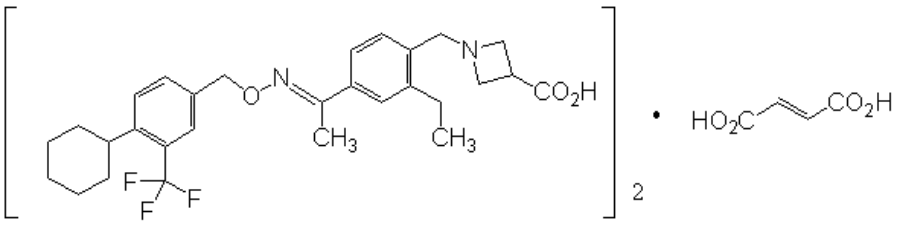
2.6.1 緒言

1 緒言

シポニモド　フマル酸（開発コード：BAF312，以下シポニモド，Figure 1-1）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，5 種類の S1P 受容体サブタイプのうち，$S1P_1$ 及び $S1P_5$ 受容体に選択的に結合する。シポニモドは $S1P_1$ 受容体に対する機能的アンタゴニスト作用により，二次リンパ組織からのリンパ球の移出を抑制し，血中リンパ球数を減少させる。移出が抑制されたリンパ球には自己反応性 T 細胞も含まれるため，自己反応性 T 細胞の中枢神経系（CNS）局所への浸潤と炎症が抑制される。また，シポニモドは CNS 移行性を有し，直接的な神経保護作用を示したことから，二次性進行型多発性硬化症に優位にみられる神経変性に対し，その進行を抑制すると期待される。以上，シポニモドは二次性進行型多発性硬化症において，再発予防並びに進行抑制効果を示すと考えられる。

Figure 1-1　　シポニモド　フマル酸の構造式



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）

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，多発性硬化症を対象とした第 I 相，第 II 相及び第 III 相臨床試験で使用された。フィルムコーティング錠は製剤処方最適化の上，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，さらにフィルムコーティング剤の色素を変更した 0.25 mg 及び 2 mg の 2 製剤を市販予定製剤として，以下の内容にて本承認申請を行う。

【申請品目】メーゼント錠 0.25 mg, 2 mg

【一般名】シポニモド　フマル酸

【効能又は効果】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

【用法及び用量】通常，成人にはシポニモドとして 0.25 mg 1 日 1 回経口投与より開始し，下表を参照して維持用量まで漸増する（漸増期）。維持用量は，2 mg 1 日 1 回経口投与する（維持期）。漸増開始からの 6 日間は朝に投与すること。

	漸増期					維持期
	1 日目	2 日目	3 日目	4 日目	5 日目	6 日目以降
1 回用量	0.25 mg	0.25 mg	0.5 mg	0.75 mg	1.25 mg	2 mg（維持用量）

2.6.2 薬理試験の概要文

目　次

目　次 2
表 一 覧 3
図 一 覧 3
略号一覧 5
1 まとめ 7
2 効力を裏付ける試験 9
2.1 S1P 受容体に対する作用 9
2.2 *In vitro* 細胞活性 10
2.2.1 $S1P_1$ 受容体の内在化誘導作用 10
2.2.2 $S1P_5$ 受容体への作用 12
2.3 *In vivo* 薬理活性 12
2.3.1 血中リンパ球数減少作用 12
2.3.2 実験的自己免疫性脳脊髄炎（EAE）における治療効果 14
2.3.3 マウス EAE モデルを用いた神経保護作用の検討（脳室内投与） 21
2.4 作用機序 27
3 副次的薬理試験 29
3.1 *In vitro* 薬理試験 29
3.1.1 混合リンパ球反応試験と骨髄細胞増殖抑制試験 29
3.1.2 受容体結合試験 30
3.2 *In vivo* 薬理試験 31
3.2.1 一次/二次免疫応答への影響 31
3.2.2 内皮/上皮バリア機能への影響 32
4 安全性薬理試験 32
4.1 心血管系に及ぼす影響 33
4.1.1 HEK293 細胞を用いた hERG 電流に及ぼす影響に関する試験 33
4.1.2 HEK293 細胞を用いた hERG 電流に及ぼす影響に関する試験 33
4.1.3 ウサギ摘出心臓を用いた活動電位に関する試験 33
4.1.4 ウサギ摘出心臓を用いた自動能に関する試験 33
4.1.5 ウサギ摘出大動脈及び冠動脈標本を用いた血管収縮に関する試験 34
4.1.6 モルモット心房筋細胞を用いた GIRK 電流に関する試験 34
4.1.7 モルモット心房筋細胞を用いた GIRK 電流に関する試験 34
4.1.8 ヒト心房筋細胞を用いた GIRK 電流に関する試験 34
4.1.9 ラットを用いた心血管系及び呼吸系に関する試験 35
4.1.10 麻酔モルモットを用いた心血管系に関する試験 35
4.1.11 モルモットを用いた心血管系に関する試験 36

4.1.12 モルモットを用いたシポニモド及びアトロピンの併用投与による心血管系に関する試験 36
4.1.13 モルモットを用いたシポニモド及びアトロピン反復投与による心血管系に関する試験 37
4.1.14 モルモットを用いたシポニモド及びアトロピン反復投与による心血管系に関する試験 38
4.1.15 ウサギを用いた心血管系に関する試験 39
4.1.16 カニクイザルを用いた心血管系に関する試験 40
4.1.17 カニクイザルを用いた心血管系に関する試験 40
4.2 中枢神経系 41
4.2.1 ラットを用いた中枢神経系に関する試験 41
4.3 呼吸系 41
4.3.1 ラットを用いた呼吸系に関する試験 41
4.3.2 ラットを用いた気道過敏性に関する試験 42
4.3.3 ラットを用いた肺及び気道過敏性に関する試験 42
5 薬力学的薬物相互作用試験 42
6 考察及び結論 42
7 参考文献 45

表一覧

Table 2-1 シポニモドの S1P 受容体サブタイプに対する EC50 値 9
Table 4-1 モルモットを用いたシポニモド及びアトロピンの併用投与による心血管系に関する試験の試験デザイン 37
Table 4-2 モルモットを用いたシポニモド及び反復投与したアトロピンによる心血管系に関する試験の試験デザイン 38
Table 4-3 モルモットを用いたシポニモド及びアトロピン反復投与による心血管系に関する試験の試験デザイン 39
Table 4-4 ウサギを用いた心血管系に関する試験の試験デザイン 40

図一覧

Figure 2-1 シポニモド及びフィンゴリモドリン酸化体による $S1P_1$ 受容体の内在化誘導作用 11
Figure 2-2 シポニモドによる血中リンパ球数減少作用の経時変化（ラット） 13
Figure 2-3 シポニモドによる血中リンパ球数減少作用の経時変化（カニクイザル） 14
Figure 2-4 ラット EAE 慢性期の神経症状に対するシポニモドの効果 16
Figure 2-5 ラット EAE 慢性期の脱髄に対するシポニモドの作用 17

Figure 2-6 ラット EAE 慢性期の脊髄ミクログリア浸潤に対するシポニモドの作用 18
Figure 2-7 マウス EAE 慢性期の神経症状に対するシポニモドの効果 20
Figure 2-8 マウス EAE 慢性期の脊髄病変に対するシポニモドの作用 20
Figure 2-9 マウス EAE 慢性期の軸索変性に対するシポニモドの作用 21
Figure 2-10 マウス EAE へのシポニモド脳室内投与における血中リンパ球数に対する影響及び治療効果 22
Figure 2-11 マウス EAE 脳を用いた抑制性シナプス伝導に対するシポニモド（脳室内投与）の作用 23
Figure 2-12 マウス EAE 線条体での GABA 作動性ニューロンに対するシポニモド（脳室内投与）の作用 24
Figure 2-13 マウス EAE 線条体でのグリオーシスに対するシポニモド（脳室内投与）の作用 26

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）
5-HT	5-hydroxytryptoamine (serotonin)	5-ヒドロキシトリプトアミン（セロトニン）
A3	adenosine 3	アデノシン A3
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
bpm	beats per minute	-
CD	cluster of differentiation	分化抗原群
CFA	complete Freund's adjuvant	完全フロイントアジュバント
CHO	chinese hamster ovary	チャイニーズハムスター卵巣
Cmax	maximal drug concentration	最高薬物濃度
CMC	sodium carboxymethyl cellulose	カルボキシメチルセルロースナトリウム
CNS	central nervous system	中枢神経系
D1	dopamine D1	ドパミン D1
D3	dopamine D3	ドパミン D3
DA	dark agouti	ダークアグーチ
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole	-
DNP	dinitrophenyl	ジニトロフェニル
dpi	the day post-immunization	免疫後日数
EAE	experimental autoimmune encephalomyelitis	実験的自己免疫性脳脊髄炎
EC50	half maximum (50%) effective concentration	50%有効濃度
ED50	half maximal (50%) effective dose	50%有効量
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay	酵素結合免疫測定（吸着）法
Emax	maximum effect	最大効果
GABA	gamma-aminobutyric acid	γ-アミノ酪酸
GFAP	glial fibrillary acidic protein	グリア線維酸性タンパク質
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
GPCR	G protein coupled receptor	G 蛋白質共役型受容体
GTP	guanosine triphosphate	グアノシン三リン酸
GTPγ[^{35}S]	guanosine ^{35}S-[gamma-thio] triphosphate	グアノシン -γ-チオ（^{35}S）三リン酸
h	hour(s)	時間
H2	histamine H2	ヒスタミン H2
H&E	hematoxylin & eosin	ヘマトキシリン&エオジン
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
hS1P	human Sphingosine 1 phosphate	ヒトスフィンゴシン 1 リン酸
Iba	ionized calcium-binding adaptor molecule	ミクログリア特異的カルシウム結合タンパク質
IC50	half maximal (50%) inhibitory concentration	50%阻害濃度

略号	省略していない表現（英）	省略していない表現（日）
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
icv	intra cerebroventricular	脳室内
Ig	immunoglobulin	免疫グロブリン
IL	interleukin	インターロイキン
Ki	inhibition constant	阻害定数
KLH	keyhole limpet hemocyanin	スカシガイヘモシアニン
LPC	lysophosphatidylcholine	リゾフォスファチジルコリン
LPS	lipopolysaccharide	リポポリサッカライド
MOG	myelin oligodendrocyte glycoprotein	ミエリンオリゴデンドロサイト糖タンパク
mRNA	messenger ribonucleic acid	メッセンジャーリボ核酸
MS	multiple sclerosis	多発性硬化症
MBP	myelin basic protein	ミエリン塩基性タンパク
NET	norepinephrine transporter	ノルエピネフリントランスポーター
pAKT	phosphorylated AKT	リン酸化 AKT
PCR	polymerase chain reaction	ポリメラーゼ連鎖反応
PD	pharmacodynamics	薬力学
pERK	phosphorylated extracellular signal-regulated kinase	リン酸化細胞外シグナル調節キナーゼ
PK	pharmacokinetics	薬物動態学
p.o.	per os	経口
RANTES	regulated on activation, normal T cell expressed and secreted	-
S1P	sphingosine 1 phosphate	スフィンゴシン 1 リン酸
SPMS	secondary progressive multiple sclelosis	二次性進行型多発性硬化症
sEPSC	spontaneously excitatory post-synaptic currents	自発性興奮性シナプス電流
sIPSC	spontaneously inhibitory post-synaptic currents	自発性抑制性シナプス電流
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
TNF	tumor necrosis factor	腫瘍壊死因子
TNP	trinitrophenol	トリニトロフェノール
VEGF	vascular endothelial growth factor	血管内皮細胞増殖因子

1 まとめ

［記載箇所：4.2.1.1-1，4.2.1.1-4~9，4.2.1.2-1~14］

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（sphingosine 1 phosphate，S1P）受容体調節薬である。S1P 受容体は G 蛋白共役型受容体（GPCR）であり，5 種類のサブタイプ（$S1P_1$，$S1P_2$，$S1P_3$，$S1P_4$，及び $S1P_5$ 受容体）が知られている。そのうち，$S1P_1$ 受容体はリンパ球に高発現し，二次リンパ組織からリンパ液中へのリンパ球の移出に関わっている。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，他のサブタイプと比較して $S1P_1$ 及び $S1P_5$ 受容体に 750 倍以上のアゴニスト活性を示す。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。フィンゴリモドはプロドラッグであり，生体内でリン酸化を受け生成した活性化代謝物（フィンゴリモドリン酸化体）が薬理活性を示す。シポニモドはリンパ球上の $S1P_1$ 受容体に対しフィンゴリモドリン酸化体と同様の薬理作用を示し，多発性硬化症（MS）に治療効果を示すと考えられる。すなわち，シポニモドは，リンパ球上の $S1P_1$ 受容体に結合し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て受容体を機能的に不活性化させる。この $S1P_1$ 受容体に対する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，リンパ球の体内循環が制御されて血中リンパ球数が減少する。その結果，中枢神経系（CNS）への自己反応性リンパ球の浸潤並びに炎症が抑制され，MS に対し治療効果を示す。一方，$S1P_5$ 受容体に対しては，シポニモドは内在化を誘導せずに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していると考えられている。

なお，シポニモドは社内報告書等では BAF312，NVP-BAF312，シポニモド，又は siponimod と記載されており，本項の一部の図表でもこれらの名称で記載している。

シポニモドの効力を裏付ける試験として，S1P 受容体サブタイプに対する選択性をチャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞で確認した他，$S1P_1$ 受容体又は $S1P_5$ 受容体内在化誘導作用について *in vitro* で検討した。その結果，$S1P_1$ 及び $S1P_5$ 受容体に対するシポニモドの選択性が示され，$S1P_1$ 受容体に対する内在化誘導作用が確認された一方で，$S1P_5$ 受容体に対しては内在化誘導作用を示さなかった。*In vivo* 試験として，ラットの血中リンパ球数減少作用，並びにマウス又はラットを用いた実験的自己免疫性脳脊髄炎（EAE）に対する治療効果を経口投与又は脳室内（icv）投与で検討した。その結果，シポニモドは，慢性型 EAE モデルへの経口投与により優れた治療効果を発揮した。また，icv 投与では，血中リンパ球数に対して有意な影響を及ぼさない用量で，神経症状の改善が認められた他，EAE でみられるシナプス電流の異常が改善され，アストロサイトやミクログリアのグリオーシスも抑制されたことから，シポニモドは CNS に直接的に作用し神経保護作用を示すと考えられた。

作用機序の検討として，アストロサイトの機能への影響について培養細胞を用いて検討した他，ラット終脳細胞スフェロイド（凝集塊）やアフリカツメガエルのオタマジャクシを用いて，再ミエリン化への影響について検討した。その結果，シポニモドは，$S1P_1$ 受容体シグナルを介してアストロサイトからの IL-6 の分泌を抑制し，また $S1P_5$ 受容体を介して終脳細胞スフェロイド及びオタマジャクシにおいて再ミエリン化を促進していることが示唆された。したがって，シポニモドはフィンゴリモドと同様に MS の再発・進行を抑制するのみならず，二次性進行型 MS（SPMS）の主要な病変である神経変性の進行を抑制する可能性も考えられた。

副次的薬理試験として，*in vitro* で混合リンパ球反応，骨髄細胞増殖抑制試験，各種受容体への結合試験を行ったほか，*in vivo* で一次/二次免疫応答への影響，内皮/上皮バリア機能への影響について検討した。その結果，シポニモドは臨床維持用量において，明らかな免疫抑制作用及びオフターゲット作用を示さなかった。また，ラット又はサルにおいて 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ことから，シポニモドの臨床使用時においても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/上皮バリア機能にも影響はみられなかった。

安全性薬理試験では，hERG（human ether-a-go-go related gene）電流阻害作用はみられず，活動電位持続時間（ウサギ摘出心臓）及び QT 間隔（モルモット及びカニクイザル）のいずれにも変化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，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。ヒト及びモルモットの心房筋細胞を用いた試験において GIRK チャネル（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）電流の活性化が認められたことから，心拍数減少は心房筋細胞の GIRK 活性化に関連した変化と考えられた。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，受容体の脱感作によるものと考えられた。モルモットでは，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。また，モルモットでは単回投与により血圧の低下が認められた。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。ウサギ大動脈及び冠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。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。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。

以上のことから，シポニモドは $S1P_1$ 受容体に対する機能的アンタゴニスト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，自己反応性リンパ球の CNS への浸潤及び炎症を阻止することで MS に対し治療効果を示すことに加え，CNS に直接的に作用し神経保護効果を示すことで，SPMS 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。

一連の非臨床試験成績から，二次性進行型多発性硬化症患者の治療において添付文書案に規定した用法・用量でシポニモドを使用することは妥当であると判断した。

2 効力を裏付ける試験

2.1 S1P 受容体に対する作用

［記載箇所：4.2.1.1-1~3］

S1P 受容体は GPCR であることから，標識 GTP を用いてアゴニスト依存性の GTP 結合を測定できる。

シポニモド及びヒト代謝物である M3，M5 及び M17[2.7.2-2.1.3 項]のヒト S1P 受容体サブタイプに対するアゴニスト作用について，GTPγ[^{35}S]を用いた結合試験で評価した。その結果，シポニモドは，$S1P_1$ 及び $S1P_5$ 受容体に対し 0.39 及び 0.98 nM の EC50 値を示した。一方，$S1P_2$，$S1P_3$ 及び $S1P_4$ 受容体に対してはいずれも 750 nM 以上の値を示した（Table 2-1，[Table 2.6.3.1 RD-2006-00729]）。

Table 2-1 シポニモドの S1P 受容体サブタイプに対する EC50 値

	EC50（nM）	Emax（%）#)
hS1P1	0.39 ± 0.07	91± 6
hS1P2	>10000	3 ± 3
hS1P3	>1000	61 ± 11
hS1P4	750 ± 487	90 ± 9
hS1P5	0.98 ± 0.43	112 ± 20

Source: [4.2.1.1-1-RD-2006-00729-Table 3-1]

シポニモドについて CHO 細胞に発現させた 5 種類のヒト S1P 受容体サブタイプに対する EC50 値を GTPγ[^{35}S]結合試験で評価した。

平均値±標準偏差，n=7（hS1P2 群のみ n=3）

#) 受容体刺激時における最大反応（Emax）の対照化合物との比較。対照化合物として，S1P［hS1P4 群のみ NVP-AFD298（フィンゴリモドの構造類似化合物）］を用いた。

なお，M3 及び M5 は $S1P_1$ 受容体に対して各々，>10000 nM 及び 470 ± 91 nM の EC50 値を示し[Table 2.6.3.1-RD-2012-00145]，M17 は，$S1P_1$ 受容体に対しては 341 ± 86 nM，$S1P_5$ 受容体に対しては 159 ± 9 nM の EC50 値を示した[Table 2.6.3.1-RD-2015-00301]。

以上のことから，シポニモドはヒト S1P 受容体サブタイプのうち，$S1P_1$ 及び $S1P_5$ 受容体に対する選択的アゴニストであり，$S1P_2$，$S1P_3$，及び $S1P_4$ 受容体と比較して 750 倍を上回るアゴニスト活性を有することが明らかになった。一方で，シポニモドのヒト代謝物である M3，M5 及び M17 は $S1P_1$ 受容体に対して顕著な作用を示さず，M17 については $S1P_5$ 受容体に対しても明らかな作用を示さなかった。

2.2 *In vitro* 細胞活性

2.2.1 $S1P_1$ 受容体の内在化誘導作用

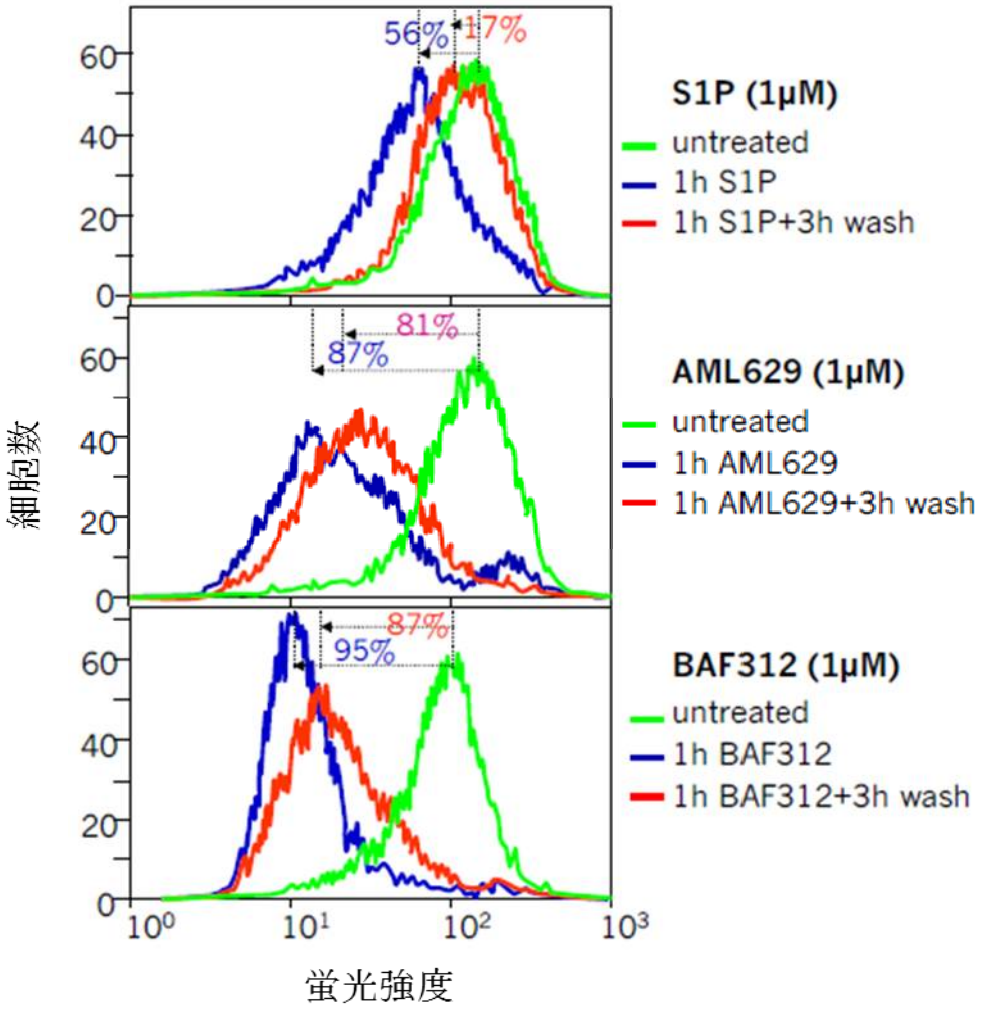
［記載箇所：4.2.1.1-4］

シポニモドの $S1P_1$ 受容体内在化誘導作用についてエピトープタグ法で検討した。

【方法】N 末端に Myc タグを付加したヒト $S1P_1$ 受容体発現ベクターを CHO 細胞に導入し，細胞膜上に $S1P_1$ 受容体を発現させた。S1P，フィンゴリモドリン酸化体（AML629，フィンゴリモド活性化代謝物），又はシポニモドを 1 時間反応させた後，細胞表面の受容体数をフローサイトメトリー法で測定した。また，作用の持続時間をみるため各リガンド除去後 3 時間以降の受容体数も測定した。

【結果】シポニモド（1 μM）は，$S1P_1$ 受容体発現細胞との 1 時間の反応により，細胞表面に発現する受容体数を約 90%減少させ，受容体の内在化誘導が確認された（Figure 2-1，[Table 2.6.3.1-RD-2006-00792]，Gergely et al. 2012）。シポニモド除去後 3 時間の時点においても $S1P_1$ 受容体の再発現はほとんど認められず，作用の持続が示唆された。なお，Figure 2-1には示さないが，シポニモド除去後 12～14 時間の時点においても受容体内在化は維持されていた。AML629 でも同様の作用が認められたことから，シポニモドは AML629 と同様，$S1P_1$ 受容体に対する機能的アンタゴニストであることが確認された。

Figure 2-1　　シポニモド及びフィンゴリモドリン酸化体による $S1P_1$ 受容体の内在化誘導作用



Source: [4.2.1.1-4-RD-2006-00792-Figure 3-4], Gergely et al. 2012

サブコンフルエントに達した 10^6 個の CHO 細胞を 37°C で 1 時間，無処置で培養（緑線：untreated），若しくは，S1P，フィンゴリモドリン酸化体（AML629）又はシポニモド存在下で培養した（青線：1h S1P，1h AML629 又は 1h BAF312，濃度はいずれも 1 μM）。さらに，同条件で S1P，AML629 又はシポニモドを 1 時間反応させた後，洗浄によりリガンドを除去し，その後新しい培養液を入れ替え 3 時間培養した（赤線：1h S1P+3h wash，1h AML629+3h wash 又は 1h BAF312+3h wash）。縦軸は細胞数を示し，横軸は蛍光強度を示す。蛍光が弱いほど，$S1P_1$ 受容体が多く内在化することを示す。

測定は 3 回以上行った。図は代表例を示す。

グラフ中の値（%）は，無処置群（untreated）に対する各リガンド反応後の $S1P_1$ 受容体内在化の百分率を示す（平均値，n≥3）。

2.2.2 $S1P_5$ 受容体への作用

シポニモドの $S1P_5$ 受容体内在化誘導作用について $S1P_1$ 受容体と同様の評価方法にて検討した（Bigaud et al. 2018）。その結果，シポニモド及びフィンゴリモドリン酸化体は，いずれも 1 μM までの濃度で $S1P_5$ 受容体内在化誘導作用を示さなかった。

この結果から，シポニモドは $S1P_1$ 受容体に対する作用とは異なり，$S1P_5$ 受容体に作用してもその機能を抑制しないと考えられた。

2.3 *In vivo* 薬理活性

2.3.1 血中リンパ球数減少作用

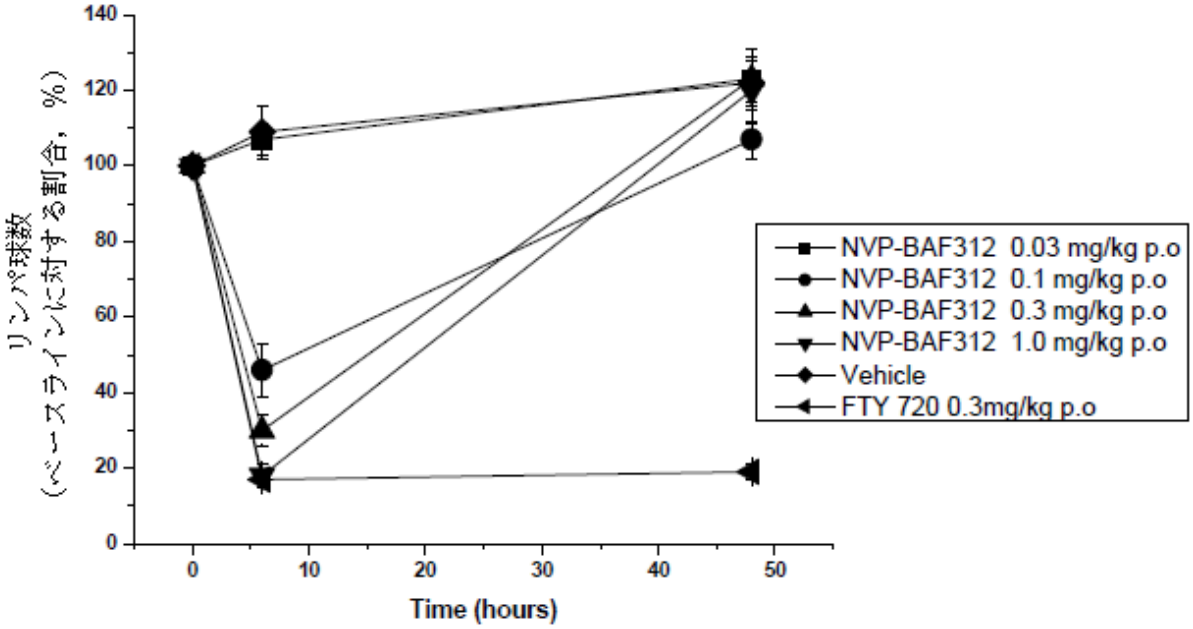
［記載箇所：4.2.1.1-5~8，4.2.2.2-5］

シポニモドとフィンゴリモドの血中リンパ球数減少作用をラットで比較し，シポニモドの作用をサルで確認した。

【方法】シポニモド（0.03，0.1，0.3，及び 1.0 mg/kg），フィンゴリモド（0.01，0.03，0.1，0.3，及び 1.0 mg/kg）又は溶媒をラットに単回経口投与し，6 及び 48 時間後の血中リンパ球数を自動血球装置（Technicon H1-E System）で測定した。サルを用いたクロスオーバーPK/PD 試験では，シポニモド（0.03，0.1，0.3，1.0 及び 3.0 mg/kg）をカニクイザルに単回経口投与し，投与 0.5，1，2，4，7，24，48 及び 72 時間後，以降，7 日後若しくは 10 日後まで採血し，血中リンパ球数を測定した。

【結果】**ラット**：シポニモドは，投与 6 時間後において用量依存的な血中リンパ球数減少作用を示し（ED50 値：0.14 ± 0.03 mg/kg），その作用は投与 48 時間後に消失した。フィンゴリモドにおいても同様の作用（投与 6 時間後の ED50 値：0.097 ± 0.01 mg/kg）が認められ，その作用は投与 48 時間後も持続した（Figure 2-2，[Table 2.6.3.1-RD-2004-03092]）。

Figure 2-2　　シポニモドによる血中リンパ球数減少作用の経時変化（ラット）

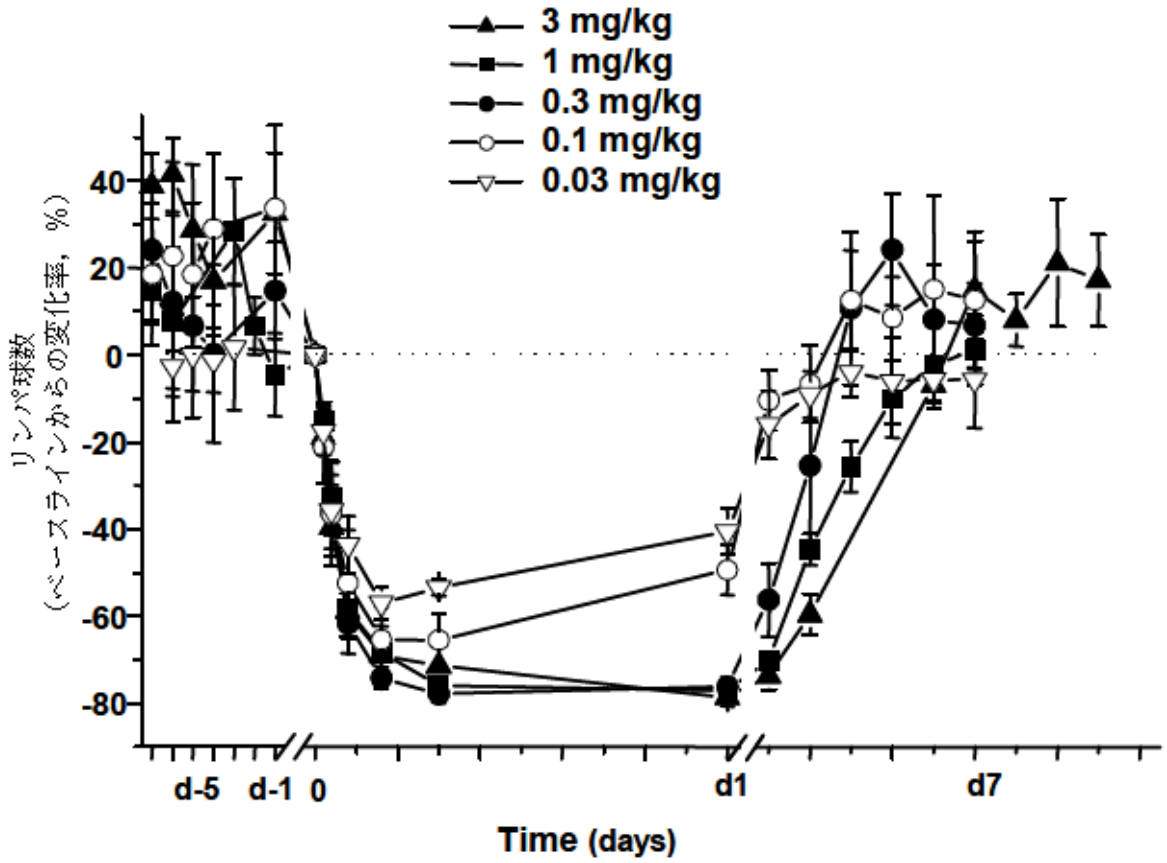


Source: [4.2.1.1-5-RD-2004-03092-Figure 3-2]

シポニモド（NVP-BAF312，0.03，0.1，0.3 及び 1.0 mg/kg），溶媒対照（vehicle），又は，フィンゴリモド（FTY 720，0.3 mg/kg）を雄性 Lewis ラットに単回経口投与し末梢血中のリンパ球数を測定した。グラフは各測定時点におけるベースラインに対する変化の割合（%）の推移を示す。平均値±標準誤差，各群につき n=4。

カニクイザル：シポニモドは，概ね用量に比例したリンパ球数減少作用を示し，作用持続時間は高用量で長かった。最大効果（血中リンパ球数が約 80%減少）は 0.3 mg/kg 以上で認められ，0.3 mg/kg 群における Cmax は 99±13 ng/mL であった。血中リンパ球数は，0.3 mg/kg 群で投与後 96 時間以内，その他の投与群においても投与後 72～168 時間以内にベースライン値まで回復した（Figure 2-3，[Table 2.6.5.1-RD-2005-00583]）。

Figure 2-3　　シポニモドによる血中リンパ球数減少作用の経時変化（カニクイザル）



Source: [4.2.2.2-5-RD-2005-00583-Figure 3-9]

シポニモド（0.03，0.1，0.3，1.0 及び 3.0 mg/kg）をカニクイザルにクロスオーバー法にて単回経口投与し，投与 0.5，1，2，4，7，24（d1），48 及び 72 時間後，以降，7 日後（d7）若しくは 10 日後まで末梢血中のリンパ球数を測定した。グラフは各測定時点におけるベースライン（投与直前値）からの変化率（%）の推移を示す。平均値±標準誤差，各群につき n=4。

以上より，ラット及びカニクイザルにおいてシポニモドにより概ね投与量に依存して血中リンパ球数が減少し，その作用には回復性が認められた。ラットの検討において，フィンゴリモドに比べシポニモドで効果持続時間が短かったのは，単回投与時の半減期が短いことに起因すると考えられ，ラット EAE モデルを用いた反復投与では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）。

2.3.2　　実験的自己免疫性脳脊髄炎（EAE）における治療効果

MS の動物モデルとして知られている EAE は，髄鞘由来のタンパク質抗原等をアジュバントとともにラット/マウスに免疫することによって誘発される自己免疫疾患モデルであり，MS の病態研究，治療薬開発において使用されている。EAE モデルでは抗原で免疫した 10 日前後から尾の

麻痺等の神経症状が発症し，その後不安定歩行，下肢麻痺，上肢麻痺へと進行する上行性麻痺を呈し，最終的には死亡する。このことから，神経症状の重症度の判定には，麻痺の程度に応じてスコア化した EAE スコアが一般的に用いられている。本モデルは，抗原や用いる動物の違いにより，一過性の神経症状を示す急性型，神経症状の再発を繰り返す再発寛解型，神経症状の回復がみられず症状が長期間持続する慢性型といった異なる病態を示す。本モデルでは脊髄を中心とした CNS に病変が生じ，神経症状が発症，進行する急性期では白質内への炎症性細胞浸潤並びに脱髄が認められ（Miller et al. 2010，Bjelobaba et al. 2018），神経症状が持続する慢性期においては軸索脱落，ミクログリオーシスといった 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）。

シポニモドの検討では慢性型 EAE モデルを用い，EAE スコアが最大値を示した直後並びに神経症状が進行している急性期に経口投与を開始して治療効果を評価した。さらに，icv 投与を行って，CNS への直接的な作用を評価した。

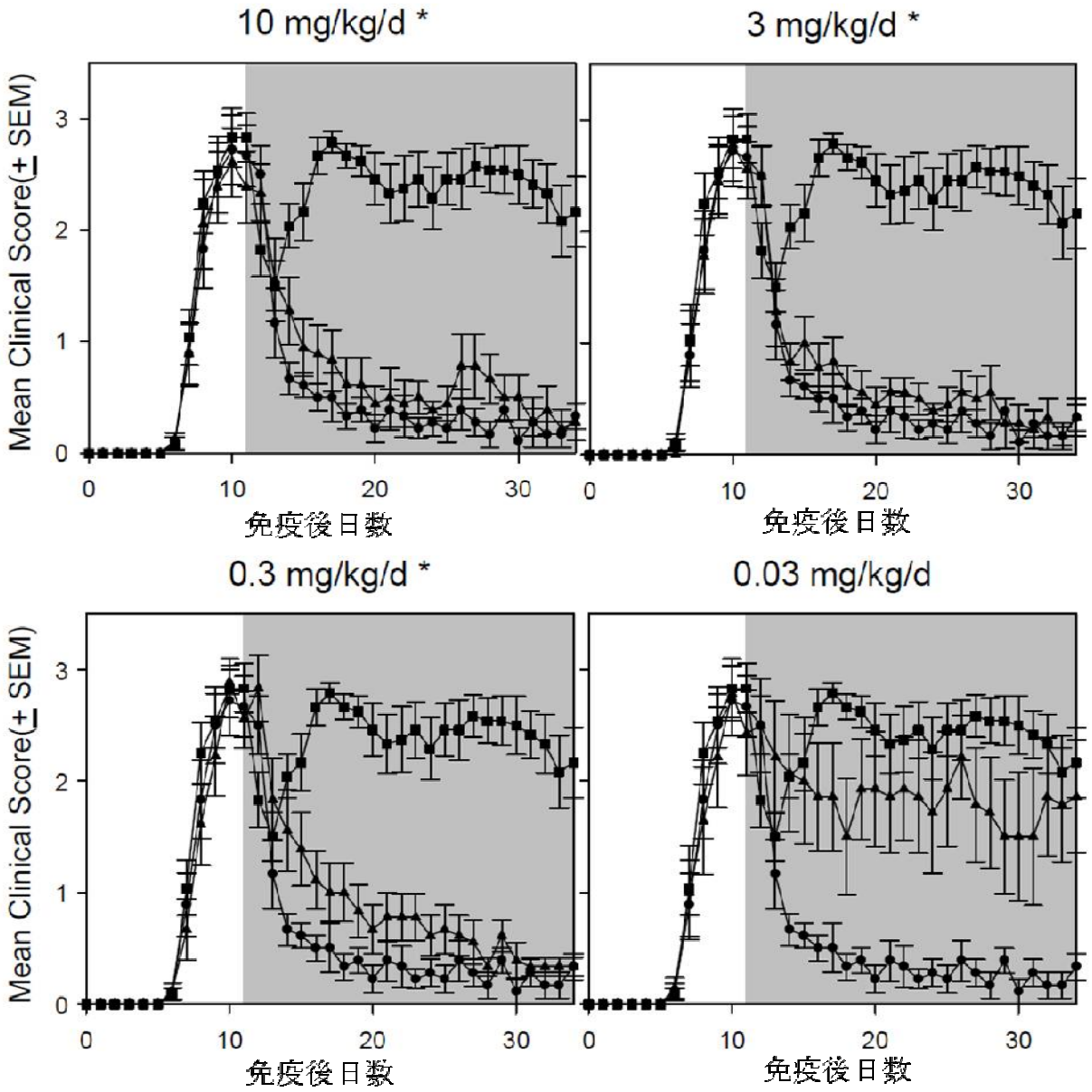
2.3.2.1 ラット EAE に対する急性期投与での効果（経口）

［記載箇所：4.2.1.1-6~8］

【方法】雌性 Dark Agouti（DA）ラットの尾根部皮下に，同系ラットの脳脊髄抽出物とウシ脊髄を完全フロイントアジュバント（CFA）とともに免疫することで慢性型 EAE を惹起した。EAE に伴う神経症状の重症度を，6 段階の EAE スコア（0=異状なし，1=尾部下垂，2=後肢の衰弱若しくはアタキシア，3=後肢の麻痺，4=後肢及び前肢の麻痺を伴う瀕死の状態，5=死亡）で判定した。シポニモド（0.03，0.3，3 及び 10 mg/kg/day），フィンゴリモド（0.3 mg/kg/day）又は溶媒を免疫 11 日後から 24 日間，1 日 1 回経口投与した。試験終了時（免疫 35 日後）にマウスを安楽死させ，脊髄を採取し，ルクソールファストブルー染色，抗 ED1 抗体による免疫組織化学を実施し，脱髄の程度とミクログリアの浸潤/活性化を確認した[Table 2.6.3.1-RD2006-00717]。

【結果】溶媒対照群における EAE スコアは免疫 11 日後までに最大に達し，一過性に低下した後は持続的に高値を示した。シポニモド投与群では，0.3 mg/kg/day 以上で投与開始後に EAE スコアが著明に低下し，その後持続的に低値を示した（Figure 2-4）。また，脊髄の病理組織学的評価において，溶媒対照群にみられた脱髄並びにミクログリアの浸潤及び活性化が，シポニモド投与によって明らかに軽減した（Figure 2-5，Figure 2-6）。

Figure 2-4　　ラット EAE 慢性期の神経症状に対するシポニモドの効果



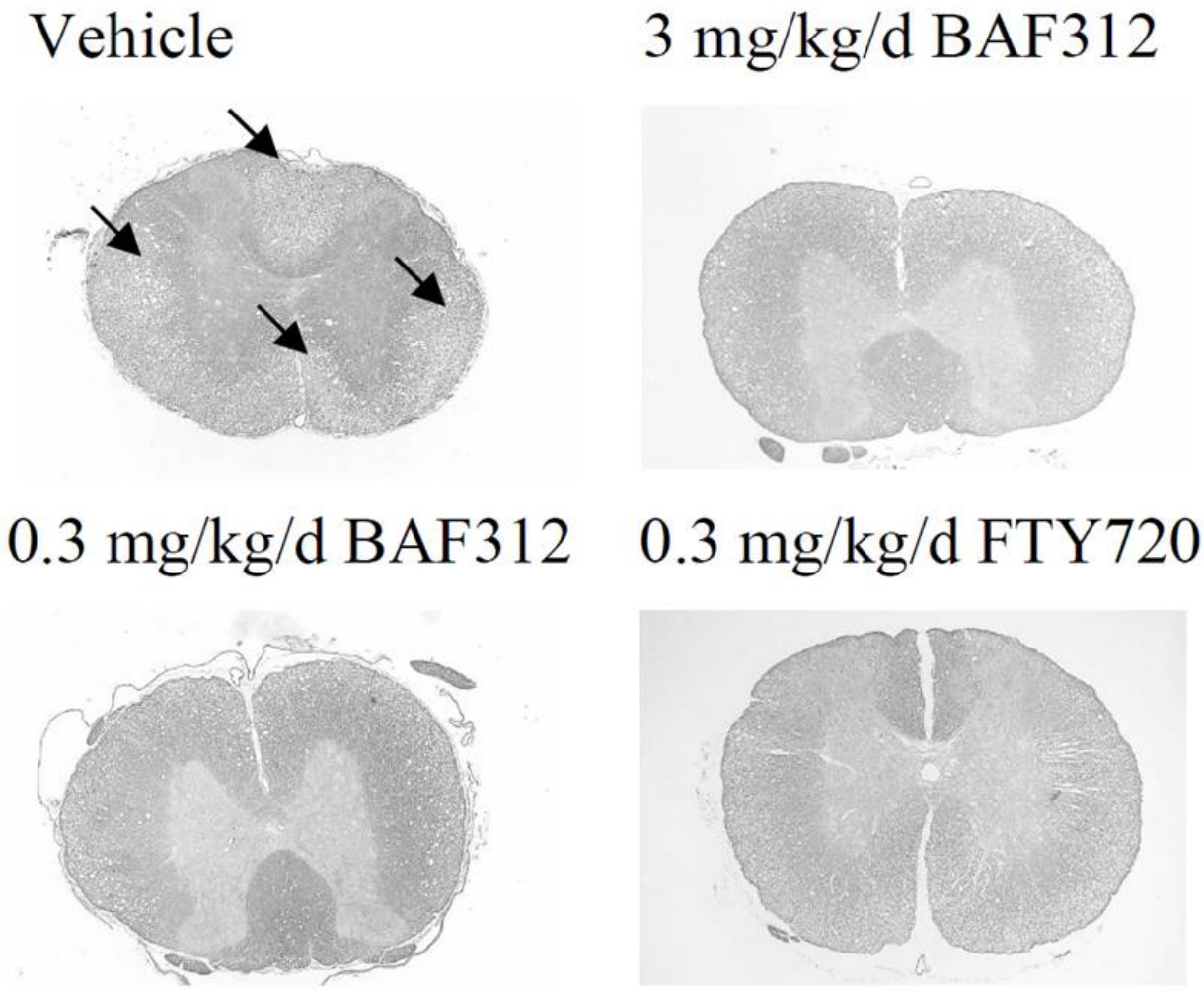
Source: [4.2.1.1-7- RD-2006-00717-Figure 3-1]

DA ラットの尾根部皮下に，同系ラットの脳脊髄抽出物とウシ脊髄を完全フロイントアジュバント（CFA）とともに免疫することで慢性 EAE を惹起した。EAE に伴う神経症状の重症度を，EAE スコアで判定した。シポニモド（0.03，0.3，3 及び 10 mg/kg/day），フィンゴリモド（0.3 mg/kg/day）又は溶媒を免疫 11 日後から 24 日間，1 日 1 回経口投与した。

▲：シポニモド群，●：フィンゴリモド群，■：溶媒対照群。n=7~12

*：p<0.05，シポニモド投与群と溶媒対照との免疫 25 日後におけるスコア比較（Dunn の多重比較）。

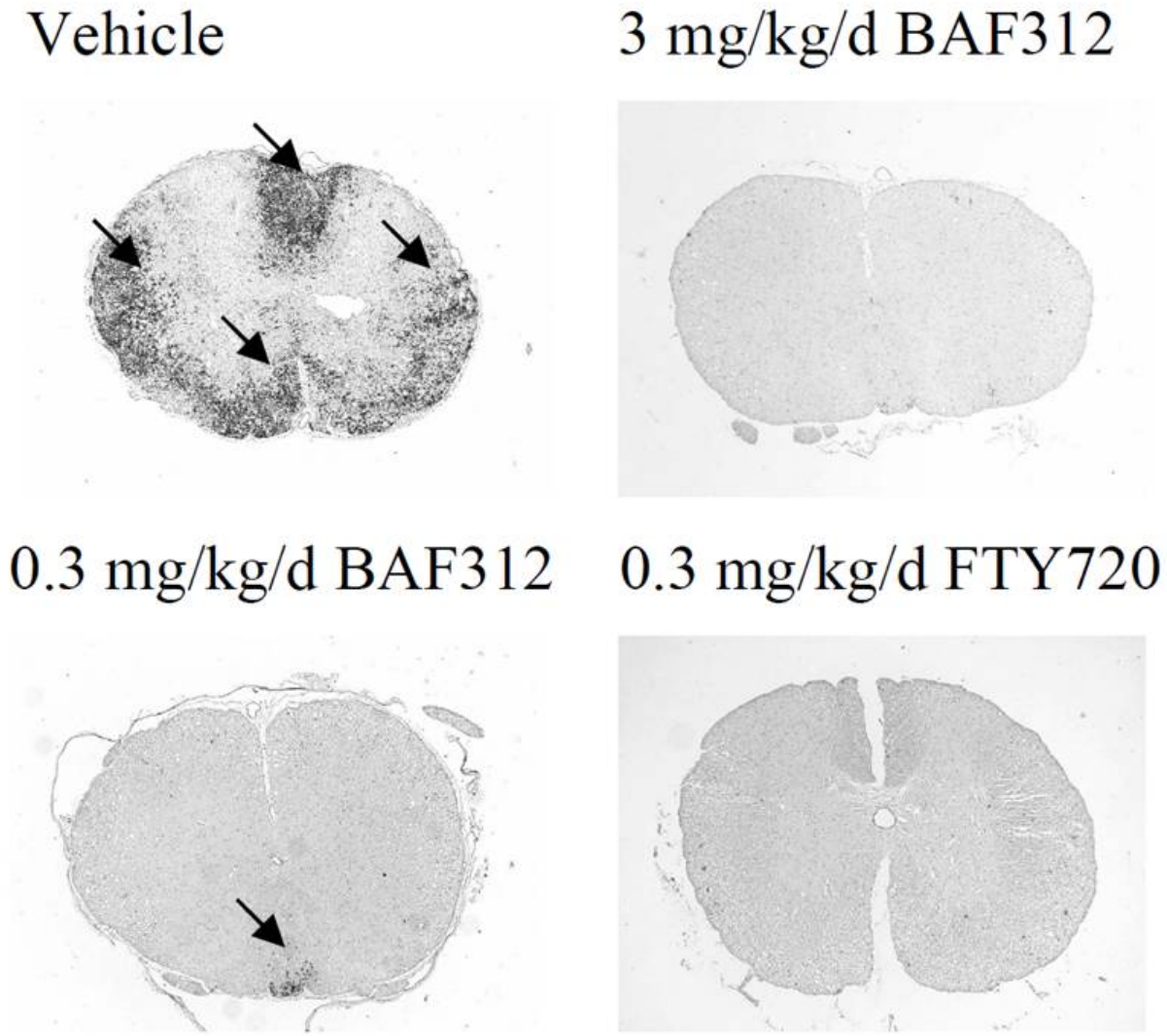
Figure 2-5　　ラット EAE 慢性期の脱髄に対するシポニモドの作用



Source: [4.2.1.1-7- RD-2006-00717-Figure 3-4]

慢性 EAE を呈した DA ラット胸髄のルクソールファストブルー染色像（有髄神経線維を染色）。溶媒を投与した胸髄では白質において脱髄病変を示す染色の薄い領域が認められた（Vehicle，矢印）。シポニモド（3 mg/kg/d BAF312，0.3 mg/kg/d BAF312）及びフィンゴリモド（0.3 mg/kg/d FTY720）を投与した胸髄では脱髄は認めらない，若しくはほとんど認められなかった。

Figure 2-6　　ラット EAE 慢性期の脊髄ミクログリア浸潤に対するシポニモドの作用



Source: [4.2.1.1-7- RD-2006-00717-Figure 3-5]

慢性 EAE を呈した DA ラット胸髄の免疫組織化学。抗 ED1 抗体を用いて活性化ミクログリアを染色した。矢印は活性化ミクログリアの集簇を示す。

シポニモド（3 mg/kg/d BAF312，0.3 mg/kg/d BAF312）及びフィンゴリモド（0.3 mg/kg/d FTY720）投与群では対照投与群（vehicle）に比べミクログリア浸潤及び活性化の著明な抑制が認められた。

以上のように，シポニモドはラット慢性 EAE において，既存の神経症状を回復させたほか，神経症状の再発を抑制し，病理組織学的にも脱髄やミクログリアの浸潤等の神経損傷所見を軽減した。

なお，ラット慢性 EAE モデルを用いた他の検討においても，シポニモドの経口投与（0.3~3.0 mg/kg/day）により同様の結果が得られている[Table 2.6.3.1-RD-2005-00885]，[Table 2.6.3.1-RD-2006-00118]。

2.3.2.2　マウス EAE に対する急性期投与での効果（経口）

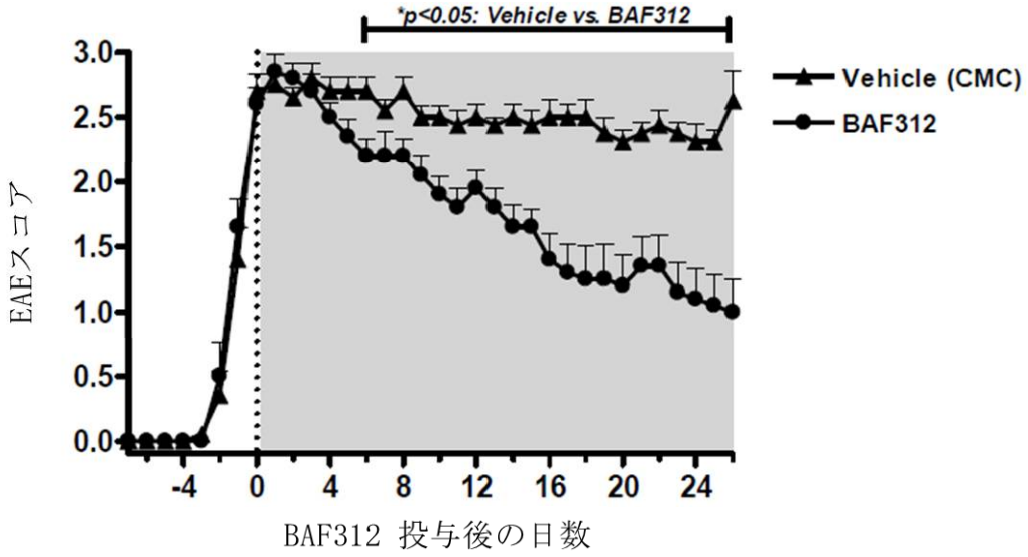
［記載箇所：4.2.1.1-9］

【方法】雌性 C57BL/6 マウス（7~8 週齢）の後背部に同系マウス由来のミエリンオリゴデンドロサイト糖蛋白（MOG）を CFA とともに免疫し，慢性型 EAE を惹起した。神経症状の重症度は 10 段階の EAE スコア（0=異常なし，0.5=尾の部分下垂，1=尾の完全下垂，1.5=後肢の衰弱，2=片側後肢の部分麻痺，2.5=両後肢の部分麻痺，3=両後肢の完全麻痺，3.5=前肢の衰弱及び両後肢の完全麻痺，4=四肢麻痺若しくは瀕死状態，5=死亡）で判定した。シポニモド（3 mg/kg/day）又は溶媒を EAE 急性期（EAE スコア 2.5 到達時）から試験終了（投与開始後 25~27 日目）まで 1 日 1 回経口投与した [Table 2.6.3.1-RD-2009-01092]。試験終了時にマウスを安楽死させ，脊髄を採取し，ヘマトキシリン&エオジン（H&E）染色，抗ミクログリア特異的カルシウム結合タンパク質（Iba）ウサギポリクローナル抗体による免疫組織化学，並びにソロクローム染色を実施した。各病変部位における炎症性細胞浸潤，ミクログリアの浸潤と活性化，並びに脱髄性変化の程度を盲検下で評価し，スコア化（0=変化なし，1=軽度，2=中等度，3=重度，4=最重症）した。また，ビルショウスキー染色により軸索の変化を確認した。

【結果】MOG/CFA 免疫後，約 1 週間で EAE スコアが 2.5 に到達した。投与開始後，溶媒対照群では EAE スコアは高値に維持されたが，シポニモド 3 mg/kg 投与群では投与期間に応じて EAE スコアが低下し，各測定日のスコア比較で，投与開始 6 日後から試験終了時まで溶媒対照群との間に有意差が認められた（Figure 2-7）。脊髄の病理組織学的評価において，溶媒対照群では炎症性細胞浸潤，ミクログリアの浸潤と活性化及び脱髄がみられたが，シポニモド投与によりこれらの変化が抑制され，いずれの病変スコアにおいても溶媒対照群と比較し有意な低下が確認された（Figure 2-8）。また，軸索変性の評価ではシポニモド投与によりミエリン密度の質的な改善も認められた（Figure 2-9）。

以上，シポニモドはマウス慢性 EAE において，既存の神経症状を回復させたほか，軸索の組織学的な障害を改善させた。

Figure 2-7　　マウス EAE 慢性期の神経症状に対するシポニモドの効果



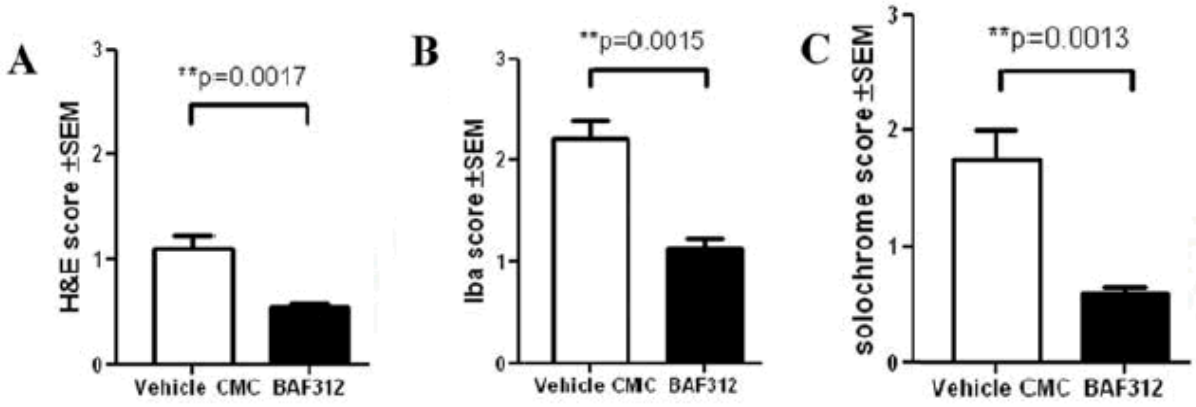
Source: [4.2.1.1-9- RD-2009-01092-Figure 3-1]

雌性 C57BL/6 マウス（7~8 週齢）の下背部に同系マウス由来の MOG を CFA とともに免疫し，慢性型 EAE を惹起した。神経症状の重症度は 10 段階の EAE スコアで判定した。シポニモド（3 mg/kg/day）又は溶媒［Vehicle（CMC）］を EAE 急性期（EAE スコア 2.5 到達時）から試験終了時（投与開始後 25~27 日目）まで投与した。

●：シポニモド群，▲：溶媒対照群。平均値±標準誤差，n=10。

*：シポニモド投与群と溶媒対照群との各測定日のスコア比較（Mann-Whitney 検定）。

Figure 2-8　　マウス EAE 慢性期の脊髄病変に対するシポニモドの作用



Source: [4.2.1.1-9- RD-2009-01092-Figure 3-3]

C57BL/6 マウス脊髄の病理組織学的評価。頸髄部位 4 箇所，胸髄並びに腰髄部位 6 箇所の脊髄切片を用いて各染色法を行った。各病変部位における炎症性細胞浸潤，ミクログリアの浸潤と活性化像の存在，並びに脱髄性変化の程度を盲検下で評価し，スコア化した。

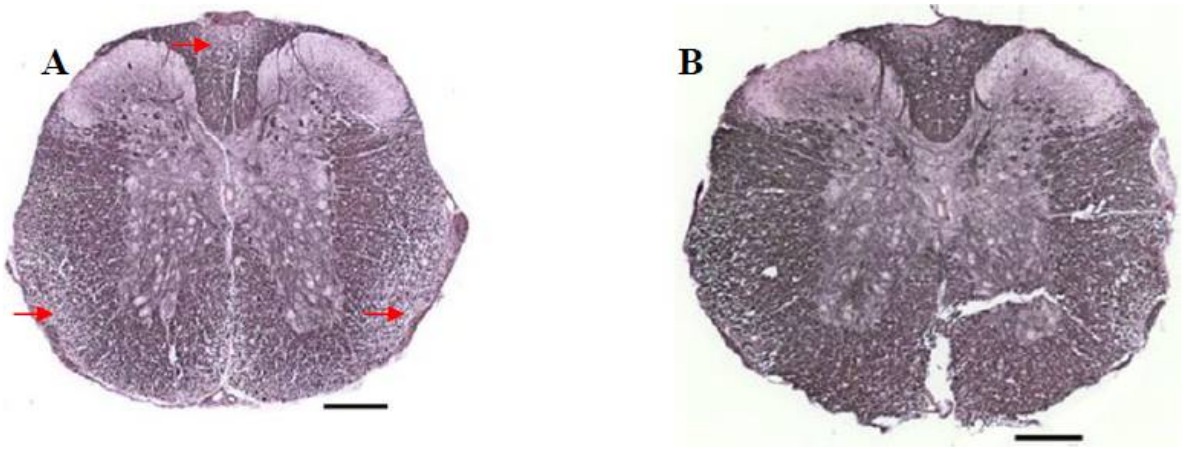
平均値±標準誤差，n=7~10，Mann-Whitney 検定。

（A）ヘマトキシリン＆エオジン（H&E）染色（核と細胞質を染色）。シポニモド群（BAF312）において細胞浸潤並びに炎症の有意な軽減が認められた。

（B）抗 Iba ウサギポリクローナル抗体を用いた染色（ミクログリアを染色）。シポニモド群においてミクログリア浸潤及び活性化の有意な軽減が認められた。

（C）ソロクローム染色（ミエリンを染色）。シポニモド群において脱髄病変領域が減少し，脱髄の有意な軽減が認められた。

Figure 2-9　　マウス EAE 慢性期の軸索変性に対するシポニモドの作用



Source: [4.2.1.1-9- RD-2009-01092-Figure 3-4]
C57BL/6 マウス EAE モデルの脊髄のビルショウスキー染色（軸索を染色）。スケールバー=200 µm。
溶媒対照群（A）ではシポニモド群（B）に比べ染色が薄く（矢印），軸索の減少が認められた。

2.3.3　　マウス EAE モデルを用いた神経保護作用の検討（脳室内投与）

マウスの慢性型 EAE モデルを用いて，シポニモド脳室内（icv）投与時の神経保護作用について検討した（Gentile et al. 2016）。

【方法】シポニモド（0.225，0.45 及び 4.5 µg/day）又は溶媒を雌性 C57BL/6 マウスに浸透圧ミニポンプを用いて 4 週間持続的に icv 投与した。投与開始 7 日後にミエリンオリゴデンドロサイト糖蛋白 33-35（MOG_{35-55}）を CFA 及び結核菌とともに皮下注射し EAE を惹起した。EAE に伴う神経症状の重症度は，11 段階の EAE スコア（0=異常なし，1=尾の弛緩，2=後肢の脱力，3=後肢の麻痺，4=両後肢の完全麻痺，5=死亡，各スコア中間の神経症状が認められた場合は 0.5 を加点する）で評価した。EAE 惹起 18 日目に抗 CD3 抗体を用いたフローサイトメトリーにより血中リンパ球数を測定し，惹起 20~24 日目にマウスの脳を採取し線条体切片を作成して，シナプス電流変化及び病理組織学的評価に用いた。

また，別途，マウス由来ミクログリア細胞株（BV2 細胞）を用いた *in vitro* 試験を行い，腫瘍壊死因子（TNF）刺激で分泌誘導される IL-6 及び RANTES を Luminex®アッセイにより測定し，シポニモドのミクログリア細胞に対する影響について検討した。

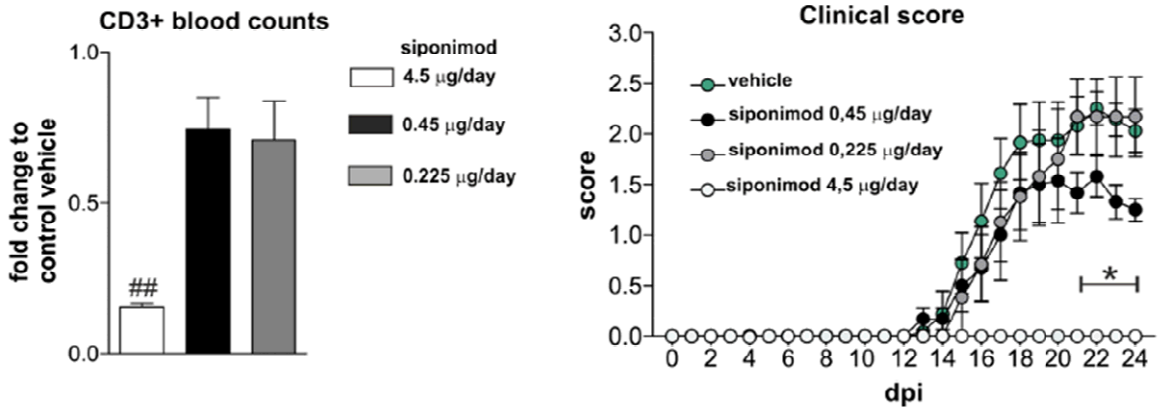
【結果】

EAE スコアと血中リンパ球数への影響：溶媒対照群では，EAE 惹起 13 日目から EAE スコアが上昇し，惹起 22 日目には最大値に達した。シポニモド 4.5 µg/day 群では観察期間を通じて EAE スコアの上昇はみられなかった。0.45 µg/day 投与群でも EAE スコアの上昇抑制がみられ，惹起 21 日目から 24 日目までのスコア比較で，溶媒対照群との間に有意差が認められた。

惹起 18 日目の血中リンパ球数は，4.5 µg/day 群で有意に低下した。一方，0.45 µg/day 投与群では血中リンパ球数に有意な低下はみられなかった（Figure 2-10）ことから，0.45 µg/day 投与群の

線条体切片を用いてシナプス電流変化並びに病理組織学的評価を行い，神経保護作用について検討した。

Figure 2-10　マウス EAE へのシポニモド脳室内投与における血中リンパ球数に対する影響及び治療効果



Source: Gentile et al. 2016

シポニモド（siponimod 0.225，0.45 及び 4.5 µg/day）又は溶媒対照（vehicle）を雌性 C57BL/6 マウスに浸透圧ミニポンプを用いて 4 週間持続的に脳室内（icv）投与した。icv 投与開始 7 日後［免疫後（dpi; the day post-immunization）0 日］に MOG_{35-55} を CFA 及び結核菌とともに免疫することにより EAE を惹起させた。

（左）dpi 18 日目に採血し，末梢血中の CD3 陽性リンパ球数を測定した。溶媒対照群に対する増加を倍数で示した。

平均値±標準誤差，n=3~6 。

##：p<0.01 vs 対照群，Student の t 検定。

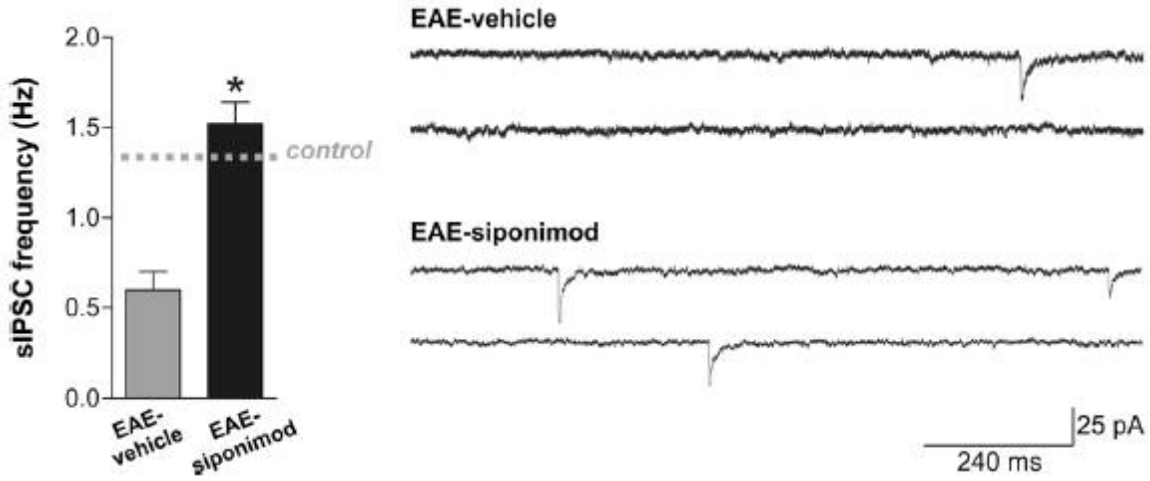
（右）EAE スコア推移。神経症状の重症度は 11 段階の EAE スコアで判定した。

平均値±標準誤差，n=5~9。

*： p<0.05 0.45 µg/day 群 vs 対照群，各測定日におけるスコア比較，Mann-Whitney 検定。

神経保護作用：マウス EAE の脳では，グルタミン酸作動性興奮性シナプス電流の増加と GABA 作動性抑制性シナプス電流の減少が認められ，これらのシナプス伝達の変化により神経系細胞の障害が誘導されると報告されている（Mandolesi et al. 2015）。そこで，EAE 惹起 20~24 日目のシポニモド 0.45 µg/day 投与群から採取した線条体切片を用いてシナプス電流を測定した。その結果，シポニモドは GABA 作動性抑制性シナプス電流の発生頻度を回復させた（Figure 2-11）。一方，グルタミン酸作動性興奮性シナプス電流に対して影響はみられなかった。同マウス線条体における GABA 作動性ニューロンを抗パルブアルブミン抗体による免疫組織化学により同定し，ニューロン量を測定したところ，溶媒対照群では GABA 作動性ニューロン量の減少がみられたが，シポニモド 0.45 µg/day 投与によりニューロン量の減少が有意に抑制された（Figure 2-12）。これらの成績から，シポニモドは EAE における GABA 作動性ニューロンの減少を抑制することで，GABA 作動性抑制性シナプス伝達の異常を改善するものと考えられた。

Figure 2-11　マウス EAE 脳を用いた抑制性シナプス伝導に対するシポニモド（脳室内投与）の作用



Source: Gentile et al. 2016

dpi 20～24 日目のマウス EAE［0.45 µg/day 投与群（EAE-siponimod），及び溶媒対照群（EAE-vehicle）］脳切片を用いたシナプス電流変化の検討。自発性抑制性シナプス電流（sIPSC ; spontaneous inhibitory post-synaptic currents）及び自発性興奮性シナプス電流（sEPSC; spontaneous excitatory post-synaptic currents）の発生頻度を測定した。図は sIPCS の結果を示す。

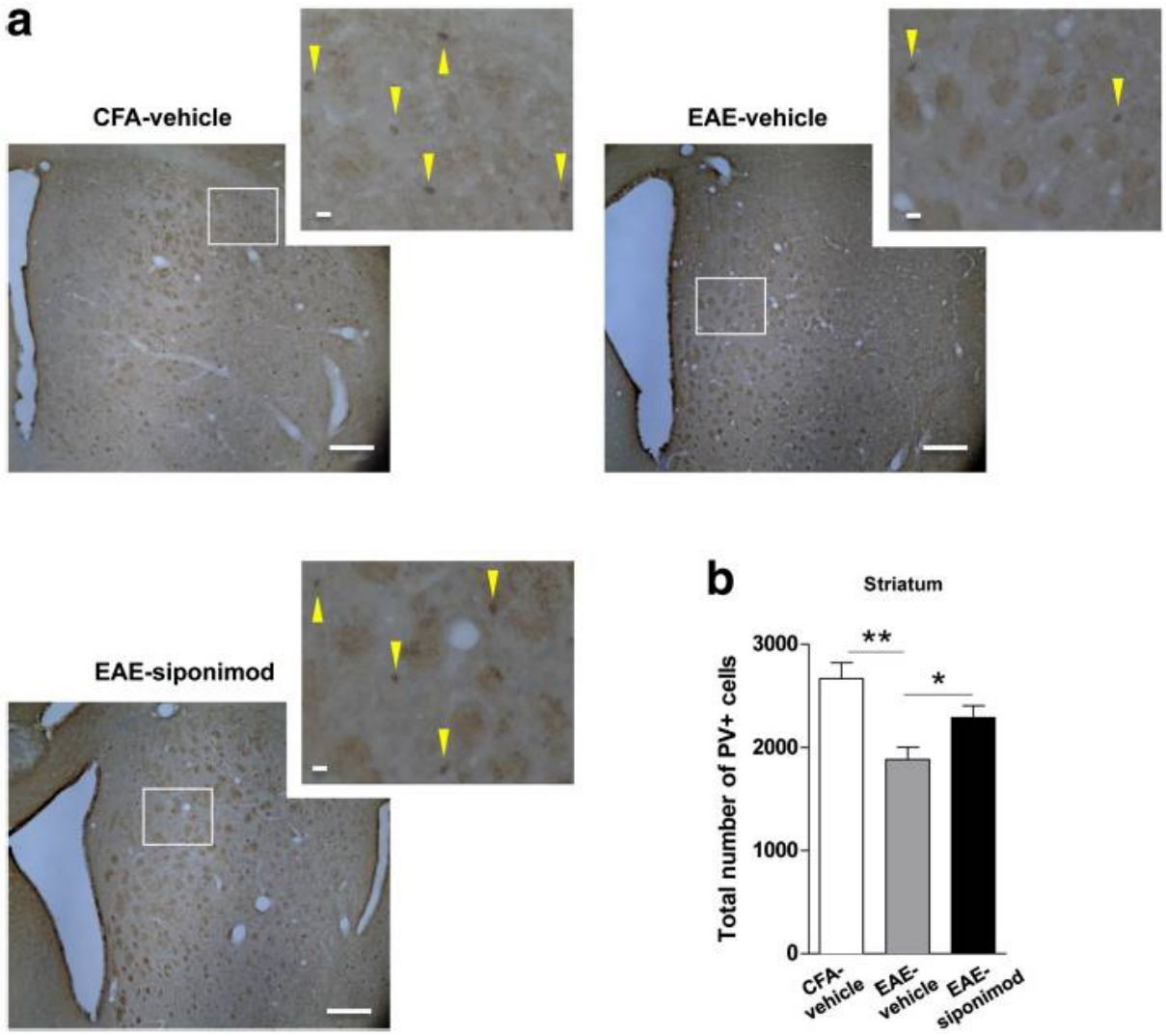
sIPCS（右）及びその発生頻度（左，Hz）を示す。

（左）点線は EAE を惹起していないマウス（control）で認められた sIPSC の発生頻度を示す。

平均値±標準誤差，n=8~10。

*： $p<0.05$ vs 対照群，Student の t 検定。

Figure 2-12　　マウス EAE 線条体での GABA 作動性ニューロンに対するシポニモド（脳室内投与）の作用



Source: Gentile et al. 2016

dpi 20～24 日目のマウス EAE［溶媒対照群（EAE-vehicle）及び 0.45 µg/day 投与群（EAE-siponimod）］及び EAE を惹起していない control 群（CFA-vehicle）の脳切片を用いた病理組織化学的評価。抗パルブアルブミン抗体，ビオチン標識二次抗体並びにジアミノベンジジン反応により免疫組織化学染色を行い，線条体におけるパルブアルブミン陽性 GABA 作動性ニューロン量を定量した。

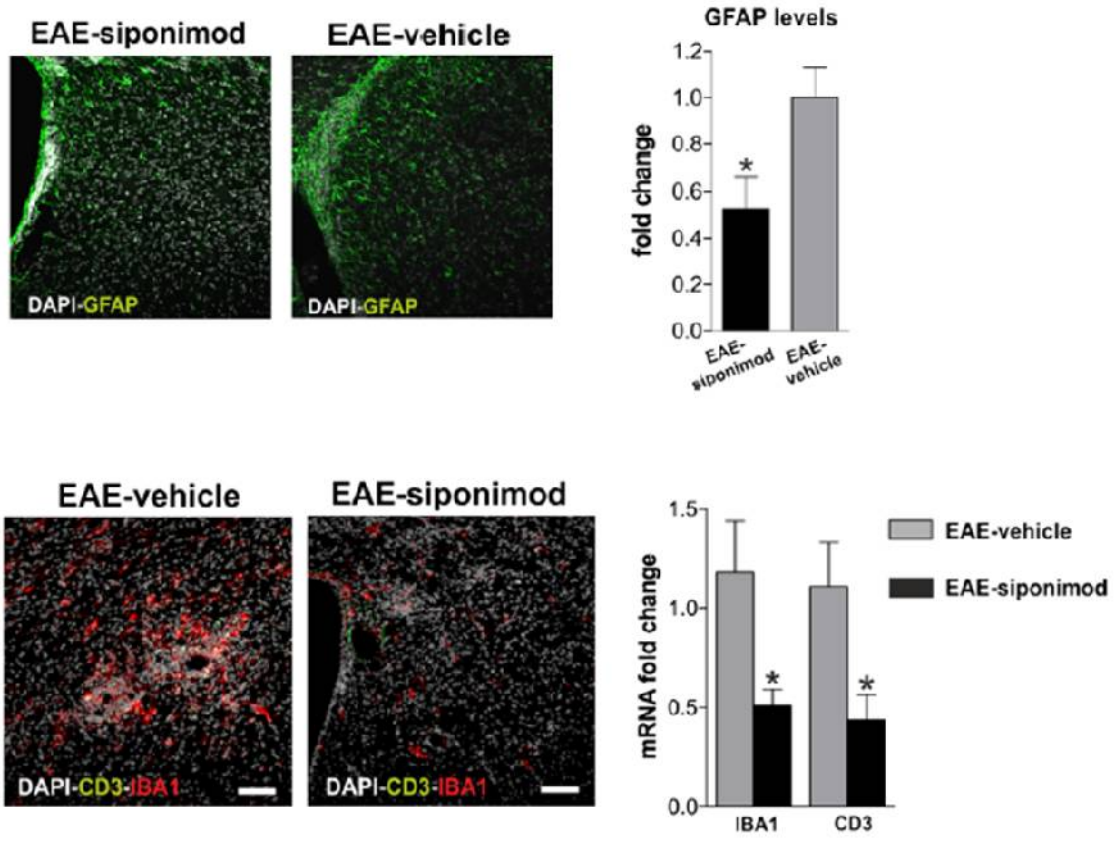
（a）矢印はパルブアルブミン陽性ニューロンを示す。スケールバー 強拡大=20 µm，弱拡大=200 µm。n=3~5。画像は代表例を示す。

（b）パルブアルブミン陽性ニューロン量を定量した。平均値±標準誤差，n=3~5。

**：p<0.01 vs 溶媒対照群（EAE-vehicle），*：p<0.05 vs 0.45 µg/day 投与群（EAE-siponimod），Newman-Keuls post hoc 検定。

同マウスの線条体標本を用いて，アストロサイトとミクログリアの同定染色である GFAP 染色と IBA1 染色を各々実施した。さらに，アストロサイトの評価についてはウエスタンブロッティング法により GFAP タンパク量を測定し，ミクログリアの評価については抗 CD3 抗体を用いた血中リンパ球の確認と，リアルタイム PCR による IBA1 mRNA 及び CD3 mRNA 量の測定も行った。その結果，溶媒対照群ではアストロサイトとミクログリアのグリオーシス（GFAP タンパク量と IBA1 mRNA 量の増加）がみられ，CD3 陽性細胞の浸潤と CD3 mRNA の上昇も確認された。シポニモド 0.45 µg/day 投与群では，アストロサイトとミクログリアのグリオーシスの抑制がみられ，GFAP タンパク量と IBA1 mRNA 量が溶媒対照群に比し有意に低下した。また，CD3 mRNA 上昇の抑制もみられたことから末梢リンパ球浸潤の抑制が示唆された（Figure 2-13）。

Figure 2-13　マウス EAE 線条体でのグリオーシスに対するシポニモド（脳室内投与）の作用



Source: Gentile et al. 2016

dpi 20～24 日目のマウス EAE［0.45 µg/day 投与群（EAE-siponimod），及び溶媒対照群（EAE-vehicle）］脳切片を用いた病理組織学的評価。線条体におけるアストログリオーシス（上段）及びミクログリオーシス（下段）の程度を評価した。

（上段）アストログリオーシスの有意な低減が認められた。

（左）脳切片を GFAP（緑色，アストロサイトを染色）並びに DAPI（灰色，細胞核を染色）を免疫蛍光染色し，線条体の共焦点電子顕微鏡画像をオーバーレイさせた。n=3，画像は代表例を示す。

（右）抗 GFAP 抗体を用いたウェスタンブロッティングにより GFAP を定量した。β-アクチン量で標準化した GFAP 量の変化を倍数で示す。

平均値±標準誤差，n=5。

*：p<0.05 vs 対照群，Student の t 検定。

（下段）ミクログリオーシスの有意な低減が認められ，CD3 陽性リンパ球浸潤の低下が認められた。

（左）脳切片を IBA1（赤色，ミクログリアを染色），CD3（緑色，CD3 陽性リンパ球を染色）並びに DAPI（灰色，細胞核を染色）を免疫蛍光染色し，線条体の共焦点電子顕微鏡画像をオーバーレイさせた。スケールバー =100 µm。

（右）IBA1 及び CD3 mRNA 発現量をリアルタイム PCR により定量した。内標準 β-アクチンに対する変化量を倍数で示す。

平均値±標準誤差，n=4~5。

*： p<0.05 vs 対照群，Student の t 検定。

BV2 細胞を用いた *in vitro* 評価では，シポニモド 0.1 μM の前処置により TNF 誘導性 IL-6 及び RANTES 遊離が有意に抑制されたことから，シポニモドはミクログリアからのサイトカイン及びケモカイン遊離を抑制することによって，リンパ球浸潤を抑制している可能性が考えられた。

以上のことから，マウス EAE への icv 投与において，シポニモドは血中リンパ球数に有意な影響を及ぼさない用量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。また，シポニモドはマウス EAE 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サイトカイン/ケモカイン遊離を抑制した。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，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血中リンパ球浸潤を抑制する可能性が示唆された。

以上，本薬は血中リンパ球に作用して二次リンパ組織からの移出を抑制し，CNS へのリンパ球浸潤を抑制することに加え，CNS に直接作用してシナプス電流異常の改善，神経変性の抑制及びリンパ球浸潤を抑制し，神経保護的に働いている可能性が示唆された。

2.4 作用機序

MS は中枢神経髄鞘を標的とした自己免疫性疾患であると考えられている。MS では中枢神経髄鞘が破壊され炎症性脱髄巣が形成される。MS の一病型である再発寛解型 MS（RRMS）では，CNS への自己反応性リンパ球の浸潤とそれに伴う炎症性脱髄並びに血液脳関門（BBB）破綻が認められる。SPMS は RRMS の発症から 15～20 年の経過の中で緩徐に移行し，進行した SPMS の特徴として，BBB が修復され正常に機能し CNS 内で炎症並びに軸索変性や神経系細胞のグリオーシスといった神経変性が進行している（多発性硬化症・視神経脊髄炎診療ガイドライン 2017）。なお，早期の SPMS では BBB はまだ修復されておらず，CNS への自己反応性リンパ球の浸潤並びに炎症性脱髄が認められているものの，時間経過に伴い限局的になると報告されている。RRMS から SPMS への移行は緩徐に推移するため，SPMS に移行後も一定期間は RRMS の病態を有しているものと考えられている（2.5-1.1.1 項，Antel et al. 2012，Mahad et al. 2015）。

シポニモド及びフィンゴリモドの以下の検討から，シポニモドは，主として血中リンパ球数減少作用を介して，自己反応性リンパ球の CNS への浸潤を制限し炎症性脱髄の形成及び進行を抑制すると考えられる。SPMS に移行後も一定期間は自己反応性リンパ球の浸潤及び炎症性脱髄が認められることから，シポニモドは早期の SPMS でみられる炎症性脱髄の形成及び進行を抑制し，SPMS の病態進行を抑制すると期待できる。さらに，CNS に対して神経保護的に作用し，アストロサイトの活性化抑制を介して炎症性細胞の動員，炎症の誘導を阻止し，オリゴデンドロサイトの再ミエリン化促進を介して，髄鞘障害後の回復を促進及び神経変性の進行を抑制すると考えられる。これにより SPMS に特徴的にみられる CNS 内の炎症並びに神経変性を抑制し治療効果を示すと期待される。

自己反応性 Th17 細胞及び B 細胞を含むリンパ球の二次リンパ組織からリンパ液中への移出抑制

RRMS 並びに早期の SPMS で認められる炎症性脱髄の病態形成における免疫機序には 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）が中心的役割を担っていると考えられている。末梢において何らかの髄鞘抗原の感作を受け分化した自己反応性 Th1/Th17 が血液脳関門（BBB）を通過して CNS 局所へ浸潤し，さらに抗原提示を受け活性化する。活性化した Th1/Th17 は炎症性サイトカインやケモカインを産生し，ミクログリアやマクロファージ等の炎症性細胞を動員して炎症性脱髄病巣を形成すると考えられている（多発性硬化症・視神経脊髄炎診療ガイドライン 2017）。実際に MS 患者の脳組織には多数の Th17 細胞集簇が認められており（Tzartos et al. 2008），*in vitro*/*in vivo* の検討において，ヒト Th17 は Th1 よりも BBB 透過性が高く，サイトカイン及び細胞傷害因子を分泌して BBB 破綻，CNS への炎症性細胞動員，及び神経系細胞傷害を誘導すると示唆されている（Kebir et al. 2007）。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 Th1/Th17 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（Frischer et al. 2009，Hemmer et al. 2015）。

フィンゴリモドの治療成績から，MS に対する治療効果において，S1P 受容体調節薬の $S1P_1$ 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，リンパ球はリンパ液中に存在する S1P に不応となり，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。自己反応性 Th17 及び B 細胞も同様にリンパ組織からの移出が抑制されるため，これらの CNS 組織への移行が制限される。これにより，早期の SPMS に一定期間認められる炎症性脱髄において，シポニモドは，CNS での Th17 介在性の炎症誘導を阻止し，SPMS に対して治療効果を示すと考えられる（Matloubian et al. 2004，Brinkmann et al. 2010，Thangada et al. 2010）。実際に，MS 患者にフィンゴリモドを投与したとき，リンパ節中に捕捉されたリンパ球の中には Th17 が含まれていることが確認され，血中 Th17 細胞数が著明に減少することが報告されている（Brinkmann 2009）。

中枢神経系（CNS）に対する保護作用

シポニモドは BBB を容易に通過し，優れた中枢移行性を示す（Briard et al. 2015，Gentile et al. 2016）。ニューロン，アストロサイト及びオリゴデンドロサイトには S1P 受容体（$S1P_1$，$S1P_2$，$S1P_3$ 及び $S1P_5$ 受容体）が発現しているため（Bryan et al. 2008，Groves et al. 2013），シポニモドは神経系の細胞に対し直接的な作用を示す可能性が考えられる。事実，培養細胞及びオタマジャクシを用いた以下の検討から，シポニモドの神経系細胞に対する直接的作用が支持されている。

- 培養アストロサイトへの作用

シポニモドは，マウス由来の初代培養アストロサイトにおいて，$S1P_1$ 受容体シグナルを介してリポポリサッカライド（LPS）で誘発される IL-6 分泌を抑制した（O'Sullivan et al. 2016）。

- 終脳細胞スフェロイドを用いた再ミエリン化モデルでの作用

ラット終脳細胞のスフェロイドを用いてリゾフォスファチジルコリン（LPC）により脱髄を惹起し，その後の再ミエリン化に対するシポニモドの影響について検討したところ，再ミエリン化の促進がみられた（Jackson et al. 2011）。ニューロフィラメント H 量には変化が認められなかったことから，本作用は軸索発芽に伴うものではなく，髄鞘保護によるものであることが示唆された。なお，選択的 $S1P_1$ 受容体アゴニストの AUY954 では再ミエリン化の促進はみられなかったことから，本作用には $S1P_5$ 受容体が関与していることが示唆された。

- オタマジャクシを用いた再ミエリン化モデルでの作用

アフリカツメガエルのオタマジャクシを用いた *in vivo* の検討において，シポニモド並びにフィンゴリモドはメトロニタゾールにより誘発した脱髄後のオリゴデンドロサイトによるミエリンの再生を促進した（Mannioui et al. 2018）。再ミエリン化作用に関して，1）選択的 $S1P_5$ 受容体アゴニストで再ミエリン化促進作用がみられたこと，2）$S1P_5$ 受容体をノックアウトした場合ではシポニモドの再ミエリン化に対する作用が消失したこと，3）選択的 $S1P_1$ 受容体アゴニストでは再ミエリン化促進作用がみられなかったことから，本作用は $S1P_5$ 受容体を介したものであることが示唆されている。

なお，シポニモドによる再ミエリン化の促進は，ヒト乳児から採取したオリゴデンドロサイト前駆細胞をラット後根神経節ニューロンと共培養した試験（Cui et al. 2011）や，器官培養マウス小脳切片において LPC 又はサイコシンで脱髄を誘発した試験（O'Sullivan et al. 2016）においても認められている他，フィンゴリモドでも同様の結果が報告されている（Miron et al. 2010，Wu et al. 2013）

以上，シポニモドは CNS において，アストロサイトに作用して炎症性細胞の動員並びに炎症誘導を抑制し，またオリゴデンドロサイトに作用して髄鞘障害後の回復を促進することで，SPMS に特徴的に認められる神経変性の進行を抑制すると期待される。

3 副次的薬理試験

3.1 *In vitro* 薬理試験

3.1.1 混合リンパ球反応試験と骨髄細胞増殖抑制試験

［記載箇所：4.2.1.2-1~3］

混合リンパ球反応に対するシポニモド及びフィンゴリモドの作用を検討した。2 例のドナーから採取した末梢血単核細胞を 1：1 で混合培養し，マイクロビーズを用いて CD4 陽性 T 細胞を分離した。分離された CD4 陽性 T 細胞に対し，シポニモドは高濃度で増殖を抑制［IC50：1.42 µM，シクロスポリン（陽性対照）IC50：0.012 µM］し，アポトーシスを誘導（シポニモド ≥30 µM，フィンゴリモド ≥10 µM）した[Table 2.6.3.1-RD-2006-00916]。健康被験者に臨床維持用量（2 mg/day）を反復経口投与したときの 10 日目の Cmax 算術平均値が 61.0 nM（31.5 ng/mL，シポニモドフリー体分子量：516.61 より算出。A2118 試験）であったことを考慮すると，シポニモ

ドの臨床使用時に免疫抑制作用が生じる可能性は低いと考えられる。なお，同様の検討がマウスの脾臓細胞で実施されており，シポニモド及びフィンゴリモドは同種抗原特異的な T 細胞の活性化と増殖に影響を及ぼさず，免疫抑制作用を示さなかった[Table 2.6.3.1-RD-2006-00909]。

CBA マウス骨髄細胞を用いて細胞増殖に対する作用を評価した結果，シポニモド及びフィンゴリモドは増殖抑制作用を示さず，シポニモドで>10 μM，フィンゴリモドで 4.2 μM，フィンゴリモドリン酸化体で>10 μM の IC50 値を示した。一方，陽性対照であるアザチオプリンでは増殖抑制作用が確認され 0.08 μM の IC50 値を示した[Table 2.6.3.1-RD-2006-00891]。

以上のことから，シポニモドは，シクロスポリンやアザチオプリン等の免疫抑制薬とは異なり，骨髄細胞増殖抑制作用を示さず，リンパ球の増殖やアポトーシス誘導に対しては臨床維持用量投与時の暴露量において影響を及ぼさないと考えられた。

3.1.2 受容体結合試験

［記載箇所：4.2.1.2-4~7，4.2.1.2-14］

98 種類の GPCR，トランスポーター，イオンチャネル，核内受容体及び酵素に対するシポニモドの影響を放射能標識リガンドを用いた結合実験で評価した[Table 2.6.3.1-RD-2006-50780]。その結果，シポニモドは 24 種類の標的に対し 10 μM 以下の IC50 値を示し，いずれに対しても 1～10 μM の Ki 値を示した。また，シポニモドは，アデノシン A3 受容体（IC50 値 4.8 μM），ドパミン D1 受容体（4.4 μM），D3 受容体（3.8 μM），ノルエピネフリントランスポーター（NET：4.4 μM）及びヒスタミン H2 受容体（1.5 μM）に対し 5 μM 以下の IC50 値を示した。

また，19 種類のキナーゼを用いた検討では，10 μM 以下の IC50 値を示した標的は Tek（9.1 μM）並びに Ret（8.3 μM）であり，それ以外の標的では認められなかった（ノバルティス社内データベース）[Table 2.6.3.1-RD-2019-00121]。

なお，同様の検討で，シポニモドの主代謝物である M3 は 10 μM で 124 種の標的に対して親和性を示さず，M16 及び M17 も高濃度で 5-HT2A（IC50 値はそれぞれ M16 で 7.4 μM，M17 で 9.6 μM）に親和性を示したのみであった[Table 2.6.3.1-RD-2016-00545，RD-2016-00166，RD2016-00167]。

臨床維持用量（2 mg/day）経口投与時の Cmax 算術平均値が 61.0 nM（31.5 ng/mL。A2118 試験）であり，シポニモドの血漿中蛋白結合率は 99.9%超[2.7.2-2.1.2 項]であることを考慮すると，血漿中フリー体薬物濃度は非常に低く，本薬の臨床使用において全身曝露により S1P 受容体以外の標的との相互作用は生じないものと予想される。

3.2 *In vivo* 薬理試験

3.2.1 一次/二次免疫応答への影響

［記載箇所：4.2.1.2-8~10］

各種抗原接種で誘導される T 細胞依存性の一次/二次応答，並びに T 細胞非依存性の免疫応答に対するシポニモドの影響について，マウス及びサルを用いて検討した。マウスの T 細胞依存性応答の誘導にはジニトロフェニル（DNP）をハプテンとしたスカシガイヘモシアニン（KLH）を，サルの T 細胞依存性応答の誘導には破傷風ワクチンを，また，マウスの T 細胞非依存性応答の誘導にはトリニトロフェニル化リポポリサッカライド（TNP-LPS）を用いた。その結果，シポニモドは，DNP-KLH 接種マウスにおいて，T 細胞依存性で抗原特異的な免疫グロブリン（Ig）M 及び IgG 抗体産生を抑制した[Table 2.6.3.1-RD-2007-00983]。カニクイザルにおいて T 細胞依存性の一次/二次免疫応答に対するシポニモドの影響を検討した[Table 2.6.3.1-RD-2009-00982]。シポニモド投与期間中に破傷風トキソイドワクチンを接種し，シポニモド投与終了後に再度接種した。シポニモド投与（3 mg/kg，1 日 1 回，経口）は初回接種日の 7 日前から初回接種 14 日後まで継続し，再接種は初回接種日から 88 日後に行った。初回接種並びに再接種後の破傷風トキソイドに対する IgG 抗体量を測定し，一次/二次免疫応答に対するシポニモドの影響を検討した。その結果，初回接種後の抗体量は対照群に比べシポニモド群において有意に減少していた。しかしながら再接種後の抗体量では有意差は認められず，シポニモドによる影響を受けなかった。このことから，シポニモドは一次免疫応答を抑制するが二次免疫応答には影響を及ぼさず，免疫記憶は維持されていると考えられた。TNP-LPS 接種マウスに対しては，シポニモドは，3 mg/kg 投与群においてのみ T 細胞非依存性の抗原特異的 IgM 及び IgG 抗体産生を抑制し，低用量の投与群では抑制は認められなかった[Table 2.6.3.1-RD-2008-00141]。

シポニモドは $S1P_1$ 受容体に対する機能的アンタゴニスト作用により二次リンパ組織からのリンパ球移出を抑制し，血中におけるリンパ球数を減少させることから，抗原特異的リンパ球数も同様に制限されると考えられる。そのため，抗原暴露後において抗原特異的リンパ球の所属リンパ組織への移入が減少し，T/B 細胞による胚中心反応が低下することにより T 細胞依存性の免疫応答が抑制されると考えられる。一方，シポニモドは二次免疫応答及び免疫記憶には影響を及ぼさなかった。エフェクターメモリーT 細胞及びセントラルメモリーT 細胞は免疫記憶において重要な役割を担っており，同一抗原刺激を再度受けた場合に，免疫応答を速やかに開始することが知られている。セントラルメモリーT 細胞は主として二次免疫組織に留まっているのに対し，エフェクターメモリーT 細胞は血中に留まり，二次免疫応答発動に備えている。エフェクターメモリーT 細胞は二次リンパ組織を介した循環能を有さないため，S1P 受容体調節薬の作用を受けないことが報告されている（Brinkmann 2009）。このことから，シポニモドはエフェクターメモリーT 細胞機能には影響を及ぼさず，二次免疫応答及び免疫記憶が維持されたと考えられる。すな

わち，シポニモドの臨床使用においても二次免疫応答は正常に機能すると考えられる。なお，フィンゴリモドでも同様の報告がある（Han et al. 2004，Brinkmann 2009）。

以上，シポニモドは抗原又は病原体刺激後の所属リンパ組織において免疫応答を抑制する可能性がある一方，二次免疫応答及び免疫記憶には影響を及ぼさなかった。このことから本薬の臨床使用においても免疫監視機構が維持，制御されると考えられる。

3.2.2 内皮/上皮バリア機能への影響

［記載箇所：4.2.1.2-11~13］

内皮若しくは上皮のバリア機能に対し，$S1P_1$ 受容体は保護的に作用する一方，$S1P_2$ 及び $S1P_3$ 受容体は抑制的に作用し，両者の作用が拮抗することでバリア機能が維持，調節されていると考えられている（Brinkmann 2007）。そのため，S1P 受容体調節薬が内皮/上皮バリアのバランスを攪乱する可能性が考えられる。フィンゴリモドの第 III 相臨床試験では，少数例の黄斑浮腫が報告されている（Calabresi et al. 2014）。そこで，シポニモドの内皮/上皮バリア機能に対する影響をげっ歯類への単回又は反復投与で検討した。その結果，マウスへの単回投与（0.03，0.1，0.3，1，3，10 及び 30 mg/kg）で用量依存的な肺血管漏出が認められたが[Table 2.6.3.1-RD-2007-00671]，4 週間反復投与（30 mg/kg/day，連日経口投与）では，血管内皮細胞増殖因子（VEGF）誘発性血管漏出を抑制した[Table 2.6.3.1-RD-2006-00778]。また，ラットへの 70 日間反復投与（30 mg/kg/day，連日経口投与）において，血液-網膜関門機能に対する障害は認められなかった[Table 2.6.3.1-RD-2006-00569]。

以上，シポニモドを長期，高用量反復投与しても内皮/上皮バリア機能への障害はみられなかった。

4 安全性薬理試験

In vitro 安全性薬理試験として，hERG 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 電流に関する試験（モルモット及びヒト心房筋細胞）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。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。なお，シポニモドの用量は遊離塩基量として表記した。

4.1 心血管系に及ぼす影響

4.1.1 HEK293 細胞を用いた hERG 電流に及ぼす影響に関する試験

［記載箇所：4.2.1.3-1］

hERG チャネル発現 HEK293 細胞を用いたホールセルパッチクランプ法により，hERG 電流に対するシポニモドの作用を検討した（GLP 非適用試験，[Table 2.6.3.4-0419050]）。シポニモドの処理濃度は 10 μM とした。

試験の結果，10 μM のシポニモドによる hERG 電流の阻害率は 5.4%であった。

4.1.2 HEK293 細胞を用いた hERG 電流に及ぼす影響に関する試験

［記載箇所：4.2.1.3-2］

hERG チャネル発現 HEK293 細胞を用いたホールセルパッチクランプ法により，hERG 電流に対するシポニモドの作用を検討した（GLP 適用試験，[Table 2.6.3.4-0616809]）。シポニモドの処理濃度は 10 及び 25 μM（溶解性の限界による最高濃度）とした。陽性対照として 1 μM の E-4031（hERG チャネルブロッカー）を用いた。

試験の結果，10 μM のシポニモドによる阻害は認められず，25 μM のシポニモドによる阻害率は 9%であった。E-4031 による hERG 電流の阻害率は 97.2%であり，既知の hERG 阻害作用が確認された。本試験条件下ではシポニモドによる 50%以上の hERG 電流の阻害が認められなかったため，IC50 は決定できなかった。

4.1.3 ウサギ摘出心臓を用いた活動電位に関する試験

［記載箇所：4.2.1.3-3］

ランゲンドルフ法により灌流したウサギ摘出心臓を用いて，シポニモドの活動電位持続時間に対する影響を検討した（GLP 非適用試験，[Table 2.6.3.4-0518509]）。シポニモドの処理濃度は 0.1，0.3，1，3 及び 10 μM とし，計 3 回実験を行った。左心室に記録電極を設置し，活動電位パラメータを測定した。

試験の結果，10 μM までのシポニモドによる QT 間隔延長または催不整脈作用を示唆する活動電位パラメータの変化は認められなかった。

4.1.4 ウサギ摘出心臓を用いた自動能に関する試験

［記載箇所：4.2.1.3-4］

ランゲンドルフ法により灌流したウサギ摘出心臓を用いて，シポニモドの自動能に対する影響を検討した（GLP 非適用試験，[Table 2.6.3.4-RD-2005-00624]）。シポニモドの処理濃度は 0.1，0.3，1，3 及び 10 μM とし，計 6 回実験を行った。自動能のパラメータとして，心周期長及び冠動脈血流量を測定した。

試験の結果，6 回中 2 回の実験において，3 及び 10 μM のシポニモドによる用量依存的かつ軽度の心周期長の延長が認められた。冠動脈血流量には，シポニモドによる影響は認められなかった。

4.1.5 ウサギ摘出大動脈及び冠動脈標本を用いた血管収縮に関する試験

［記載箇所：4.2.1.3-5］

摘出したウサギ胸部大動脈及び冠動脈のリング標本を用いて，シポニモドの血管収縮に対する影響を検討した（GLP 非適用試験，[Table 2.6.3.4-1170645]）。シポニモドの処理濃度は 0.5 μM から 100 mM とした。

試験の結果，胸部大動脈及び冠動脈のいずれにおいても，100 mM までのシポニモドによる血管収縮作用は認められなかった。

4.1.6 モルモット心房筋細胞を用いた GIRK 電流に関する試験

［記載箇所：4.2.1.3-6］

モルモット心房筋細胞を用いたホールセルパッチクランプ法により，GIRK 電流に対するシポニモドの影響を検討した（GLP 非適用試験，[Table 2.6.3.4-RD-2006-00780]）。シポニモドの処理濃度は 0.1，1，3 及び 10 μM とした。陽性対照としてアセチルコリン（20 μM）を用いた。

アセチルコリンによる GIRK 電流活性化を 100%とすると，0.1，1，3 及び 10 μM のシポニモドによる GIRK 電流活性化はそれぞれ 3.2，22.9，56.4 及び 61.7%であり，3 及び 10 μM のシポニモドによる GIRK 電流活性化が認められた。

4.1.7 モルモット心房筋細胞を用いた GIRK 電流に関する試験

［記載箇所：4.2.1.3-7］

モルモット心房筋細胞を用いたホールセルパッチクランプ法により，GIRK 電流に対するシポニモドの影響を検討した（GLP 非適用試験，[Table 2.6.3.4-RD-2010-00781]）。シポニモドの処理濃度は 1 μM とした。陽性対照としてカルバコール（20 μM）を用いた。細胞を 1 μM のシポニモドで 1 時間前処理した後 3 時間ウォッシュアウトを行い，カルバコール，シポニモドの順に処理して膜電流を測定した。

カルバコールによる GIRK 電流活性化を 100%とすると，前処理後にシポニモド処理した細胞では，GIRK 電流の活性化は 2.1%であった。前処理を実施しない細胞をシポニモド処理した結果，52.3%の GIRK 電流の活性化が認められた。シポニモドの前処理による GIRK 電流活性化抑制は，細胞表面における $S1P_1$ 受容体の発現低下による脱感作を示唆するものと考えられた。

4.1.8 ヒト心房筋細胞を用いた GIRK 電流に関する試験

［記載箇所：4.2.1.3-8］

ヒト心房筋細胞を用いたホールセルパッチクランプ法により，GIRK 電流に対するシポニモドの影響を検討した（GLP 非適用試験，[Table 2.6.3.4-1170416]）。シポニモドの適用濃度は 0.01，0.1，1，10，100 及び 1000 nM とし，陽性対照としてカルバコール（20 μM）を用いた。

カルバコールによる GIRK 電流活性化を 100%とすると，シポニモドによる GIRK 電流の活性化は最大で 80.1%であり，EC50 値は 15.8 nM と算出された。

4.1.9 ラットを用いた心血管系及び呼吸系に関する試験

［記載箇所：4.2.1.3-9］

雄ラットを用いて，心血管系及び呼吸系に対するシポニモドの影響を検討した（GLP 非適用，[Table 2.6.3.4-0510072]）。1 群 2 例の Wistar Hannover 系雄ラットに，シポニモドを 0（媒体対照）及び 10 mg/kg の用量で単回静脈内投与した。投与前並びに投与 0.5，1，5，10 及び 30 分後に心電図を測定した。媒体として，10%エタノール，10%PEG 300，4%クレモフォール EL 含有生理食塩水を用いた。

死亡は認められず，一般状態観察において呼吸の異常はみられなかった。

10 mg/kg 群では，投与 0.5 分後を最大とする心拍数の一過性の減少がみられたが，投与 1 分後には回復または回復傾向が認められた。また，10 mg/kg 群では投与後に一過性の等頻度房室解離がみられた。1 例では投与約 20 秒後に心室性期外収縮が 1 回認められた。

以上，シポニモドの投与直後に一過性の心拍数の減少及び等頻度房室解離がみられた。心拍数の減少は速やかに回復した。シポニモドによる洞性不整脈はみられなかった。

4.1.10 麻酔モルモットを用いた心血管系に関する試験

［記載箇所：4.2.1.3-10］

麻酔モルモットを用いて，心血管系に対するシポニモドの影響を検討した（GLP 非適用試験，[Table 2.6.3.4-1070201]）。1 群 2 又は 4 例の Hartley 系雄モルモットをケタミン／キシラジンの腹腔内投与により麻酔し，シポニモドを 0（媒体対照），0.3 μg/kg 並びに 0.03，0.3 及び 1 mg/kg の用量で静脈内投与し，投与後 60 分間血圧及び心電図を測定した。媒体として 1%エタノール，1%PEG 300，0.4%クレモフォール EL 含有生理食塩水を用いた。

0.03 mg/kg 以上の投与群で，血圧（収縮期，拡張期及び平均動脈血圧）の低下が認められた。平均動脈血圧は投与後 2 分以内にベースライン値に対して最大約−70%低下し，観察期間中（投与後 60 分間）にわたって約 30～50%の低下が認められた。また，投与後 5 分以内に心拍数の減少（ベースライン値に対して約−50～60%）がみられた。投与後 2 分以内に房室解離及び第二度房室ブロックがみられた。投与直後には，房室伝導の異常が発現する前に PR 間隔の延長がみられた。QRS 時間及び QTcF 間隔には影響は認められなかった。いずれの投薬群においても，血液学的検査に影響は認められなかった。

以上，麻酔モルモットにシポニモドを 0.03 mg/kg 以上の用量で静脈内投与した結果，血圧の低下及び心拍数の減少，並びに房室伝導異常が認められた。

4.1.11 モルモットを用いた心血管系に関する試験

［記載箇所：4.2.1.3-11］

モルモットを用いて，テレメトリー法によりシポニモドの心血管系に対する影響を検討した（GLP 非適用試験，[Table 2.6.3.4-1070382]）。1 群 4 例の Hartley 系雄モルモットに，シポニモドを 0（媒体対照），0.03，0.3 及び 1.0 mg/kg の用量で単回経口投与した。投与 1 時間前から投与 24 時間後まで，血圧，心電図及び体温を測定した。媒体として 1%カルボキシメチルセルロース液を用いた。

0.03 mg/kg 以上の投与群で，投与直後に血圧（収縮期，拡張期及び平均動脈血圧）の低下がみられ，投与後約 7～11 時間まで持続した（0.03，0.3 及び 1.0 mg/kg 投与時の平均動脈血圧は媒体対照群と比較してそれぞれ最大−19，−21 及び−21%）。また，投与 170～290 分後に脈圧の低下がみられた。投与 20～40 分後に心拍数の減少がみられ，投与約 3～5 時間後までに回復した（0.03，0.3 及び 1.0 mg/kg 投与により，媒体対照群と比較してそれぞれ最大−40，−48 及び−45%）。PR 間隔の延長及び QTcB 間隔の短縮，並びに第二度房室ブロックが認められた。心拍数に関連したパラメータ[RR 間隔，散布図縦軸方向の標準偏差（SD1），散布図横軸方向の標準偏差（SD2），SD1/SD2 比及び RR 間隔の逐次差の標準偏差（SDRR）]の増加が認められた。QRS 間隔に影響はみられなかった。

いずれの投薬群においても，体温に影響はみられなかった。

以上，投薬に関連した血圧の低下，心拍数の減少，QTcB 間隔の短縮，PR 間隔及び RR 間隔の延長，並びに SD1 及び SD2 の増加がみられた。また，第二度房室ブロックが認められた。QRS 間隔及び体温には影響はみられなかった。

4.1.12 モルモットを用いたシポニモド及びアトロピンの併用投与による心血管系に関する試験

［記載箇所：4.2.1.3-12］

モルモットを用いて，テレメトリー法によりシポニモドをアトロピンと併用投与したときの心血管系に対する影響を検討した（GLP 非適用試験，[Table 2.6.3.4-1070363]）。4 例の Hartley 系雄モルモットにシポニモド及びアトロピンをTable 4-1に示した試験デザインに基づいて投与し，投与の投与 1 時間前から 24 時間後まで血圧及び心電図を測定した。

Table 4-1　モルモットを用いたシポニモド及びアトロピンの併用投与による心血管系に関する試験の試験デザイン

	試験 1 日	試験 4 日	試験 8 日
試験動物番号 1-4	アトロピン[a]（0.1 mg/kg）	シポニモド[a]（0.3 mg/kg） + アトロピン（0.1 mg/kg，シポニモドの投与 60 分後）	シポニモド[a]（0.3 mg/kg） + アトロピン（0.1 mg/kg/回，シポニモドの投与 15 分前かつ 30 分後）

シポニモドは経口投与，アトロピンは皮下投与により投与した。
a = 投与 0 分

アトロピンの投与により，心拍数の増加及び PR 間隔の短縮がみられた。シポニモドの投与により血圧（収縮期，拡張期及び平均動脈血圧）の低下，心拍数の減少，並びに QTcB 間隔の短縮が認められた。シポニモド投与の 60 分後にアトロピンを投与した結果，血圧，心拍数及び QTcB 間隔に対するシポニモドの影響に変化はみられなかったが，シポニモド投与の 15 分前かつ 30 分後にアトロピンを投与した結果，心拍数及び QTcB 間隔に対するシポニモドの影響は消失した。シポニモド投与後に第二度房室ブロックが認められた。シポニモド投与 60 分後にアトロピンを投与しても房室ブロックの回復はみられなかったが，シポニモド投与の 15 分前かつ 30 分後にアトロピンを投与した結果，房室ブロックの発現抑制または発現の遅延／持続期間の短縮が認められた。

4.1.13　モルモットを用いたシポニモド及びアトロピン反復投与による心血管系に関する試験

［記載箇所：4.2.1.3-13］

モルモットを用いて，テレメトリー法によりシポニモド及び反復投与したアトロピンの心血管系に対する影響を検討した（GLP 非適用試験，[Table 2.6.3.4-1170402]）。4 例の Hartley 系雄モルモットにアトロピン及びシポニモドをTable 4-2に示した試験デザインに基づいて投与し，投与 1 時間前から 24 時間後まで血圧，心電図及び体温を測定した。シポニモドの媒体として 1%カルボキシメチルセルロース液を用いた。

Table 4-2 モルモットを用いたシポニモド及び反復投与したアトロピンによる心血管系に関する試験の試験デザイン

	試験 1 日	試験 3 日
試験動物番号 1-4	アトロピン[a]（0.1 mg/kg/回を 15 分間隔で 4 回投与）	シポニモド[a]（0.3 mg/kg） + アトロピン（0.1 mg/kg/回をシポニモド投与の 60 分後から 15 分間隔で 4 回投与）

シポニモドは経口投与，アトロピンは皮下投与により投与した。
a = 投与 0 分

アトロピンの投与により，血圧（収縮期，拡張期及び平均動脈血圧）の上昇及び心拍数の増加，QA 間隔及び PR 間隔の短縮並びに脈圧の低下がみられた。また，SD1 及び SD2 が減少した。シポニモドの投与により血圧（収縮期，拡張期及び平均動脈血圧）の低下，心拍数の減少，QTcB 間隔の短縮並びに SD1 の減少がみられた。シポニモド投与の 60 分後にアトロピンを投与した結果，血圧，心拍数及び QTcB 間隔に対するシポニモドの影響に変化はなかった。また SD1 及び SD2 の減少が認められた。

4.1.14 モルモットを用いたシポニモド及びアトロピン反復投与による心血管系に関する試験

［記載箇所：4.2.1.3-14］

モルモットを用いて，テレメトリー法によりシポニモド及び反復投与したアトロピンの心血管系に対する影響を検討した（GLP 非適用試験，[Table 2.6.3.4-1370465]）。4 例の Hartley 系雄モルモットにアトロピン及びシポニモドをTable 4-3に示した試験デザインに基づいて投与し，投与の 1 時間前から 24 時間後まで血圧，心電図及び体温を測定した。シポニモドの媒体として 1%カルボキシメチルセルロース液を用いた。

Table 4-3　モルモットを用いたシポニモド及びアトロピン反復投与による心血管系に関する試験の試験デザイン

	試験 1 日	2 日	8 日	11 日	15 日	72 日
試験動物番号 1, 2	アトロピン（0.5 mg/kg）	生理食塩水	アトロピン（0.5 mg/kg/回を 60 分間隔で 2 回投与）	シポニモド（0.3 mg/kg）	シポニモド[a]（0.3 mg/kg） + アトロピン（0.5 mg/kg/回をシポニモド投与の 90 分後から 60 分間隔で 2 回投与）	アトロピン（1.5 mg/kg/回を 90 分間隔で 3 回投与）
試験動物番号 3, 4	生理食塩水	アトロピン（0.5 mg/kg）				

シポニモドは経口投与，アトロピン及び生理食塩水は皮下投与により投与した。
a = 投与 0 分

いずれの用法用量のアトロピン投与時にも，心拍数の増加，PR 間隔及び QRS 間隔の短縮が認められた。シポニモドの初回投与（試験 11 日）により，血圧（収縮期，拡張期及び平均動脈血圧）の低下及び心拍数の減少がみられた。試験 15 日の投与前に 1 例で一般状態悪化がみられたため，テレメトリー動物を補充した。シポニモドの 2 回目の投与（試験 15 日）を実施した 3 例では心拍数に顕著な変化は認められず，受容体の脱感作によるものと考えられた。試験 15 日にシポニモドを初回投与した動物では，心拍数の減少がみられた。心拍数の減少に対するアトロピン投与の影響は認められなかった。

4.1.15　ウサギを用いた心血管系に関する試験

［記載箇所：4.2.1.3-15］

ウサギを用いてテレメトリー法によりシポニモドの心血管系に対する影響を評価し，末梢血リンパ球数及び血漿中薬物濃度との関連を検討した（GLP 非適用試験，[Table 2.6.3.4-RD-2005-50312]）。ニュージーランドホワイトウサギ（テレメトリー動物又はイソフルラン吸入により麻酔した動物）にシポニモドをTable 4-4に示した試験デザインに基づいて投与した。テレメトリー動物では血圧及び心電図，麻酔動物では末梢血リンパ球数及び血漿中薬物濃度を測定した。媒体として 4～5%PEG300 含有生理食塩水を使用した。

Table 4-4　　ウサギを用いた心血管系に関する試験の試験デザイン

		試験動物数			
		テレメトリー動物		麻酔動物	
	用量（mg/kg）	雄	雌	雄	雌
静脈内持続投与	0	2	3	2	1
	3.15（0.45，0.90 及び 1.80 mg/kg を 45 分間隔で累積投与）	3	2	4	-
静脈内投与	0	2	4	5	-
	0.3	3	3	4	2
	0	4	2	5	-
	1.0	2	4	5	3

3.15 mg/kg（累積投与量）の静脈内持続投与により，心拍数の一過性の減少（最大−18.9%），不整脈（心拍の不整）及び平均動脈血圧の上昇傾向（最大+8.1%）が認められた。この用量における Cmax は 1.0 µM，AUC は 32 min*µg/mL であった。また，末梢血リンパ球数の減少が認められた。

0.3 mg/kg の静脈内投与では心拍数及び血圧への影響はみられなかったが，末梢血リンパ球数の減少が認められた。この用量における Cmax は 0.43 µM，AUC は 38 min*µg/mL であった。1.0 mg/kg の静脈内投与では心拍数の減少及び末梢血リンパ球数の減少が認められ，この用量における Cmax は約 1.5 µM，AUC は約 120 min*µg/mL であった。

以上，いずれの投与スケジュールにおいても末梢血リンパ球数の減少が認められた。曝露量は用量依存的に増加し，それに伴って心血管系への影響が認められた。

4.1.16　カニクイザルを用いた心血管系に関する試験

［記載箇所：4.2.1.3-16］

カニクイザルを用いて，テレメトリー法によりシポニモドの心血管系に対する影響を検討した（GLP 非適用試験，[Table 2.6.3.4-0570044]）。2 例の雄カニクイザルに，試験 2 日に 100 mg/kg，試験 8 日に 60 mg/kg の用量でシポニモドを経口投与し，心電図及び体温を測定した。別の 1 例を媒体対照群とし，0.5%カルボキシメチルセルロース溶液を投与した。

死亡は認められず，投薬に関連した一般状態，摂餌量及び体温の変化はみられなかった。100 mg/kg の用量では，2 例中 1 例で心拍数の減少（ベースラインと比較して−47～68 bpm，媒体と比較して−38 bpm）がみられ，その結果として QT 間隔（補正なし）が延長した。心拍数の減少は投与 1 時間後に発現し，2 時間持続した。また，投与約 1 時間後から約 1 時間にわたり第二度房室ブロックがみられた。別の個体では，100 mg/kg の投与 30 分後から 2 時間後まで心拍数の減少傾向がみられた。

4.1.17　カニクイザルを用いた心血管系に関する試験

［記載箇所：4.2.1.3-17］

カニクイザルを用いて，テレメトリー法によりシポニモドの心血管系に対する影響を検討した（GLP 適用試験，[Table 2.6.3.4-0670305]）。4 例の雄カニクイザルに，シポニモドを 0，50 及び 150 mg/kg の用量で用量漸増法により経口投与し，血圧及び心電図を測定した。媒体として 0.5%ヒドロキシプロピルセルロースを使用した。

死亡は認められず，投薬に関連した一般状態の変化はみられなかった。いずれの用量においても，血圧及び心電図間隔に明らかに投薬に関連した変化はみられず，不整脈及び波形異常は認められなかった。投与約 1 から 5 時間後に心拍数の変動がみられたが，軽度かつ短期間の変化であったことから，毒性変化ではないと考えられた。

4.2 中枢神経系

4.2.1 ラットを用いた中枢神経系に関する試験

［記載箇所：4.2.1.3-18］

ラットを用いてシポニモドの中枢神経系に対する影響を検討した（GLP 適用試験，[Table 2.6.3.4-0670302]）。1 群 10 例の Wistar Hannover 系雄ラットにシポニモドを 0（媒体対照），100 及び 200 mg/kg の用量で単回経口投与した。投与 15，30 及び 45 分後並びに 1，2，3，4 及び 24 時間後に一般行動観察を行い，投与 60 分後に体温を測定した。媒体として 0.5%ヒドロキシプロピルセルロースを使用した。

死亡は認められず，一般行動観察において投薬に関連した変化はみられなかった。いずれの投与群においても，中枢神経系への影響または体温の変化は認められなかった。

4.3 呼吸系

4.3.1 ラットを用いた呼吸系に関する試験

［記載箇所：4.2.1.3-19］

ラットを用いてシポニモドの呼吸系に対する影響を検討した（GLP 適用試験，[Table 2.6.3.4-0670301]）。1 群 6 例の Wistar Hannover 系雄ラットにシポニモドを 0（媒体対照），100 及び 200 mg/kg の用量で単回経口投与した。プレチスモグラフを用いて，投与前並びに投与約 1，2，4 及び 24 時間後に呼吸パラメータ（1 回換気量，呼吸数及び分時換気量）を測定した。媒体として 0.5%ヒドロキシプロピルセルロースを使用した。

死亡は認められず，投薬に関連した一般状態の変化はみられなかった。

100 及び 200 mg/kg 投与群で，投与 1 時間後に 1 回換気量の軽微な増加がみられた（ベースライン値と比較してそれぞれ約+27%及び+25%）。また，投与 1 時間後に呼吸数の軽微な減少がみられた（それぞれ−15%及び−22%）。呼吸数の減少傾向は投与 2 時間後及び 4 時間後にも認められたが，投与 24 時間後には回復した。これらの変化はいずれも正常範囲内の変動であり，分時換気量に変化はみられなかったことから，毒性変化ではないと考えられた。

4.3.2 ラットを用いた気道過敏性に関する試験

［記載箇所：4.2.1.3-20］

ラットを用いてシポニモドの気道過敏性に対する影響を検討した（GLP 非適用試験，[Table 2.6.3.4-RD-2006-01156]）。1 群 4 または 6 例の Brown Norway 系雄ラットにシポニモドを 0（媒体対照）及び 30 mg/kg の用量で単回経口投与した。投与 3 時間後に麻酔下で気道切開し，気管支収縮促進剤（セロトニン，メタコリン及びアデノシン）を静脈内投与して血圧，心拍数及び気道抵抗を測定した。媒体として 10%Tween80／40%PEG200 溶液を用いた。

心拍数，血圧及び気道抵抗に，シポニモド投与による影響はみられなかった。セロトニン，メタコリン及びアデノシン投与により気道抵抗の増大がみられたが，この気道抵抗の変化に対するシポニモド投与の影響はみられなかった。

4.3.3 ラットを用いた肺及び気道過敏性に関する試験

［記載箇所：4.2.1.3-21］

ラットを用いて，シポニモドの反復投与による肺及び気道過敏性への影響を検討した（GLP 非適用試験，[Table 2.6.3.4-RD-2005-01357]）。1 群 7 または 8 例の Wistar Hannover 系雄ラットにシポニモドを 0（媒体対照）及び 30 mg/kg/日の用量で 4 週間反復経口投与した。試験 30 日にラットを麻酔下で気道切開し，気管支収縮促進剤（セロトニン，メタコリン及びアデノシン）を静脈内投与して気道抵抗を測定した。また，$S1P_1$ 受容体及び $S1P_5$ 受容体の mRNA 発現解析並びに肺の病理組織学的検査を実施した。媒体として 1%カルボキシメチルセルロース液を用いた。

シポニモド投与により軽度の気道抵抗の増大がみられた。セロトニン及びアデノシンによる気道抵抗の増大にはシポニモド投与による影響はみられなかったが，メタコリンによる気道抵抗の増大には軽度の増加が認められた。肺の病理組織学的検査において，肺平滑筋の過形成はみられなかった。軽微な気管支浮腫及び肺胞マクロファージの増加がみられ，気管支収縮促進剤投与に関連した変化である可能性が考えられた。肺において，$S1P_1$ 受容体の発現量は $S1P_5$ 受容体の 20～40 倍であった。肺の $S1P_1$ 受容体発現量は脳の約 2 倍であり，$S1P_5$ 受容体の発現量は脳よりも低値であった。いずれの受容体の発現量にも，シポニモド投与による影響はみられなかった。

以上，30 mg/kg/日のシポニモド投与により，軽度の気道抵抗増大，及びメタコリンによる気道抵抗の増大に軽度の増加が認められた。肺の平滑筋に病理組織学的変化は認められなかった。

5 薬力学的薬物相互作用試験

実施していない

6 考察及び結論

シポニモドは S1P 受容体サブタイプのうち，$S1P_1$ 及び $S1P_5$ 受容体に高い選択性を示し，$S1P_2$, $S1P_3$ 及び $S1P_4$ 受容体と比較して $S1P_1$ 及び $S1P_5$ 受容体に 750 倍を上回るアゴニスト活性を示した。

シポニモドは *in vitro* 試験においてリンパ球上の $S1P_1$ 受容体をほぼ完全に内在化させ，その作用は長時間持続した。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。*In vivo* 試験において，シポニモドはラット又はカニクイザルの血中リンパ球数を 80%以上減少させた他，マウス又はラットの EAE モデルにおいて，既存の神経症状を回復させ，症状の再発を抑制し，神経損傷を改善した。

これまでに得られている試験成績から，シポニモドは CNS に直接作用し，神経保護的に働くことが示唆されている。マウス EAE モデルにシポニモドを icv 投与したとき，血中リンパ球数に対する影響は軽微であったにもかかわらず，シポニモドは EAE の神経症状を改善した。さらに EAE に伴うシナプス電流異常を改善した他，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。シポニモドはニューロン量の減少を抑制することでシナプス電流異常を改善し，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で炎症性細胞の浸潤を抑制する可能性が示唆された。また，ヒト又はげっ歯類の神経系細胞を用いた *in vitro* の検討から，シポニモドは，$S1P_1$ 受容体を介して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の再ミエリン化を誘導することが示唆された。シポニモドの再ミエリン化促進作用の詳細についてはいまだ解明されていないものの，アフリカツメガエルのオタマジャクシやラット終脳細胞スフェロイドを用いた再ミエリン化モデルでの検討から，$S1P_5$ 受容体を介したオリゴデンドロサイトに対する作用であることが示された。

副次的薬理試験において，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 Cmax が 61.0 nM であり，シポニモドの血漿中蛋白結合率は 99.9%超であることを考慮すると，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，本薬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予想される。また，シポニモドは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恐れはあるものの，二次免疫応答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，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認められたが，冠動脈血流量に影響は認められなかった。ウサギ大動脈及び冠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，投与後早期に心拍数減少を誘発する。

この影響は心筋細胞に発現する $S1P_1$ 受容体へのアゴニズム作用及びそれに続く GIRK チャネル活性化によって誘発され，$S1P_1$ 受容体が内在化して脱感作すると消失すると考えられている（Camm et al. 2014）。ヒト及びモルモットの心房筋細胞を用いた試験では，シポニモドによる GIRK 電流の活性化が認められた。従って，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 $S1P_1$ 受容体介在性 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。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，受容体の脱感作が示唆された。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，この徐脈の発現低下に脱感作が関与している可能性が考えられた。モルモットでは，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る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。ラットを用いた気道過敏性に関する試験では，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が軽微に悪化したが，肺の平滑筋に病理組織学的変化は認められなかった。

以上のことから，本薬は $S1P_1$ 受容体に対する機能的アンタゴニスト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，自己反応性リンパ球の CNS への浸潤並びに炎症を阻止することで MS に対し治療効果を示すことに加え，CNS に直接的に作用し保護効果を示すことで，SPMS 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。一連の非臨床試験成績から二次性進行型多発性硬化症患者の治療において，添付文書案に規定した用法・用量で本薬を使用することは妥当であると判断した。

7 参考文献

[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.

[Bjelobaba I, Begovic-Kupresanin V, Pekovic S, et al. (2018)] Animal models of multiple sclerosis: Focus on experimental autoimmune encephalomyelitis. J Neurosci Res; 96(6):1021-42.

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

[Calabresi PA, Radue EW, Goodin D, et al. (2014)] Safety and efficacy of fingolimod in patients with relapsing–remitting multiple sclerosis (FREEDOMS II): a double-blind, randomised, placebo-controlled, phase 3 trial. Lancet Neurol; 13(6):545-56.

[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.

[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.

[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.

[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.

[Han S, Zhang X, Wang G, et al. (2004)] FTY720 suppresses humoral immunity by inhibiting germinal center reaction. Blood; 104(13):4129-33.

[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.

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

[Kebir H, Kreymborg K, Ifergan I, et al. (2007)] Human TH17 lymphocytes promote blood-brain barrier disruption and central nervous system inflammation. Nat Med; 13(10):1173-5.

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

[Mandolesi G, Gentile A, Musella A, et al. (2015)] Synaptopathy connects inflammation and neurodegeneration in multiple sclerosis. Nat Rev Neurol; 11(12):711-24.

[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.

[Miller SD, Karpus WJ, Davidson TS (2010)] Experimental autoimmune encephalomyelitis in the mouse. Curr Protoc Immunol; Chapter 15:Unit 15.1. 1-20.

[Miron VE, Ludwin SK, Darlington PJ, et al. (2010)] Fingolimod (FTY720) enhances remyelination following demyelination of organotypic cerebellar slices. Am J Pathol; 176(6):2682-94.

[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.

[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.

[Thangada S, Khanna KM, Blaho VA, et al. (2010)] Cell-surface residence of sphingosine 1-phosphate receptor 1 on lymphocytes determines lymphocyte egress kinetics. J Exp Med; 207(7):1475-83.

[Tzartos JS, Friese MA, Craner MJ, et al. (2008)] Interleukin-17 production in central nervous system-infiltrating T cells and glial cells is associated with active disease in multiple sclerosis. Am J Pathol; 172(1):146-55.

[Wu C, Leong SY, Moore CS, et al. (2013)] Dual effects of daily FTY720 on human astrocytes in vitro: relevance for neuroinflammation. J. Neuroinflammation; 10:41.

[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)

2.6.3 薬理試験概要表

目　次

目　次 2
略号一覧 3
2.6.3.1　薬理試験一覧表 4
2.6.3.2　薬効を裏付ける試験 7
2.6.3.3　副次的薬理試験 7
2.6.3.4　安全性薬理試験 8
2.6.3.5　薬力学的薬物相互作用試験 11

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）
AV	atrioventricular	房室
BP	blood pressure	血圧
BRB	blood retina barrier	血液網膜関門
CFA	complete Freund's adjuvant	完全フロイントアジュバント
CHO	Chinese hamster ovary	チャイニーズハムスター卵巣
CNS	central nervous system	中枢神経系
d	day	日
DA	dark agouti	ダークアグーチ
DNP	dinitrophenyl	ジニトロフェニル
EAE	experimental autoimmune encephalomyelitis	実験的自己免疫性脳脊髄炎
F	female	雌
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
GPCR	G protein coupled receptor	G 蛋白質共役型受容体
GTP	guanosine triphosphate	グアノシン三リン酸
GTPγ[^{35}S]	guanosine ^{35}S-[gamma-thio] triphosphate	グアノシン -γ-チオ（^{35}S）三リン酸
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
HR	heart rate	心拍数
IAVD	isorhythmic atrioventricular dissociation	等頻度房室解離
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
Ig	Immunoglobulin	免疫グロブリン
KLH	keyhole limpet hemocyanin	スカシガイヘモシアニン
M	male	雄
MLR	mixed leukocyte glycoprotein	混合リンパ球反応
MOG	myelin oligodendrocyte glycoprotein	ミエリンオリゴデンドロサイト糖タンパク
MRI	magnetic resonance imaging	磁気共鳴映像法
NA	not applicable	該当なし
PBMC	peripheral blood mononuclear cell	末梢血単核球
S1P	sphingosine 1 phosphate	スフィンゴシン 1 リン酸
VEGF	vascular endothelial growth factor	血管内皮細胞増殖因子
VPC	ventricular premature complex	心室性期外収縮

2.6.3.1 薬理試験一覧表

試験の種類	試験系／プロトコール	投与方法	実施施設	試験番号	CTD における記載箇所
効力を裏付ける試験					
>*In vitro* 薬理試験					
Potency of NVP-BAF312 on human S1P receptors	GTPγ[^{35}S] binding to CHO membranes expressing human S1Preceptors	*In vitro*	Novartis Pharma AG	[RD-2006-00729]	4.2.1.1-1
Potency of M3 (NVP-CPY994) and M5 (NVP-CIM841) metabolites of NVP-BAF312 on human S1P1 receptor	GTPγ [^{35}S] binding to CHO membranes expressing human S1P1 receptor	*In vitro*	Novartis Pharma AG	[RD-2012-00145]	4.2.1.1-2
Potency of M16 (NVP-LYG778) and M17 (NVP-LYS815) metabolites of NVP-BAF312 on human S1P1 and S1P5 receptors	GTPγ [^{35}S] binding to CHO membranes expressing human S1P1- and S1P5 receptor	*In vitro*	Novartis Pharma AG	[RD-2015-00301]	4.2.1.1-3
Internalization of the S1P1 receptor mediated by NVP-BAF312	Flow cytometry on CHO cells overexpressing myc-tagged human S1P1 receptor	*In vitro*	Novartis Pharma AG	[RD-2006-00792]	4.2.1.1-4
>*In vivo* 薬理試験					
Efficacy for NVP-BAF312 on peripheral lymphocytes in the rat	Treatment-induced changes in peripheral blood lymphocyte counts	Single oral (0.03, 0.1, 0.3, 1 mg/kg)	Novartis Pharma AG	[RD-2004-03092]	4.2.1.1-5
Effects of NVP-BAF312 prophylactic and therapeutic treatments in DA rat model of chronic experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE)	Homogenized DA rat spinal cord and brain, lyophilized bovine spinal cord/CFA immunization-induced chronic EAE in DA rat	Daily oral - 3 weeks (1, 3, 10, 30 mg/kg/d)	Novartis Pharma AG	[RD-2005-00885]	4.2.1.1-6
Therapeutic efficacy for NVP-BAF312 on chronic EAE in the rat	Homogenized bovine spinal cord/CFA immunization-induced chronic EAE in DA rat	Daily oral - 34 days (0.03, 0.3, 3, 10 mg/kg/d)	Novartis Pharma AG	[RD-2006-00717]	4.2.1.1-7
Therapeutic efficacy for NVP-BAF312, vs FTY720 on chronic EAE in the rat	Homogenized bovine spinal cord/CFA immunization-induced chronic EAE in DA rat	Daily oral - 34 days (0.3, 1, 3 mg/kg/d)	Novartis Pharma AG	[RD-2006-00118]	4.2.1.1-8
Therapeutic efficacy for NVP-BAF312 on EAE in C57BL/6 mice	MOG/CFA immunization-induced EAE in the mouse	Daily oral - 25-27 days (3 mg/kg/d)	Novartis Pharma AG	[RD-2009-01092]	4.2.1.1-9

試験の種類	試験系 又はプロトコール	投与方法	試験番号	CTD における 記載箇所
副次的薬理試験				
>*In vitro* 薬理試験				
Lack of anti-proliferative and/or proapoptotic properties for NVP-BAF312 in human PBMC	Mixed lymphocyte reaction (MLR) and drug induced apoptosis on PBMC from human blood-donors	*In vitro*	[RD-2006-00916]	4.2.1.2-1
Lack of anti-proliferative efficacy for NVP-BAF312 on mouse splenocytes	Mixed lymphocyte reaction (MLR) using single spleen cell suspensions from 2 different mouse strains	*In vitro*	[RD-2006-00909]	4.2.1.2-2
Lack of hematotoxic effect *in vitro* for NVP-BAF312	Mouse bone marrow proliferation assay	*In vitro*	[RD-2006-00891]	4.2.1.2-3
In vitro secondary pharmacology profile of BAF312	Off-target binding and/or functional potency on 98 pharmacological targets (including GPCRs, transporters, ion channels, nuclear receptors and enzymes).	*In vitro*	[RD-2006-50780]	4.2.1.2-4
In vitro secondary pharmacology profile of M3 (NVP-LNL925, HE-07-MS35)	Off-target binding and/or functional potency on 124 pharmacological targets (including GPCRs, transporters, ion channels, nuclear receptors and enzymes).	*In vitro*	[RD-2016-00545]	4.2.1.2-5
In vitro secondary pharmacology profile of M17 (NVP-LYS815)	Off-target binding and/or functional potency on 56 pharmacological targets (including GPCRs, transporters, ion channels, nuclear receptors and enzymes).	*In vitro*	[RD-2016-00166]	4.2.1.2-6
In vitro secondary pharmacology profile of M16 (NVP-LYG778)	Off-target binding and/or functional potency on 56 pharmacological targets (including GPCRs, transporters, ion channels, nuclear receptors and enzymes).	*In vitro*	[RD-2016-00167]	4.2.1.2-7
Kinase Profiling Report	Off-target binding and/or functional potency on 19 protein kinases.	*In vitro*	[RD-2019-00121]	4.2.1.2-14
>*In vivo* 薬理試験				
Efficacy for NVP-BAF312 on Tcell-dependent B cell responses in the mouse	DNP-KLH immunization induced IgM/IgG responses	Daily oral - 1 week (0.3, 1, 3, 10, 30 mg/kg/d)	[RD-2007-00983]	4.2.1.2-8
Lack of inhibitory effect for NVP-BAF312 on primary vaccination and recall responses in non-human primates	Tetanus toxoid vaccination and boost induced IgG responses	Daily oral - 3 weeks (3 mg/kg/d)	[RD-2009-00982]	4.2.1.2-9

試験の種類	試験系 又はプロトコール	投与方法	試験番号	CTD における 記載箇所
Weak efficacy for NVP-BAF312 on T cell-independent responses in the mouse	TNP-LPS immunization induced IgM/IgG responses	Daily oral - 5 days (0.003, 0.03, 0.3, 3 mg/kg/d)	[RD-2008-00141]	4.2.1.2-10
NVP-BAF312-induced capillary leakage in the mouse lungs	Tissues-levels of plasma-protein bound Evans Blue dye	Single doses (0.03, 0.1, 0.3, 1, 3, 10, 30 mg/kg)	[RD-2007-00671]	4.2.1.2-11
Protective effect for NVP-BAF312 on VEGF-induced vessel leakage in the mouse	VEGF-induced microvascular permeability in the mouse ear	Daily oral - 4 weeks (30 mg/kg/d)	[RD-2006-00778]	4.2.1.2-12
Lack of impact for NVP-BAF312 on Blood Retina Barrier (BRB) in the rat	MRI monitoring of treatment induced BRB changes	Daily oral - 1-3 months (10, 30 mg/kg)	[RD-2006-00569]	4.2.1.2-13
安全性薬理試験	2.6.3.4 項参照			
薬力学的薬物相互作用試験	2.6.3.5 項参照			

2.6.3.2　薬効を裏付ける試験

2.6.3.1 に記載

2.6.3.3　副次的薬理試験

2.6.3.1 に記載

2.6.3.4 安全性薬理試験

Organ systems evaluated	Species/ strain	Method of admin.	Doses (mg/kg) [a]	Gender and no. per group	Significant findings	Report number	Location in CTD
In vitro							
Cardio-vascular: hERG channel	HEK293 cell	*In vitro*	10 µM	NA	10 µM: 5.4% inhibition	[0419050]	4.2.1.3-1
Cardio-vascular: hERG channel	HEK293 cell	*In vitro*	10, 25 µM	NA	10 µM: no inhibition 25 µM: 9 % inhibition	[0616809][b]	4.2.1.3-2
Cardio-vascular	Isolated heart, Rabbit	*In vitro*	0.1, 0.3, 1, 3, 10 µM	3	No effects on action potential parameters.	[0518509]	4.2.1.3-3
Cardio-vascular	Isolated heart, Rabbit	*In vitro*	0.1, 0.3, 1, 3, 10 µM	6	Mild, dose-dependent increase on cycle length at 3 and 10 µM in 2/6 experiments. No effect on coronary flow up to 10 µM.	[RD-2005-00624]	4.2.1.3-4
Cardio-vascular	Isolated rabbit aorta and coronary artery	*In vitro*	0.5 µM to 100 mM	3	BAF312 didn't elicit vasoconstriction in the coronary artery or thoracic aorta.	[1170645]	4.2.1.3-5
Cardio-vascular: GIRK channel	Atrial myocytes Guinea pig	*In vitro*	0.1, 1, 3, 10 µM	4	GIRK activation of 3.2, 22.9, 56.4 and 61.7% at 0.1, 1, 3 and 10 µM, respectively (normalized against maximal GIRK current induced by 20 µM acetylcholine).	[RD-2006-00780]	4.2.1.3-6
Cardio-vascular: GIRK channel	Atrial myocytes Guinea pig	*In vitro*	1 µM	4	One-hour preincubation with 1 µM BAF312 followed by 3-hour washout time almost totally prevented GIRK channel activation (2.1% normalized against maximal GIRK current induced by 20 µM carbachol).	[RD-2010-00781]	4.2.1.3-7
Cardio-vascular: GIRK channel	Atrial myocytes Human	*In vitro*	0.01, 0.1, 1, 10, 100, 1000 nM	4	BAF312 dose-dependently increased GIRK current amplitude; EC50 = 15.8 nM.	[1170416]	4.2.1.3-8

2.6.3.4 安全性薬理試験（続き）

Organ systems evaluated	Species/ strain	Method of admin.	Doses (mg/kg) [a]	Gender and no. per group	Significant findings	Report number	Location in CTD
In vivo							
Cardio-vascular and respiratory	Rat/Wistar Hannover	Intravenous	0, 10	2M	No mortality and no clinical signs. Decrease in HR (sinus bradycardia), IAVD and VPC after injection; full recovery at 5 min No effect on respiration.	[0510072]	4.2.1.3-9
Cardio-vascular	Guinea pig/ Hartley Crl: HA	Intravenous (slow bolus)	0, 0.0003, 0.03, 0.3, 1.0	2 or 4M	≥ 0.03 mg/kg: decrease in mean arterial BP and HR, development of AV conduction abnormalities	[1070201]	4.2.1.3-10
Cardio-vascular	Guinea pig/ Hartley Crl: HA	Oral	0, 0.03, 0.3, 1.0	4M	≥ 0.03 mg/kg: Decreases in arterial BP, HR, pulse pressure and QTcB interval, second degree AV block, increase in PR interval, increases in instantaneous (SD1) and continuous (SD2) R-R interval variance	[1070382]	4.2.1.3-11
Cardio-vascular	Guinea pig/ Hartley Crl: HA	BAF312: oral Atropine: subcutaneous	BAF312: 0.3 Atropine: 0.1 (1 hour after BAF312 / 15 min before and 30 min after BAF312)	4M	BAF312: Decrease in arterial BP, HR and QTcB interval, second degree AV block Atropine administration 15 min before BAF312 prevented BAF312 effects on HR, QTcB interval and affected the occurrence of the AV block	[1070363]	4.2.1.3-12
Cardio-vascular	Guinea pig/ Hartley Crl: HA	BAF312: oral Atropine: subcutaneous	BAF312: 0.3 Atropine: 0.1 (4 doses with 15 min interval)	4M	Atropine alone: increase in HR, decreases in QA, PR intervals, pulse pressure and instantaneous (SD1) and continuous (SD2) R-R interval variance BAF312: decreases in arterial BP, HR, QTcB interval and SD1 Atropine after BAF312 dose: decreases in SD1 and SD2	[1170402]	4.2.1.3-13
Cardio-vascular	Guinea pig/ Hartley Crl: HA	BAF312: oral Atropine: subcutaneous	BAF312: 0.3 Atropine: 0.5 (2 doses 90 min and 150 min after BAF312 dose)	4M	BAF312: 1st dose: decrease in HR; 2nd dose: no substantive effect on HR Atropine: No effect on BAF312-induced HR decrease at 90 min after BAF312 dose.	[1370465]	4.2.1.3-14

2.6.3.4 安全性薬理試験（続き）

Organ systems evaluated	Species/ strain	Method of admin.	Doses (mg/kg) [a]	Gender and no. per group	Significant findings	Report number	Location in CTD
Cardio-vascular	Rabbits/New Zealand White	Intravenous infusion, Bolus	Infusion (accumulated dose): 0, 0.45, 0.9, 1.8 (3.15 in total) Bolus: 0, 0.3, 1	Infusion: 3 to 5 Bolus: 5 to 8	Infusion: significant but transient decrease in HR, arrhythmia (irregular heartbeat); minor increase in mean BP Bolus: pronounced decrease in HR at 1.0 mg/kg	[RD-2005-50312]	4.2.1.3-15
Cardio-vascular	Monkey/ Cynomolgus	Oral	60, 100	2M	100 mg/kg: decrease in HR, increase in QT interval, Second degree AV block in 1male	[0570044]	4.2.1.3-16
Cardio-vascular	Monkey/ Cynomolgus	Oral	0, 50, 150	4M	No effect on ECG or hemodynamic parameters	[0670305][b]	4.2.1.3-17
CNS	Rat/Wistar Hannover	Oral	0, 100, 200	10M	No neuropharmacological signs and no significant change in mean body temperature	[0670302][b]	4.2.1.3-18
Respiratory	Rat/Wistar Hannover	Oral	0, 100, 200	6M	≥100 mg/kg: slight increase in the tidal volume (1-1.25h post dose: up to 27% from the baseline) 200 mg/kg: slight decrease in respiratory rate (1-4h post dose: up to 22% from the baseline)	[0670301][b]	4.2.1.3-19
Respiratory	Rat/Brown Norway	BAF312: Oral Serotonin, metacholine, adenosine: intravenous	BAF312: 0, 30 Serotonin: 0.3, 1, 3, 10, 30 µg/kg Methacholine: 3, 10, 30 µg/kg Adenosine: 3 mg/kg	4M	No change in the sensitivity of the airways to serotonin, metacholine and adenosine	[RD-2006-01156]	4.2.1.3-20
Respiratory	Rat/Wistar Hannover	BAF312: Oral Serotonin, metacholine, adenosine: intravenous	BAF312: 30 (4weeks) Serotonin: 0.3, 1, 3, 10, 30 µg/kg Metacholine: 3, 10, 30 µg/kg Adenosine: 3 mg/kg	8M	Slight increase in baseline airway resistance and slight increase in the response to methacholine after 4 weeks, but not to Serotonin and adenosine.	[RD-2005-01357]	4.2.1.3-21

a = single dose unless specified otherwise. b = GLP

min = Minute; AV = atrioventricular; BP = Blood pressure; CNS = Central Nervous System; F = Female; GIRK = G protein-coupled inwardly rectifying K^+ channel; hERG=human ether-a go go-related gene; HR = Heart rate; IAVD = isorhythmic atrioventricular dissociation; M = male; NA = not applicable; SD1 = beat-to-beat variance of the R-R intervals; SD2 = long term continuous variance of all R-R intervals; VPC = ventricular premature complex

2.6.3.5　薬力学的薬物相互作用試験

実施していない