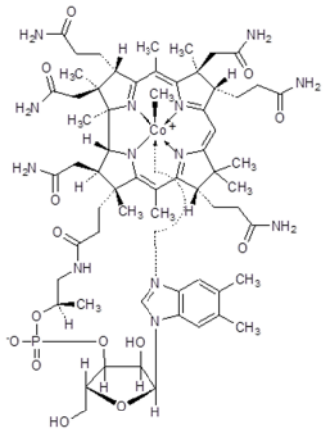
2.6 非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.1 緒言

メコバラミン（以下，本薬）は活性型ビタミン B_{12} である。エーザイ株式会社において末梢性神経障害及び巨赤芽球性貧血の治療剤として開発され，メチコバール®として販売されている。本薬の化学構造を図 2.6.1-1 に示す。

本薬はメチオニン合成酵素の補酵素として働き，生体内でホモシステインからメチオニンを合成する反応に関与している。本薬は，神経変性疾患における神経細胞障害に対して保護効果を持つことが示唆されているが，作用機序に関しては解明されていない。



化学名：
［日本名］*Co*α-[α-(5,6-ジメチル-1*H*-ベンズイミダゾール-1-イル)]-*Co*β-メチルコバミド
［英　名］*Co*α-[α-(5,6-Dimethyl-1*H*-benzimidazol-1-yl)]-*Co*β-methylcobamide

分子式：$C_{63}H_{91}CoN_{13}O_{14}P$

分子量：1344.38

図 2.6.1-1 メコバラミンの化学構造

本薬はエーザイが開発を進め，「メチコバール注射液 500 μg」として「末梢性神経障害」及び「ビタミン B_{12} 欠乏による巨赤芽球性貧血」の適応で承認・販売されている。

1990 年代後半より，厚生科学研究費補助金特定疾患対策研究事業の神経変性疾患に関する研究班において，高用量の本薬が筋萎縮性側索硬化症（ALS）患者に対して臨床効果を示すことが示唆されてきた。

本薬高用量の ALS の病態における作用機序は不明であるが，in vitro 及び in vivo において神経保護作用を有することから，ALS を含む神経変性疾患治療において有効であることを示唆している。

本薬の効能・効果（案）及び用法・用量（案）は以下のとおりである。

【効能・効果】筋萎縮性側索硬化症（ALS）における機能障害の進行抑制
【用法・用量】通常，成人にはメコバラミンとして 50 mg を，1 日 1 回，週に 2 回筋肉内に注射する

目次

2.6.2 薬理試験の概要文 3
2.6.2.1 まとめ 3
2.6.2.2 効力を裏付ける試験 6
2.6.2.3 副次的薬理試験 20
2.6.2.4 安全性薬理試験 20
2.6.2.5 薬力学的薬物相互作用試験 21
2.6.2.6 考察及び結論 21
2.6.2.7 図表 23
2.6.2.8 参考文献 23

薬理試験の概要文の略号一覧表

略号	省略していない表現（英語）	省略していない表現（日本語）
ALS	amyotrophic lateral sclerosis	筋萎縮性側索硬化症
APD	action potential duration	活動電位持続時間
CMAP	compound muscle action potential	複合筋活動電位
C_{max}	maximum observed concentration	最高血漿中濃度
$C_{ss,av}$	average steady-state concentration	定常状態における平均血漿中濃度
ES 細胞	embryonic stem cell	胚性幹細胞
GAD	gracile axonal dystrophy	簿束軸索ジストロフィー
H50	—	酸化ストレス（+）コントロール群の単位面積あたりの神経突起長の総和の最大値を 100%として，50%未満の値が初めて観察された時間
hERG	human ether-à-go-go related gene	ヒト ether-à-go-go 関連遺伝子
IC_{50}	50% inhibitory concentration	50%阻害濃度
iPS 細胞	induced pluripotent stem cell	人工多能性幹細胞
MAX	—	単位面積あたりの神経突起長の総和の最大値
NADH	nicotinamide adenine dinucleotide	—
Nbtd	4-nitro-2,1,3-benzothiadiazole	—
NMDA	*N*-methyl-D-aspartate	*N*-メチル-D-アスパラギン酸
NSC-34	Mouse Motor Neuron-Like Hybrid Cell Line	マウス運動神経と神経芽細胞腫のハイブリッド細胞株
NSC-34D	differentiated form of a motor NSC-34 cell line	分化した NSC-34
SAM	*S*-adenosylmethionine	*S*-アデノシルメチオニン
SD	Sprague Dawley	—
SOD1	Cu/Zn superoxide dismutase	—
Tg	transgenic	トランスジェニック

2.6.2 薬理試験の概要文

2.6.2.1 まとめ

メコバラミンは，日本では末梢性神経障害及び巨赤芽球性貧血の治療剤として使用されてきた。メコバラミンの筋萎縮性側索硬化症（ALS）の病態における作用機序に関しては解明されていないが，神経変性疾患において効果を示すことが示唆されている。

効力を裏付ける試験の社内研究として，ヒト人工多能性幹細胞（iPS 細胞）から分化させた運動神経を用いた酸化ストレスによる運動神経細胞傷害に対する本薬の保護効果，G93A 変異 Cu/Zn superoxide dismutase（SOD1）発現アストロサイトによるマウス運動神経細胞死に対する本薬の保護効果及び ALS モデル動物 G93A 変異 SOD1 トランスジェニック（Tg）マウスにおける本薬の延命効果を検討した。

効力を裏付ける試験の論文報告として，ラット培養網膜神経細胞及び大脳皮質神経細胞におけるグルタミン酸及びニトロプルシドナトリウム誘発神経細胞死に対する保護効果，ラット培養小脳顆粒細胞における軸索伸展促進作用，運動神経様に分化したマウス NSC-34D 細胞におけるホモシステイン誘発細胞死に対する保護効果，簿束軸索ジストロフィー（GAD）マウスの運動神経終末の変性に対する神経再生作用，ラットアクリルアミド神経障害モデルにおける神経再生作用及び ALS モデル動物である wobbler マウスにおける神経保護効果が報告されている。

安全性薬理試験として，中枢神経系，心血管系及び呼吸系に対する影響について評価した。

2.6.2.1.1 効力を裏付ける試験

(1) 作用機序

メコバラミンは，図 2.6.2-1 に示すように，ヒト生体内において，ホモシステインからメチオニンを合成するメチオニン合成酵素の補酵素として働き，葉酸及びアミノ酸代謝や DNA のメチル化等に寄与する。

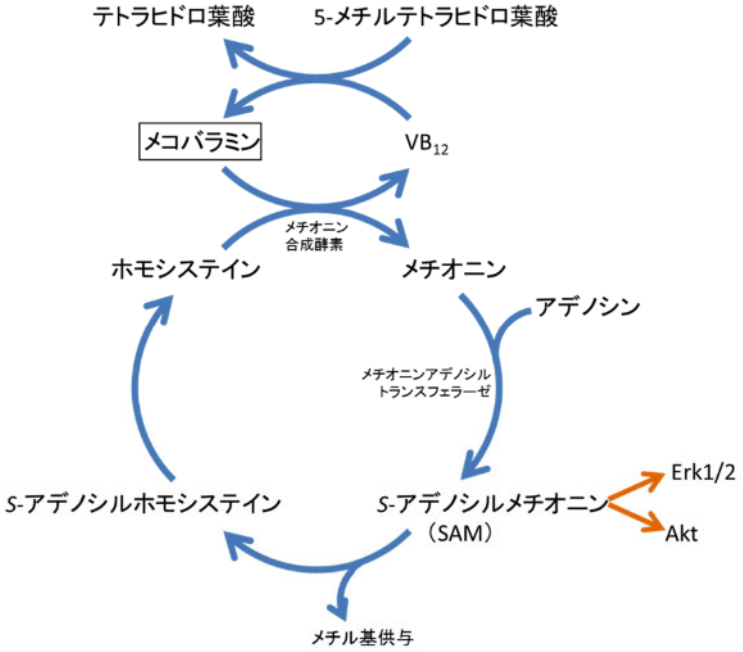


図 2.6.2-1 メコバラミンの生体内変換

メチオニンとアデノシンの縮合により *S*-アデノシルメチオニン（SAM）が生成するが，SAM は種々のメチル化反応におけるメチル基供与体として働き，酸化ストレスによるタンパク質のダメージの修復時にもメチル基供与体として働く（Ingrosso D, et al., 2000）。SAM は，ALS 患者の赤血球において約半分に低下していることが報告されている（D'Angelo S, et al., 2013）。メコバラミンの神経変性疾患に対する作用機序の詳細は不明であるが，SAM によるメチル化を介した細胞膜の性質変化によると示唆される。さらに，メコバラミンによる神経軸索伸展促進作用は，Erk1/2 及び Akt のリン酸化阻害剤で抑制されたが，SAM 添加により Erk1/2 及び Akt のリン酸化が増加することから，メコバラミンは SAM を介して Erk1/2 及び Akt のリン酸化を増加させて神経軸索を伸展すると考えられた。

また，ホモシステインは，血液中に含まれるアミノ酸の一つであるが，神経変性にかかわると考えられており，ALS 患者で増えていることが報告されている（Zoccolella S, et al., 2008; Valentino F, et al., 2010; Zoccolella S, et al., 2010）。NSC-34D 細胞において，メコバラミンはホモシステイン誘発アポトーシス及びカスパーゼ 3/7 活性を抑制した。図 2.6.2-1 に示すように，メコバラミンはホモシステインからメチオニンを合成するメチオニン合成酵素の補酵素として働くことにより，ALS におけるホモシステイン誘発細胞死を抑制すると考えられる。

(2) 細胞保護効果

効力を裏付ける試験の一覧を表 2.6.2-1，表 2.6.2-2 に示す。

表 2.6.2-1　in vitro 試験の一覧

in vitro 試験	細胞	濃度	結果
酸化ストレスに対する保護作用（2.6.2.2.1 ）	ヒト iPS 細胞由来運動神経細胞	メコバラミン：0.1，0.3，1 μmol/L エダラボン：3，10，30 μmol/L リルゾール：0.1，1，10 μmol/L	抗酸化剤を含まない培地中で培養して酸化ストレスを与えた。メコバラミン（0.1，0.3，1 μmol/L），エダラボン（3，10，30 μmol/L）及びリルゾール（10 μmol/L）処置により H50 はコントロール群に比較して有意に増加した。
G93A 変異 SOD1 発現アストロサイト誘発細胞死（2.6.2.2.2 ）	ヒト変異 SOD1(G93A) 導入マウスアストロサイト，マウス ES 細胞を分化させた運動神経細胞	メコバラミン：0.001～0.1 μmol/L	メコバラミンは，0.01 μmol/L 以上で濃度依存的に保護作用を示した。
グルタミン酸誘発細胞死（2.6.2.2.3 ）	ラット培養網膜神経細胞	メコバラミン：0.01～10 μmol/L SAM：1 μmol/L	メコバラミンは，0.01 μmol/L 以上で保護作用を示した。SAM も保護効果を示した。
グルタミン酸誘発細胞死（2.6.2.2.4 ）	ラット培養大脳皮質神経細胞	メコバラミン：0.01～10 μmol/L SAM：0.01～10 μmol/L	メコバラミン，SAM とも濃度依存的に保護効果を示した。
NMDA 誘発細胞死（2.6.2.2.4 ）	ラット培養大脳皮質神経細胞	メコバラミン：10 μmol/L	メコバラミンは，保護作用を示した。

in vitro 試験	細胞	濃度	結果
ニトロプルシドナトリウム誘発細胞死（2.6.2.2.3 ）	ラット培養網膜神経細胞	メコバラミン：1 μmol/L SAM：1 μmol/L	メコバラミン，SAM とも保護効果を示した。
ニトロプルシドナトリウム誘発細胞死（2.6.2.2.4 ）	ラット培養大脳皮質神経細胞	メコバラミン：10 μmol/L SAM：0.01～10 μmol/L	メコバラミン，SAM とも保護効果を示した。
神経軸索伸展（2.6.2.2.5 ）	ラット培養小脳顆粒細胞	メコバラミン：0.001～100 μmol/L SAM：10 μmol/L	メコバラミンは，0.1 μmol/L 以上で軸索伸展促進作用を示した。SAM も軸索伸展促進作用を示した。
ホモシステイン誘発細胞死（2.6.2.2.6 ）	NSC-34D 細胞	メコバラミン：0.01～10 μmol/L	メコバラミンは，1 μmol/L 以上で保護作用を示した。

ES 細胞 ＝ 胚性幹細胞，H50＝ 酸化ストレス（+）コントロール群の単位面積あたりの神経突起長の総和の最大値を 100%として，50%未満の値が初めて観察された時間，iPS 細胞 ＝ 人工多能性幹細胞，NSC-34D 細胞 ＝ 運動神経細胞様に分化させたマウス運動神経と神経芽細胞腫のハイブリッド細胞株，SAM＝*S*-アデノシルメチオニン.

表 2.6.2-2　in vivo 試験の一覧

in vivo 試験	動物	投与量（投与経路）	結果
ALS モデル動物（2.6.2.2.7 ）	G93A 変異 SOD1 Tg マウス	メコバラミン：10 mg/kg，死亡時まで（皮下） リルゾール：100 μg/mL，死亡時まで（飲水）	メコバラミン投与群及びリルゾール投与群は，反応個体数，生存日数，発症後生存日数ともに媒体群に比べ増加させたが，統計学的有意差はなかった。
ALS モデル動物（2.6.2.2.8 ）	Wobbler マウス	メコバラミン：3, 30 mg/kg，4 週間（腹腔内）	メコバラミンの 30 mg/kg 投与群は，前肢の握力低下を抑制し，二頭筋重量及び有髄線維数を有意に増加させた。
運動神経終末の変性（2.6.2.2.9 ）	GAD マウス	メコバラミン：1 mg/kg，25 日間（経口）	メコバラミン投与群は，運動神経終末の周囲長を増加させた。
アクリルアミド末梢神経障害モデル（2.6.2.2.10 ）	Wistar ラット	メコバラミン：50, 500 μg/kg，1 週間に 5 回，12～13 週間（腹腔内）	メコバラミン 500 μg/kg 投与群は，CMAP の振幅減少を回復させた。

CMAP ＝ 複合筋活動電位，GAD＝ 簿束軸索ジストロフィー.

2.6.2.1.2 安全性薬理試験

メコバラミンの安全性薬理試験として，中枢神経系に対する影響については，ラットにおける筋肉内投与試験を実施した。心血管系に対する影響については，ヒト ether-à-go-go 関連遺伝子（hERG）チャネルを発現した HEK293 細胞や摘出モルモット乳頭筋標本を用いた電気生理学的 in vitro 試験を実施した。また，心血管系及び呼吸系に対する影響について，テレメトリーを装着した覚醒犬を用いた筋肉内投与による試験を実施した。

その結果，中枢神経系の一般症状及び行動では，16 mg/kg まで影響は認められなかった。心血管系への影響について，10 μmol/L で hERG 末尾電流を 24.6%阻害した。摘出モルモット乳頭

筋においては，各活動電位パラメータに対して 10 µmol/L で影響は認められなかった。覚醒イヌでは，血圧，心拍数及び心電図に対して 10 mg/kg で影響は認められなかった。呼吸系では，10 mg/kg で呼吸数及び血液ガスパラメータに影響は認められなかった。

以上，安全性薬理試験において，中枢神経系，心血管系及び呼吸系に対して，有害作用は認められなかった。

2.6.2.2 効力を裏付ける試験

2.6.2.2.1 ヒト iPS 細胞由来運動神経細胞における酸化ストレスに対する保護作用（添付資料 4.2.1.1.10［試験番号 CCNS-ES-ROS001］）

ヒト iPS 細胞由来運動神経細胞を用い，抗酸化剤を含まない培地で培養して誘導した酸化ストレスに対するメコバラミンの効果を検討した。同時に，国内で ALS に適応を持つエダラボン及びリルゾールの効果と比較した。

抗酸化剤を含まない培地中（酸化ストレス［+］）で，メコバラミン（0.1, 0.3, 1 µmol/L），エダラボン（3, 10, 30 µmol/L）及びリルゾール（0.1, 1, 10 µmol/L）存在下，健常ヒト iPS 細胞由来分化神経細胞である iCell®運動神経細胞を 96 ウェルプレートに 15×10^3 cells/well で播種し，36.5 °C, 5% CO_2 雰囲気下で培養した。酸化ストレスを与えないコントロール群（酸化ストレス［–］）は，抗酸化剤を含む培地中で培養した。培養開始時を起点として 6 時間間隔で撮像を行った。単位面積あたりの神経突起長の総和を計測し，各ウェルの最大値（MAX 値）を算出した。酸化ストレス（+）コントロール群の MAX 値を 100%として，50%未満の値が初めて観察された時間を H50 値として算出した。図 2.6.2-2 に神経突起長の経時推移を示す。



図 2.6.2-2　ヒト iPS 細胞を分化させた運動神経細胞における酸化ストレスによる神経突起長の経時推移

(A)は，Stress (+)群と Stress (–)群を示す。(B)(C)及び(D)は，Stress (+)群と Stress (–)群に加え，それぞれメコバラミン（0.1, 0.3, 1 μmol/L）群，エダラボン（3, 10, 30 μmol/L）群及びリルゾール（0.1, 1, 10 μmol/L）群を示す。Stress (–) = 抗酸化剤を含む培地で培養したコントロール群，Stress (+) = 抗酸化剤を含まない培地で培養したコントロール群．なお化合物添加群は抗酸化剤を含まない培地で培養した。データは 4 回の実験（1 実験あたり 3～6 ウェル）の平均値と標準誤差で示す。添付資料 4.2.1.1.10［試験番号 CCNS-ES-ROS001］の Figure 5 を引用。

表 2.6.2-3 に示すように，酸化ストレス（+）処置群の MAX 値は，メコバラミン及びエダラボン処置によって有意な違いを示さなかった。酸化ストレス（+）処置群の H50 値は，メコバラミン（0.1, 0.3, 1 μmol/L），エダラボン（3, 10, 30 μmol/L）及びリルゾール（10 μmol/L）処置により有意に増加した。

表 2.6.2-3　ヒト iPS 細胞を分化させた運動神経細胞における神経突起長の比較

薬物(μmol/L)	–	メコバラミン			エダラボン			リルゾール			–
		0.1	0.3	1	3	10	30	0.1	1	10	
酸化ストレス	+										–
MAX (mm/mm^2)	31.6 ±1.7	32.4 ±1.0	31.1 ±1.4	30.3 ±0.8	32.9 ±1.4	31.6 ±0.7	31.5 ±1.2	31.8 ±0.6	28.0 ±0.8**	29.5 ±0.7	36.5 ±1.8****
H50 (hr)	167 ±2	184 ±7***	201 ±13****	259 ±11****	177 ±3***	184 ±2****	206 ±3****	170 ±2	168 ±3	177 ±4****	336 ±0****

データは 4 回の実験（1 実験あたり 3～6 ウェル）の平均値と標準誤差で示す。MAX = 単位面積あたりの神経突起長の総和の最大値，H50 = 酸化ストレス（+）コントロール群の MAX 値を 100%として，50%未満の値が初めて観察された時間．** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$, **** $P \leq 0.0001$ は酸化ストレス（+）コントロール群に対して二元配置分散分析後，Dunnett 型多重比較検定により解析した。出典：添付資料 4.2.1.1.10［試験番号 CCNS-ES-ROS001］。

図 2.6.2-3 に，1 回目実験の培養開始から 168 時間後の代表的な画像を示す。

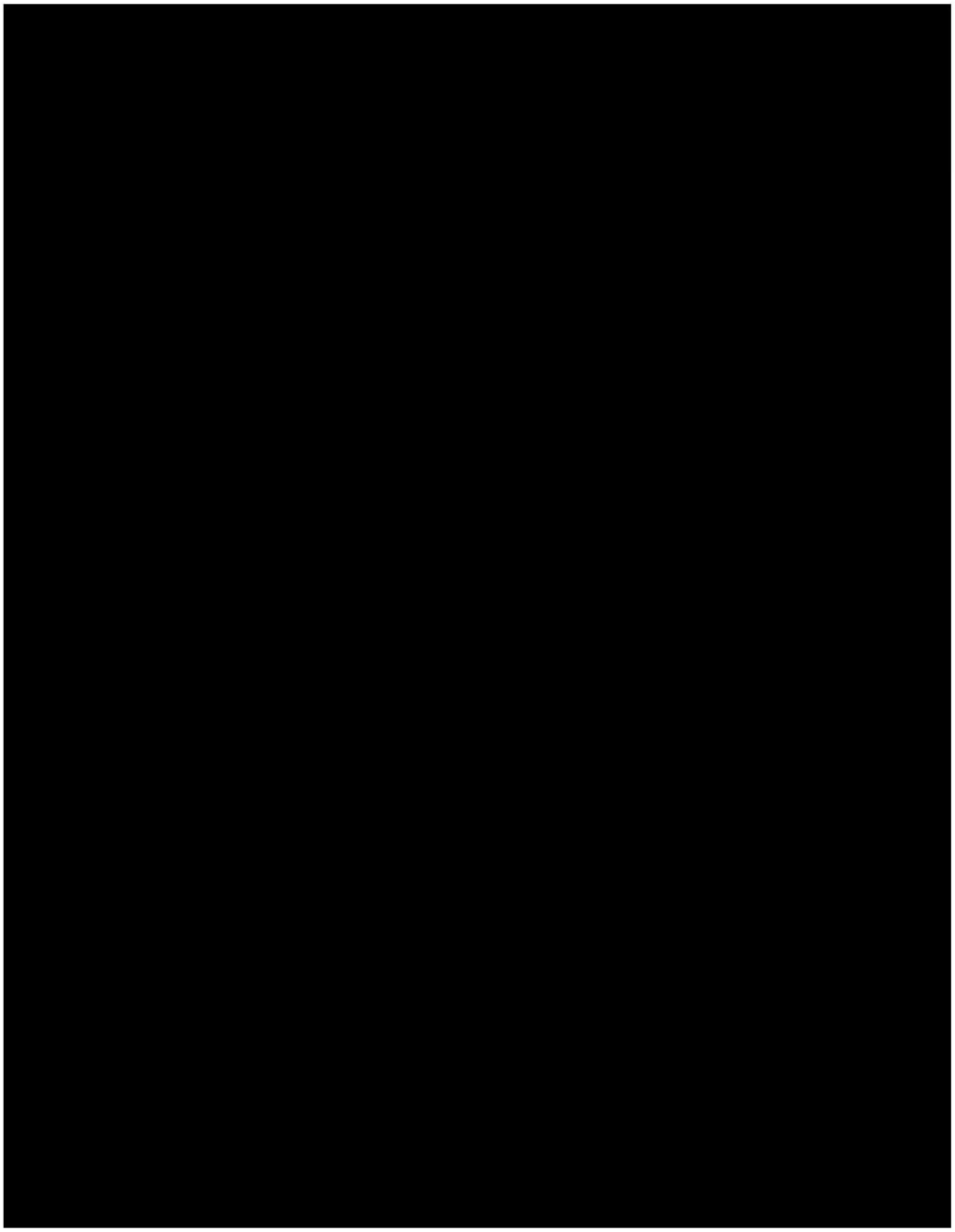


図 2.6.2-3 ヒト iPS 細胞を分化させた運動神経細胞の画像

1 回目実験の培養開始から 168 時間後の代表的な画像を示す。Oxidative Stress (–) = 抗酸化剤を含む培地で培養したコントロール群，Oxidative Stress (+) = 抗酸化剤を含まない培地で培養したコントロール群． なお化合物添加群は抗酸化剤を含まない培地で培養した。添付資料 4.2.1.1.10［試験番号 CCNS-ES-ROS001］の Appendix Figure 1 を引用。

以上より，ヒト iPS 細胞由来運動神経細胞において，メコバラミン（0.1，0.3，1 μmol/L）は，抗酸化剤非添加による酸化ストレス誘発神経突起傷害を有意に抑制した。

2.6.2.2.2 G93A 変異 SOD1 発現アストロサイトによる運動神経細胞死に対するメコバラミンの保護作用（添付資料 4.2.1.1.1［参考］［試験番号 KAN14001］）

家族性 ALS 原因遺伝子の一つであるヒト変異 SOD1（G93A）導入マウスから調製したアストロサイトとマウス ES 細胞から分化させた運動神経細胞を共培養すると，運動神経細胞死が確認された。この運動神経細胞死に対するメコバラミンの効果を検討した。

フィーダー細胞としてマウス胎児線維芽細胞を組織培養シャーレで 1 日間培養後，マウス ES 細胞を添加しコンフルエントになるまで培養した。ES 細胞をトリプシン/EDTA で剥離し，12 ウェルプレートで 2 日間浮遊培養後，レチノイン酸（1 μmol/L）と purmorphamine（2 μmol/L）を添加して 5 日間培養し運動神経細胞に分化させた。分化させた運動神経細胞塊を分散溶液 Accumax で分散後，8 ウェルマイクロスライドチャンバーで 1 日間培養したアストロサイトの上に添加し，メコバラミン（0，1，10，100 nmol/L）とともに 2 日間培養した。アストロサイトは，ヒト変異 SOD1（G93A）導入マウス（B6.Cg-Tg[SOD1*G93A]1Gur/J，2 日齢）の大脳皮質から調製した。なお正常コントロールとして，野生型マウス（C57BL/6J，2 日齢）から調製したアストロサイトを用いた。2 日間培養後，細胞を 4%パラホルムアルデヒドで固定し，Hoechst33342（核染色）と抗 ISL1 抗体（運動神経のマーカー）を用いて 2 重染色した。生存細胞数として，Hoechst33342 と抗 ISL1 抗体で共染色された細胞数をカウントした。

その結果，G93A 変異 SOD1 発現アストロサイトによる運動神経細胞死に対して，メコバラミンは濃度依存的に保護効果を示した。

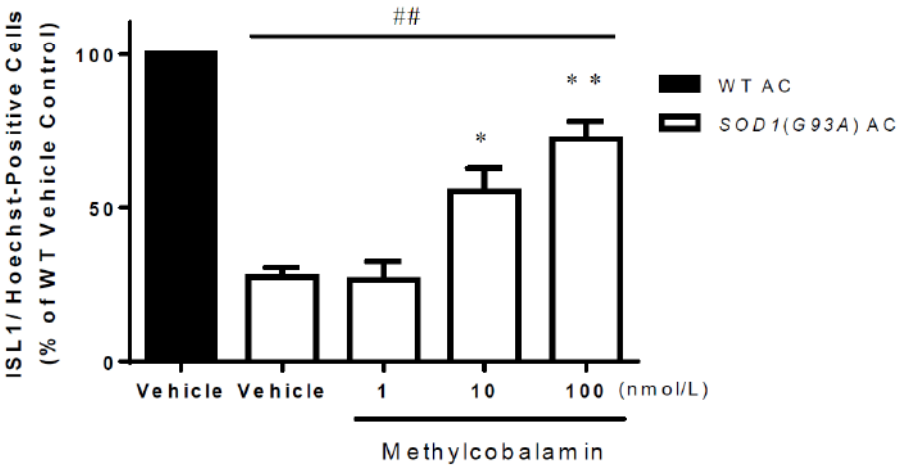


図 2.6.2-4　G93A 変異 SOD1 発現アストロサイトによる運動神経細胞数の減少に対するメコバラミンの抑制効果

ISL1/Hoechst-Positive Cells (% of WT Vehicle Control)

$$= \frac{\text{SOD1(G93A)AC ウェルの ISL1/Hoeschst33342 共染色細胞数（平均値）}}{\text{SOD1WT AC ウェルの ISL1/Hoeschst33342 共染色細胞数（平均値）}} \times 100$$

AC＝アストロサイト，Hoechst＝Hoechst33342，WT＝野生型。データは 3 回の実験の平均値±標準誤差を示す。* P<0.05，** P<0.01 はメコバラミン非添加群（白カラム）に対して，Dunnett 検定により解析した。## P<0.001 は SOD1(G93A)AC 群におけるメコバラミンの濃度依存性を回帰分析により解析した。添付資料 4.2.1.1.1［参考］［試験番号 KAN14001］の Figure 1 から作図。

以上より，家族性 ALS 原因遺伝子の一つである変異 SOD1（G93A）により惹き起こされる運

動神経細胞死に対し，メコバラミンは保護効果を示すことが確認された。なお，変異 SOD1（G93A）による家族性 ALS の発症メカニズムはまだ十分には解明されていないが，G93A 変異 SOD1 発現アストロサイトが何らかの神経毒性因子を遊離することにより細胞の興奮性を上げて細胞傷害を惹き起こすことが報告されている（Fritz E, et al., 2013）。

2.6.2.2.3 培養網膜神経細胞におけるグルタミン酸他誘発細胞死に対するメコバラミンの保護作用（添付資料 4.2.1.1.2［参考］［Kikuchi M, et al., 1997］）

ラット培養網膜神経細胞におけるグルタミン酸誘発細胞死に対するメコバラミン及び SAM の効果が報告されている。図 2.6.2-1 に示すように，SAM はヒト生体内において，メチオニンとアデノシンの縮合により生成し，種々のメチル化反応におけるメチル基供与体として働く。

ラット胎児（胎生 16～19 日）の網膜から調製し 10～12 日間培養した網膜神経細胞の培地中にグルタミン酸（1 mmol/L）を 10 分間加えた後，グルタミン酸を除いた培地中で 1 時間培養した。メコバラミン（0.01～10 μmol/L）又は SAM（1 μmol/L）は，培養開始直後からグルタミン酸添加直前まで培地中に加えた。細胞死は，トリパンブルーにより死細胞を染色することで定量的に評価した。

グルタミン酸誘発神経細胞死に対するメコバラミンの効果を図 2.6.2-5 に示す。メコバラミンは，0.01 から 10 μmol/L で濃度依存的に保護作用を示した。同様に SAM も，グルタミン酸誘発神経細胞死に対して保護作用を示した。なお，メコバラミンをグルタミン酸添加の 48 又は 96 時間前から培地中に加えた場合も有意な保護効果を示したが，メコバラミンをグルタミン酸添加と同時以降に加えた場合は保護効果を示さなかった。

同様に，一酸化窒素を放出するニトロプルシドナトリウム（1 mmol/L）誘発神経細胞死に対してメコバラミン（1 μmol/L）及び SAM（1 μmol/L）が保護作用を示したことが報告されている。

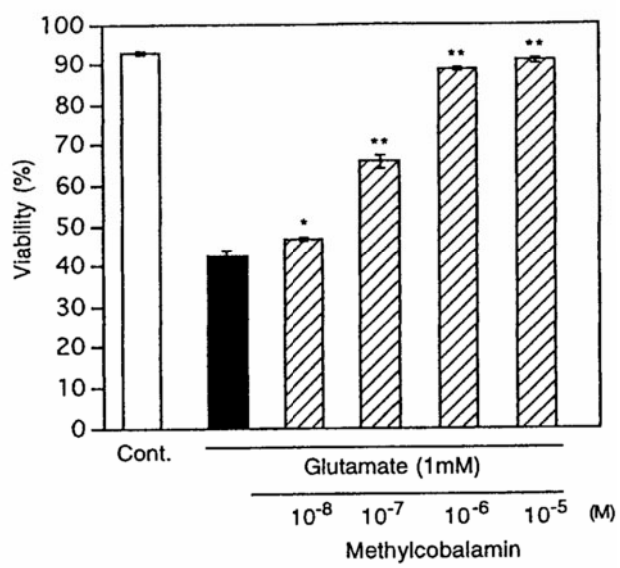


図 2.6.2-5 ラット培養網膜神経細胞におけるグルタミン酸誘発細胞死に対するメコバラミンの保護効果

培養神経細胞は 1 mmol/L のグルタミン酸に 10 分間暴露し，その後グルタミン酸を含まない培地で 1 時間培養した。データは平均値±標準誤差（5 例）を示す。* $P<0.05$，** $P<0.01$ はメコバラミン非添加群（黒カラム）に対して，Dunnett 検定により解析した。添付資料 4.2.1.1.2［参考］［Kikuchi M, et al., 1997］の Figure 3 から作図。

以上より，メコバラミンは，培養網膜神経細胞におけるグルタミン酸及びニトロプルシドナトリウム誘発神経細胞死を抑制することが示された。これらの作用の正確な機序は不明であるが，SAM によるメチル化を介した細胞膜の性質の変化により生じたと示唆される。

2.6.2.2.4 培養大脳皮質神経細胞におけるグルタミン酸他誘発細胞死に対するメコバラミンの保護作用（添付資料 4.2.1.1.3［参考］［Akaike A, et al., 1993］）

培養大脳皮質神経細胞におけるグルタミン酸誘発細胞死に対するメコバラミン及び SAM の効果が報告されている。

ラット胎児（胎生 16-18 日）の大脳皮質から調製し 10～12 日間培養した大脳皮質神経細胞の培地中にグルタミン酸（1 mmol/L）を 10 分間加えた後，グルタミン酸を除いた培地中で 1 時間培養した。メコバラミン（0.01～10 μmol/L）又は SAM（0.01～10 μmol/L）は，培養開始直後からグルタミン酸添加直前まで培地中に加えた。細胞死は，トリパンブルーにより死細胞を染色することで定量的に評価した。

グルタミン酸誘発神経細胞死に対するメコバラミンの効果を図 2.6.2-6 に示す。メコバラミンはグルタミン酸誘発神経細胞死に対して濃度依存的に保護作用を示した。同様に SAM も，グルタミン酸誘発神経細胞死に対して濃度依存的に保護作用を示した。なお，メコバラミン又は SAM をグルタミン酸添加と同時以降に加えた場合は保護効果を示さなかった。

同様に，*N*-メチル-D-アスパラギン酸（NMDA; 1 mmol/L）誘発細胞死に対するメコバラミン（10 μmol/L）の効果が報告されている。メコバラミンは，NMDA 誘発神経細胞死に対して保護作用を示した。

さらに，ニトロプルシドナトリウム（0.5 mmol/L）誘発神経細胞死に対するメコバラミン（10 μmol/L）及び SAM（0.01～10 μmol/L）の効果が報告されている。メコバラミン及び SAM は，ニトロプルシドナトリウム誘発神経細胞死に対して保護作用を示した。

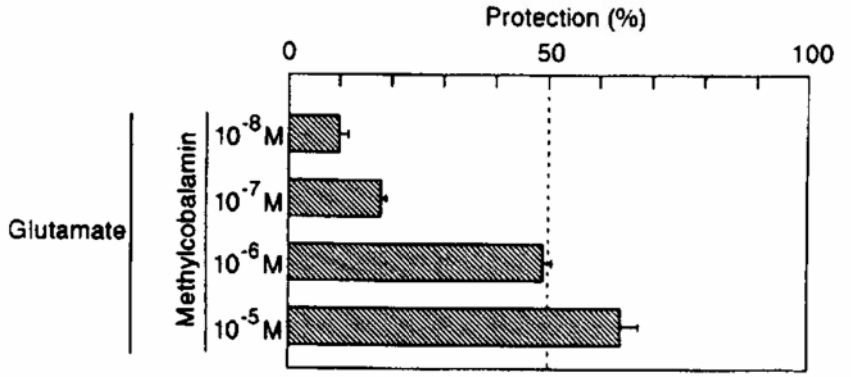


図 2.6.2-6　ラット培養大脳皮質神経細胞におけるグルタミン酸誘発細胞死に対するメコバラミンの保護効果

培養神経細胞は 1 mmol/L のグルタミン酸に 10 分間暴露し，その後グルタミン酸を含まない培地で 1 時間培養した。データは平均値±標準誤差（5～10 例）を示す。添付資料 4.2.1.1.3［参考］［Akaike A, et al., 1993］の Figure 3 から作図。

以上より，メコバラミン及び SAM は，培養大脳皮質神経細胞におけるグルタミン酸，NMDA，及びニトロプルシドナトリウム誘発神経細胞死を抑制することが示された。これらの作用の正確な機序は不明であるが，SAM によるメチル化を介した細胞膜の性質の変化により生じたと示唆される。

2.6.2.2.5 小脳顆粒細胞におけるメコバラミンの軸索伸展効果（添付資料 4.2.1.1.4［参考］［Okada K, et al., 2010］）

メコバラミンによる神経軸索伸展の作用機序について報告されている。小脳顆粒細胞は，Wistar ラット（生後 9 日齢）より調製した。軸索長測定実験では，メコバラミン（1 nmol/L～100 μmol/L）存在下，72 時間培養した。なお，軸索長として，それぞれの神経の最も長い突起の長さを測定した。Erk1/2 のリン酸化阻害剤 U0126（10 μmol/L），Akt のリン酸化阻害剤 LY294002（50 μmol/L），メチオニン合成阻害剤 Nbtd（1 μmol/L）及び SAM（10 μmol/L）は，メコバラミンと同時に 72 時間培養液中に加えた。

さらに，Erk1/2 及び Akt のリン酸化におけるメコバラミンの機序を解明するために，Nbtd（1 μmol/L）及び SAM（10 μmol/L）の効果が検討された。Erk1/2 及び Akt のリン酸化は，メコバラミン（10 μmol/L）添加の 10 分後，ウエスタンブロットにより定量した。Nbtd 及び SAM は，メコバラミンと同時に 10 分間培養液中に加えた。

軸索長測定実験の結果を図 2.6.2-7 に示す。メコバラミンは 0.1 μmol/L から小脳顆粒細胞の軸索伸展を促進した（図 2.6.2-7 A）。メコバラミンによる軸索伸展は，U0126，LY294002 及び Nbtd の存在下で抑制された（図 2.6.2-7 B, C）。SAM は，メコバラミンと同様に軸索伸展を促進

した（図 2.6.2-7 C）。

また，Erk1/2 及び Akt のリン酸化における結果を図 2.6.2-8 に示す。メコバラミンにより Erk1/2 及び Akt のリン酸化が増加すること，Erk1/2 及び Akt のリン酸化増加は Nbtd により阻害されること，SAM 添加により Erk1/2 及び Akt のリン酸化が増加することが確認された。

以上より，メコバラミンによる軸索伸展には，Erk1/2 及び Akt のリン酸化が関与することが示唆された。図 2.6.2-1 に示すように，メコバラミンは SAM を介して Erk1/2 及び Akt のリン酸化を増加させて神経軸索を伸展すると考えられる。

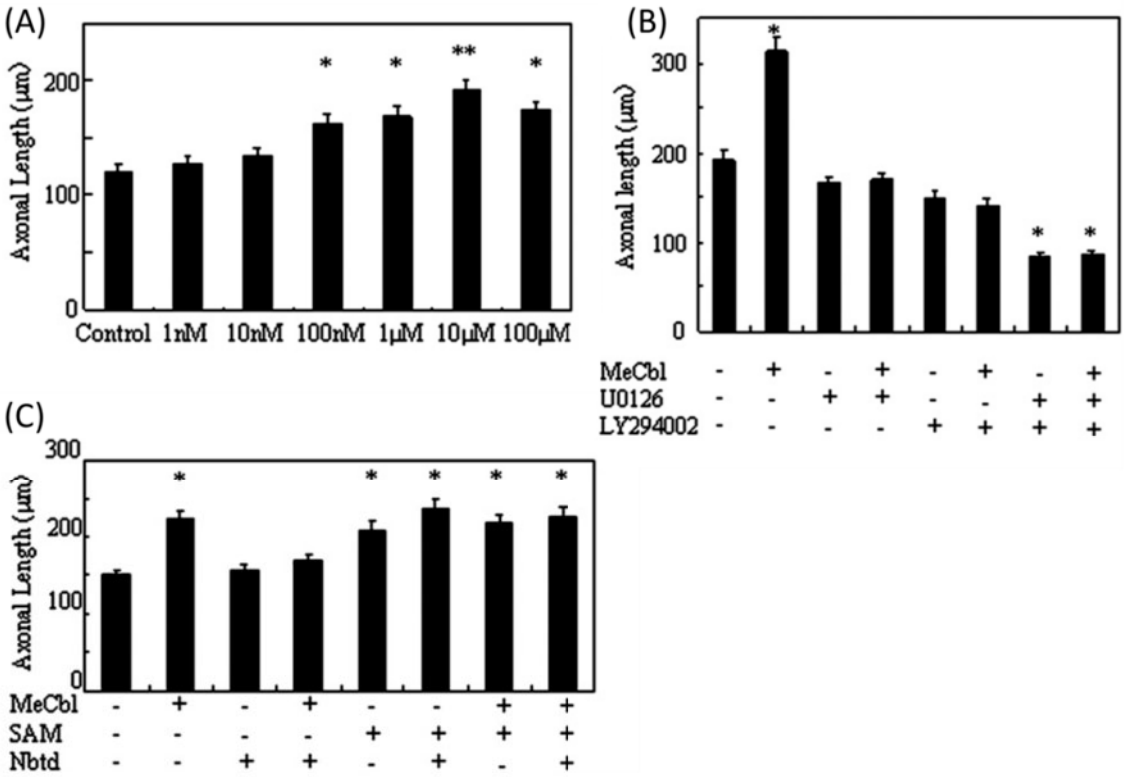


図 2.6.2-7 ラット培養小脳顆粒細胞におけるメコバラミンの軸索伸展効果

（A）は，軸索長に対するメコバラミンの濃度反応性を示す。（B）は，メコバラミン（10 μmol/L），U0126（10 μmol/L）及び LY294002（50 μmol/L）の存在下（+）及び非存在下（–）における軸索長を示す。（C）は，メコバラミン（10 μmol/L），SAM（10 μmol/L）及び Nbtd（1 μmol/L）の存在下（+）及び非存在下（–）における軸索長を示す。MeCbl = メコバラミン，SAM = *S*-アデノシルメチオニン。データは平均値±標準誤差を示す（3 例）。* $P<0.05$, ** $P<0.01$ は薬剤無処置対照群に対して一元配置分散分析後，Student *t* 検定により解析した。添付資料 4.2.1.1.4［参考］［Okada K. et al., 2010］の Figure 1, Figure 2, Figure 6 から作図。

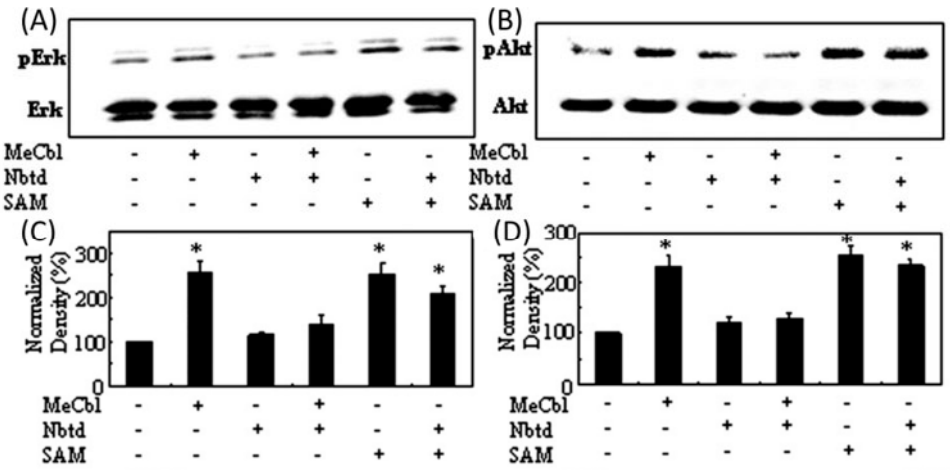


図 2.6.2-8　ラット培養小脳顆粒細胞における Erk1/2 及び Akt のリン酸化

Nbtd（1 μmol/L）及び SAM（10 μmol/L）の存在下（+）及び非存在下（-）におけるメコバラミン（10 μmol/L）による Erk1/2 及び Akt のリン酸化を示す。（A），（C）は，Erk1/2 及びリン酸化 Erk1/2 のウエスタンブロット及び定量を示す。（B），（D）は，Akt 及びリン酸化 Akt のウエスタンブロット及び定量を示す。MeCbl = メコバラミン，SAM = *S*-アデノシルメチオニン。データは平均値±標準誤差を示す（3 例）。* P<0.05 は薬剤無処置対照群に対して一元配置分散分析後，Student t 検定により解析した。添付資料 4.2.1.1.4［参考］［Okada K, et al., 2010］の Figure 5 から作図。

2.6.2.2.6 ホモシステイン誘発細胞死に対するメコバラミンの保護作用（添付資料 4.2.1.1.5［参考］［Hemendinger RA, et al., 2011］）

運動神経細胞様に分化させたマウス運動神経と神経芽細胞腫のハイブリッド細胞株 NSC-34D におけるホモシステイン誘発アポトーシスに対するメコバラミンの保護効果が報告されている。

NSC-34 細胞を分化用培地で 3～7 日間培養して軸索伸長を示す NSC-34D 細胞に分化させた。NSC-34D 細胞に，ホモシステインを加えて培養するとアポトーシスを惹起し，24 時間後の 50%細胞死誘発濃度は 2.2 mmol/L であった。なお，ホモシステインは，活性酸素種を産生しないことを確認している。NSC-34D 細胞の培養液中に，ホモシステイン（5 mmol/L）添加と同時又は 2 時間前にメコバラミン（0.01～10 μmol/L）を加えて培養し，保護効果が検討された。ホモシステイン添加の 24 時間後に細胞を染色した。細胞死の計測は，顕微鏡下，細胞染色と核の形態変化で細胞をネクローシス，アポトーシス，生細胞に分類しそれぞれの細胞数の割合を計算することにより行った。

その結果，NSC-34D 細胞の培養液中に，ホモシステインと同時又は 2 時間前にメコバラミンを加えて培養するとアポトーシスが抑制された（図 2.6.2-9）。それぞれの 50%阻害濃度（IC_{50}）は，0.4 及び 0.6 μmol/L であった。

さらに，ホモシステインを 24 時間暴露することにより，細胞のカスパーゼ 3/7 活性が上昇したが，メコバラミンはカスパーゼ 3/7 活性化を抑制した（図 2.6.2-10）。なお，アポトーシスがおこるとカスパーゼがプロテオリシスを受けて活性化され，細胞の生存に不可欠なタンパク質の分解へとつながるカスパーゼカスケードが開始されることが知られている。

なお，ALS 治療薬リルゾールは NSC-34D 細胞におけるホモシステイン誘発アポトーシスに対して効果がなかったことが報告されている（Hemendinger RA, et al., 2012）。

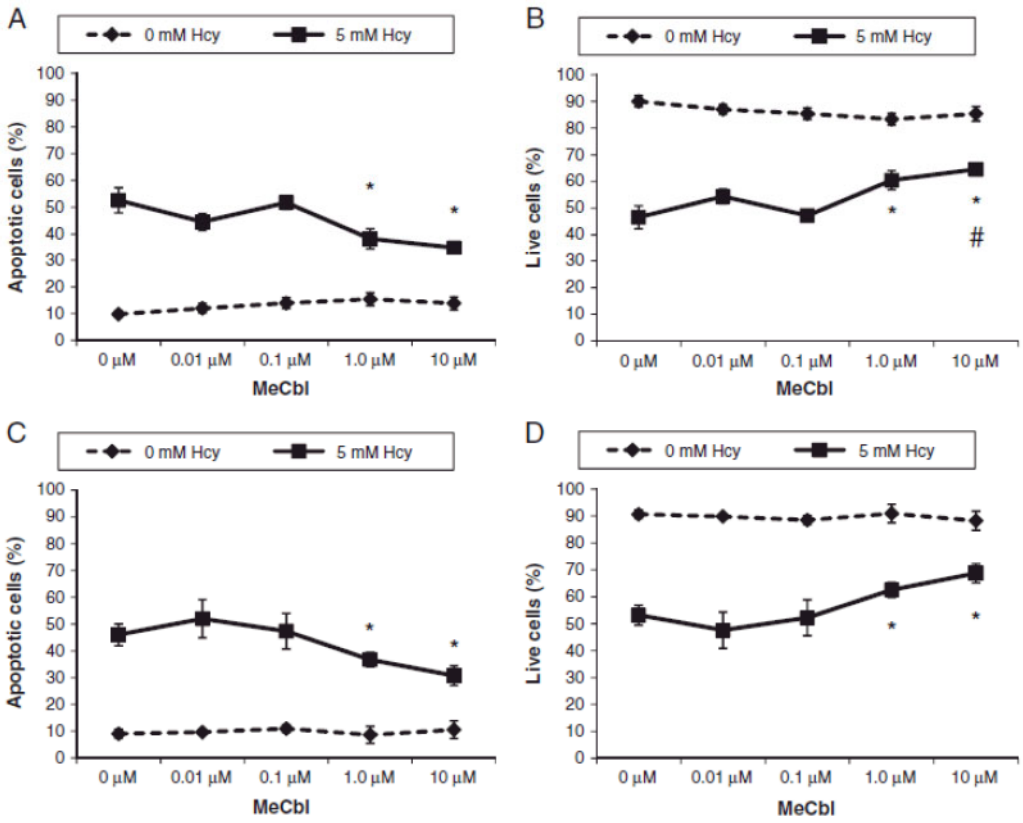


図 2.6.2-9 NSC-34D 細胞におけるホモシステイン誘発細胞死に対するメコバラミンの保護効果

NSC-34D 細胞にホモシステイン（5 mmol/L）を 24 時間暴露した。A，B は，ホモシステイン添加と同時にメコバラミンを添加した。C，D は，ホモシステイン添加の 2 時間前にメコバラミンを添加した。Hcy＝ ホモシステイン，MeCbl＝ メコバラミン。データは平均値±標準誤差を示す。* P<0.05 は 5 mM Hcy/0 µM MeCbl 群に対して，# P<0.05 は 5 mM Hcy/0.01 µM MeCbl 群に対する解析を示す。添付資料 4.2.1.1.5［参考］［Hemendinger RA, et al., 2011］の Figure 4 から作図。

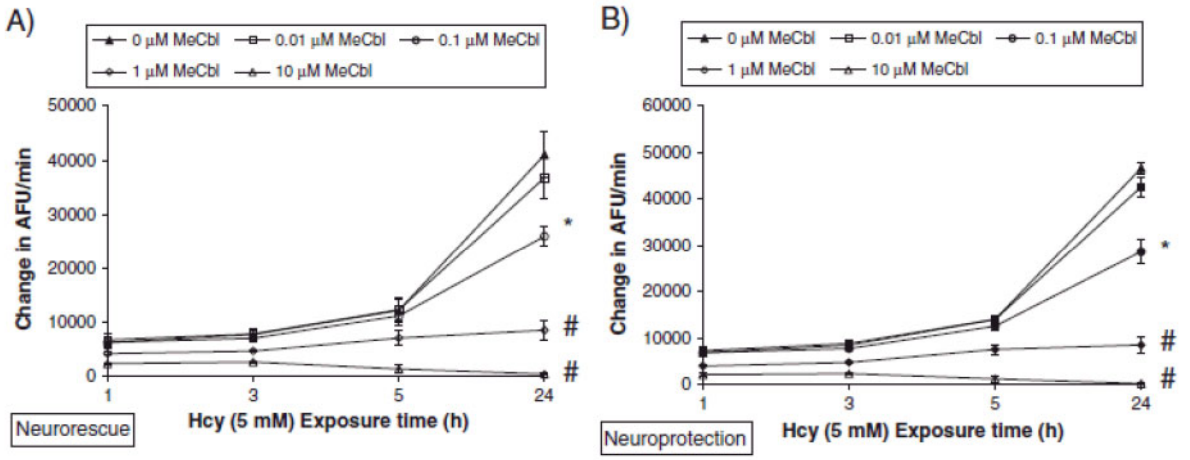


図 2.6.2-10　NSC-34D 細胞におけるホモシステイン誘発カスパーゼ 3/7 活性化に対するメコバラミンの効果

NSC-34D におけるホモシステイン（5 mmol/L）暴露によるカスパーゼ 3/7 活性の経時変化を示す。A）は，ホモシステイン添加と同時にメコバラミンを添加した。B）は，ホモシステイン添加の 2 時間前にメコバラミンを添加した。Hcy＝ ホモシステイン，MeCbl＝ メコバラミン。データは平均値±標準誤差を示す。* P<0.05 は 24 h /0 μM MeCbl 群に対して，# P<0.05 は 1, 3, 5, 24 h/0 μM MeCbl 群に対する解析を示す。添付資料 4.2.1.1.5［参考］［Hemendinger RA, et al., 2011］の Figure 6 から作図。

以上より，メコバラミンは，ホモシステインによるカスパーゼ 3/7 活性化を抑制し，アポトーシスを抑制することが確認された。

2.6.2.2.7 ALS モデル動物 G93A 変異 SOD1 Tg マウスにおけるメコバラミン及びリルゾールの延命効果（添付資料 4.2.1.1.6［参考］［試験番号 K08011］）

ALS モデル動物である G93A 変異 SOD1 Tg マウス（B6SJL-Tg(SOD1-G93A)1Gur/J）を用い，メコバラミン及び ALS 治療薬リルゾールの効果を検討した。

G93A 変異 SOD1 Tg マウスは，生後 50 日齢から死亡時まで，メコバラミン（10 mg/kg，皮下），リルゾール（100 μg/mL 飲水投与）又は媒体（生理食塩水の皮下投与及び逆浸透膜ろ過水の飲水投与）を投与した。

生存個体数の経日変化とメコバラミン及びリルゾールの効果を図 2.6.2-11 に示す。各投与群の生存日数，投与開始後の発症までの日数，発症から死亡までの日数，投与開始から死亡までの日数を表 2.6.2-4 に示す。また，反応個体数として，投与開始後 100 日以上生存例数を測定した（表 2.6.2-4）。メコバラミン投与群及びリルゾール投与群は，生存日数，発症後生存日数，投与開始後生存日数，反応個体数ともに媒体群に比べ増加したが，統計学的有意差はなかった（表 2.6.2-4）。

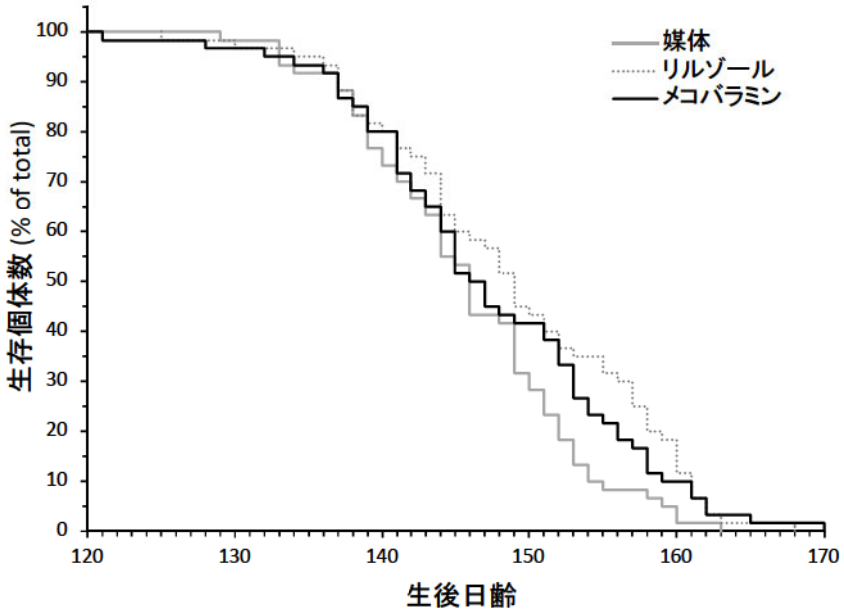


図 2.6.2-11　G93A 変異 SOD1 Tg マウスにおける生存個体数の経日変化とメコバラミン及びリルゾールの効果

各群（60 例/群）の各日齢における生存個体数の割合（%）を示す。メコバラミン（10 mg/kg，皮下），リルゾール（100 μg/mL 飲水投与）又は媒体は生後 50 日齢から死亡時まで投与した。
添付資料 4.2.1.1.6［参考］（K08011）から作図。

表 2.6.2-4　G93A 変異 SOD1 Tg マウスにおけるメコバラミン及びリルゾール投与後の延命及び治療効果

投与検体	例数	生存日数	投与開始後発症日数	発症後生存日数	投与開始後生存日数	反応個体数
媒体	60	145.9 ± 7.5	5.1 ± 5.8	90.8 ± 9.6	95.9 ± 7.5	19
メコバラミン	60	147.5 ± 9.5	4.1 ± 4.9	93.4 ± 11.2	97.5 ± 9.5	25
リルゾール	60	149.0 ± 9.4	4.2 ± 5.0	94.8 ± 11.3	99.0 ± 9.4	27

反応個体数 = 投与開始後 100 日以上生存例数。各値は平均値±標準偏差を示す。
添付資料 4.2.1.1.6［参考］（K08011）から作表。

以上より，G93A 変異 SOD1 Tg マウスを用いてメコバラミン，リルゾールの延命作用を検討したが，両薬剤ともに統計学的な有意差を持った延命効果を示さなかった。

2.6.2.2.8 ALS モデル動物 wobbler マウスにおけるメコバラミンの神経保護効果（添付資料 4.2.1.1.7［参考］［Ikeda K, et al., 2015］）

Wobbler マウスは，上位及び下位運動神経の進行性の変性を特徴とし，ALS モデル動物と考えられている（Moser JM, et al., 2013）。

Wobbler（wr/wr）マウスは，生後 3 週間頃から筋力低下等の身体症状が現れる。最初に振戦が現れた時点を発症とし，発症直後から 4 週間，メコバラミン（3, 30 mg/kg）又は媒体を腹腔内投

与した。前肢の握力測定は，毎週行った。4 週間の投与終了後，二頭筋重量を測定した。二頭筋の切片標本を作製して，NADH 染色後に形態顕微鏡により有髄線維数を測定し，ニッスル染色により運動神経数を測定した。

その結果，wobbler マウスにおける前肢の握力低下を，メコバラミンの 30 mg/kg 投与群は有意に抑制した（図 2.6.2-12）。また，投与 4 週間後の二頭筋重量及び筋皮神経線維数を，メコバラミンの 30 mg/kg 投与群は有意に増加させた（図 2.6.2-13，図 2.6.2-14）。なお，運動神経数に増加は見られたが，統計的に有意ではなかった。

以上より，ALS モデル動物である wobbler マウスにおける筋力低下と運動神経の変性に対して，メコバラミンの 30 mg/kg（腹腔内）は改善効果を示すことが確認された。

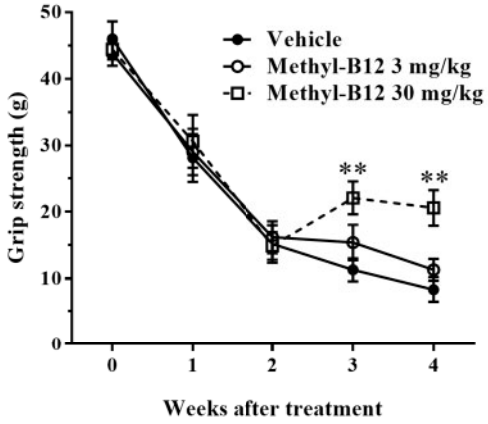


図 2.6.2-12　Wobbler マウスにおけるメコバラミンの握力減少に対する効果

各値は平均値±標準誤差（10 例/群）を示す。** $P<0.01$ は，同じ処置週の媒体対照群に対して経時型分散分析後，Dunnett 検定により解析した。
添付資料 4.2.1.1.7［参考］の Figure 1 から作図。

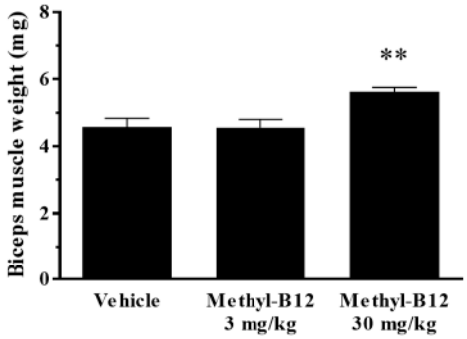


図 2.6.2-13　Wobbler マウスにおけるメコバラミンの二頭筋重量に対する効果

各値は平均値±標準誤差（10 例/群）を示す。** $P<0.01$ は，媒体対照群に対して一元配置分散分析後，Dunnett 検定により解析した。
添付資料 4.2.1.1.7［参考］の Figure 2 から作図。

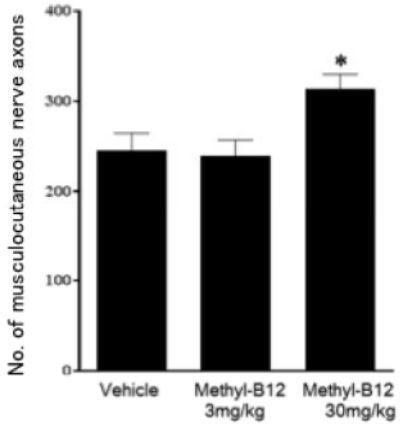


図 2.6.2-14 Wobbler マウスにおけるメコバラミンの筋皮神経線維数に対する効果
各値は平均値±標準誤差（10 例/群）を示す。* $P<0.05$ は，媒体対照群に対して一元配置分散分析後，Dunnett 検定により解析した。
添付資料 4.2.1.1.7［参考］の Figure 3 から作図。

2.6.2.2.9 GAD マウス前薄筋運動神経終末の変性に対するメコバラミンの神経再生作用（添付資料 4.2.1.1.8［参考］［Yamazaki K, et al., 1994］）

簿束軸索ジストロフィー（GAD）マウスの前薄筋における運動神経終末の変性に対するメコバラミンの効果が報告されている。

雄 GAD マウス（40 日齢）又は表現型が正常な同腹仔マウスに，メコバラミン（1 mg/kg）又は生理食塩水を 25 日間経口投与した。投与開始から 25 日後に前薄筋をオスミウムヨウ化亜鉛銀染色により染色し画像解析した。GAD マウスの遠位運動終板領域では，ほとんどの終末が処置によらず変性していたが，メコバラミン処置群では軸索再生像がしばしば観察された。近位運動終板領域では，変性終末は両群ともほとんど観察されず，メコバラミン投与群で有意な終末周囲長の増加と終末面積の減少が観察された（表 2.6.2-5）。運動神経終末の周囲長の増加は，メコバラミンが GAD マウスにおいて変性神経終末の再生を促進することを示唆する。

表 2.6.2-5 GAD マウス前薄筋近位運動終板領域の運動神経終末に対するメコバラミンの効果

マウス表現型	処置	例数	終末周囲長(P) (μm)	終末面積(A) (μm²)
正常	生理食塩水	140	325±35	293±30
	メコバラミン	140	331±39	301±41
GAD	生理食塩水	133	277±32**	335±30*
	メコバラミン	133	370±28	303±21

各値は平均値±標準誤差を示す。CMAP = 複合筋活動電位。* $P<0.05$，** $P<0.01$ は，GAD マウスのメコバラミン投与群に対して Student t 検定により解析した。
添付資料 4.2.1.1.8［参考］［Yamazaki K, et al., 1994］の Table 2 から作表。

2.6.2.2.10 アクリルアミド神経障害モデルにおけるメコバラミンの神経再生作用（添付資料 4.2.1.1.9［参考］［Watanabe T, et al., 1994］）

ラットアクリルアミド末梢神経障害モデルの軸索再生に対するメコバラミンの効果が報告されている。

雄 Wistar ラット（体重 250～300 g，5～12 例/群）にアクリルアミドを 4 週間投与後，メコバラミン（50, 500 μg/kg）又は生理食塩水を 1 週間に 5 回，12～13 週間腹腔内投与した。脛骨神経刺激による複合筋活動電位（CMAP）の振幅を再生軸索数の指標とした。CMAP の測定はアクリルアミド投与前，投与終了直後，約 30 日後（Day 30），約 60 日後（Day 60），約 90 日後（Day 90）に後肢筋肉で行った。また，アクリルアミド投与の約 60 日後に脛骨神経の病理組織検査を行った。

その結果，アクリルアミド処置により，全てのラットで CMAP の振幅が同様に減少した。メコバラミンの 500 μg/kg 投与群ではコントロール群に比して早い CMAP の回復が観察されたが，50 μg/kg 投与群ではコントロール群と差がなかった（表 2.6.2-6）。病理組織検査における 500 μg/kg 投与群，50 μg/kg 投与群，コントロール群の軸索密度は，それぞれ 5360/mm^2，3290/mm^2，2125/mm^2 であった。

表 2.6.2-6 ラットアクリルアミド神経障害モデルにおける CMAP の変化

群	コントロール群 (mV)	500 μg/kg 投与群(mV)	50 μg/kg 投与群(mV)	*P* 値
Before	13.92±1.16 (n=9)	13.89±0.84 (n=12)	13.72±0.77 (n=5)	*P*=0.86
After	7.76±1.20 (n=9)	7.82±0.94 (n=12)	7.32±0.81 (n=5)	*P*=0.42
Day 30	7.70±1.11 (n=9)	9.32±0.83 (n=11)	7.99±0.80 (n=5)	*P*<0.001
Day 60	9.30±0.98 (n=8)	11.67±0.99 (n=10)	9.51±0.89 (n=5)	*P*<0.001
Day 90	11.41±0.79 (n=5)	12.8±0.98 (n=8)	11.93±0.46 (n=2)	*P*=0.001

各値は平均値±標準偏差を示す。CMAP＝ 複合筋活動電位。
P 値は一元配置分散分析における 3 群間の違いの統計学的有意性を示す。評価期間中の麻酔過誤により数例の動物が死亡した。
添付資料 4.2.1.1.9［参考］［Watanabe T, et al., 1994］の Table 1 から作表。

以上より，メコバラミンは，アクリルアミド末梢神経障害モデルにおいて軸索再生を促進することが確認された。

2.6.2.3 副次的薬理試験

該当資料なし。

2.6.2.4 安全性薬理試験

2.6.2.4.1 中枢神経系に及ぼす影響

2.6.2.4.1.1 ラットの一般症状及び行動に及ぼす影響（添付資料 4.2.1.3.1［試験番号 SBL47-66］）

雄性 SD ラット（6 例/群）にメコバラミン 4 及び 16 mg/kg を単回筋肉内投与し，投与前と投与後 0.5，2 及び 6 時間に，一般症状及び行動を改良型機能観察総合評価（FOB，functional observational battery）法により観察した。対照群には，媒体（生理食塩水）を投与した。

その結果，16 mg/kg まで一般症状及び行動に影響は認められなかった。

2.6.2.4.2 心血管系に及ぼす影響

2.6.2.4.2.1 hERG 電流に及ぼす影響（添付資料 4.2.1.3.2［試験番号 DJNR1027］）

hERG を安定的に導入したヒト胎児腎臓由来細胞（HEK293）を用いて，メコバラミン 10 μmol/L の hERG 末尾電流に及ぼす影響を Whole-cell-patch clamp 法により評価した。

メコバラミンは，hERG 末尾電流を 10 μmol/L（5 細胞/群）で 24.6%抑制したが，媒体投与群

と比較して統計学的有意差は認められなかった。媒体（0.1% DMSO，5 細胞/群）及び陽性対照薬（E-4031）0.1 μmol/L（5 細胞/群）の hERG 末尾電流の抑制率は，それぞれ 18.0%及び 83.1%であった。

2.6.2.4.2.2 活動電位に及ぼす影響（添付資料 4.2.1.3.3［試験番号 S03013］）

摘出モルモット乳頭筋標本（5 標本/群）を用いて，メコバラミン 10 μmol/L の心筋活動電位に及ぼす影響をガラス微小電極法により評価した。

モルモット乳頭筋を 1 Hz で電気刺激し，活動電位パラメータ（静止膜電位，活動電位振幅，最大立ち上がり速度及び活動電位持続時間［APD_{50} 及び APD_{90}］）を測定した結果，10 μmol/L でいずれのパラメータにも影響は認められなかった。

2.6.2.4.2.3 覚醒イヌの心血管系に及ぼす影響（添付資料 4.2.1.3.4［試験番号 SBL47-67］）

テレメトリー送信機を埋め込んだ覚醒犬（雄 3 例/群，雌 3 例/群）に媒体（生理食塩水），メコバラミン 10 mg/kg を単回筋肉内投与し，血圧，心拍数及び心電図（PQ 間隔，QRS 時間，QT/QTc 間隔）に及ぼす影響を評価した。血圧，心拍数及び心電図の測定は，投与前，投与後 0.5 及び 6 時間に実施した。

その結果，10 mg/kg で血圧，心拍数及び心電図に影響は認められなかった。

2.6.2.4.3 呼吸系に及ぼす影響

2.6.2.4.3.1 覚醒イヌの呼吸系に及ぼす影響（添付資料 4.2.1.3.4［試験番号 SBL47-67］）

テレメトリー送信機を埋め込んだ覚醒犬（雌雄各 3 例/群）にメコバラミン 10 mg/kg 又は媒体（生理食塩水）を単回筋肉内投与し，呼吸数及び血液ガスパラメータ（動脈血 pH，酸素分圧，二酸化炭素分圧及び酸素飽和度）に及ぼす影響を評価した。呼吸数及び血液ガスパラメータの測定は，投与前，投与後 0.5 及び 6 時間に実施した。

その結果，10 mg/kg で呼吸数及び血液ガスパラメータに影響は認められなかった。

2.6.2.5 薬力学的薬物相互作用試験

該当資料なし。

2.6.2.6 考察及び結論

ALS の病因として，SOD1 遺伝子の異常や TDP-43 タンパクの病巣における異常な凝集及び蓄積等が報告されてきたが，正確な発症機序は未だ明らかにされていない（Robberecht W and Philips T, 2013）。

メコバラミンは，末梢性神経障害治療剤として 1 日用量 1500 μg の内服剤及び 1 日 1 回 500 μg を週 3 回の筋肉内又は静脈内注射として承認・販売されてきたが，その後，高用量（25～50 mg）の 1 日 1 回 14 日間の筋肉内投与による ALS 患者に対する臨床試験において有効性が報告された（添付資料 5.3.5.4.3［参考］）。ALS では，末梢神経系である脳幹や脊髄の運動神経が障害されるだけでなく，中枢神経系である大脳皮質運動野の運動神経も障害を受ける。ラット及びイヌに[^{57}Co]メコバラミン（1 mg/kg）を単回筋肉内投与した実験より（添付資料 4.2.2.3.1，4.2.2.3.2），メコバラミンの脳内への移行性は末梢神経系への移行性より低く血漿中濃度の 1/100 程度である

ことが確認されている。よって，メコバラミンが中枢神経系でも効果を示すためには，より高用量を必要とすると考えられる。

ALS の病因は未だ解明されていないが，ALS の病態には興奮性アミノ酸及び酸化ストレス等が運動神経細胞死にかかわると考えられている（Petrov D, et al., 2017）。ヒト iPS 細胞由来運動神経細胞における，抗酸化剤非添加による酸化ストレス誘発神経突起傷害を，メコバラミン（0.1, 0.3, 1 μmol/L）は有意に抑制した。メコバラミンの 0.1 及び 0.3 μmol/L における H50 値（それぞれ，184 及び 201 hr）は，エダラボンの 10 及び 30 μmol/L における H50 値（それぞれ，184 及び 206 hr）と同程度であった。なお，外国 001 試験において，日本人にメコバラミンの臨床用量 50 mg を単回筋肉内投与したときの血漿中 C_{max} は 1660 ng/mL（1.2 μmol/L）であった（添付資料 5.3.3.1.1）。エダラボンの臨床用量 105 mg を単回経口投与したときの血漿中 C_{max} は 1656 ng/mL（9.5 μmol/L）である（ラジカット内用懸濁液 2.1% 添付文書, 2023）。

また，G93A 変異 SOD1 発現アストロサイトは，何らかの神経毒性因子を遊離することにより細胞の興奮性を上げて細胞傷害を惹き起こすことが報告されている（Fritz E, et al., 2013）。In vitro ALS モデル細胞死と考えられるヒト変異 SOD1（G93A）導入マウスアストロサイト誘発運動神経細胞死に対し，メコバラミンは 0.01 μmol/L 以上で保護効果をした。さらに，メコバラミンは NSC-34D 細胞において，1 μmol/L 以上でホモシステイン誘発アポトーシスを抑制し，0.1 μmol/L 以上でカスパーゼ 3/7 の活性化を抑制することが示された。ALS モデル動物 G93A 変異 SOD1 Tg マウスにおいても，ビタミン B_{12} 及び葉酸の上昇とホモシステインの減少は，細胞保護作用と相関性があることが報告されている（Song L, et al., 2013）。ホモシステインは，神経変性にかかわると考えられているが，ALS 患者で増えていることが報告されている（Zoccolclla S, et al., 2008; Valentino F, et al., 2010; Zoccolella S, et al., 2010）。メコバラミンはホモシステインからメチオニンを合成するメチオニン合成酵素の補酵素として働くため，ALS におけるホモシステイン誘発細胞死を抑制することが示唆される。

さらに，メコバラミン及び SAM は，ラット培養網膜神経細胞におけるグルタミン酸及びニトロプルシドナトリウム誘発神経細胞死，ラット培養大脳皮質神経細胞におけるグルタミン酸，NMDA，及びニトロプルシドナトリウム誘発神経細胞死を 0.01～10 μmol/L の範囲で抑制することが示された。よって，メコバラミンによる神経細胞死の抑制は，SAM を介することが示唆された。SAM は，酸化ストレスによるタンパク質のダメージの修復時にメチル基供与体として働くが（Ingrosso D, et al., 2000），ALS 患者の赤血球において約半分に低下していることが報告されている（D'Angelo S, et al., 2013）。さらに，ラット培養小脳顆粒細胞において，メコバラミンは神経軸索伸展を促進したが，Erk1/2 のリン酸化阻害剤 U0126 及び Akt のリン酸化阻害剤 LY294002 存在下で抑制された。メコバラミンによる Erk1/2 及び Akt のリン酸化増加はメチオニン合成阻害剤 Nbtd により阻害されること，SAM 添加により Erk1/2 及び Akt のリン酸化が増加することから，メコバラミンは SAM を介して Erk1/2 及び Akt のリン酸化を増加させて神経軸索を伸展すると考えられた。

また，ALS モデル動物である wobbler マウスにおいて，メコバラミンは 30 mg/kg（腹腔内）で筋力低下と運動神経の変性に対して改善効果を示すことが確認された。一方，G93A 変異 SOD1 Tg マウスにおいて，メコバラミン 10 mg/kg 皮下投与により，反応個体数，生存日数，発症後生存日数ともに媒体群に比べ増加したが，統計学的有意差はなかった。

さらに，メコバラミンは，GAD マウスにおける運動神経終末の変性に対して 1 mg/kg（経口）で変性神経終末の再生を促進すること，ラットアクリルアミド末梢神経障害モデルにおいて 500 μg/kg（腹腔内）で軸索再生を促進することが確認された。

安全性薬理試験として，中枢神経系，心血管系及び呼吸系に対する影響について評価した。中枢神経系では，16 mg/kg まで一般症状及び行動に影響は認められなかった。心血管系では，10 μmol/L で hERG 末尾電流を 24.6%阻害した。各活動電位パラメータに対しては 10 μmol/L で影響は認められなかった。血圧，心拍数及び心電図に対して 10 mg/kg で影響は認められなかった。呼吸系では，10 mg/kg で呼吸数及び血液ガスパラメータに影響は認められなかった。以上，安全性薬理試験において，中枢神経系，心血管系及び呼吸系に対して，有害作用は認められなかった。

2.6.2.7 図表

図表は本文中に記載した。

2.6.2.8 参考文献

D'Angelo S, Trojsi F, Salvatore A, Daniele L, Raimo M, Galletti P, et al. Accumulation of altered aspartyl residues in erythrocyte membrane proteins from patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis. Neurochem Int. 2013;63(6):626–34.

Fritz E, Izaurieta P, Weiss A, Mir FR, Rojas P, Gonzalez D, et al. Mutant SOD1-expressing astrocytes release toxic factors that trigger motoneuron death by inducing hyperexcitability. J Neurophysiol. 2013;109(11):2803–14.

Hemendinger RA, Armstrong EJ 3rd, Radio N, Brooks BR. Neurotoxic injury pathways in differentiated mouse motor neuron-neuroblastoma hybrid (NSC-34D) cells in vitro—Limited effect of riluzole on thapsigargin, but not staurosporine, hydrogen peroxide and homocysteine neurotoxicity. Toxicol Appl Pharmacol. 2012;258(2):208–15.

Ingrosso D, D'Angelo S, di Carlo E, Perna AF, Zappia V, Galletti P. Increased methyl esterification of altered aspartyl residues in erythrocyte membrane proteins in response to oxidative stress. Eur J Biochem. 2000;267(14):4397–405.

Moser JM, Bigini P, Schmitt-John T. The wobbler mouse, an ALS animal model. Mol Genet Genomics. 2013;288(5-6):207–29.

Okada K, Tanaka H, Temporin K, Okamoto M, Kuroda Y, Moritomo H, et al. Akt/mammalian target of rapamycin signaling pathway regulates neurite outgrowth in cerebellar granule neurons stimulated by methylcobalamin. Neurosci Lett. 2011;495(3):201–4.

Petrov D, Mansfield C, Moussy A, Hermine O. ALS Clinical Trials Review: 20 years of failure. Are we any closer to registering a new treatment? Front Aging Neurosci. 2017;9:68.

Robberecht W, Philips T. The changing scene of amyotrophic lateral sclerosis. Nat Rev Neurosci. 2013;14:248–64.

Song L, Gao Y, Zhang X, Le W. Galactooligosaccharide improves the animal survival and alleviates motor neuron death in $SOD1^{G93A}$ mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. Neuroscience. 2013; 246:281–90.

Valentino F, Bivona G, Butera D, Paladino P, Fazzari M, Piccoli T, et al. Elevated cerebrospinal fluid and plasma homocysteine levels in ALS. Eur J Neurol. 2010;17(1):84–9.

Zoccolella S, Bendotti C, Beghi E, Logroscino G. Homocysteine levels and amyotrophic lateral sclerosis: A possible link. Amyotroph Lateral Scler. 2010;11(1-2):140–7.

Zoccolella S, Simone IL, Lamberti P, Samarelli V, Tortelli R, Serlenga L, et al. Elevated plasma homocysteine levels in patients with amyotrophic lateral sclerosis. Neurology. 2008;70(3):222–5.

ラジカット内用懸濁液 2.1% 添付文書, 2023.

目次

2.6.3 薬理試験概要表 2
2.6.3.1 薬理試験：一覧表 2
2.6.3.2 効力を裏付ける試験 3
2.6.3.3 副次的薬理試験 4
2.6.3.4 安全性薬理試験 4
2.6.3.5 薬力学的薬物相互作用試験 4

2.6.3 薬理試験概要表
2.6.3.1 薬理試験：一覧表

被験物質：メコバラミン

試験の種類	試験系	投与経路／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 試験					
酸化ストレスによる運動神経の突起障害に対する保護作用	ヒト人工多能性幹細胞を分化させた運動神経細胞	in vitro	[redacted]	CCNS-ES-ROS001	4.2.1.1.10
G93A 変異 SOD1 発現アストロサイト誘発細胞死に対する保護作用	ヒト変異 SOD1(G93A)導入マウスアストロサイト，マウス胚性幹細胞を分化させた運動神経細胞	in vitro	株式会社カン研究所	KAN14001	4.2.1.1.1
グルタミン酸他誘発細胞死に対する保護作用	ラット培養網膜神経細胞	in vitro	京都大学 福山大学	(Kikuchi et al. 1997)	4.2.1.1.2
グルタミン酸他誘発細胞死に対する保護作用	ラット培養大脳皮質神経細胞	in vitro	福山大学	(Akaike et al. 1993)	4.2.1.1.3
軸索伸展作用における Erk1/2 及び Akt リン酸化	ラット培養小脳顆粒細胞	in vitro	大阪大学	(Okada et al. 2010)	4.2.1.1.4
ホモシステイン誘発細胞死に対する保護作用	NSC-34D 細胞	in vitro	Carolinas Medical Center	(Hemendinger et al. 2011)	4.2.1.1.5
in vivo 試験					
ALS モデル動物 G93A 変異 SOD1 Tg マウスにおける延命効果	マウス／G93A 変異 SOD1 Tg（B6SJL-Tg(SOD1-G93A)1Gur/J）	皮下	株式会社サンプラネット	K08011	4.2.1.1.6
ALS モデル動物 wobbler マウスにおける神経保護効果	マウス／wobbler	腹腔内	東邦大学医療センター大森病院 徳島大学	(Ikeda et al. 2015)	4.2.1.1.7

被験物質：メコバラミン

試験の種類	試験系	投与経路／方法	実施施設	試験番号	CTD における記載箇所
前薄筋運動神経終末の変性に対する神経再生作用	マウス／GAD	経口	エーザイ株式会社 国立精神・神経医療研究センター神経研究所	(Yamazaki et al. 1994)	4.2.1.1.8
アクリルアミド神経障害モデルにおける神経再生作用	ラット／Wistar	腹腔内	京都大学医学部附属病院	(Watanabe et al. 1994)	4.2.1.1.9
安全性薬理試験					
中枢神経系（一般症状及び行動試験）[a]	ラット／SD	筋肉内	[redacted]	SBL47-66	4.2.1.3.1
心血管系（hERG 試験）[a]	hERG を安定導入した HEK293 細胞	in vitro	[redacted]	DJNR1027	4.2.1.3.2
心血管系（APD 試験）	摘出モルモット乳頭筋	in vitro	エーザイ株式会社	S03013	4.2.1.3.3
心血管系（テレメトリー試験）[a]	イヌ／ビーグル	筋肉内	[redacted]	SBL47-67	4.2.1.3.4
呼吸系（テレメトリー試験）[a]	イヌ／ビーグル	筋肉内	[redacted]	SBL47-67	4.2.1.3.4
薬力学的薬物相互作用試験					
該当試験なし					

ALS＝ 筋萎縮性側索硬化症，APD＝ 活動電位持続時間，GAD＝ 簿束軸索ジストロフィー，hERG＝ ヒト ether-à-go-go 関連遺伝子，HEK＝ ヒト胎児腎臓由来細胞，NSC-34D＝ 運動神経細胞様に分化させたマウス運動神経と神経芽細胞腫のハイブリッド細胞株，SD＝Sprague Dawley，SOD1＝Cu/Zn superoxide dismutase，Tg＝ 遺伝子組換え.
a:　GLP 適用試験

2.6.3.2 効力を裏付ける試験

効力を裏付ける試験結果は 2.6.2.2 項に記載した。

2.6.3.3 副次的薬理試験

該当試験なし

2.6.3.4 安全性薬理試験

被験物質：メコバラミン

試験の種類	動物種／系統	投与経路	投与量[a]	性別及び動物数／群	試験結果	GLP適用	試験番号	CTDにおける記載箇所
中枢神経系（一般症状及び行動試験）	ラット／SD	筋肉内	4, 16 mg/kg	雄 6／群	4, 16 mg/kg：影響なし	適	SBL47-66	4.2.1.3.1
心血管系（hERG 試験）	hERG を安定導入した HEK293 細胞	in vitro	10 µmol/L	5 細胞/群	10 µmol/L：影響なし	適	DJNR1027	4.2.1.3.2
心血管系（APD 試験）	摘出モルモット乳頭筋	in vitro	10 µmol/L	5 標本/群	10 µmol/L：影響なし	非適	S03013	4.2.1.3.3
心血管系（テレメトリー試験）	イヌ／ビーグル	筋肉内	10 mg/kg	雄 3／群, 雌 3／群	10 mg/kg：影響なし	適	SBL47-67	4.2.1.3.4
呼吸系（テレメトリー試験）	イヌ／ビーグル	筋肉内	10 mg/kg	雄 3／群, 雌 3／群	10 mg/kg：影響なし	適	SBL47-67	4.2.1.3.4

APD＝ 活動電位持続時間，HEK＝ ヒト胎児腎臓由来細胞，hERG＝ ヒト ether-à-go-go 関連遺伝子，SD＝Sprague Dawley.
a: 単回投与

2.6.3.5 薬力学的薬物相互作用試験

該当試験なし