2.4 非臨床試験の概括評価

目　次

目　次 2
表 一 覧 3
図 一 覧 3
略号一覧 4
1 緒言 5
2 非臨床試験計画の概要及び GLP 適合性 6
3 薬理試験 7
3.1 効力を裏付ける試験 10
3.1.1 S1P 受容体に対する作用 10
3.1.2 *In vitro* 細胞活性 11
3.1.3 *In vivo* 薬理活性 11
3.2 副次的薬理試験 13
3.3 安全性薬理試験 13
3.4 薬力学的薬物相互作用試験 14
4 薬物動態試験 14
4.1 分析法 14
4.2 薬物動態 14
4.3 分布 15
4.3.1 *In vitro* 血漿蛋白結合率及び血球への移行性 15
4.3.2 臓器及び組織への分布 15
4.3.3 胎盤通過性 15
4.4 代謝 16
4.4.1 *in vitro* 代謝 16
4.4.2 *in vivo* 代謝 16
4.5 排泄 16
4.6 薬物間相互作用 17
4.7 トキシコキネティクス 17
5 毒性試験 17
5.1 単回投与毒性試験 18
5.2 反復投与毒性試験 19
5.3 遺伝毒性試験 22
5.4 がん原性試験 23
5.5 生殖発生毒性試験 24
5.5.1 受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験 24
5.5.2 胚・胎児発生に関する試験 25

5.5.3 出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験 25
5.5.4 幼若動物を用いた毒性試験 26
5.5.5 生殖発生毒性に関する総合評価 26
5.6 曝露量の比較 26
5.7 局所刺激性試験 27
5.8 その他の毒性試験 27
6 不純物及び分解物 28
7 安全性の総合評価 28
8 結論 29
9 参考文献 31

表 一 覧

Table 5-1 毒性試験一覧 18
Table 5-2 単回投与毒性試験 19
Table 5-3 反復投与毒性試験 19
Table 5-4 遺伝毒性試験 23
Table 5-5 がん原性試験 23
Table 5-6 受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験 25
Table 5-7 胚・胎児発生に関する試験 25
Table 5-8 出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験 26
Table 5-9 毒性試験に用いた動物種とヒトの全身曝露量の比較 27
Table 6-1 反復投与毒性試験における不純物含有量 28

図 一 覧

Figure 1-1 シポニモド　フマル酸の構造式 5
Figure 3-1 S1P 受容体の生理機能及びシポニモドの作用 10

略号一覧

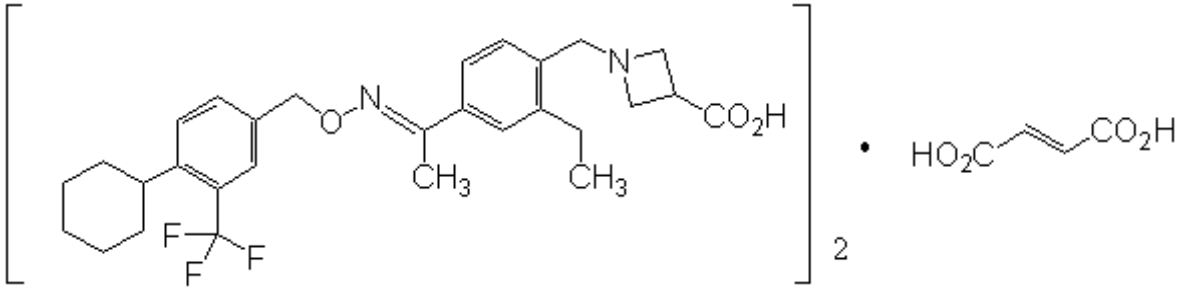
略号	省略していない表現（英）	省略していない表現（日）
AUC	area under the concentration-time curve	薬物濃度-時間曲線下面積
BBB	blood brain barrier	血液脳関門
CHO	chinese hamster ovary	チャイニーズハムスター卵巣
Cmax	maximal drug plasma concentration	最高血漿中薬物濃度
CNS	central nervous system	中枢神経系
EAE	experimental autoimmune encephalomyelitis	実験的自己免疫性脳脊髄炎
GIRK	G protein-coupled inwardly rectifying K+ channel	G 蛋白質共役型内向き整流カリウムチャネル
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
hERG	human ether-a-go-go related gene	ヒト急速活性型遅延整流カリウムチャネル遺伝子
HPLC	high performance liquid chromatography	高速液体クロマトグラフィー
ICH	International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use	医薬品規制調和国際会議
IC50	half maximal (50%) inhibitory concentration	50%阻害濃度
icv	intra cerebroventricular	脳室内
IL	interleukin	インターロイキン
KLH	keyhole limpet hemocyanin	スカシガイヘモシアニン
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
LOAEL	lowest observed adverse effect level	最小毒性量
MRI	magnetic resonance imaging	磁気共鳴映像法
MS	multiple sclerosis	多発性硬化症
MTD	maximum tolerated dose	最大耐量
NOAEL	no observed adverse effect level	無毒性量
PLGF2	placental growth factor 2	胎盤成長因子
PPMS	primary progressive multiple sclerosis	一次性進行型多発性硬化症
RANTES	regulated on activation, nomal T cell expressed and secreted	-
RRMS	relapsing-remitting multiple sclerosis	再発寛解型多発性硬化症
S1P	sphingosine 1 phosphate	スフィンゴシン 1 リン酸
SPMS	secondary progressive multiple sclerosis	二次性進行型多発性硬化症
TDAR	T-cell dependent antibody response	T 細胞依存性抗体産生
Th1	T-helper cell 1	1 型ヘルパーT 細胞
Th17	T-helper cell 17	17 型ヘルパーT 細胞
TK	toxicokinetics	トキシコキネティクス
TNF	tumor necrosis factor	腫瘍壊死因子
TSH	thyroid stimulating hormone	甲状腺刺激ホルモン
T4-UDP-GT	T4-Thyroxine-UDP-Glucuronosyl transferase	T4-UDP-グルクロン酸転移酵素

1 緒言

シポニモド　フマル酸（Siponimod Fumaric Acid，開発コード：BAF312，以下シポニモド）は新規のスフィンゴシン 1 リン酸（S1P）受容体調節薬であり，二次性進行型多発性硬化症（SPMS）の適応取得を目的とし開発が進められた。S1P 受容体は G 蛋白共役型受容体であり，5 種類のサブタイプ（$S1P_1$，$S1P_2$，$S1P_3$，$S1P_4$，$S1P_5$ 受容体）が知られている。シポニモドは $S1P_1$ 及び $S1P_5$ 受容体に対する選択的アゴニストであり，血液脳関門（BBB）を通過し高い中枢移行性を示す。シポニモドは，主にリンパ球上に発現する $S1P_1$ 受容体にアゴニストとして作用した後，$S1P_1$ 受容体の内在化を誘導し，受容体を機能的に不活性化する。この機能的アンタゴニスト作用により，二次リンパ組織からリンパ液中へのリンパ球の移出が抑制され，血中リンパ球数が減少する。その結果，中枢神経系（CNS）への炎症性リンパ球浸潤が抑制され，多発性硬化症（MS）に対し治療効果を示すと考えられている。一方，$S1P_5$ 受容体に対しては内在化を誘導せずアゴニストとして作用し，CNS においてオリゴデンドロサイトによる再ミエリン化の促進に関与することが示唆されている。このようにシポニモドは CNS へのリンパ球浸潤を抑制することに加え，CNS に対し直接的な神経保護作用を示すことで，MS の進行を抑制することが期待される。

シポニモドでは，経口投与用のカプセル剤 1 種類，並びに，フィルムコーティング錠 2 種類が製剤開発され，MS を対象とした臨床試験で使用された。早期臨床試験用として開発されたカプセル剤及びフィルムコーティング錠は第 I 相及び第 II 相臨床試験で使用された。その後，製剤処方を最適化したフィルムコーティング錠（シポニモドフリー体として 0.25 mg，0.5 mg，1 mg，2 mg 及び 4 mg を含有する 5 製剤）が開発され，第 III 相臨床試験で使用された。これらのフィルムコーティング錠に，さらに識別性の観点からフィルムコーティング剤の色素を変更した 0.25 mg，2 mg の 2 製剤を市販予定製剤として本承認申請を行う。

Figure 1-1　　シポニモド　フマル酸の構造式



一般名：シポニモド　フマル酸（Siponimod Fumaric Acid）

化学名：1-({4-[(1E)-1-({[4-Cyclohexyl-3-(trifluoromethyl)phenyl]methoxy}imino)ethyl]-2-ethylphenyl}methyl)azetidine-3-carboxylic acid hemifumaric acid

分子式：$(C_{29}H_{35}F_3N_2O_3)_2 \cdot C_4H_4O_4$

分子量：1,149.26（フマル酸共結晶として）

本薬に光学活性はない。

シポニモドは SPMS を対象とした臨床試験においてその有効性が認められており，「二次性進行型多発性硬化症の再発予防及び身体的障害の進行抑制」を効能又は効果として本承認申請を行う。本概括評価では，シポニモドの薬理試験，薬物動態試験，及び毒性試験の結果から，非臨床における有効性及び安全性を総合的に評価し，以下に記載した。

2 非臨床試験計画の概要及び GLP 適合性

シポニモドの非臨床試験として，薬理試験，薬物動態試験及び毒性試験がノバルティス社，ノバルティス社と契約した受託研究機関，若しくは，外部研究機関で実施された。なお，本項に記載する用量はすべてシポニモドフリー体に換算した値を示す。

効力を裏付ける試験として，シポニモドの S1P 受容体サブタイプに対するアゴニスト活性並びに S1P 受容体内在化作用を評価した。また，ラット及びカニクイザルを用いて S1P 受容体調節薬の特徴的な作用である血中リンパ球数減少作用を確認し，MS の動物モデルとして広く使用されているラット及びマウス実験的自己免疫性脳脊髄炎（EAE）を用いてシポニモドの治療効果を検討した。さらに，マウス EAE を用いた脳室内（icv）投与によるシポニモドの CNS に対する直接的作用について公表論文に基づいて評価した。シポニモドの作用機序に関しては *in vitro*，*in vivo* 各種試験を公表論文に基づいて評価した。副次的薬理試験では，*in vitro* 混合リンパ球反応試験，骨髄細胞増殖抑制試験，及び *in vitro* 受容体結合試験を実施し，シポニモドの免疫抑制への影響，並びに，オフターゲット作用を評価した他，*in vivo* 試験としてサル，ラット及びマウスを用いて一次/二次免疫応答，及び内皮/上皮バリア機能に対する影響を確認した。

安全性薬理試験では，心血管系，中枢神経系及び呼吸系に及ぼす影響について検討した。コアバッテリー試験は医薬品規制調和国際会議（International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use，ICH）ガイドライン S7A 及び S7B に従い，医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準（Good Laboratory Practice，GLP）を遵守して実施した。

シポニモドの薬物動態特性を明らかにするために，マウス，ラット，ウサギ，イヌ，及びサルにおける吸収，分布，代謝及び排泄（ADME）を，*in vivo* 及び *in vitro* 試験で検討した。また，毒性試験におけるトキシコキネティクス（toxicokinetics，TK）を評価した。薬物間相互作用の可能性を評価するため，トランスポーターを用いた *in vitro* 試験を実施した。これらの試験は，ノバルティス社又は受託研究機関の試験施設で実施した。

シポニモドの非臨床安全性評価を目的として，単回投与毒性試験，反復投与毒性試験，遺伝毒性試験，がん原性試験，生殖発生毒性試験，局所刺激性試験及びその他の毒性試験を実施した。主要な毒性試験は，ICH M3(R2)ガイドライン（医薬品の臨床試験のための非臨床安全性試験の実施時期についてのガイドライン）及びその他の安全性に関するガイドラインに従い，GLP を遵守して実施した。

3 薬理試験

既存の S1P 受容体調節薬であるフィンゴリモド塩酸塩（開発コード：FTY720。以下，フィンゴリモド）は，本邦で「多発性硬化症の再発予防及び身体的障害の進行抑制」を効能又は効果として承認されている。フィンゴリモドの治療成績から，再発寛解型 MS（RRMS）の再発及び身体的障害の進行に対する S1P 受容体調節薬の治療効果は既に十分に支持されている。しかしながら，二次性進行型 MS（SPMS）に対するフィンゴリモドの治療効果は確立されていない。

MS は，脳・視神経・脊髄といった CNS に病変が多発する炎症性脱髄疾患であり，中枢神経髄鞘を標的とした自己免疫性疾患と考えられている。MS は，自然経過に基づき，再発と寛解を繰り返す RRMS と発症当初から慢性進行性の経過をとる一次性進行型 MS（PPMS）に大別され，さらに RRMS から移行する SPMS が知られている。RRMS の約半数が 15～20 年の経過で緩徐に SPMS へ移行するとされ，SPMS へ移行すると再発の有無にかかわらず障害が徐々に進行するようになる（厚生労働省診断基準 2015，多発性硬化症・視神経脊髄炎診療ガイドライン 2017）。MS 治療においてはいまだアンメットメディカルニーズが存在し，特に SPMS においてはその進行を抑制する根本的な治療が存在しないことから，有効性と安全性に優れた新規治療薬が強く望まれている。

RRMS の急性期においては，獲得免疫系による炎症が病態の中心であり，脳や脊髄の白質に活動性脱髄巣が形成される。炎症には T 細胞サブセットである 1 型ヘルパーT 細胞（Th1）及び 17 型ヘルパーT 細胞（Th17）が重要であると考えられており，末梢において何らかの髄鞘抗原の感作を受けることによりナイーブ T 細胞が自己反応性 Th1/Th17 へと分化し，BBB 破綻を誘導するとともに CNS 局所へ浸潤し，炎症性脱髄を形成する。また，自己反応性 B 細胞の役割も注目されており，B 細胞は T 細胞へ抗原を提示及び自己抗体を産生することで炎症性脱髄形成に寄与すると考えられている。一方，SPMS へ移行後の慢性進行期では，活動性脱髄は限局的となるとともに細胞浸潤は乏しくなり，活性化ミクログリアが主体となる自然免疫が優位となる。SPMS では BBB の機能は回復しており，MRI で正常にみえる白質において軸索変性が進行する。病巣には活性化ミクログリア認められ，サイトカイン産生や酸化ストレス誘導等を介して神経系細胞の障害並びに細胞死を誘導していると考えられている。さらに SPMS の特徴として，髄膜の軟膜下層の皮質における脱髄が広汎にみられる。一部の SPMS では髄膜においてリンパ濾胞構造の形成が認められ，豊富に含まれる B 細胞からの自己抗体並びにサイトカイン産生を介して隣接する皮質の脱髄進行並びに変性に寄与することが示唆されている（Frischer et al. 2009，Antel et al. 2012，Frischer et al. 2015，Hemmer et al. 2015，Mahad et al. 2015，多発性硬化症・視神経脊髄炎診療ガイドライン 2017）。このように SPMS では BBB が正常に機能していること，CNS 内で免疫反応並びに神経変性が進行していることから，SPMS を対象とした治療薬は優れた BBB 透過性を有し，神経保護作用を示すことが望ましいとされている（Mahad et al. 2015）。

S1P は S1P 受容体の内因性リガンドであり，生体膜構成成分スフィンゴミエリンの分解産物であるスフィンゴシンから生成される（Brinkmann et al. 2007）。S1P の主な生理機能として，脂質

メディエータとして免疫細胞遊走を調節する他，血管緊張性及び内皮バリアの維持を調節しているものと考えられている。5 種類の S1P 受容体サブタイプのうち，$S1P_1$，$S1P_2$ 及び $S1P_3$ 受容体は免疫細胞，心血管系及び CNS の広範な組織に発現している。リンパ球における主要な受容体は $S1P_1$ 受容体でありリンパ球再循環において重要な役割を果たしている。獲得免疫では，T 細胞及び B 細胞をはじめとするリンパ球は血管系から二次リンパ組織に移入し，さらに二次リンパ組織からリンパ液へと移出して生体内を循環し（リンパ球再循環），病原体の侵入を監視している。S1P の生体内分布には濃度勾配があり，血液/リンパ液中では高濃度に，二次リンパ組織内では低濃度に維持されている。血液中では豊富に存在する S1P の作用によりリンパ球上の $S1P_1$ 受容体は内在化し機能的に不活性化されているが，二次リンパ組織に移入すると S1P 濃度が低くなるため S1P の作用が減弱し，$S1P_1$ 受容体が再発現する。これによりリンパ球はリンパ液中の S1P に反応し，運動性が亢進して，二次リンパ組織からリンパ液へと移出する。このように S1P 濃度勾配に従ってリンパ球は再循環し，免疫監視機構が保たれている。また CNS 組織では，$S1P_1$，$S1P_2$，$S1P_3$ 受容体に加え $S1P_5$ 受容体の発現が認められており，これらの S1P 受容体は各神経系細胞の生存，増殖，遊走及びサイトカイン分泌等の生理作用に影響を及ぼすと報告されている（Figure 3-1，Bryan et al. 2008，Groves et al. 2013）。

フィンゴリモドを用いた試験成績から，MS に対する S1P 受容体調節薬の治療効果は，$S1P_1$ 受容体を介したリンパ球への作用が重要と考えられている。すなわち，S1P 受容体調節薬がリンパ球上の $S1P_1$ 受容体に作用すると，受容体の内在化及び分解が誘導される。この作用によりリンパ球の二次リンパ組織からリンパ液への移出が抑制され，血中リンパ球数が減少する。MS の炎症形成に重要な役割を担う自己反応性 Th1/Th17 細胞及び B 細胞も同様に二次リンパ組織に捕捉されるため，CNS への浸潤並びに炎症が抑制され，MS に対し治療効果を示す（Matloubian et al. 2004，Brinkmann et al. 2010）。

シポニモドは BBB 透過性を有し（Briard et al. 2015，4.3.2 項），神経系の細胞に対し直接的な作用を示すと考えられる。事実，マウス，オタマジャクシ及びヒト胎児由来細胞を用いた各 *in vivo*，*in vitro* の検討において，シポニモドは，$S1P_1$ 受容体を介しアストロサイトからのインターロイキン（IL）-6 分泌を抑制し，$S1P_5$ 受容体を介しオリゴデンドロサイトによる軸索の再ミエリン化を促進することが明らかとなっている（Cui et al. 2011，Jackson et al. 2011，O'Sullivan et al. 2016，Mannioui et al. 2018）。その他，MS モデルである EAE を用いた icv 投与による検討において，シポニモドはアストロサイト及びミクログリアのグリオーシスを抑制し，シナプス電流異常を改善した他，マウス由来ミクログリア細胞株においてサイトカイン並びにケモカイン分泌を抑制する等，神経保護的に作用することが報告されている（[2.6.2-2.3.3 項]，Gentile et al. 2016）。以上，シポニモドは SPMS において，血中リンパ球数減少作用による炎症反応の抑制のみならず，CNS に直接的に作用して神経保護効果を示し，神経変性や脱髄の進行を抑制すると期待される。

シポニモドはフィンゴリモドと比べ，特定の S1P 受容体サブタイプ（$S1P_1$ 及び $S1P_5$ 受容体）に対して高い選択性を示す。フィンゴリモドの活性化代謝物であるフィンゴリモドリン酸化体は

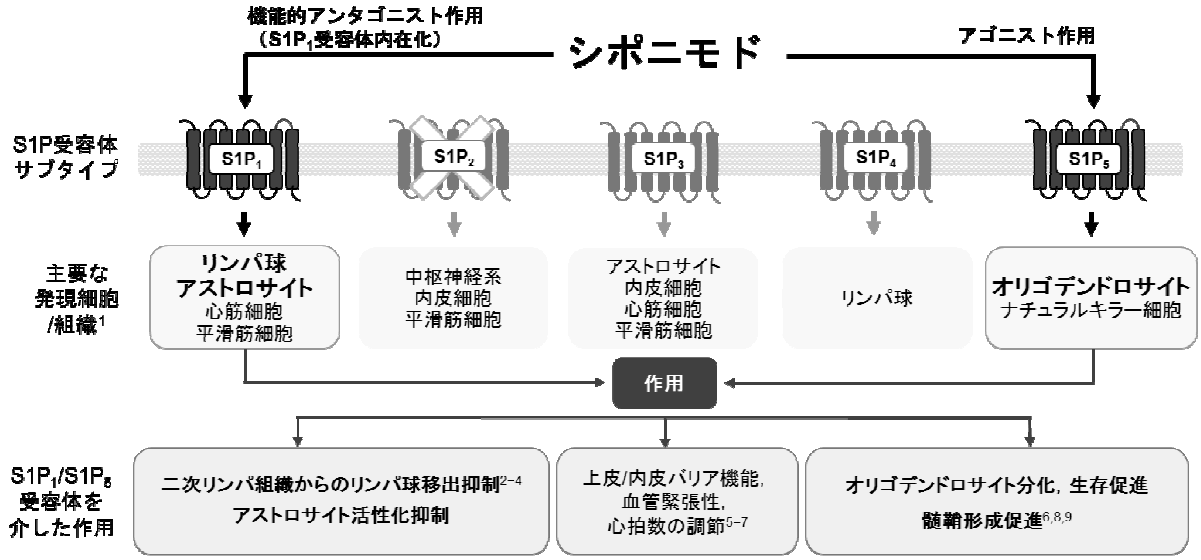
S1P 受容体サブタイプのうち $S1P_1$，$S1P_3$，$S1P_4$，及び $S1P_5$ 受容体に作用し，それぞれ，$S1P_1$ 受容体：0.3 nM，$S1P_3$ 受容体：3.1 nM，$S1P_4$ 受容体：0.6 nM，$S1P_5$ 受容体：0.3 nM の EC50 値を示す（Albert et al. 2005）。一方，シポニモドは S1P 受容体サブタイプに対して，それぞれ，$S1P_1$ 受容体：0.39 nM，$S1P_3$ 受容体：>1000 nM，$S1P_4$ 受容体：750 nM，$S1P_5$ 受容体：0.98 nM の EC50 値を示す[2.6.2-2.1 項]，[Table 2.6.3.1 RD-2006-00729]。シポニモドはフィンゴリモドとは異なり $S1P_1$ 及び $S1P_5$ 受容体に対して選択性を示し，$S1P_3$ 及び $S1P_4$ 受容体に対する作用は弱い。なお，両者とも $S1P_2$ 受容体への作用はない。$S1P_3$ 及び $S1P_4$ 受容体の生理機能は完全に解明されていないものの，近年，以下に示すようにその作用が明らかになりつつある（Figure 3-1）。

$S1P_3$ 受容体：$S1P_3$ 受容体は心臓の線維芽細胞及び心筋細胞に発現がみられ，血圧上昇に関与していると考えられている（Fryer et al. 2012）。また，$S1P_3$ 受容体シグナルによりアストロサイトが活性化し，シクロオキシゲナーゼやサイトカイン等の発現促進を介して炎症を誘導することが示唆されている（Dusaban et al. 2017）。その他，$S1P_3$ 受容体シグナルはマクロファージにおいて貪食後の殺菌過程に影響を及ぼし病原菌の排除に関与する可能性が報告されている（Hou et al. 2017）。

$S1P_4$ 受容体：$S1P_4$ 受容体シグナルにおいては，主として形質細胞様樹状細胞の分化誘導，好中球の遊走，並びに，マクロファージの活性化といった自然免疫反応を調節する他，Th17 を活性化させる可能性が報告されている（Olesch et al. 2017，Bryan and Del Poeta 2018）。

現在得られているこれらの知見を踏まえると，シポニモドは $S1P_1$ 及び $S1P_5$ 受容体に対する選択性が高いことから，$S1P_3$ 及び $S1P_4$ 受容体を介してアストロサイト活性化誘導等の炎症反応を惹起/進展しないと推測される。

Figure 3-1　　S1P 受容体の生理機能及びシポニモドの作用



Source: 1 Chun and Hartung 2010，2 Mandala et al. 2002，3 Matloubian et al. 2004，4 Gergely et al. 2012，5 Brinkmann 2007，6 Mizugishi et al. 2005，7 Rosen and Goetzl 2005，8 Jaillard et al. 2005，9 Kimura et al. 2007

$S1P_1$受容体：生体内において広範に発現している。主としてリンパ球及びアストロサイトに発現している。シポニモドは細胞表面上の $S1P_1$受容体にアゴニストとして作用し，内在化を誘導する。この機能的アンタゴニスト作用により，リンパ球の二次リンパ組織からの移出が抑制される。アストロサイトにおいてはその活性化を抑制する。その他，心臓，血管系にも高い発現が認められ，上皮/内皮バリア機能並びに血管緊張性を亢進させる他，心拍数を調節する。

$S1P_2$受容体：生体内において広範に発現している。$S1P_3$受容体と同様に上皮/内皮バリア機能並びに血管緊張性を低下させ，$S1P_1$受容体による作用と拮抗し，その機能を調節する。その他，聴覚機能及び神経伝導を調節する。

$S1P_3$受容体：中枢神経系を含め，生体内において広範に発現している。$S1P_2$受容体と同様に上皮/内皮バリア機能並びに血管緊張性を調節する。その他，アストロサイトを活性化させ，炎症を誘導する可能性がある。

$S1P_4$受容体：リンパ球に限局した発現が認められるものの，その機能はいまだ解明されていない。免疫細胞の分化，遊走並びに活性化を誘導する可能性がある。

$S1P_5$受容体：主として中枢神経系において白質に発現し，オリゴデンドロサイトに高発現している。オリゴデンドロサイトの分化並びに生存，及び，ミエリン形成を促進する。シポニモドは $S1P_5$受容体にアゴニストとして作用するが，内在化作用はなく，その機能を抑制しない。シポニモドは脱髄後の再ミエリン化を促進する。その他，$S1P_5$受容体はナチュラルキラー細胞の遊走に関与する可能性が示唆されている。

以下，シポニモドを多発性硬化症治療薬として開発することを支持する非臨床薬理試験の成績の概要について記載する。

3.1　効力を裏付ける試験

3.1.1　S1P 受容体に対する作用

シポニモドは $S1P_1$及び $S1P_5$受容体に優れた選択性を示し，他の S1P 受容体サブタイプと比較し 750 倍以上のアゴニスト活性を示した[2.6.2-2.1 項]，[Table 2.6.3.1 RD-2006-00729]。また，シポニモドのヒト代謝物である M3，M5，M17 のうち，M5 は $S1P_1$受容体に，M17 は $S1P_1$及び $S1P_5$受容体に活性を示したものの，その活性は弱く，いずれもシポニモドの 1/850（$S1P_1$ 受容体）及

び 1/150（$S1P_5$ 受容体）以下であった。なお，M3 は $S1P_1$ 受容体に対する活性を示さなかった[2.6.2-2.2 項]，[Table 2.6.3.1-RD-2012-00145]，[Table 2.6.3.1-RD-2015-00301]。

3.1.2 *In vitro* 細胞活性

シポニモドの $S1P_1$ 受容体内在化誘導作用について検討した結果，シポニモド（1 μM）はチャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞表面上の受容体を約 90%内在化させ，シポニモド除去 3～14 時間後においても作用の持続が認められた（[2.6.2-2.2.1 項]，[Table 2.6.3.1-RD-2006-00792]，Gergely et al. 2012）。このことから，シポニモドは $S1P_1$ 受容体に対し機能的アンタゴニストとして作用することが確認された。一方，シポニモドは $S1P_5$ 受容体に対しては内在化誘導作用を示さなかった（[2.6.2-2.2.2 項]，Bigaud et al. 2018）。以上より，シポニモドは $S1P_1$ 受容体に対しては持続的な内在化作用を示しその機能を抑制する一方，$S1P_5$ 受容体には作用してもその機能を抑制しないと考えられた。

3.1.3 *In vivo* 薬理活性

3.1.3.1 血中リンパ球数減少作用

フィンゴリモドの治療成績から，S1P 受容体調節薬の $S1P_1$ 受容体内在化誘導作用により，リンパ球の二次リンパ組織からの移出が抑制され，血中リンパ球数が減少することが既知である（Brinkmann et al. 2010）。ラット（用量：0.03，0.1，0.3，及び 1.0 mg/kg）及びカニクイザル（用量：0.03，0.1，0.3，1.0，及び 3.0 mg/kg）にシポニモドを単回経口投与したところ，最大で約 80%の血中リンパ球数減少が認められ，その作用は概ね用量に依存していた[2.6.2-2.3.1 項]，[Table 2.6.3.1-RD-2004-03092]，[Table 2.6.5.1-RD-2005-00583]。シポニモドによる血中リンパ球の減少には回復性が認められた。ラットの検討では血中リンパ球数の回復はフィンゴリモドよりも速やかであり，これは単回投与時の半減期がフィンゴリモドより短いことに起因すると考えられた。なお，EAE モデルの検討ではシポニモドを反復投与することにより持続的な血中リンパ球数減少作用が認められている[Table 2.6.3.1-RD-2005-00885]，[Table 2.6.3.1-RD2006-00717]，[Table 2.6.3.1-RD-2006-00118]。また，健康成人にシポニモド（0.3～20 mg/day）を 28 日間反復経口投与した試験においても概ね用量依存的な血中リンパ球数減少作用が認められている（A2105 試験）。

3.1.3.2 実験的自己免疫性脳脊髄炎（EAE）における治療効果

ラット及びマウスの慢性型 EAE モデルを用いて，シポニモドの治療効果を評価した。慢性型 EAE では炎症性脱髄により神経症状が発症する急性期を経た後，神経症状が長期間持続する慢性期へと移行する。本モデルでは脊髄を中心とした CNS に病変が生じ，慢性期においては軸索脱落，アストログリオーシスやミクログリア活性化といった SPMS の病態と同様の神経病変が認められる（Wujek et al. 2002，Papadopoulos et al. 2006，Hampton et al. 2008）。本モデルを用いた検討ではシポニモドの経口投与を急性期に開始し，慢性期における神経症状改善の評価，並びに脊髄の病理組織学的評価を行った。また，シポニモドを icv 投与し，血中リンパ球数に有意な影響

を与えない用量での神経症状改善に加え，シナプス電流異常の改善並びにアストロサイト/ミクログリアのグリオーシス抑制といった神経系の細胞に対する直接的な作用を検討した。

経口投与：ラット及びマウス EAE への経口投与の検討において，シポニモド（用量：0.03～10 mg/kg/day）は既存の神経症状を回復させた他，脱髄やミクログリア浸潤，軸索変性等の神経損傷を軽減し，優れた治療効果を示した[2.6.2-2.3.2 項]，[Table 2.6.3.1-RD2006-00717]，[Table 2.6.3.1-RD-2005-00885]，[Table 2.6.3.1-RD-2006-00118]，[Table 2.6.3.1-RD-2009-01092]。

icv 投与：マウス EAE への icv 投与（シポニモド用量：0.225，0.45 及び 4.5 µg/day）の検討において，シポニモドは血中リンパ球数に有意な影響を与えない用量（0.45 µg/day）で，神経症状を改善した他，EAE で典型的にみられるシナプス電流の異常を改善し，アストロサイト及びミクログリアのグリオーシスを抑制した（[2.6.2-2.3.3 項]，Gentile et al. 2016）。また，シポニモドはマウス EAE モデルの線条体においてニューロン量減少を抑制し，マウス由来ミクログリア細胞株において腫瘍壊死因子（TNF）誘導性 IL-6 並びに RANTES 遊離を抑制した。このことから，シポニモドはニューロン量の減少を抑制することによりシナプス電流異常を改善し，また，ミクログリアからのサイトカイン/ケモカイン遊離を抑制することによりリンパ球浸潤を抑制する可能性が示唆された。

以上のことから，シポニモドは経口投与で EAE に対し治療効果を示すことが確認された。シポニモドは血中リンパ球数減少作用を介して中枢において炎症性細胞浸潤を抑制し，その結果，脱髄等の神経系の障害を軽減することで治療効果を示すものと考えられる。また，icv 投与の検討において，血中リンパ球数に対し有意な影響を与えなかったにもかかわらず，神経症状の改善並びに炎症や神経系の障害の抑制といった神経保護的な効果が認められた。このことから，シポニモドは CNS に送達された場合，神経系へ直接的に作用し神経保護効果を示すと考えられる。シポニモドは脂溶性で BBB を容易に通過することから，優れた中枢移行性を示し，げっ歯類並びにサルに静脈内投与若しくは経口投与した場合，その脳内濃度は血中濃度より高かった（Briard et al. 2015，4.3.2 項）。健康成人に臨床維持用量（2.0 mg）を経口投与した時のシポニモドの Cmax は 61.0 nM で（A2118 試験），$S1P_1$ 及び $S1P_5$ 受容体に対するアゴニスト活性の検討における EC50 値（$S1P_1$ 受容体：0.39 nM，$S1P_5$ 受容体：0.98 nM。3 項）より高値であった。したがって，シポニモドは，臨床においても血中より高濃度で CNS へ移行すると推測すると，非臨床モデルと同様の神経保護作用を示し得ると考えられる。

以上，EAE モデルを用いた検討から，シポニモドは，血中リンパ球の二次リンパ組織からの移出，並びに，CNS への浸潤を抑制するだけでなく，CNS に直接的に作用し炎症や神経系の障害を抑制し，神経保護的に働く可能性が示唆された。シポニモドの優れた中枢移行性，並びに臨床で EC50 値を上回る Cmax が得られていることを踏まえると，ヒトにおいても効果を発現するのに十分な脳内濃度が得られるものと推測される。

3.2 副次的薬理試験

副次的薬理試験として，*in vitro* 混合リンパ球反応[Table 2.6.3.1-RD-2006-00916]，[Table 2.6.3.1-RD-2006-00909]，骨髄細胞増殖抑制試験[Table 2.6.3.1-RD-2006-00891]，各種受容体への結合試験[Table 2.6.3.1-RD-2006-50780]，[Table 2.6.3.1-RD-2006-00166]，[Table 2.6.3.1-RD-2016-00167]，[Table 2.6.3.1-RD-2019-00121]を行ったほか，*in vivo* 一次/二次免疫応答[Table 2.6.3.1-RD-2007-00983]，[Table 2.6.3.1-RD-2009-00982]，[Table 2.6.3.1-RD-2008-00141]，並びに，内皮/上皮バリア機能に対するシポニモドの影響について検討した[Table 2.6.3.1-RD-2007-00671]，[Table 2.6.3.1-RD-2006-00778]，[Table 2.6.3.1-RD-2006-00569]。その結果，シポニモド並びにその主要な代謝物は S1P 受容体以外のいくつかの標的に対し作用を示したものの，1 μM 以下の IC50 値を示す標的はみられなかった。臨床維持用量（2.0 mg）投与時のシポニモドの Cmax が 61.0 nM であり（A2118 試験），血漿蛋白結合率が 99.9%超であったことを踏まえると[2.7.2-2.1.2 項]，血漿中フリー体薬物濃度は非常に低いと考えられることから，シポニモドの臨床使用において全身暴露により S1P 受容体以外の標的との相互作用は生じないものと考えられた[2.6.2-3.1.2 項]。また，シポニモドは，シクロスポリンやアザチオプリンといった免疫抑制薬で認められるような著明な免疫抑制作用及び細胞毒性を示さなかった[2.6.2-3.1.1 項]。さらに，シポニモドはマウス又はサルにおいて T 細胞依存性の一次免疫応答を抑制したが，二次免疫応答及び免疫記憶には影響を及ぼさなかった[2.6.2-3.2.1 項]。免疫記憶においてエフェクターメモリーT 細胞の関与が知られているが，エフェクターメモリーT 細胞は二次リンパ組織循環能を有さず，S1P 受容体調節薬の影響を受けないことが報告されている（FTY720 承認申請時資料 1-13-1-CTD2.6.2-3.2.4.2 項，Brinkmann 2009）。このことから，シポニモドの臨床使用時においてもエフェクターメモリーT 細胞は正常に機能し，免疫記憶及び免疫監視機構が維持・制御されるものと考えられる。また，高用量のシポニモドをラットに反復投与しても血管の内皮/上皮バリア機能に影響はみられなかった[2.6.2-3.2.2 項]。

3.3 安全性薬理試験

In vitro 安全性薬理試験として，hERG（human ether-a-go-go related gene）電流に関する試験，活動電位及び自動能に関する試験（ウサギ摘出心臓），血管収縮に関する試験（ウサギ摘出動脈），並びに GIRK（G protein-coupled inwardly rectifying K^+ channel，G 蛋白質共役型内向き整流カリウムチャネル）電流に関する試験を実施した。*In vivo* 安全性薬理試験として，ラット，モルモット，ウサギまたはカニクイザルを用いた心血管系に関する試験，ラットを用いた中枢神経系及び呼吸系に関する試験，並びにラットを用いた気道過敏性に関する試験を実施した[2.6.2-4 項]。

シポニモドによる hERG 電流阻害作用は認められず，ウサギ摘出心臓を用いた活動電位に関する試験において活動電位持続時間への影響はみられなかった。また，モルモット，ウサギまたはカニクイザルを用いた *in vivo* 試験において，QT 間隔に影響はみられなかった。ウサギ摘出心臓を用いた自動能に関する試験では，軽度の心周期長の延長がみられたが，冠動脈血流量に影響は

認められなかった。ウサギ摘出動脈を用いた試験では，血管収縮作用は認められなかった。すべての動物種（ラット，モルモット，ウサギ及びカニクイザル）において一過性の心拍数の減少がみられ，ラット及びモルモットでは房室解離及び第二度房室ブロックが認められた。既に上市されている S1P 受容体調節薬であるフィンゴリモドは心筋細胞に発現する $S1P_1$ 受容体を介して GIRK チャネルを活性化し，心拍数減少を誘発する（Camm et al. 2014）。ヒト及びモルモットの心房筋細胞を用いた *in vitro* 試験において，シポニモドによる GIRK 電流の活性化が認められた。したがって，シポニモドによる心拍数減少はフィンゴリモドと同様の作用機序，すなわち GIRK チャネル活性化により発現する負の変時作用によるものと考えられた。また，心房筋細胞をシポニモドで前処置した結果，GIRK 電流活性化作用の減弱が認められ，$S1P_1$ 受容体の脱感作が示唆された。モルモットでのシポニモドによる心拍数減少は，アトロピンの前処置により軽減した。

モルモットにおいて単回投与により血圧の低下がみられたが，ウサギ及びカニクイザルでは明らかな血圧への影響は認められなかった。

ラットを用いた中枢神経系及び呼吸系に関する試験では，毒性学的に意義のある変化は認められなかった。また，ラットを用いた気道過敏性に関する試験では，シポニモドの 4 週間反復投与により，軽微な気道抵抗の増大及びメタコリン投与による気道抵抗の増大に軽微な増加がみられたが，肺の平滑筋に病理組織学的変化は認められなかった。

3.4 薬力学的薬物相互作用試験

実施していない。

4 薬物動態試験

4.1 分析法

^{14}C-標識したシポニモドの放射能は，液体シンチレーションカウンター又は定量的全身性オートラジオグラフィーによって測定した。血漿中未変化体及び主要代謝物濃度の定量は LC-MS/MS 法により行った。代謝物の組成分析は，放射能検出器を接続した HPLC を用いた。代謝物の構造は，構造既知代謝物との保持時間の比較，あるいは単離後の質量分析及び核磁気共鳴分光分析により同定した。

4.2 薬物動態

動物（マウス，ラット，ウサギ，イヌ，及びサル）の薬物動態は，^{14}C-標識したシポニモドを静脈内又は経口投与して検討した。

雄ラットに ^{14}C-シポニモド 3 mg/kg を経口投与したときの吸収率は 58%～71%であった。雄ラットにシポニモド 3 mg/kg，及び雌雄サルにシポニモド 1 mg/kg を経口投与したときの絶対的バイオアベイラビリティの平均値は，それぞれ 49%～52%及び 54%～83%であった。シポニモド 1 mg/kg を静脈内投与したときの血漿クリアランスは，雄及び雌ラットでそれぞれ 0.4～0.5 L/h/kg

及び 0.074 L/h/kg，サルで 0.098 L/h/kg であった。ラットの薬物動態には性差が認められ，雌雄間の CYP の発現量の差が影響したと考えられる（Martignoni et al. 2006）。雌ラットのクリアランスは雄に比べて小さく，雌ラットの T1/2 は 28 時間であったのに対し，雄ラットでは T1/2 は 5～6 時間であった。

雄マウスにシポニモド 8～25 mg/kg，雌雄ラットにシポニモド 3～10 mg/kg，及び雌雄サルにシポニモド 1～15 mg/kg を経口投与したときの Tmax（中央値）は 2～8 時間であった。シポニモドの累積性については，初回投与に比べ反復投与後に曝露量が増加する傾向が認められた。

4.3 分布

4.3.1 *In vitro* 血漿蛋白結合率及び血球への移行性

シポニモドの *in vitro* 血漿蛋白結合率は，マウス，ラット，ウサギ，イヌ，及びサルでいずれも 99%超であり，濃度依存性は認められなかった（マウス及びウサギの最終濃度 1～100 ng/mL，ラット，イヌ，サルの最終濃度 4 又は 40 ng/mL）。シポニモドの血中／血漿中濃度比にも濃度依存性はなく，マウスで 1.06，ラットで 1.21，ウサギで 1.11，イヌで 0.74，及びサルで 1.01 であった（マウス及びウサギの最終濃度 10～70000 ng/mL，ラット，イヌ，サルの最終濃度：10～10000 ng/mL）。

4.3.2 臓器及び組織への分布

^{14}C-シポニモド 8 mg/kg をアルビノマウスに単回経口投与したとき，シポニモド及びその代謝物は全身に分布し，涙腺，肝臓，腎臓（皮質）及びリンパ節に高い放射能が認められた。

^{14}C-シポニモドを有色及びアルビノラットに単回静脈内投与（^{14}C-シポニモド 1 mg/kg）並び単回経口投与（^{14}C-シポニモド 3 mg/kg）にしたとき，シポニモド及びその代謝物は全身に分布した。静脈内投与後 15 分で全身に広く分布し，副腎皮質に高い放射能が認められた。経口投与では，消化管への分布以外は静脈内投与後の放射能分布パターンと類似していた。有色ラットの組織内放射能分布はアルビノラットと類似しており，メラニン含有組織である眼（脈絡膜）から放射能が比較的早く消失することから，メラニンへの親和性は強くないと考える。

^{14}C-シポニモド 3 mg/kg を有色ラットに 7 日間反復経口投与したとき，脳内組織／血液の AUClast 比は小脳白質（15.1），脳梁（12.9）及び延髄（12.4）で高かった。サルにシポニモド 10～200 mg/kg/日を 2，4，26 及び 52 週間反復経口投与したとき，投与後 24 時間の脳／血漿中濃度比は，6.1～9.6（2 週間），6.6～7.6（4 週間），11.3～14.8（26 週間）及び 8.6～12.4（52 週間）であった。シポニモドは脳血液関門を通過し，高い中枢移行性を示した。

4.3.3 胎盤通過性

妊娠 7 日目のウサギに，シポニモド 0.1，1 及び 5 mg/kg/日で 14 日間反復経口投与（妊娠 20 日目まで）したとき，胎児への移行が認められた。1 mg/kg/日及び 5 mg/kg/日群の胎児でシポニモ

ドが定量可能であり，胎児放射能の母体血中放射能に対する比はそれぞれ 2.6 及び 1.6 であった。胎児はシポニモドに曝露されていることが示唆された。

4.4 代謝

4.4.1 *in vitro* 代謝

マウス，ラット及びサル肝のミクロソーム及び肝細胞を用いた *in vitro* 試験において，シポニモドの主な代謝経路は，1）水酸化（シクロヘキシル環の水酸化），2）グルクロン酸抱合，3）硫酸抱合と推定された。水酸化代謝物（M5，M6 及び M7）が，マウス，ラット，及びサルで検出された。

4.4.2 *in vivo* 代謝

^{14}C-シポニモドをマウス（8 mg/kg），ラット（3 mg/kg），及びサル（15 mg/kg）に単回経口投与したとき，いずれも血漿中の主成分は未変化体であり，それぞれ総放射能の 38%，67%，及び 79%であった。^{14}C-シポニモドをマウス（8 mg/kg），ラット（3 mg/kg），及びサル（15 mg/kg）に単回経口投与したときの主な代謝物として，それぞれ M17 （コレステロールエステル体，総放射能の 27%），M6（水酸化代謝物，総放射能の 18%），及び M3（M5 の O-グルクロン酸抱合体，総放射能の 7%）が検出された。

マウスに ^{14}C-シポニモド 8 mg/kg を単回経口投与したとき，糞中の主代謝物は M5（投与量の 29%），尿中の主代謝物は M17（投与量の 1%）であった。ラットに ^{14}C-シポニモド 3 mg/kg を単回経口投与したとき，糞中の主代謝物は M4（投与量の 26%），尿中の主代謝物は M1 及び M8（いずれも投与量の 3%）であった。サルに ^{14}C-シポニモド 15 mg/kg を単回経口投与したとき，糞中の主代謝物は M5（投与量の 28%）であり，尿中の代謝物は 1%以下であった。

また，胆管にカニュレーション処置したラットに ^{14}C-シポニモド 1 mg/kg を静脈内投与したとき，投与 72 時間後までに投与量の 8%が未変化体として胆汁から回収された。胆汁中の主代謝物は，M4［M4a（M5 の硫酸抱合体，投与量の 17%），M4c（M6 の硫酸抱合体，投与量の 7%），及び M4b（M7 の硫酸抱合体，投与量の 3%）］であった。

4.5 排泄

^{14}C-シポニモドをマウス（8 mg/kg），ラット（3 mg/kg），及びサル（15 mg/kg）に単回経口投与したとき，総放射能の 74.9%～98.2%が糞中に排泄され，1.44%～6.95%が尿中に排泄された。ラットでは経口投与後 96 時間までに総放射能の 100%が，サルでは投与後 336 時間までに総放射能の 99.9%が排泄された。マウスでは投与後 168 時間に，総放射能の 16.1%が屍体中から回収された。

授乳中のラットに ^{14}C-シポニモド 10 mg/kg を単回経口投与したとき，シポニモド及びその代謝物はラットの乳汁中に分泌され，未変体の乳汁／血漿中未変化体濃度比は約 0.5 であった。

4.6 薬物間相互作用

ヒト *in vitro* 及び *in vivo* 薬物間相互作用試験については，「2.7.2 臨床薬理試験」を参照のこと。動物試料を用いた *in vivo* 薬物間相互作用試験は実施していない。

ラット及びサルにおいて，シポニモドは能動的肝取込みトランスポーターの基質ではなく，代謝クリアランスは 10～15 μL/min/mg であった。ラット及びサル肝細胞による肝取込みに対して，リファマイシン SV（RSV，OATP 阻害剤），*p* - アミノ馬尿酸（PAH，OAT 基質）及び塩化テトラエチルアンモニウム（TEA，OCT 基質）のいずれも阻害作用を示さなかった。

4.7 トキシコキネティクス

マウス，ラット及びイヌにシポニモドを経口投与したときの毒性試験において，シポニモドのトキシコキネティクスを評価した。また，ラット及びウサギに経口投与したときの生殖発生毒性試験においても評価した。

雌雄マウスにシポニモド 5～80 mg/kg を単回経口投与したときの未変化体の曝露量は，雄雌ともに用量にほぼ比例して増加した。反復投与（1 日 1 回 2～13 週間）したときの曝露量はばらつきが大きく，用量比をわずかに下回った。

39 週間反復投与試験において，雄マウスにシポニモド 25 及び 75 mg/kg/日を反復投与したとき，用量増加に伴い未変化体の曝露量が増加した。75 mg/kg/日投与群において，274 日目の M17 の曝露量は投与初日に比べて 58 倍以上増加し，明らかな累積性を示した。

雌雄ラットにシポニモド 10～200 mg/kg を単回経口投与したときの未変化体の曝露量は，雄ラットの低用量（10～50 mg/kg）を除き，雌雄ラットで用量比を下回った。雄ラットにシポニモド 10 mg/kg/日又は 50 mg/kg/日を 4 週間反復投与したとき累積は認められなかったが，200 mg/kg/日投与での累積係数は 2.7 であった。雌ラットにシポニモドを投与したときの曝露量は雄ラットに比べて高く，4 週間反復投与時の曝露量は投与初日に比べて増加する傾向がみられた。

雌雄サルにシポニモド 10～150 mg/kg を単回経口投与したときの未変化体の曝露量は，雄サルの低用量（10～50 mg/kg/日）を除き，雌雄サルで用量比を下回った。シポニモド 10～200 mg/kg/日を反復投与（1 日 1 回 2～52 週間）したときの曝露量は，雄雌ともに用量にほぼ比例して増加した。曝露量はばらつきが大きく，明らかな性差は認められなかった。反復投与（2～52 週間）時の曝露量は投与初日に比べて増加する傾向にあった。

妊娠ウサギにシポニモド 0.1～5 mg/kg を 2 週間反復経口投与したときの未変化体の曝露量は，用量にほぼ比例して増加した。

5 毒性試験

シポニモドの非臨床安全性評価を目的として，単回投与毒性試験，反復投与毒性試験，遺伝毒性試験，がん原性試験，生殖発生毒性試験，局所刺激性試験及びその他の毒性試験を実施した。毒性試験の一覧を Table 5-1 に示す。

Table 5-1 毒性試験一覧

試験の種類		投与経路	試験系
単回投与毒性		静脈内	マウス
		経口	ラット，カニクイザル
反復投与毒性	2 週間	経口	マウス，ラット，カニクイザル
	4 週間	経口	ラット，カニクイザル
	13 週間	経口	マウス
	26 週間	経口	ラット，カニクイザル
	52 週間	経口	カニクイザル
遺伝毒性	遺伝子突然変異	*in vitro*	ネズミチフス菌
	小核試験	*in vitro*	ヒトリンパ芽球様 TK6 細胞
	染色体異常	*in vitro*	ヒト末梢血リンパ球
	小核	経口	マウス（骨髄），ラット（骨髄）
がん原性	104 週間	経口	マウス，ラット
生殖発生毒性	受胎能及び初期胚発生	経口	ラット
	胚・胎児発生	経口	ラット，ウサギ
	出生前及び出生後発生	経口	ラット
局所刺激性	皮膚	経皮	ウサギ
	眼	点眼	ウサギ
	静脈内，動脈内，静脈周囲	左に同じ	ウサギ
その他の毒性	免疫毒性試験	経口	ラット
	毒性発現の機序に関する試験	*in vitro*	マウス，ラット及びヒト血管内皮細胞
		経口	マウス，ラット
	光毒性試験	*in vitro*	3T3 線維芽細胞
	皮膚感作性試験	経皮	マウス
	依存性試験	経口	ラット
	不純物の毒性試験	経口	ラット

供試動物として，シポニモドの薬理作用がみられ，代謝経路がヒトと類似している動物種であるマウス，ラット，ウサギ及びカニクイザルを選択した。

5.1 単回投与毒性試験

マウスを用いた単回静脈内投与毒性試験，ラットを用いた単回経口投与毒性試験，及びカニクイザルを用いた用量漸増経口投与毒性試験を実施した（Table 5-2）。マウスに 200 mg/kg までの用量で静脈内投与した結果，死亡は認められなかった。ラット及びカニクイザルにそれぞれ 2000 及び 60 mg/kg までの用量で経口投与した結果，死亡はみられなかった。ラットでは，2000 mg/kg 投与群の雌で立毛，身づくろいの低下，身体緊張低下，歩行異常または異常姿勢がみられた。カニクイザルでは，60 mg/kg まで投与した後の病理組織学的検査において 1 例に肝細胞の細胞質内封入体がみられた。

以上，マウス，ラット及びカニクイザルを用いた単回投与毒性試験における概略の致死量は，各試験の最高用量を上回るものと考えられた。

Table 5-2 単回投与毒性試験

動物種／系統	投与経路	動物数／群	用量（mg/kg）	概略の致死量（mg/kg）	試験番号
マウス／CD1	静脈内	雌雄各 3 例	0, 50, 100, 150, 200	>200	0670303
ラット／Wistar Hannover	経口	雌雄各 3～5 例	0, 250, 500, 1000, 2000	>2000	0670304
カニクイザル	経口	雄 2 例	10, 30, 60	>60	0470204

Source: Table 2.6.7.5-0670303, Table 2.6.7.5-0670304, Table 2.6.7.5-0470204

5.2 反復投与毒性試験

マウスを用いた最長 13 週間の反復経口投与毒性試験，ラットを用いた最長 26 週間の反復経口投与毒性試験，及びカニクイザルを用いた最長 52 週間の反復経口投与毒性試験を実施した（Table 5-3）。

Table 5-3 反復投与毒性試験

動物種／系統	投与期間	投与経路	動物数／群	用量（mg/kg/日）	試験番号
マウス／CD1	2 週間	経口	雌雄各 6 例	0, 50, 150, 300	0770648
	13 週間	経口	雌雄各 10 例	0, 5, 15, 35, 80	0770649
ラット／Wistar Hannover	2 週間	経口	雄 5 例	0, 10, 30, 100	0410113
	4 週間／	経口	雌雄各 10 例	雄：0, 10, 50, 200	0670037
	休薬 4 週間 [a]		回復性試験 [a]：雌雄各 5 例	雌：0, 10, 50, 200→100[b]	
	26 週間／	経口	雌雄各 20 例	雄：0, 15, 50, 150	0770059
	休薬 8 週間 [a]		回復性試験 [a]：雌雄各 10 例	雌：0, 5, 15, 50	
カニクイザル	2 週間	経口	雌雄各 1～2 例	0, 10, 30, 100	0570040
	4 週間／	経口	雌雄各 3 例	0, 10, 50, 200→150[c]	0670007
	休薬 4 週間 [a]		回復性試験 [a]：雌雄各 2 例		
	26 週間／	経口	雌雄各 4 例	0, 10, 50, 100	0770061
	休薬 12 週間 [a]		回復性試験 [a]：雌雄各 2 例		
	52 週間／	経口	雌雄各 4 例	0, 10, 30, 100	0770339
	休薬 8 週間 [a]		回復性試験 [a]：雌雄各 2 例		

Source: Table2.6.7.6-0770648, Table2.6.7.7A-0770649, Table2.6.7.6-0410113, Table2.6.7.7B-0670037, Table2.6.7.7C-0770059, Table2.6.7.6-0570040, Table2.6.7.7D-0670007, Table2.6.7.7E-0770061, Table2.6.7.7F-0770339

a = 媒体対照群及び高用量群のみ　b = 試験 13 日に 200 mg/kg/日から 100 mg/kg/日に減量した　c = 試験 8 日に 200 mg/kg/日から 150 mg/kg/日に減量した

反復投与により，いずれの動物種においてもすべての投薬群で中等度～重度の末梢血中リンパ球数の減少及びリンパ系組織の萎縮性変化がみられ，シポニモドの薬理作用に起因した変化と考

えられた。反復投与による主な標的器官は中枢神経系，肺，腎臓，肝臓，甲状腺，涙腺，消化管，骨格筋及び皮膚であった。

リンパ系組織への影響

いずれの動物種においても，すべての用量で末梢血中リンパ球数の減少及びリンパ系組織の萎縮性変化（脾臓，リンパ節，及び胸腺のリンパ球枯渇またはリンパ組織萎縮）並びに胸腺の髄質拡大が認められた。また，リンパ球フェノタイピング（ラット及びカニクイザル）において末梢血中 T 細胞及び B 細胞の減少がみられた。$S1P_1$ 受容体は胸腺からの T 細胞の移出，並びに二次リンパ組織からの T 細胞及び B 細胞の移出において必要とされることから（Matloubian et al. 2004），リンパ系組織の変化はシポニモドによる $S1P_1$ 受容体アンタゴニズム作用によるものと考えられた。リンパ系組織でみられた変化には回復性または回復傾向が認められた。T 細胞依存性抗体産生（T-cell dependent antibody response，TDAR）検査（ラット及びカニクイザル）の結果，スカシガイヘモシアニン（keyhole limpet hemocyanin，KLH）に対する二次応答は一次応答を上回る抗体価を示したことから，シポニモドは T 細胞と B 細胞の相互作用に顕著な影響は及ぼさないと考えられた。以上のことから，リンパ系組織への影響は毒性変化ではないと判断された。

中枢神経系への影響

マウス，ラット及びカニクイザルの高用量群において，中枢神経系への影響を示唆する一般状態の変化がみられた。マウス（2 週間反復投与）では，150 mg/kg/日投与により振戦，300 mg/kg/日投与により筋緊張の低下がみられた。カニクイザルでは，100 mg/kg/日投与により振戦（26 及び 52 週間反復投与）及び痙攣（52 週間反復投与），200→150 mg/kg/日投与群（4 週間反復投与）で振戦，間代性痙攣，及び筋攣縮が認められた。また，マウスを用いた小核試験の 1000 mg/kg/日投与群では振戦，痙攣，及び筋攣縮，ラットを用いた単回経口投与毒性試験の 2000 mg/kg 投与群では身体緊張の低下がみられている。高用量では痙攣が誘発されたが，最大耐量（maximum tolerated dose，MTD）を上回る用量でのみ認められたことから，シポニモドの痙攣誘発作用を示唆するものではないと考えられた。Cmax に基づくと，マウス及びカニクイザルの中枢神経系に関する無毒性量（no observed adverse effect level，NOAEL）における曝露量は，臨床用量（2 mg）投与時のヒト曝露量のそれぞれ 793 及び 362 倍以上であり，十分な安全域が認められた。なお，いずれの動物種においても脳における病理組織学的変化は認められず，安全性薬理試験において中枢神経系への影響は認められていない。

肺への影響

マウス（2 及び 13 週間反復投与）及びラット（2 及び 4 週間反復投与）では，低用量から肺に炎症／線維化，平滑筋の肥大／過形成，フィブリン／硝子様物質の沈着巣，及び肺胞マクロファージ集簇が認められた。ラットではこれらの変化には休薬による回復性が確認された。変化の発現機序の詳細は不明であるが，$S1P_1$ 受容体アゴニストが持続的曝露により機能的アンタゴニスト

として作用した結果，血管透過性及び線維化を促進すると報告されていることから（Shea et al. 2010），薬理作用に関連した変化である可能性がある。しかし，同等の用量を投与したラットの 26 週間反復投与試験では肺の変化は認められていない。AUC に基づくと，マウスの毒性発現用量における曝露量は，臨床用量（2 mg）投与時のヒト曝露量の 72 倍以上，ラットの NOAEL における曝露量は 39 倍であることから，これらの動物でみられた肺の変化が臨床用量付近で発現する可能性は低いと考えられた。なお，安全性薬理試験において，呼吸機能及び気道過敏性に毒性学的意義のある変化は認められていない。

腎臓への影響

マウス（2 週間反復投与）では，150 mg/kg/日以上の投与群の雄で腎臓に尿細管壊死，鉱質沈着，尿細管拡張，硝子円柱または好塩基性尿細管が認められた。これらの腎臓の変化は，死亡例での死因と考えられた。AUC に基づくと，マウスの腎臓に関する NOAEL における曝露量は臨床用量（2 mg）投与時のヒト曝露量の 677 倍であることから，マウスの腎臓でみられた変化が臨床用量付近で発現する可能性は低いと考えられた。

ラット（4 週間反復投与）では，10 mg/kg/日以上の投与群の雄でのみ，腎臓の近位尿細管に硝子滴が認められた。シポニモドはトリフルオロメチルベンゼン部分を有しており，同部位は雄ラット特異的に発現することが知られている，α2 マイクログロブリンの近位曲尿細管への蓄積を誘発することが報告されている（Jameson and Yuan 1992，Hard et al. 1993）。したがって，シポニモド投与によりみられた近位尿細管の硝子滴は，ヒトへの外挿性はないと考えられた。

肝臓及び甲状腺への影響

マウス及びラットでは，すべての反復投与毒性試験で肝臓の小葉中心性肝細胞肥大が認められた。また，ラットでは甲状腺に濾胞上皮細胞肥大（26 週間反復投与），血中甲状腺刺激ホルモン（thyroid stimulating hormone，TSH）の増加及び肝 T4-UDP-グルクロン酸転移酵素（T4-Thyroxine-UDP-Glucuronosyl transferase，T4-UDP-GT）活性上昇が認められ，肝細胞の酵素誘導に関連した変化と考えられた。この変化はげっ歯類特異的であり，ヒトへの外挿性はないことが知られている。

マウスを用いた 2 週間反復投与毒性試験では，150 mg/kg/日以上の投与群で肝細胞壊死及び炎症がみられた。AUC に基づくと，マウスの NOAEL における曝露量は臨床用量（2 mg）投与時のヒト曝露量の 502 倍であることから，マウスでみられた肝細胞壊死及び炎症が臨床用量付近で発現する可能性はないと考えられた。

なお，カニクイザルの用量漸増投与毒性試験（～60 mg/kg）では，肝細胞に細胞質内封入体がみられている。カニクイザルでは免疫抑制による種々の感染症の再燃が報告されていることから（Sasseville and Mansfield 2010），肝臓の変化がシポニモドの免疫調節に伴う感染の再燃である可能性は否定できない。しかし，より高用量を投与したカニクイザルを用いた最長 52 週間の反復経口投与毒性試験では，同様の変化は認められなかった。

涙腺への影響

マウス（13 週間反復投与）では涙腺に変性及び萎縮がみられたが，ラット及びカニクイザルでは同様の変化は認められなかった。涙腺の変化の発現機序の詳細は不明であるが，マウスの涙腺では高い薬物曝露がみられたことから[2.6.5-5.5A 項]，シポニモドに関連する変化である可能性は否定できなかった。しかしながら，AUC に基づくと，マウスの NOAEL における曝露量は臨床用量（2 mg）投与時のヒト曝露量の 72 倍であり，涙腺の変化が臨床用量付近で発現する可能性は低いと考えられた。

消化管への影響

カニクイザルでは，下痢／水様便（2，4，26，及び 52 週間反復投与）及び消化管の炎症（26 週間反復投与）が認められた。カニクイザルの消化管でみられた変化は，休薬により回復傾向を示した。マウス及びラットでは，消化管への影響はみられなかった。カニクイザルの消化管における変化の発現機序は不明であるが，カニクイザルでは免疫抑制に伴う種々の感染症の再燃が報告されていることから，感染の再燃が関連している可能性は否定できなかった。AUC に基づくと，カニクイザルの毒性発現用量における曝露量は臨床用量（2 mg）投与時のヒト曝露量の 251 倍以上であった。

骨格筋及び皮膚への影響

カニクイザルを用いた 52 週間反復投与毒性試験では，10 mg/kg/日以上の投与群で骨格筋及び皮膚に変化がみられた。骨格筋では用量依存的な骨格筋変性／再生がみられ，30 mg/kg/日以上の投与群では中等度の変性／再生が認められたことから毒性変化と考えられた。皮膚では軽微から中等度の毛包萎縮，100 mg/kg/日群で表皮真皮境界部に皮膚炎がみられた。皮膚の変化は，シポニモドの免疫調節作用と関連した変化の可能性は否定できなかった。AUC に基づくと，骨格筋及び皮膚における変化は臨床用量（2 mg）投与時のヒト曝露量の 171 倍以上の曝露量でみられていることから，これらの変化が臨床用量付近で発現する可能性は低いと考えられた。

5.3 遺伝毒性試験

In vitro 遺伝毒性試験として，ネズミチフス菌を用いた復帰突然変異試験，ヒトリンパ芽球様 TK6 細胞を用いた小核試験及びヒト末梢血リンパ球を用いた染色体異常試験を，*in vivo* 遺伝毒性試験としてラット及びマウスを用いた小核試験を実施した（Table 5-4）。試験の結果，遺伝子突然変異誘発性，染色体異常誘発性並びに小核誘発性のいずれも認められなかった。

Table 5-4 遺伝毒性試験

試験の種類	試験系	濃度／用量	結果	試験番号
***In vitro* 試験**				
復帰突然変異	ネズミチフス菌，TA97a，TA98，TA100，TA102，TA1535	プレート法：8～5000 µg/plate（±S9） プレインキュベーション法：2.3～5000 µg/plate（±S9）	陰性	0612011
In vitro 小核	ヒトリンパ芽球様 TK6 細胞	3 時間処理+24 時間回復：37.5，75，150，300 µg/mL（+S9） 20 時間処理+48 時間回復：18.8，37.5，75，150 µg/mL（−S9）	陰性	0414047
染色体異常	ヒト末梢血リンパ球	20 時間：32.5～90.4 µg/mL（−S9） 3 時間+17 時間回復：49.3～90.0 µg/mL（−S9） 3 時間+17 時間回復：26.5～70.1 µg/mL（+S9） 3 時間+17 時間回復：27.0～66.6 µg/mL（+S9）	陰性	0612109
***In vivo* 試験**				
In vivo 小核	マウス／CD1	実験 1：0，250，500，1000 mg/kg 実験 2：0，125 mg/kg	陰性	1470042
In vivo 小核	ラット／Wistar Hannover	0，125，395，1250 mg/kg	陰性	0770326

Source: Table2.6.7.8A-0612011, Table2.6.7.8B-0414047, Table2.6.7.8C-0612109, Table2.6.7.9A-1470042, Table 2.6.7.9B-0770326

5.4 がん原性試験

マウス及びラットを用いた 104 週間がん原性試験を実施した（Table 5-5）。

Table 5-5 がん原性試験

動物種／系統	投与期間	投与経路	動物数／群	用量（mg/kg/日）	特記事項	試験番号
マウス／CD1	104 週間	経口	雌雄各 70 例	0，2，8，25	2 mg/kg/日（雌）：97 週に投与中止，101 週に剖検 [a] 8 mg/kg/日（雌雄）：91 及び 92 週に投与中止，93 及び 98 週に剖検 [a] 25 mg/kg/日（雌雄）：91 及び 92 週に投与中止，96 及び 95 週に剖検 [a]	0870139
ラット／Wistar Hannover	104 週間	経口	雌雄各 50 例	雄：0，10，30，90 雌：0，3，10，30	−	0870138

Source: Table 2.6.7.10A-0870139, Table 2.6.7.10B-0870138
a =生存率が 20/70 例まで低下した時点で投与を中止し，15/70 例まで低下した時点で剖検を実施した。

マウスを用いたがん原性試験において，すべての投薬群で血管肉腫／血管腫の発現頻度の増加が認められた。一方，ラットを用いたがん原性試験では血管肉腫は認められなかった。*In vivo* 毒

性発現機序検討試験により，マウスでは血管内皮細胞の活性化，細胞分裂及び血管新生因子 PLGF2 濃度の増加が持続的に認められ，血管新生が持続的に亢進したことにより血管肉腫が発現した可能性が考えられた。ラットでは血管内皮細胞の分裂及び PLGF2 濃度の持続的な増加は認められなかった。*In vitro* 毒性発現機序検討試験では，マウス血管内皮細胞において細胞分裂促進及び PLGF2 産生の増加が認められたが，ラット及びヒト血管内皮細胞では同様の変化は認められなかった。ヒト血管内皮細胞でみられた変化はラットと類似していたことから，ヒトでは血管肉腫の誘発はみられないと考えられた。さらに，自然発生性の血管肉腫の発現率はマウスではヒトと比較して高く（Cohen et al. 2009），薬剤誘発性血管肉腫にもマウス特異的な発現機序が報告されている（Pegg et al. 2012，Criswell et al. 2012，Kakiuchi-Kiyota et al. 2009）。以上のことから，シポニモド投与による血管肉腫の誘発はマウス特異的な変化であり，ヒトへの外挿性は低いものと考えられた。

マウスを用いたがん原性試験では，雌マウスにおいて悪性リンパ腫の発現頻度の増加が認められた。雄マウス及びラットでは，同様の変化は認められなかった。雌マウスは自然発生性のリンパ腫の発現頻度が高いことから（Son and Gopinath 2004），シポニモドの免疫調節作用に関連して自然発生性の悪性リンパ腫が増加した可能性が考えられた。

ラットを用いたがん原性試験では，甲状腺に腫瘍性病変として濾胞上皮細胞腺腫／腺癌，非腫瘍性病変として濾胞上皮細胞肥大及び過形成が認められた。これらの変化は，肝細胞の酵素誘導による甲状腺ホルモンの代謝促進，それに続く TSH 分泌の亢進により甲状腺濾胞上皮細胞が刺激されたことによるものと考えられた。肝細胞の酵素誘導による変化はげっ歯類特異的であり，ヒトへの外挿性はないと考えられている。

5.5 生殖発生毒性試験

雌雄ラットを用いた受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験（Table 5-6），ラット及びウサギを用いた胚・胎児発生に関する試験（Table 5-7），並びにラットを用いた出生前及び出生後の発生並びに母動物の機能に関する試験（Table 5-8）を実施した。

5.5.1 受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験

雄ラットの授胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験では，200 mg/kg/日までの用量で精子及び生殖能に影響は認められなかった。雌ラットの受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験では，1 mg/kg/日までの用量で受胎能及び初期胚発生に対する影響はみられなかった。

Table 5-6 受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験

動物種／系統	試験の種類	投与経路	動物数／群	用量（mg/kg/日）	投与期間	試験番号
ラット／Wistar Hannover	雄の授胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験	経口	雄 25 例	0，2，20，200	交配前 28 日間，交配期間中及び剖検前日まで	0970446
ラット／Wistar Hannover	雌の受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験	経口	雌 24 例	0，0.1，0.3，1	交配前 14 日間，交配期間中及び妊娠 6 日まで	1070054

Source: Table 2.6.7.12A-0970446, Table 2.6.7.12B-1070054

5.5.2 胚・胎児発生に関する試験

ラットを用いた胚・胎児発生に関する試験では，低用量群である 1 mg/kg/日から吸収胚数の増加，外表異常（異常回転肢及び口蓋裂），内臓異常（巨心）及び骨格異常（鎖骨形態異常）が認められ，シポニモドはラットに対して催奇形性を示すと考えられた。ウサギでは，5 mg/kg/日群の母動物で流産，1 mg/kg/日以上の投与群の胎児で吸収胚数及び骨格変異の増加，5 mg/kg/日群で内蔵変異の増加が認められた。

Table 5-7 胚・胎児発生に関する試験

動物種／系統	試験の種類	投与経路	動物数／群	用量（mg/kg/日）	投与期間	試験番号
ラット／Wistar Hannover	胚・胎児発生に関する試験	経口	雌 25 例	0，1，5，40	妊娠 6～17 日	0770653
ウサギ／NZW	胚・胎児発生に関する用量設定試験	経口	雌 3 または 6 例	0，5，10，50，100，150	妊娠 7～20 日	0770060
ウサギ／NZW	胚・胎児発生に関する試験	経口	雌 20	0，0.1，1，5	妊娠 7～20 日	0770652

Source: Table 2.6.7.13A-0770653, Table 2.6.7.11-0770060, Table 2.6.7.13B-0770652
NZW = New Zealand White

5.5.3 出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験

ラットを用いた出生前及び出生後の発生並びに母動物の機能に関する試験において，0.15 mg/kg/日以上の投与群で母動物の妊娠期間の延長，出生児の生存率の減少及び異常／変異の増加（雄生殖器異常等）がみられた。0.5 mg/kg/日群の出生児では膣開口及び包皮分離の遅延がみられたが，行動発達及び生殖機能への影響は認められなかった。出生児の免疫毒性検査の結果，リンパ球フェノタイピングでは，0.05 mg/kg/日以上の投与群で末梢血中のリンパ球サブセットの変化（総 T 細胞数，ヘルパーT 細胞数及び細胞障害性 T 細胞数の増加並びにナチュラルキラー細胞数の減少）がみられた。TDAR 検査では投薬による影響は認められなかった。

Table 5-8 出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験

動物種／系統	試験の種類	投与経路	動物数／群	用量（mg/kg/日）	投与期間	試験番号
ラット／Wistar Hannover	出生前及び出生後の発生並びに母動物の機能に関する試験	経口	雌 24 例	0，0.05，0.15，0.5	妊娠 6 日～分娩後 20，21 又は 22 日	0970449

Source: Table 2.6.7.14-0970449

5.5.4 幼若動物を用いた毒性試験

実施していない。

5.5.5 生殖発生毒性に関する総合評価

シポニモドは遺伝毒性を示さず，反復投与毒性試験において雌雄の生殖器官及び内分泌系組織に対する毒性はみられなかった。ラットを用いた雌雄の受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験において，受胎能への影響は認められなかった。

胚・胎児発生に関する試験において，ラット及びウサギで胚・胎児毒性，ラットでは催奇形性が認められた。ラットを用いた出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験では出生児の生存率の減少がみられた。シポニモドによる胎児毒性発現の可能性があることから，妊娠中は本薬の使用を避けることが推奨される[1.8.1-9.5 項]。

5.6 曝露量の比較

反復投与毒性試験及び生殖発生毒性試験の最小毒性量（lowest observed adverse effect level，LOAEL）または NOAEL における曝露量を Table 5-9 に示す。AUC に基づいて臨床用量投与時のヒト曝露量と比較した結果，ラットを用いた 26 週間反復投与毒性試験の NOAEL における曝露量は雌雄でそれぞれ 190 及び 342 倍，カニクイザルを用いた 52 週間反復投与毒性試験の NOAEL における曝露量は雌雄でそれぞれ 171 及び 222 倍であった。

Table 5-9 毒性試験に用いた動物種とヒトの全身曝露量の比較

試験の種類（試験番号）	用量 (mg/kg/日)	性	Cmax (ng/mL)	AUC0-24 (ng*h/mL)	曝露量比 [a]	
					Cmax 比	AUC 比
マウス，13 週間 (0770649)	LOAEL，5	雄	2730	44700	90	80
	LOAEL，5	雌	2570	40100	85	72
ラット，26 週間 (0770059)	NOAEL，50	雄	7060	106000	232	190
	NOAEL，15	雌	9680	191000	318	342
カニクイザル，52 週間 (0770339)	NOAEL，10	雄	5440	95400	179	171
	NOAEL，10	雌	6620	124000	218	222
ラット，雌受胎能 (1070054)	受胎能，NOAEL，1	雌	468	9030	15	16
ラット，胚・胎児発生 (0770653)	胚・胎児，LOAEL，1	雌	498	10300	16	19
ウサギ，胚・胎児発生 (0770652)	胚・胎児，NOAEL，0.1	雌	7	96 [b]	0.2	0.2

Source: Table 2.6.7.7A-0770649, Table 2.6.7.7C- 0770059, Table2.6.7.7F-0770339, Table2.6.7.12B-1070054, Table2.6.7.13A-0770653, Table 2.6.7.13B-0770652

a = 臨床用量（2 mg）投与時の定常状態における Cmax=30.4 ng/mL，AUCtau=558 ng*h/mL を用いて算出した

b = 1 mg/kg/日群の曝露量（958 ng*h/mL）から推定した

5.7 局所刺激性試験

ウサギを用いた局所刺激性試験において，シポニモドは皮膚適用，並びに静脈内投与，動脈内投与及び静脈周囲投与時に刺激性を示さなかった。結膜嚢内の適用により，結膜に発赤，浮腫及び分泌物，並びに虹彩に軽度の刺激性が認められたが，重篤な眼刺激性はみられなかった[2.6.6-7 項]。

5.8 その他の毒性試験

マウスを用いた局所リンパ節試験において，シポニモドの皮膚感作性は認められなかった。*In vitro* 光毒性試験において，シポニモドは光毒性を示さなかった。

シポニモドの依存性について，Lister Fooled 系ラットを用いた身体依存性試験，薬物弁別法及び自己投与法による依存性試験を実施した。シポニモドは休薬時の退薬症候，強化効果または薬物弁別作用を示さなかったことから，依存性はないものと判断された[2.6.6-8.5 項]。

ヒト血漿中の主要な代謝物はコレステロールエステル M17 及びグルクロン酸抱合体 M3 である[2.7.2 項]。M17 及び M3 の非臨床毒性試験における曝露量は，マウス，ラットまたはサルのいずれかの動物種においてヒト臨床用量（2 mg）投与時の曝露量を上回ることが確認された[2.6.4-5.2.1 項]。したがって，代謝物の毒性については既に実施された毒性試験で評価されたと考えられた。

6 不純物及び分解物

原薬中の不純物 010-10 が安全性確認の必要な閾値を超えることから，*in silico* 変異原性評価，不純物添加バッチ（TOX1/BAF312，不純物 010-10 の含有量は[redacted]%）を被験物質としたラットを用いた 4 週間反復経口投与毒性試験及び小核試験を実施した。その結果，不純物 010-10 の変異原性に関する警告構造，不純物に関連したシポニモドの毒性プロファイルの変化及び小核誘発性のいずれも認められなかった。本試験における不純物 010-10 の用量は，本剤の予定最高臨床用量及び規格値から算出したヒト最大用量を上回ることが確認された（Table 6-1）。以上のことから，不純物 010-10 の規格値までの安全性は確認されているものと判断した。

Table 6-1 反復投与毒性試験における不純物含有量

用量	不純物 010-10 含有量	不純物 010-10 用量
ラット, 50 mg/kg	[redacted]%	[redacted]mg/kg [a]
ヒト, 2 mg/day	[redacted]%	[redacted]µg/kg [b]
用量比（ラット/ヒト）		4167

Source: Table2.6.7.4

a = 最高用量 50 mg/kg を用いて算出した

b = 予定最高臨床用量 2 mg，010-10 の規格上限値[redacted]%，体重 50 kg として算出した

7 安全性の総合評価

安全性薬理試験では，hERG チャネル，活動電位持続時間または QT 間隔のいずれに対してもシポニモドの影響は認められなかった。また，心自動能に関する試験において軽度の心周期長の延長がみられたが，冠動脈血流量に影響は認められなかった。ウサギ血管を用いた試験では，血管収縮作用もみられなかった。複数の動物種において，一過性の心拍数の減少及び房室伝導異常（房室解離及び第二度房室ブロック）が認められた。シポニモドの心房筋細胞を用いた *in vitro* 試験の結果から，心拍数の減少は $S1P_1$ 受容体介在性 GIRK チャネル活性化に関連した変化であり，$S1P_1$ 受容体の脱感作により作用が減弱することが示唆された。シポニモドの臨床試験では一過性の徐脈がみられ，投与後数日で消失するが，徐脈の発現低下に受容体の脱感作が関与している可能性が考えられた。モルモットにおいて血圧の低下がみられたが，ウサギ及びカニクイザルでは明らかな血圧への影響は認められなかった。ラットを用いた中枢神経系及び呼吸系に関する試験では，毒性学的に意義のある変化は認められなかった。

単回投与毒性試験において，概略の致死量はマウスで 200 mg/kg 超，ラットでは 2000 mg/kg 超，カニクイザルでは 60 mg/kg 超であった。マウス，ラット及びカニクイザルを用いた反復投与毒性試験では，いずれの動物種においてもすべての投薬群で薬理作用に関連した末梢血中リンパ球数の減少及びリンパ系組織の萎縮性変化（脾臓，リンパ節または胸腺のリンパ球枯渇またはリンパ組織萎縮，胸腺の髄質拡大）がみられた。リンパ系組織への影響は休薬による回復傾向が認め

られ，重度の免疫抑制作用を伴っていないことから，毒性変化ではないと判断された。その他，中枢神経系への影響を示唆する一般状態の変化（マウス，ラット，カニクイザル），並びに肺（マウス，ラット），腎臓（マウス，ラット），肝臓（マウス，ラット），甲状腺（ラット），涙腺（マウス），消化管（カニクイザル），骨格筋（カニクイザル）及び皮膚（カニクイザル）に投薬に関連した病理組織学的変化がみられた。AUC に基づくと，NOAEL または毒性発現用量における曝露量は臨床用量（2 mg）投与時のヒト曝露量を十分上回るものであり，同様の毒性変化がヒトで発現する可能性は低いと考えられた。

シポニモドは遺伝毒性，光毒性または依存性のいずれも示さなかった。マウスを用いたがん原性試験において血管肉腫が認められた。毒性発現機序検討試験の結果，マウス特異的に血管新生の亢進を示唆する変化が認められたことから，血管肉腫の誘発はヒトへの外挿性の低い変化と考えられた。また，がん原性試験において認められたその他の腫瘍性病変（雌マウスの悪性リンパ腫及びラットの甲状腺濾胞上皮癌）はいずれもヒトへの外挿性の低い変化と考えられた。生殖発生毒性試験では，雌雄の受胎能への影響は認められなかった。催奇形性を含む胚・胎児毒性が認められたことから，妊娠中は本薬の使用を避けることが推奨される。

シポニモドはフィンゴリモドと比較して，$S1P_1$ 及び $S1P_5$ 受容体に対する選択性が高い。S1P 受容体サブタイプ機能は完全には解明されていないものの，$S1P_3$ 及び $S1P_4$ 受容体を介したアストロサイトや免疫細胞活性化等の炎症反応誘導が報告されている。このことから，シポニモドは S1P 受容体に対する高い選択性により炎症反応を惹起/進展しないと推測される。

8 結論

シポニモドは $S1P_1$ 及び $S1P_5$ 受容体に高い選択性を示す S1P 受容体調節薬である。一連の *in vitro* 及び *in vivo* 試験成績から，シポニモドは $S1P_1$ 受容体にアゴニストとして作用し，内在化を誘導して受容体を機能的に不活性化させる。一方，$S1P_5$ 受容体に対してはアゴニストとして作用するものの内在化は誘導せず，その機能を抑制しないことが明らかとなった。シポニモドはリンパ球上の $S1P_1$ 受容体をほぼ完全に内在化させ，血中リンパ球数を減少させるとともに，MS モデルとして汎用されているラット/マウス慢性型 EAE に対し優れた治療効果を示した。また，同モデルを用いた icv 投与の検討で，シポニモドはシナプス電流異常を改善し，神経系細胞のグリオーシスを抑制したことから CNS に対して直接的な保護効果を有する可能性がある。シポニモドは $S1P_1$ 受容体を介しアストロサイトの活性化を抑制し，$S1P_5$ 受容体を介してオリゴデンドロサイトによる軸索の再ミエリン化を誘導することが示唆された。以上のことから，シポニモドは，$S1P_1$ 受容体内在化作用を介してリンパ球の二次リンパ組織からの移出を抑制し，CNS への細胞浸潤を阻止することで，MS の再発を予防し治療効果を示すものと考えられる。また，CNS に直接的に作用し保護効果を示すことで，SPMS 移行後に主としてみられる神経変性に対してもその進行を抑制することが期待される。

副次的薬理試験成績から，シポニモドは臨床維持用量（2.0 mg）において，S1P 受容体以外の標的との相互作用を示さないものと推測された。また，著明な免疫抑制作用及び細胞毒性を示さず，高用量を反復投与しても内皮/上皮バリア機能への影響も認められなかった。シポニモドは T 細胞依存性の一次免疫応答を抑制するおそれはあるものの，二次免疫や免疫記憶には影響を及ぼさないことから，本薬の臨床使用において免疫監視機構は正常に維持，制御されると考えられる。

安全性薬理試験では，心拍数の減少及び房室伝導異常が認められた。中枢神経系及び呼吸系には，毒性学的に意義のある変化は認められなかった。

シポニモドを経口投与したときのバイオアベイラビリティの平均値はサルで 54%～83%，ラット 49%～52%であった。いずれの動物種でも Tmax は 2～8 時間であり，ラット及びサルのクリアランスは小さく，種差が認められた。ラットの薬物動態には性差が認められ，雌雄間の CYP の発現量の差が影響したと考えられる。雌ラットのクリアランスは雄に比べて小さく，雌ラットの T1/2 は 28 時間であったのに対し，雄ラットでは T1/2 は 5～6 時間であった。シポニモドの血漿蛋白結合率はいずれの動物種でも 99%超であり，濃度依存性は認められなかった。シポニモドの血中／血漿中濃度比は 0.74～1.21 であった。有色ラットの組織内放射能分布はアルビノラットと類似しており，メラニン含有組織である脈絡膜から放射能が比較的早く消失することから，メラニンへの親和性は強くないと考える。妊娠ウサギにおいて，シポニモドは胎盤を通過し胎児へ移行した。シポニモド及びその代謝物はラットの乳汁中に分泌され，乳汁中／血漿中未変化体濃度比は約 0.5 であった。マウス，ラット，及びサルにシポニモドを経口投与したとき，血漿中には主として未変化体が検出された。水酸化が主要な代謝経路であり，水酸化体はグルクロン酸抱合又は硫酸抱合を受けた。その他に，主要な代謝物としてコレステロールエステル体が検出された。^{14}C-シポニモドをマウス，ラット，及びサルに単回経口投与したとき，総放射能の 74.9%～98.2%が糞中に排泄され，1.44%～6.95%が尿中に排泄された。

反復投与毒性試験では，リンパ系組織，中枢神経系に関する一般状態の変化，並びに肺，腎臓，肝臓，甲状腺，涙腺，消化管，骨格筋及び皮膚に変化が認められた。リンパ系組織への影響は薬理作用から予想される変化であり，その他の臓器における変化には十分な安全域が確認された。シポニモドは遺伝毒性，光毒性及び依存性を示さず，ヒトでの発現が懸念される腫瘍性病変は認められなかった。生殖発生毒性試験において催奇形性を含む胚・胎児毒性が認められたことから，妊娠中は本薬の使用を避けることが推奨される。

以上，非臨床試験成績から，添付文書に規定した用法・用量に従った二次性進行型多発性硬化症患者の治療は支持されると考えられた。

9 参考文献

[Albert R, Hinterding K, Brinkmann V, et al. (2005)] Novel immunomodulator FTY720 is phosphorylated in rats and humans to form a single stereoisomer. Identification, chemical proof, and biological characterization of the biologically active species and its enantiomer. J Med Chem; 48(16):5373-7.

[Antel J, Antel S, Caramanos Z, et al (2012)] Primary progressive multiple sclerosis: part of the MS disease spectrum or separate disease entity? Acta Neuropathol; 123(5): 627-38.

[Bigaud M, Nuesslein-Hildesheim B, Tran TTT, et al. (2018)] Siponimod is a Functional Agonist for the S1P5 Receptor. Neurology; 90 Suppl 15: P3.404.

[Briard E, Rudolph B, Desrayaud S, et al. (2015)] MS565: A SPECT Tracer for Evaluating the Brain Penetration of BAF312 (Siponimod). ChemMedChem; 10(6):1008-18.

[Brinkmann V (2007)] Sphingosine 1-phosphate receptors in health and disease: Mechanistic insights from gene deletion studies and reverse pharmacology. Pharmacol Ther; 115(1):84-105.

[Brinkmann V (2009)] FTY720 (fingolimod) in Multiple Sclerosis: therapeutic effects in the immune and the central nervous system. Brit J Pharmacol; 158(5):1173-82.

[Brinkmann V, Billich A, Baumruker T, et al. (2010)] Fingolimod (FTY720): discovery and development of an oral drug to treat multiple sclerosis. Nat Rev Drug Discov; 9(11):883-97.

[Bryan AM and Del Poeta M (2018)] Sphingosine-1-phosphate receptors and innate immunity. Cell Microbiol; 20(5):e12836.

[Bryan L, Kordula T, Spiegel S, et al. (2008)] Regulation and functions of sphingosine kinases in the brain. Biochim Biophys Acta; 1781(9):459-66.

[Camm J, Hla T, Bakshi R, et al. (2014)] Cardiac and vascular effects of fingolimod: Mechanistic basis and clinical implications. Am Heart J; 168:632-644.

[Chun J and Hartung HP (2010)] Mechanism of action of oral fingolimod (FTY720) in multiple sclerosis. Clin Neuropharmacol; 33(2):91-101.

[Cohen SM, Storer RD, Criswell KA, et al. (2009)] Hemangiosarcoma in rodents: mode-of-action evaluation and human relevance. Toxicol Sci; 111(1):4-18.

[Criswell KA, Wojcinski Z, Pegg D, et al. (2012)] Key components of the mode of action for hemangiosarcoma induction in pregabalin-treated mice: evidence of increased bicarbonate, dysregulated erythropoiesis, macrophage activation, and increased angiogenic growth factors in mice but not in rats. Toxicol Sci;128(1):22-41.

[Cui QL, Fang J, Almazan G, et al. (2011)] Sphingosine 1-phosphate receptor agonists promote axonal ensheathment by human fetal oligodendrocyte progenitors. Multi Scler J; 17 Supp 10:S366, P823.

[Dusaban SS, Chun J, Rosen H, et al. (2017)] Sphingosine 1-phosphate receptor 3 and RhoA signaling mediate inflammatory gene expression in astrocytes. J Neuroinflammation; 14(1):111.

[Frischer JM, Bramow S, Dal-Bianco A, et al. (2009)] The relation between inflammation and neurodegeneration in multiple sclerosis brains. Brain; 132(Pt 5):1175-89.

[Frischer JM, Weigand SD, Guo Y, et al. (2015)] Clinical and pathological insights into the dynamic nature of the white matter multiple sclerosis plaque. Ann Neurol; 78(5):710-21.

[Fryer RM, Muthukumarana A, Harrison PC, et al. (2012)] The clinically-tested S1P receptor agonists, FTY720 and BAF312, demonstrate subtype-specific bradycardia ($S1P_1$) and hypertension ($S1P_3$) in rat. PLoS One; 7(12):e52985.

[Gentile A, Musella A, Bullitta S, et al. (2016)] Siponimod (BAF312) prevents synaptic neurodegeneration in experimental multiple sclerosis. J Neuroinflammation; 13(1):207.

[Gergely P, Nuesslein-Hildesheim B, Guerini D, et al. (2012)] The selective sphingosine 1-phosphate receptor modulator BAF312 redirects lymphocyte distribution and has species-specific effects on heart rate. Br J Pharmacol; 167(5):1035-47.

[Groves A, Kihara Y, Chun J (2013)] Fingolimod: direct CNS effects of sphingosine 1-phosphate (S1P) receptor modulation and implications in multiple sclerosis therapy. J Neurol Sci; 328(1-2):9-18.

[Hampton DW, Anderson J, Pryce G, et al. (2008)] An experimental model of secondary progressive multiple sclerosis that shows regional variation in gliosis, remyelination, axonal and neuronal loss. J Neuroimmunol; 201-202:200-11.

[Hard GC, Rodgers IS, Baetcke KP, et al. (1993)] Hazard evaluation of chemicals that cause accumulation of α2μ globulin, hyaline droplet nephropathy, and tubule neoplasia in the kidneys of male rats. Environ Health Perspect; 99: 313-49.

[Hemmer B, Kerschensteiner M, Korn T (2015)] Role of the innate and adaptive immune responses in the course of multiple sclerosis. Lancet Neurol; 14(4):406-19.

[Hou J, Chen Q, Wu X, et al. (2017)] S1PR3 Signaling Drives Bacterial Killing and Is Required for Survival in Bacterial Sepsis. Am J Respir Crit Care Med; 196(12):1559-70.

[Jackson SJ, Giovannoni G, Baker D (2011)] Fingolimod modulates microglial activation to augment markers of remyelination. J Neuroinflammation; 8:76.

[Jaillard C, Harrison S, Stankoff B, et al. (2005)] Edg8/S1P5: an oligodendroglial receptor with dual function on process retraction and cell survival. J Neurosci; 25(6):1459-69.

[Jameson CW and Yuan J (1992)] NTP technical report on the toxicity studies of para-chloro-alpha,alpha,alpha trifluorotoluene (CAS No.: 98-56-6) administered in corn oil and alpha-cyclodextrin to F344/N rats and B6C3F1 mice in 14-day comparative gavage studies. Toxic Rep Ser; 14: 1-C2.

[Kakiuchi-Kiyota S, Vetro JA, Suzuki S, et al. (2009)] Effects of the PPARgamma agonist troglitazone on endothelial cells in vivo and in vitro: differences between human and mouse. Toxicol Appl Pharmacol; 237(1):83-90.

[Kimura A, Ohmori T, Ohkawa R, et al. (2007)] Essential roles of sphingosine 1-phosphate/S1P1 receptor axis in the migration of neural stem cells toward a site of spinal cord injury. Stem Cells; 25(1):115-24.

[Mahad DH, Trapp BD, Lassmann H (2015)] Pathological mechanisms in progressive multiple sclerosis. Lancet Neurol; 14(2):183-93.

[Mandala S, Hajdu R, Bergstrom J, et al. (2002)] Alteration of lymphocyte trafficking by sphingosine-1-phosphate receptor agonists. Science; 296(5566):346-9.

[Mannioui A, Vauzanges Q, Fini JB, et al. (2018)] The Xenopus tadpole: An *in vivo* model to screen drugs favoring remyelination. Mult Scler; 24(11):1421-32.

[Matloubian M, Lo CG, Cinamon G, et al. (2004)] Lymphocyte egress from thymus and peripheral lymphoid organs is dependent on S1P receptor 1. Nature; 427(6972):355-60.

[Mizugishi K, Yamashita T, Olivera A, et al. (2005)] Essential role for sphingosine kinases in neural and vascular development. Mol Cell Biol; 25(24):11113-21.

[O'Sullivan C, Schubart A, Mir AK, et al. (2016)] The dual S1PR1/S1PR5 drug BAF312 (Siponimod) attenuates demyelination in organotypic slice cultures. J Neuroinflammation; 13:31.

[Olesch C, Ringel C, Brüne B, et al. (2017)] Beyond Immune Cell Migration: The Emerging Role of the Sphingosine-1-phosphate Receptor S1PR4 as a Modulator of Innate Immune Cell Activation. Mediators Inflamm; 2017:6059203.

[Papadopoulos D, Pham-Dinh D, Reynolds R (2006)] Axon loss is responsible for chronic neurological deficit following inflammatory demyelination in the rat. Exp Neurol; 197(2):373-85.

[Pegg D, Bleavins M, Herman J, et al. (2012)] Hemangiosarcoma in mice administered pregabalin: analysis of genotoxicity, tumor incidence, and tumor genetics. Toxicol Sci; 128(1):9-21.

[Rosen H and Goetzl EJ (2005)] Sphingosine 1-phosphate and its receptors: an autocrine and paracrine network. Nat Rev Immunol; 5(7):560-70.

[Sasseville VG and Mansfield KG (2010)] Overview of known non-human primate pathogens with potential to affect colonies used for toxicity testing. J Immunotoxicol. 2010 Apr-Jun;7(2):79-92.

[Shea BS, Brooks SF, Fontaine BA, et al. (2010)] Prolonged exposure to sphingosine 1- phosphate receptor-1 agonists exacerbates vascular leak, fibrosis and mortality after lung injury. Am J Respir Cell Mol Biol; 43:662-73.

[Son WC and Gopinath C (2004)] Early occurrence of spontaneous tumors in CD-1 mice and Sprague-Dawley rats. Toxicol. Pathol; 32(4):371-4.

[Wujek JR, Bjartmar C, Richer E, et al. (2002)] Axon loss in the spinal cord determines permanent neurological disability in an animal model of multiple sclerosis. J Neuropathol Exp Neurol; 61(1):23-32.

多発性硬化症・視神経脊髄炎診療ガイドライン (2017) 「多発性硬化症・視神経脊髄炎診療ガイドライン」作成委員会編. 多発性硬化症・視神経脊髄炎診療ガイドライン 2017. 東京; 医学書院 (internet) Available from: <https://www.neurology-jp.org/guidelinem/koukasyo_onm_2017.html> (Accessed 22 Jun 2018)

多発性硬化症診断基準 (2015) 厚生労働省「エビデンスに基づいた神経免疫疾患の早期診断基準・重症度分類・治療アルゴリズムの確立に関する研究」班（エビデンス班） (internet) Available from: <https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/0000062437.html> (Accessed 22 Jun 2018)