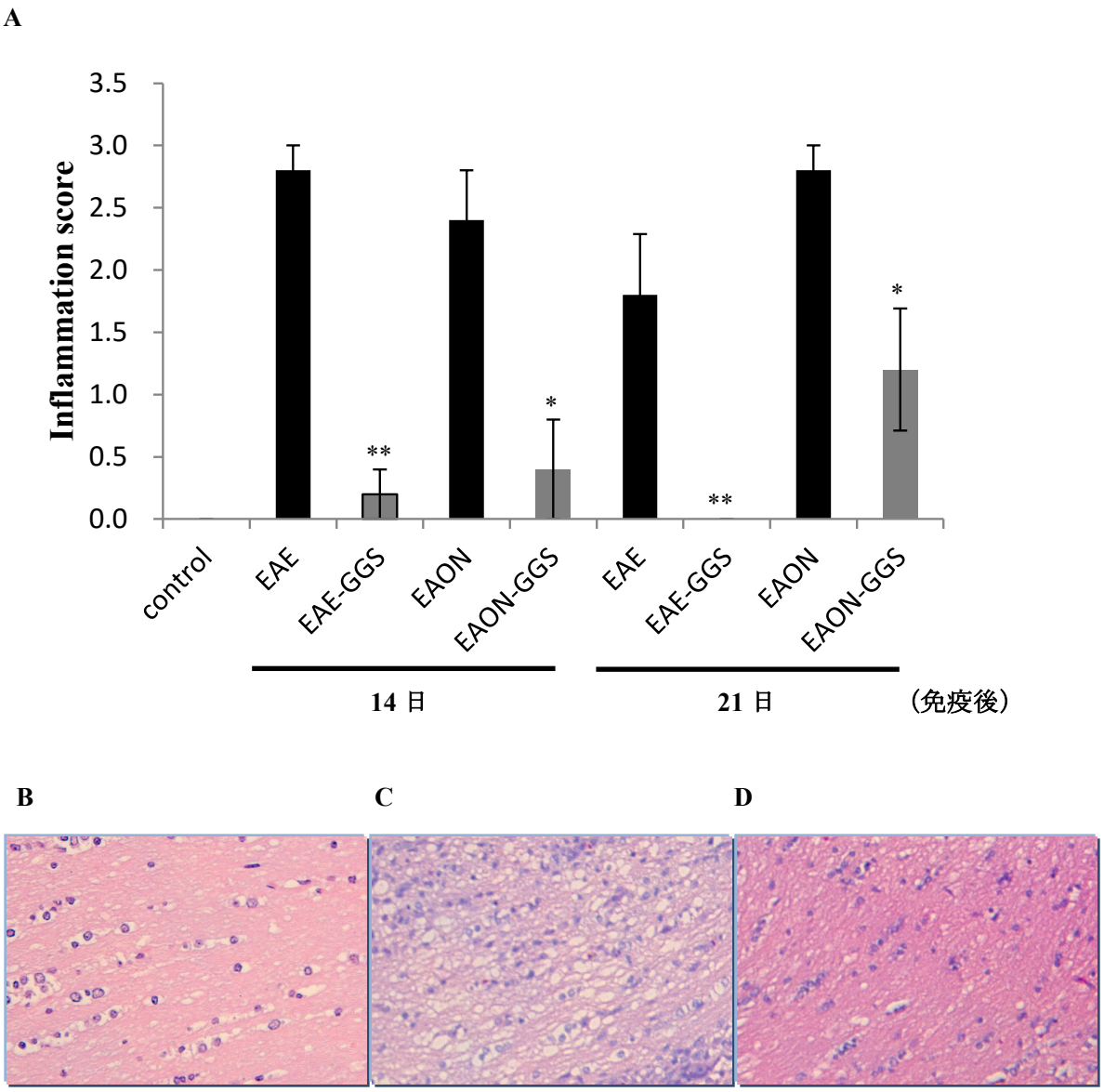


図 2.6.2-4 視神経 HE 染色標本を用いた病理組織学的検討

(A) Inflammation score（炎症スコア）．平均±標準誤差（各群 5 例、無処置群のみ 3 例）．**P < 0.01 vs EAE, *P < 0.05 vs EAON（Mann-Whitney U 検定）． **(B)** - **(D)** 典型例. **(B)** 無処置群. **(C)** EAE 群（免疫後 14 日）．細胞浸潤の増加がみられる. **(D)** EAE（GGS）群（免疫後 14 日）．GGS 投与により浸潤の抑制がみられる.

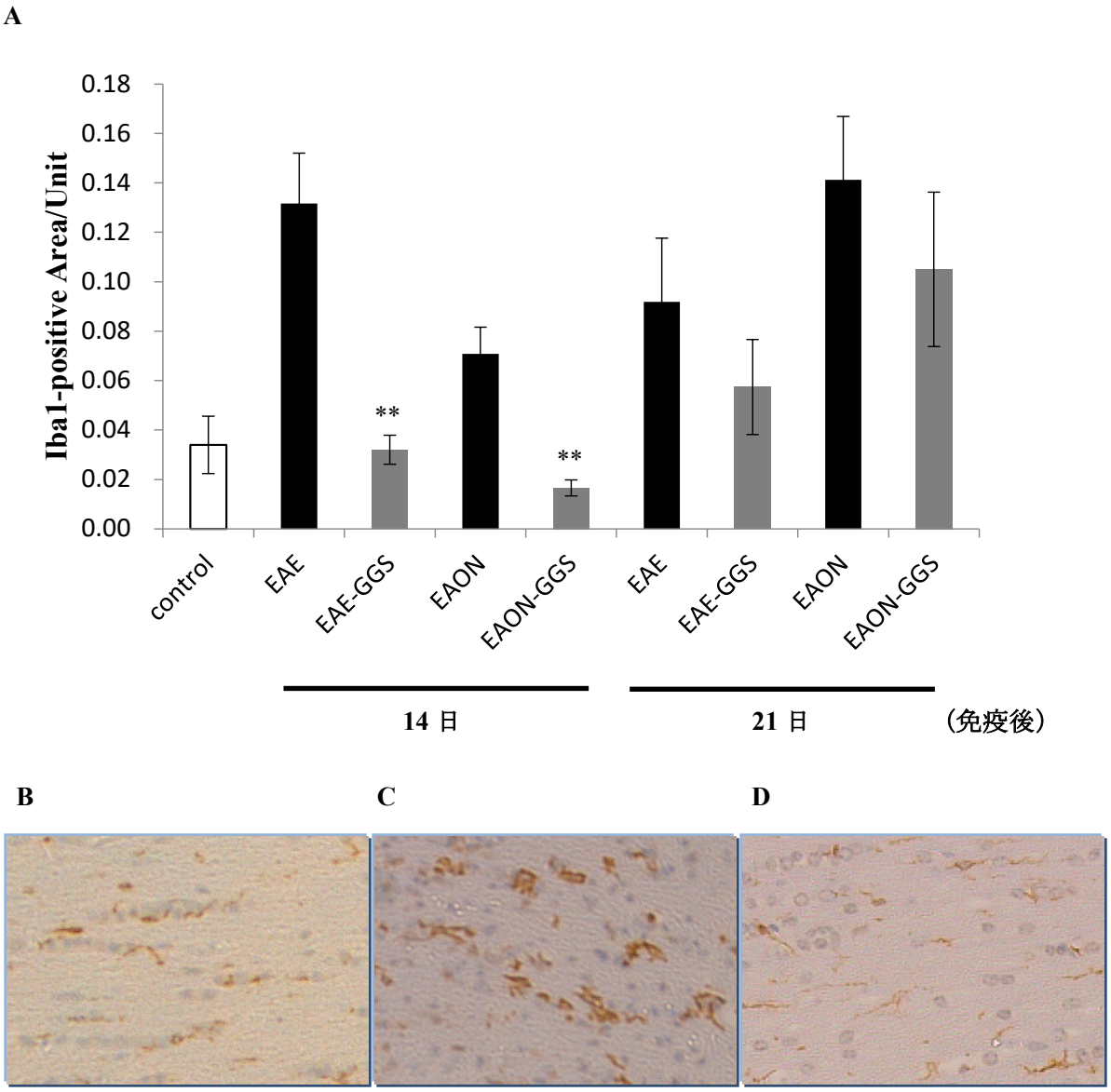


図 2.6.2-5 視神経 Iba1 染色標本を用いたミクログリアの免疫組織化学的検討

(A) Iba1-positive area per unit（Iba1 陽性の面積の割合）．平均±標準誤差（各群 5 例、無処置群のみ 3 例）．**P < 0.01 vs EAE or EAON（Mann-Whitney U 検定）．**(B)** - **(D)** 典型例. **(B)** 無処置群. **(C)** EAE 群（免疫後 14 日）．ミクログリア浸潤の増加がみられる. **(D)** EAE（GGS）群（免疫後 14 日）．GGS 投与により浸潤の抑制がみられる.

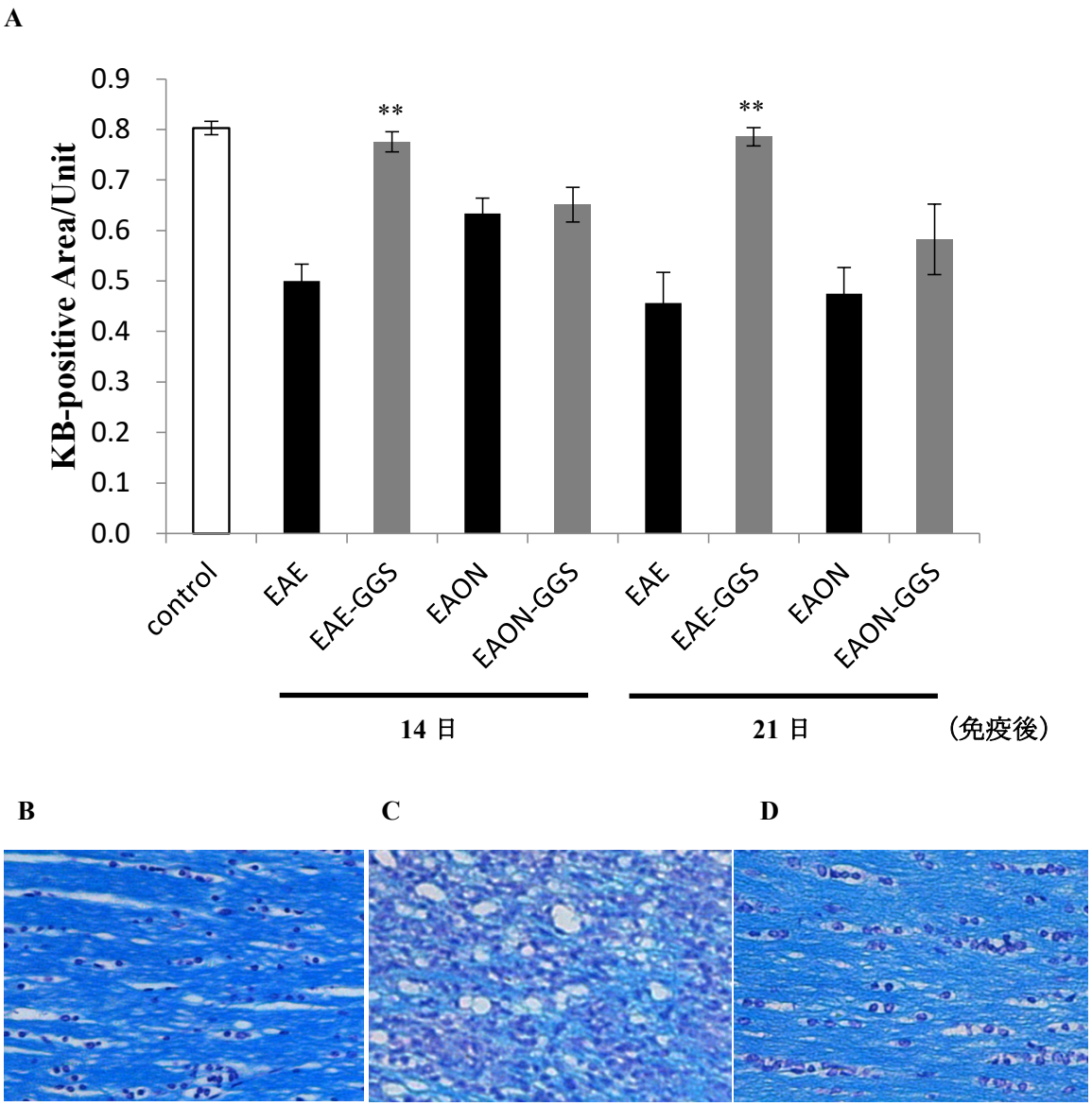


図 2.6.2-6 視神経 Klüver-Barrera (KB) 染色標本を用いた病理組織学的検討

(**A**) KB-positive area per unit（KB 陽性の面積の割合）．平均±標準誤差（各群 5 例、無処置群のみ 3 例）．**P < 0.01 vs EAE（Mann-Whitney U 検定）．(**B**) - (**D**) 典型例. (**B**) 無処置群. (**C**) EAE 群（免疫後 14 日）．脱髄がみられる. (**D**) EAE（GGS）群（免疫後 14 日）．GGS 投与により脱髄の抑制がみられる．

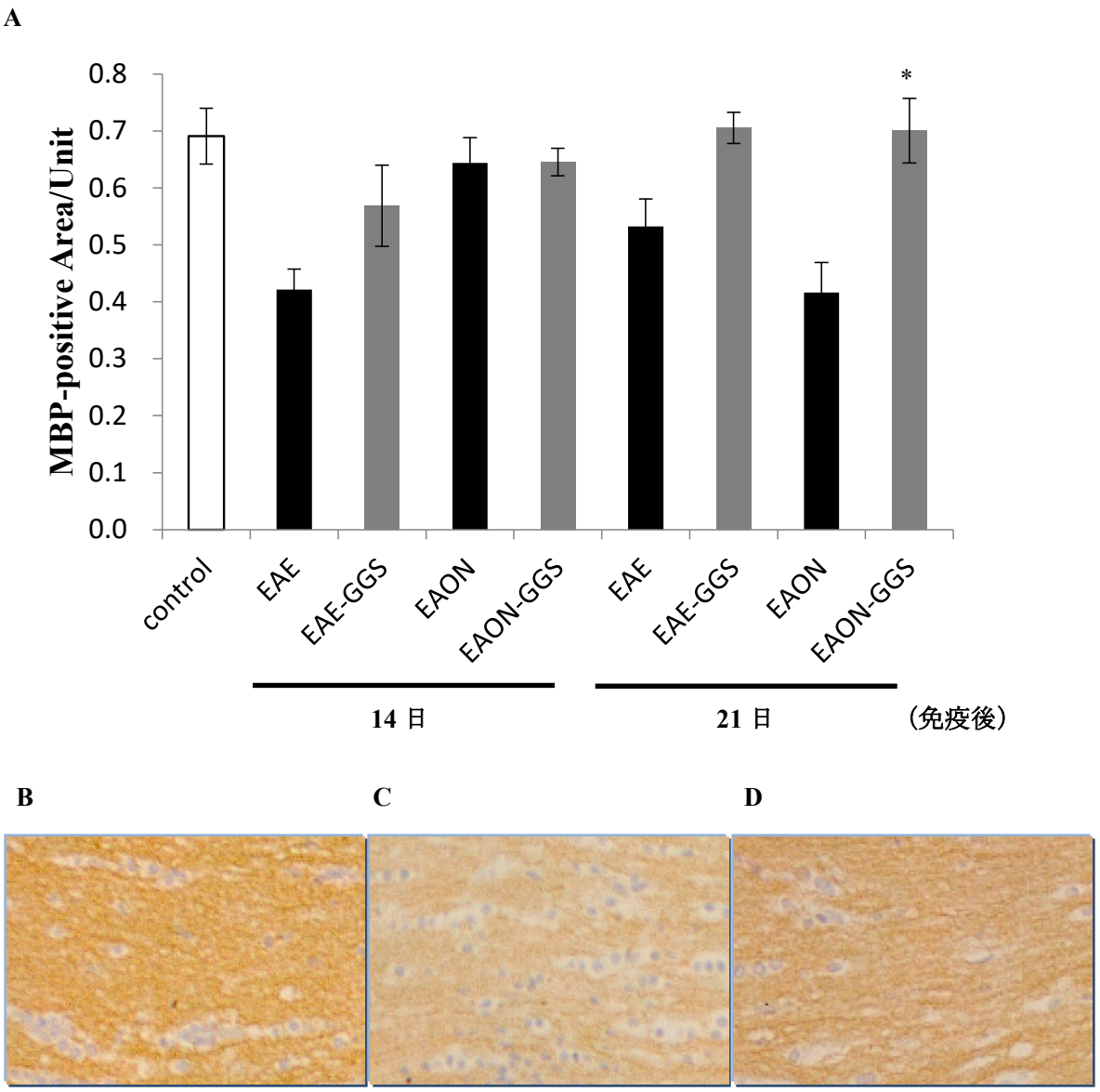


図 2.6.2-7 視神経 MBP 染色標本を用いたオリゴデンドロサイトの免疫組織化学的検討

(A) MBP-positive area per unit（MBP 陽性の面積の割合）．平均±標準誤差（各群 5 例、無処置群のみ 3 例）．*P < 0.05 vs EAON（Mann-Whitney U 検定）．**(B)** - **(D)** 典型例. **(B)** 無処置群. **(C)** EAE 群（免疫後 14 日）．脱髄がみられる． **(D)** EAE（GGS）群（免疫後 14 日）．GGS 投与により脱髄の抑制がみられる．

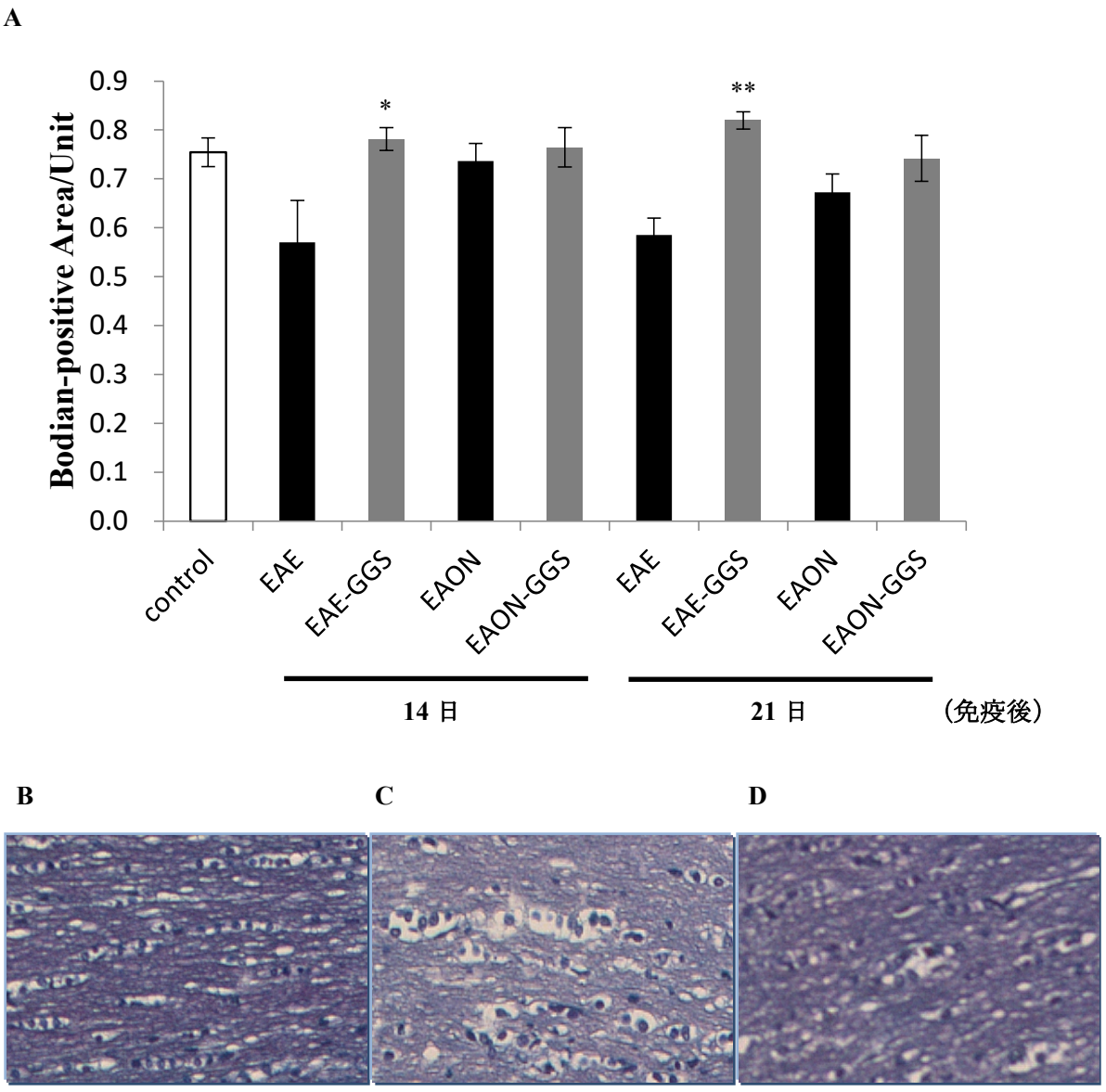


図 2.6.2-8 視神経 Bodian 染色標本を用いた病理組織学的検討

(A) Bodian-positive area per unit（Bodian 陽性の面積の割合）．平均±標準誤差（各群 5 例、無処置群のみ 3 例）．**P < 0.01 vs EAE, *P < 0.05 vs EAE（Mann-Whitney U 検定）．**(B)** - **(D)** 典型例. **(B)** 無処置群. **(C)** EAE 群（免疫後 14 日）．軸索損傷がみられる. **(D)** EAE（GGS）群（免疫後 14 日）．GGS 投与により軸索損傷の抑制がみられる.

A

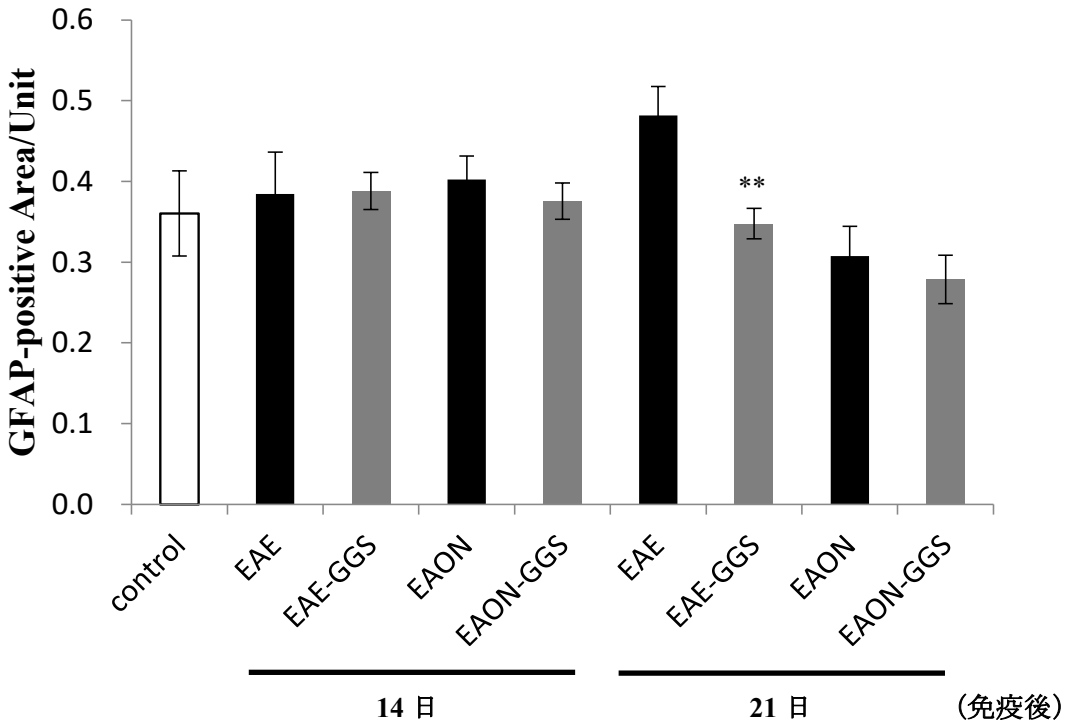


図 2.6.2-9 視神経 GFAP 染色標本を用いたアストロサイトの免疫組織化学的検討

(A) GFAP-positive area per unit（GFAP 陽性の面積の割合）．平均±標準誤差（各群 5 例、無処置群のみ 3 例）．**P < 0.01 vs EAE（Mann-Whitney U 検定）．

2.6.2.2.3　抗 AQP4 抗体陽性 NMO 患者血清曝露ラットにおける視神経変性改善作用 [1)]

［概要表 2.6.3.2］

抗 AQP4 抗体陽性視神経炎では、網膜神経線維の菲薄化と視機能障害に強い相関性がある[18)]。RGC の密度、神経線維のマーカーである NF を指標に抗 AQP4 抗体陽性 NMO 患者血清を曝露したラットにおいて GGS の視神経変性に対する効果を検討したと報告されている[1)]。

（方法）

SD ラット（雄）の頭頂骨にドリルで小さな穴をあけ、神経回路を標識するため Fluoro-Gold を上丘に注入した。注入から 7 日後に NMO 患者から採取された抗 AQP4 抗体陽性血清を切開した視神経鞘に注入した。血清曝露 0 日及び 7 日後（コホート A）、7 日及び 10 日後（コホート B）において、生理食塩液、GGS 500 mg/kg を各日尾静脈内投与した。血清曝露 14 日後に網膜を採取してパラホルムアルデヒド固定し、Fluoro-Gold で標識された RGC を蛍光顕微鏡下でカウントし、単位面積あたりの細胞密度を算出した。また、網膜と同時にコホート A の視神経を採取してホモジナイズ後、抗 NF 抗体のウエスタンブロットを実施した。

（結果）

RGC の密度は、対照群で 981±182 /mm^2、コホート A の GGS 投与群で 1455±192 /mm^2、コホート B の GGS 投与群で 1657±192 /mm^2 であり、対照群と比較して GGS 投与群はいずれも有意に高値を示した［図 2.6.2-10］。

NF 量は、対照群と比較してコホート A の GGS 投与群で有意に高値を示した［図 2.6.2-11］。

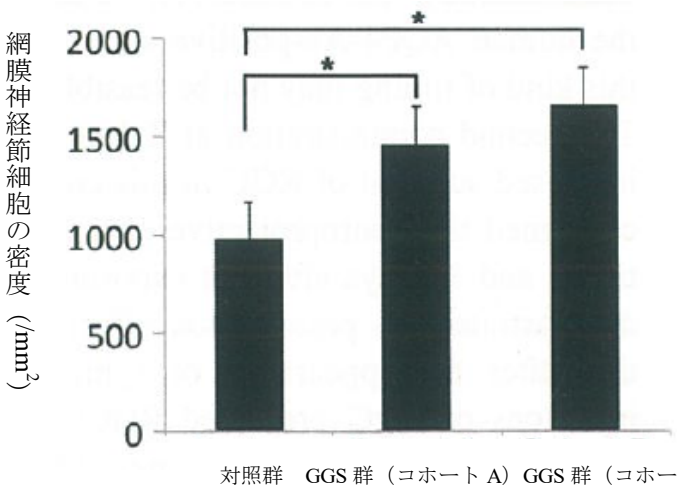


図 2.6.2-10 ラット網膜神経節細胞（RGC）の密度

平均±標準偏差（対照群 10 例、GGS 群（コホート A）7 例、GGS 群（コホート B）4 例）．*P < 0.001 vs 対照群．　GGS 投与により神経節細胞の脱落の抑制がみられる（参考文献 1）より引用、一部改変）．

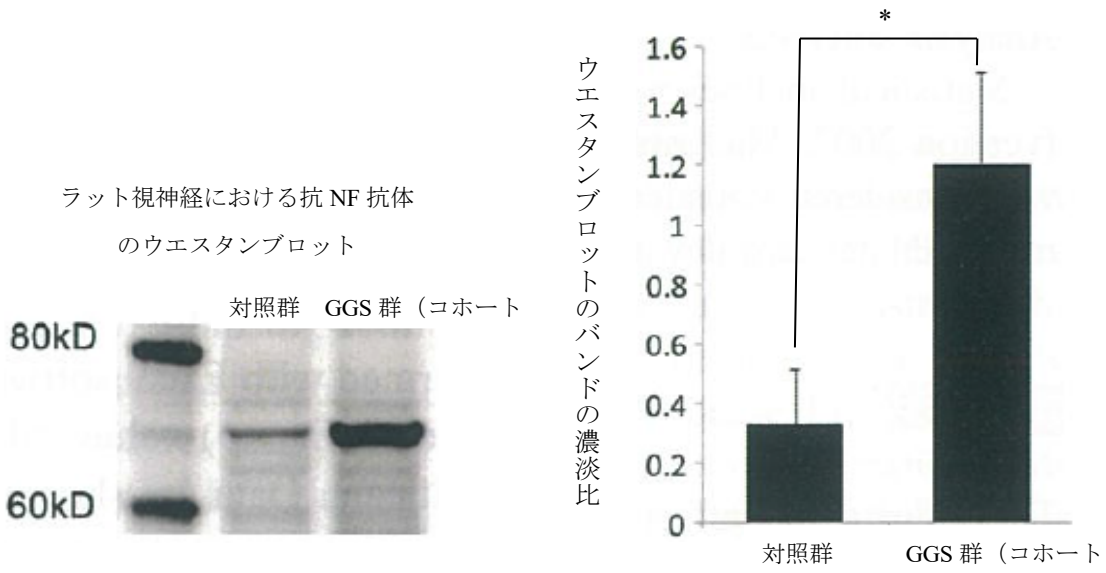


図 2.6.2-11 ラット視神経における抗ニューロフィラメント（NF）抗体のウエスタンブロット

平均±標準偏差（対照群 5 例、GGS 群（コホート A）4 例）．*P < 0.05 vs 対照群．　GGS 投与により NF の増加がみられる（参考文献 1）より引用、一部改変）．

2.6.2.3　副次的薬理試験

本申請では、新たな試験は実施していない。

2.6.2.4　安全性薬理試験

本申請では、新たな試験は実施していない。

2.6.2.5　薬力学的薬物相互作用試験

本申請では、新たな試験は実施していない。

2.6.2.6　考察及び結論

効力を裏付ける試験として、MS などの中枢神経系炎症性脱髄疾患の動物モデルとして知られ、視神経炎が発症する EAE モデル、EAE を強化免疫した EAON モデルを用いて、GGS の視神経炎抑制効果を病理組織学的に検討した。その結果、GGS は両モデルの視神経において抗炎症作用及び脱髄抑制作用、EAE モデルの視神経において軸索保護作用を有することが示された。また、EAON マウスでは GGS が用量依存的に臨床症状スコアを抑制することを確認した。

NMO モデルと考えられる抗 AQP4 抗体陽性 NMO 患者血清を曝露したラットでは、視神経障害の指標となりうる RGC の密度、NF の低下を GGS はいずれも抑制したと報告されている [1)]。

以上より、GGS は視神経炎の発症原因となる MS 及び NMO の各モデルにおいて薬効を示したことから、視神経炎患者において有効性が期待される。

2.6.2.7　図表

図表は本文中に示した。

2.6.2.8　参考文献

1）Nobuyoshi S, Kanamori A, Matsumoto Y, Nakamura M. Rescue effects of intravenous immunoglobulin on optic nerve degeneration in a rat model of neuromyelitis optica. Jpn J Ophthalmol. 2016; 60: 419-23.　［4.3-4］
2）多発性硬化症・視神経脊髄炎診療ガイドライン 2017. 医学書院. 2017.　［4.3-2］
3）Sallusto F, Impellizzieri D, Basso C, Laroni A, Uccelli A, Lanzavecchia A, Engelhardt B. T-cell trafficking in the central nervous system. Immunol Rev. 2012; 248: 216-27.　［4.3-5］
4）Hauser SL, Waubant E, Arnold DL, Vollmer T, Antel J, Fox RJ, Bar-Or A, Panzara M, Sarkar N, Agarwal S, Langer-Gould A, Smith CH; HERMES Trial Group. B-cell depletion with rituximab in relapsing-remitting multiple sclerosis. N Engl J Med. 2008; 358: 676-88.　［4.3-6］
5）Hemmer B, Kerschensteiner M, Korn T. Role of the innate and adaptive immune responses in the course of multiple sclerosis. Lancet Neurol. 2015; 14: 406-19.　［4.3-7］
6）Jacob S, Rajabally YA. Current proposed mechanisms of action of intravenous immunoglobulins in inflammatory neuropathies. Curr Neuropharmacol. 2009; 7: 337-42.　［4.3-8］
7）千葉　厚郎. 免疫グロブリン静注療法. 内科. 2010; 105: 835-838.　［4.3-9］
8）Trinath J, Hegde P, Sharma M, Maddur MS, Rabin M, Vallat JM, Magy L, Balaji KN, Kaveri SV, Bayry J. Intravenous immunoglobulin expands regulatory T cells via induction of cyclooxygenase-2-dependent prostaglandin E2 in human dendritic cells. Blood. 2013; 122: 1419-27.　［4.3-10］
9）Okuda S, Kamei S, Harano S, Shinya N, Hayashida K, Sasaki T. Enhancement of regulatory T cell induction by intravenous S-sulfonated Immunoglobulin during the treatment of experimental autoimmune encephalomyelitis. Yakugaku Zasshi. 2012; 132: 243-9.　［4.3-11］
10）Niimi N, Kohyama K, Kamei S, Matsumoto Y. Intravenous immunoglobulin therapy prevents development of autoimmune encephalomyelitis and suppresses activation of matrix metalloproteinases. Neuropathology. 2011; 31: 392-400.　［4.3-12］
11）Othy S, Hegde P, Topçu S, Sharma M, Maddur MS, Lacroix-Desmazes S, Bayry J, Kaveri SV. Intravenous gammaglobulin inhibits encephalitogenic potential of pathogenic T cells and interferes with their trafficking to the central nervous system, implicating sphingosine-1 phosphate receptor 1-mammalian target of rapamycin axis. J Immunol. 2013; 190: 4535-41.　［4.3-13］
12）Levin MH, Bennett JL, Verkman AS. Optic neuritis in neuromyelitis optica. Prog Retin Eye Res. 2013; 36: 159-71.　［4.3-14］
13）Sato DK, Callegaro D, Lana-Peixoto MA, Waters PJ, de Haidar Jorge FM, Takahashi T, Nakashima I, Apostolos-Pereira SL, Talim N, Simm RF, Lino AM, Misu T, Leite MI, Aoki M, Fujihara K. Distinction between MOG antibody-positive and AQP4 antibody-positive NMO spectrum disorders. Neurology. 2014; 82: 474-81.　［4.3-15］
14）Ratelade J, Smith AJ, Verkman AS. Human immunoglobulin G reduces the pathogenicity of

aquaporin-4 autoantibodies in neuromyelitis optica. Exp Neurol. 2014; 255: 145-53.　［4.3-16］

15）Takahashi H, Okuda S, Tamura M, Kamei S, Aizawa R, Kobayashi T. Prophylactic Treatment with Intravenous Immunoglobulin Attenuates Experimental Optic Neuritis in Mice. Biol Pharm Bull. 2019; 42: 173-8.　［4.3-17］

16）Aranami T, Yamamura T. Th17 Cells and autoimmune encephalomyelitis (EAE/MS). Allergol Int. 2008; 57: 115-20.　［4.3-18］

17）Kezuka T, Usui Y, Goto H. Analysis of the pathogenesis of experimental autoimmune optic neuritis. J Biomed Biotechnol. 2011; 2011: 294046.　［4.3-19］

18）抗アクアポリン 4 抗体陽性視神経炎診療ガイドライン. 日眼会誌. 2014; 118: 446-460.　［4.3-3］

献血ベニロン - Ⅰ静注用 500 mg
献血ベニロン - Ⅰ静注用 1000 mg
献血ベニロン - Ⅰ静注用 2500 mg
献血ベニロン - Ⅰ静注用 5000 mg

医薬品製造販売承認事項一部変更承認申請

2.6　非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.3　薬理試験概要表

ＫＭバイオロジクス株式会社

目次

2.6.3　薬理試験概要表 3
2.6.3.1　薬理試験：一覧表 3
2.6.3.2　効力を裏付ける試験 3
2.6.3.3　副次的薬理試験 4
2.6.3.4　安全性薬理試験 4
2.6.3.5　薬力学的薬物相互作用試験 4

2.6.3　薬理試験概要表

2.6.3.1　薬理試験：一覧表

試験の種類	試験系	投与方法	実施施設	試験番号	報告書番号
効力を裏付ける試験					
実験的自己免疫性視神経炎（EAON）マウスにおける臨床症状改善作用	マウス	腹腔内投与	KMバイオロジクス株式会社	1301341	4.2.1.1-1
実験的自己免疫性脳脊髄炎（EAE）及び実験的自己免疫性視神経炎（EAON）マウスにおける視神経病態改善作用	マウス	腹腔内投与	KMバイオロジクス株式会社／帝人ファーマ株式会社	B2-18001	4.2.1.1-2
抗 AQP4 抗体陽性 NMO 患者血清曝露ラットにおける視神経変性改善作用	ラット	尾静脈内投与	神戸大学	-	-

2.6.3.2　効力を裏付ける試験

試験内容	動物種・系統	試験方法	投与量	動物数／群	特筆すべき所見	試験番号	報告書番号
臨床症状改善作用	C57BL/6J マウス	MOG ペプチドなど以外に DMSO を混和して強化免疫した EAON マウスに生理食塩液、GGS 100、200、400 及び 800 mg/kg を 5 日間腹腔内投与した。臨床症状評価には EAE スコアを用いた。	100, 200, 400, 800 mg/kg	12 匹／群	生理食塩液投与群に対し、GGS 投与群は EAON モデルにおける発症日、発症日数、最大スコア、AUC いずれも有意に抑制した。また、その効果は GGS の投与量に依存していた。	1301341	4.2.1.1-1
視神経病態改善作用	C57BL/6J マウス	EAE 及び EAON マウスに生理食塩液、GGS 800 mg/kg を 5 日間腹腔内投与した。免疫後 14 日及び 21 日に視神経を採取してホルマリン固定し、HE 染色、Klüver-Barrera 染色、Bodian 染色、さらに抗 Iba1 抗体、抗 MBP 抗体及び抗 GFAP 抗体を用いた免疫組織学的染色の各視神経標本を作製し、病理組織学的に評価した。	800 mg/kg	3-5 匹／群	GGS は両モデルの視神経において抗炎症作用及び脱髄抑制作用、EAE モデルの視神経において軸索保護作用を有することが示された。	B2-18001	4.2.1.1-2
視神経変性改善作用	SD ラット	抗 AQP4 抗体陽性 NMO 患者血清を曝露したラットにおいて、血清曝露 0 日及び 7 日後（コホート A）、7 日及び 10 日後（コホート B）において、生理食塩液、GGS 500 mg/kg を各日尾静脈内投与した。血清曝露 14 日後に網膜を採取してパラホルムアルデヒド固定し、Fluoro-Gold で標識された RGC を蛍光顕微鏡下でカウントし、単位面積あたりの細胞密度を算出した。また、網膜と同時にコホート A の視神経を採取してホモジナイズ後、抗 NF 抗体のウエスタンブロットを実施した。	500 mg/kg	4-10 匹／群	RGC の密度は、対照群と比較して GGS 投与群はいずれも有意に高値を示した。 NF 量は、対照群と比較してコホート A の GGS 投与群で有意に高値を示した。	-	-

2.6.3.3　副次的薬理試験

本申請では、新たな試験は実施していない。

2.6.3.4　安全性薬理試験

本申請では、新たな試験は実施していない。

2.6.3.5　薬力学的薬物相互作用試験

本申請では、新たな試験は実施していない。