

## 試験方法



- 7日齢の幼若雌雄ラット(Crl:CD(SD))に、リン酸オセルタミビルをフリー体換算で0(溶媒), 300, 500, 600, 700, 850及び1000 mg/kg (リン酸塩として, 0, 394, 657, 788, 920, 1117, 1314 mg/kg)の用量で単回経口投与した
- 毒性群:7日齢ラットでは, 成熟の程度にあわせて行動機能観察法を一部変更し(FOB変法), 投与後2時間に実施した
- トキシコキネティクス群(TK群): 血漿中及び脳中濃度を, 幼若ラットでは全用量において, 成熟ラット(42日齢)では1000 mg/kgにおいて測定した; また, 投与後2時間に行動観察を行った
- 剖検は途中死亡例, 及び解剖予定日に安楽死させた毒性群ラットに対して実施した
- 脳の病理組織学的検査は, 解剖予定日に安楽死させた毒性群の, 対照, 850及び1000 mg/kg群の全幼若ラットに対して行われた

31

## 中間報告- 主要な結果 (1)

### 確認された安全係数



- OPは幼若ラットでは300 mg/kg, 成熟ラットでは1000 mg/kgの用量において, FOB変法/行動観察に影響を及ぼさなかった
  - 日本の小児の治療用量:2 mg/kgを1日2回投与
- 幼若ラットでは, 検討したいずれの用量においても, 脳の剖検及び病理組織学的所見に薬物関連の変化は認められなかった
- 成熟ラットは1000 mg/kgの用量で, 死亡又は瀕死状態はみられなかった
- 幼若ラットは500 mg/kg以上の用量で, FOB変法(毒性群)又は行動観察(TK群)への影響, 体重増加減少, 及び死亡例が認められた
- FOB変法/行動観察で認められた所見は, 本薬のCNSへの特異的な作用ではなく, 瀕死状態, 又は動物の未成熟に起因するものと考えられた

32

- TK群の300 mg/kgで幼若ラット1例が死亡した。本用量の他の全ての動物において関連した症状変化が見られず単独の所見であることから、本死亡は偶発的であると考えられた
- 7日齢の幼若ラットを用いた4つのGLP試験より得られた全てのデータのメタ解析では、より高い用量(フリー体換算で383 mg/kg)でも幼若ラットで死亡が認められていないことが確認された

## 中間報告 – 結果 (3)

### 脳/血漿中の濃度比

- リン酸オセルタミビル(OP)及び活性代謝物(OC)の脳/血漿中濃度比は、若齢及び成熟ラット共に低値を示した

	OP用量 (フリー体換算)	脳/血漿比 Cmax		脳/血漿比 AUC	
		OP	OC	OP	OC
幼若ラット	300 mg/kg	0.25	0.057	0.31	0.056
成熟ラット	1000 mg/kg	0.12	0.013	0.22	0.014

## 中間報告 – 結果 (4)

### 脳中濃度

- OPの脳中濃度は、前回の幼若ラット試験よりも、今回の試験において著しく低い値を示した
- そのため、ロシュ社と中外製薬は前回試験データの再確認を行い、濃度算出時の計算式に誤り見出した。前回試験結果の誤りを是正することにより、今回の幼若ラット試験結果と大きな矛盾が認められないものと考えている
- ロシュ社は前回試験の改訂報告書を当局に提出する予定である

35

## 結論

- 日本の小児の治療用量は2 mg/kgを1日2回であるのに対し、リン酸オセルタミビルのNOEL(無影響量)は幼若ラット(7日齢)では300 mg/kg(フリー体換算)、成熟ラットでは少なくとも1000 mg/kgであった
- 高用量群で認められたFOB変法/行動観察の所見は、本薬のCNSへの特異的な作用ではないと考えられた
- 幼若ラットにおける脳への相対的な薬物移行は低く、成熟動物と類似していた

36

# オセルタミビルの中枢神経系に対する安全性を裏付ける成績

## 新たな解析及び非臨床試験



Roche ロシュグループ

主要な疑問点/課題	非臨床試験
オセルタミビル及び活性代謝物は脳において薬理学的な作用を示すか？	<i>In vitro</i> 試験でのウイルス及び脳由来のノイラミニダーゼに対するオセルタミビル(及び活性代謝物)の特異性の確認

37

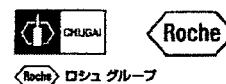
試験名: 非ウイルス・シアリダーゼ(特にニューロン組織由来シアリダーゼ)のOP, OC選択性の確認



Roche ロシュグループ

OP及びOCがサル脳由来ノイラミニダーゼに薬理学的作用を及ぼす可能性

## 背景及び目的



- オセルタミビル<sup>®</sup>の活性代謝物はインフルエンザウィルスのノイラミニダーゼに対する選択的で強力な阻害薬である。オセルタミビルのノイラミニダーゼに対する特異性をウィルスと哺乳類とで比較検討するために、サル脳由来のノイラミニダーゼ活性に対するオセルタミビル(OP, RO0640796)と活性代謝物(OC, RO0640802)の作用を評価した
- サル脳由来のノイラミニダーゼ活性が臨床を考察する上で妥当であることを確認するために、非ヒト霊長類とヒトにおけるノイラミニダーゼの遺伝子配列を比較した

39

## 試験方法



- 非ヒト霊長類であるカニクイザル(*Macaca fascicularis*)の脳由来ノイラミニダーゼに対するOP及びOCの阻害作用を、最高で 50 mMの濃度まで評価した
- 非ヒト霊長類であるアカゲザル(*Macaca mulatta*)由来のノイラミニダーゼの遺伝子配列をヒトと比較した。基質結合部位から5 Å内のアミノ酸配列を比較した

40

## 結果 (1)

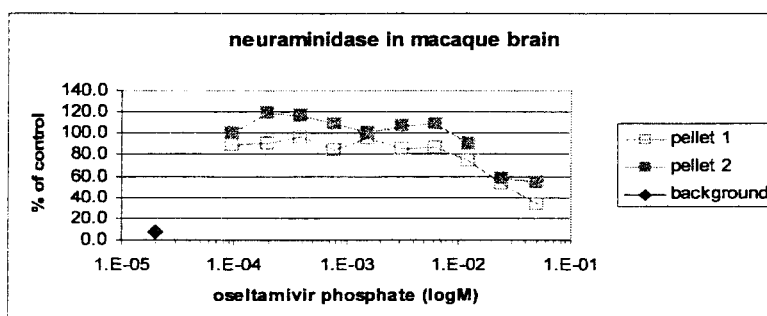
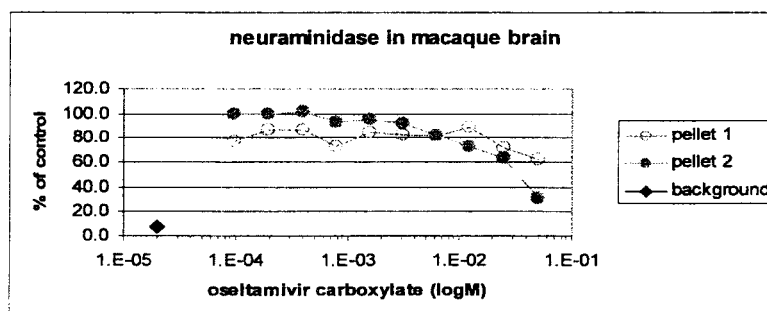
- OP及びOCのいずれも10 mMの濃度まで非ヒト霊長類の脳由来ノイラミニダーゼ活性に対する明らかな阻害は認められなかった
- CHO細胞に発現させた遺伝子組換え型インフルエンザウィルスノイラミニダーゼに対するOC及びOPのIC<sub>50</sub>はそれぞれ1 nM及び10 μM未満であった
- ヒトと非ヒト霊長類のノイラミニダーゼの遺伝子配列を比較したところ、基質結合部位周囲のアミノ酸配列は完全に一致した。このことより、今回のサルで得られた結果はヒトに外挿可能であることが示唆された

41

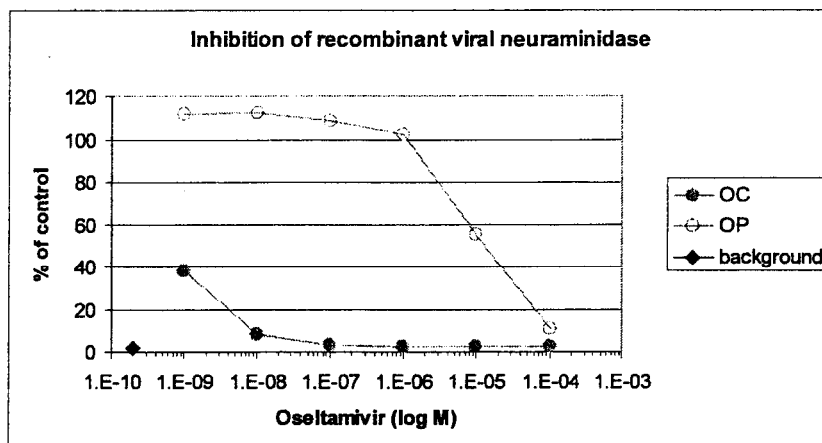
## 結果 (2)

カニクイザル脳から得られたマイクロソーム画分 (pellet 1) 及び膜画分 (pellet 2) のノイラミニダーゼ活性。各点1例の結果であり、反復測定なし。バックグラウンド補正なし。

なお、データは示していないが、脳の可溶性蛋白画分におけるノイラミニダーゼ活性は検出されなかった。



42



遺伝子組換え型インフルエンザウィルスノイラミニダーゼ(CHO細胞溶解試料)に対するOC(IC50 < 1 nM)及びOP(IC50 10  $\mu$ M)の阻害作用。なお、OPによる阻害作用は、反応操作中に加水分解にて生成したOCによる可能性が高い

結果 (4)

- ヒト(*Homo sapiens*)とアカゲザル(*Macaca mulatta*)におけるノイラミニダーゼのアミノ酸配列は極めて類似している

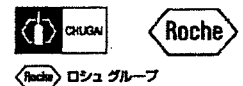
Gene	% id.	% sim.
NEU1	97.1	98.1
NEU2	96.1	97.1
NEU3	97.2	98.0
NEU4	95.2	96.2

- 活性部位[ヒトNEU2(PDB:2F25)と阻害薬である2-deoxy-2,3-dehydro-N-acetyl-neuraminic acid (DANA)との三次元構造により推定]近傍の全てのアミノ酸配列はヒトとアカゲザルで同じであった
- カニクイザル(*Macaca fascicularis*)のノイラミニダーゼに関しては、遺伝子配列は明らかにはなっていない。カニクイザルにおいてEST(expressed-sequence tag)情報が得られているNEU1とNEU4の2つについては、蛋白レベルでカニクイザルとアカゲザルは一致している

- OP及びOCは非ヒト霊長類の脳におけるノイラミニダーゼに対し  
て臨床的に意味のある作用を示さなかった
- ヒトとサルにおいてノイラミニダーゼのアミノ酸配列は極めて類似  
している。したがって、今回の試験結果はオセルタミビルがCNS  
に影響を及ぼす薬理作用機序を持たないことを示唆するもので  
あり、これまで実施した試験結果とも一致している

45

オセルタミビルの心血管系への安全性を裏付ける成績



主要な疑問点 / 課題	非臨床試験
OPあるいはOCが心血管系に影響を及ぼす可能性を示唆する作用機序は存在するか？	OP及びOCのhERG試験及びモルモット乳頭筋活動電位試験

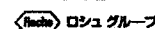
46



## OP及びOCのHEK293細胞に発現した hERG チャンネル電流への影響に関する試験及びモルモット乳頭筋標本を用いた活動電位への影響に関する試験

47

### 背景及び目的

 ロシュグループ

- これまでに実施した試験では、プルキンエ線維試験の低頻度刺激下のみで、 $APD_{50}$ の軽度延長が認められたが、それ以外には、オセルタミビル (OP, RO0640796) 及び 活性代謝物 (OC, RO0640802) の心血管系への電気生理学的な影響は示されていない
- 広範囲のOP濃度を用いて、また、異なるin vitro活動電位試験系でのOP及びOCの作用を検討するため、hERG試験及びモルモット乳頭筋活動電位試験を実施した

48

## 方法- hERG試験

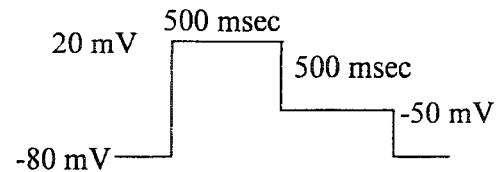


細胞: HEK293

刺激頻度: 15 秒毎 (合計40刺激)

試験パルス

- 保持電位: -80 mV
- 脱分極パルス: +20 mV (500 msec)
- 再分極パルス: -50 mV (500 msec)



灌流液温度: 37°C

測定指標: hERG テール電流のピーク

被験物質

- 対照: 0 μM (5 細胞)
- OP: 10, 30, 100 μM (5 細胞/各濃度)
- OC: 10, 30, 100 μM (5 細胞/各濃度)
- E-4031 (陽性対照): 100 nM (5 細胞)

49

## 結果 - hERG試験



### OP及びOC のhERG テール電流に対する 阻害率 (%)

	Vehicle	10 μM	30 μM	100 μM
OP	0.0 ± 3.3	5.1 ± 6.5	16.9 ± 8.9**	37.5 ± 4.7**
OC		2.4 ± 8.1	1.7 ± 5.1	5.7 ± 6.3

Data are presented the mean ± SD (n=5).

\*\* $p < 0.01$ , significantly different from the vehicle group (Dunnett's test)

Positive control:

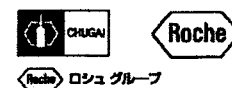
E-4031 at 100 nM: 88.0 ± 2.0 %.

50

- 試験標本: モルモット乳頭筋
- 刺激頻度: 1Hz
- 測定指標:
  - 最大立ち上がり速度 ( $V_{max}$ )
  - 活動電位時間 ( $APD_{30}$ ,  $APD_{60}$ ,  $APD_{90}$ ,  $APD_{30-90}$ ),
  - 活動電位高 (APA)
  - 静止膜電位(RMP)
- 被験物質
  - 対照: 0  $\mu$ M (6 標本)
  - OP: 3, 10, 30, 100  $\mu$ M (6 標本/各濃度)
  - OC: 10, 30, 100  $\mu$ M (6 標本/各濃度)
  - Sotalol (陽性対照): 30  $\mu$ M (6 標本)

51

## OPの結果 – モルモット乳頭筋活動電位試験



### OPのモルモット乳頭筋活動電位パラメータに対する影響

Test substance	Conc. ( $\mu$ M)	N	Mean percentage of pre-test value						
			RMP	APA	$APD_{30}$	$APD_{60}$	$APD_{90}$	$APD_{30-90}$	$V_{max}$
Vehicle	--	6	100.4 $\pm$ 1.1	99.8 $\pm$ 0.6	99.0 $\pm$ 3.3	98.8 $\pm$ 1.9	99.0 $\pm$ 1.7	98.6 $\pm$ 3.2	100.5 $\pm$ 1.7
OP	3	6	100.6 $\pm$ 0.9	99.9 $\pm$ 1.1	96.9 $\pm$ 3.3	98.0 $\pm$ 2.0	98.7 $\pm$ 1.4	101.9 $\pm$ 2.9	97.2 $\pm$ 5.0
	10	6	100.4 $\pm$ 1.3	100.3 $\pm$ 1.1	96.7 $\pm$ 3.1	97.7 $\pm$ 2.6	98.0 $\pm$ 2.6	100.7 $\pm$ 2.6	100.1 $\pm$ 3.5
	30	6	101.5 $\pm$ 0.6	100.8 $\pm$ 1.0	94.5 $\pm$ 6.2	96.2 $\pm$ 4.0	97.1 $\pm$ 3.3	102.7 $\pm$ 3.5	97.4 $\pm$ 4.2
	100	6	100.2 $\pm$ 1.1	99.0 $\pm$ 1.6	84.5 $\pm$ 5.6*	88.0 $\pm$ 4.0*	90.5 $\pm$ 3.1*	101.9 $\pm$ 3.5	92.6 $\pm$ 3.6*

Data are presented as mean percentage  $\pm$  SD (n=6) of pre-test values.  
 \* $p < 0.05$ , significantly different from the Vehicle group (Dunnnett's test).

52

## OC及びsotalolのモルモット乳頭筋活動電位パラメータに対する影響

Test substance	Conc. (μM)	N	Mean percentage of pre-test value						V <sub>max</sub>
			RMP	APA	APD <sub>30</sub>	APD <sub>60</sub>	APD <sub>90</sub>	APD <sub>30-90</sub>	
Vehicle	—	6	100.4 ±1.1	99.8 ±0.6	99.0 ± 3.3	98.8 ±1.9	99.0 ± 1.7	98.6 ±3.2	100.5 ± 1.7
OC	10	6	100.4 ±0.6	100.2 ±0.8	99.1 ± 1.6	99.8 ±0.9	99.5 ± 0.6	100.3 ±1.8	101.7 ± 2.6
	30	6	100.9 ±0.8	100.0 ±0.9	99.6 ± 3.3	100.0 ±2.8	100.5 ±2.4	102.0 ±3.0	100.1 ± 3.1
	100	6	99.8 ±1.9	100.4 ±0.4	98.6 ± 2.4	99.2 ±1.9	99.5 ± 1.4	101.1 ±0.8	101.6 ± 5.0
Sotalol	30	6	100.9 ±1.5	99.4 ±0.6	102.1 ± 6.9	115.9 ±5.0\$	117.3 ±5.0#	141.9 ±8.2\$	100.1 ± 2.0

Data are presented as mean percentage ± SD (n=6) of pre-test values

Positive control:

\$p<0.05, significantly different from the Vehicle group (Student's t test)

#p<0.05, significantly different from the Vehicle group (Aspin-Welch's test)

53

## hERG 及び 活動電位試験の総括

### OC:

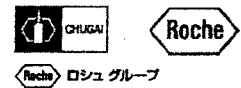
- 最高濃度 (100 μM)までhERG 試験及び 活動電位試験のパラメータに対して、影響は認められなかった

### OP:

- 30 及び100 μM で濃度依存的にhERG電流を抑制し、抑制率はそれぞれ、16.9%及び37.5%であった
  - したがって、IC<sub>50</sub> は 100 μMより高濃度である
- 100 μMでモルモット乳頭筋活動電位時間(APD<sub>30</sub>, APD<sub>60</sub>, APD<sub>90</sub>) 及び V<sub>max</sub>を軽度減少した

54

## hERG及びモルモット乳頭筋活動電位試験についての考察 – OC



64

- OCは最高濃度である100  $\mu$ MまでhERG 電流及び 活動電位に影響を与えなかった
- 100  $\mu$ Mは臨床用量投与時の血漿中濃度に比べ 80倍以上高い

55

## hERG及びモルモット乳頭筋活動電位試験についての考察 – OP



- 30  $\mu$ M以上でhERG電流を抑制し, 100  $\mu$ Mで活動電位時間及び $V_{max}$ を減少した  
これらの結果からOPは30  $\mu$ M以上で $I_{Kr}$ チャンネルを抑制し, 100  $\mu$ MではCa及びNaチャンネルを阻害することが示唆される
- 30  $\mu$ Mは臨床用量投与時の血漿中濃度の100倍以上に相当する
- OPIによるhERGの抑制が認められたが, 活動電位時間に対するOPの影響としては, 延長作用ではなく, 短縮作用が認められた

56

- OCでは催不整脈を示唆する所見は認められなかった
- OPでは*in vitro*試験において、臨床用量を超える高い濃度でのみ、心筋に存在する種々のイオンチャンネルに対する影響がみられた
- これらの新しいデータはタミフルの心血管系に対する安全性を更に裏付ける結果であり、心血管系への影響に関するExpert Reportに示した非臨床試験及び臨床試験の結果と一致するものである



## オセルタミビル幼若ラット試験成績における脳中濃度について

中外製薬株式会社  
安全管理責任者 横山俊二

今回新たに実施された幼若ラットを用いたリン酸オセルタミビル単回投与毒性試験におけるオセルタミビルの脳中濃度は、2001年に実施された幼若ラット試験での結果に比べ非常に低いものでした。このため、中外製薬およびロシュ社は直ちに試験成績を改めて確認したところ、以前に行われた試験では測定値の計算に誤りがあり、特に幼若ラットにおけるオセルタミビルの脳中濃度は、実際よりも高い濃度で算出されていたことが確認されました。この試験は試験計画書に沿って行われたもので、その元となるデータは問題のないものです。その元となるデータからの計算の誤りを正した場合には、新しい試験の成績とほぼ矛盾はないと考えられます。ロシュ社は、以前に行われた試験の血漿中および脳中の薬物濃度の測定を実施した CRO に対し、誤りを正した報告書の提出を求めています。

### 経緯

2001年に外部CRO 2社に委託して幼若ラットを用いたリン酸オセルタミビル単回投与毒性試験(以下、旧試験)が実施された(1社は動物実験を担当、他の1社が血漿中および脳中の薬物濃度測定を担当)。この試験において、オセルタミビル1000mg/kg単回投与時の脳中オセルタミビル未変化体AUCは、42日齢のラットと比較して7日齢ラットでは1500倍、14日齢ラットでは650倍になるとの結果を得た。中外製薬・ロシュ社はこの試験成績を既に報告している(カプセル剤予防承認時参考資料二-1;2004年7月9日承認)。

ロシュ社は、米国NIHが実施する2歳未満の乳幼児におけるタミフルの安全性と薬物動態試験をサポートするため、新たな幼若ラット試験(以下、新試験)を計画した。新試験は、旧試験とは別のCRO 2社に委託して本年4月に開始された。タミフルの基礎ワーキンググループ(WG)からも、本試験成績提出の指示を受けた。

新試験については、10月にロシュ社より、旧試験で認められたような高い脳中濃度を示す成績が得られていないようだとの報告を受けた。このため、直ちに両社で協議し、両試験データのレビューを実施して不整合の原因を探った。10月末までに、旧試験において脳中濃度の計算における問題点が見出され、ロシュ社は直ちに担当CROに測定結果の再確認を指示した。一方、新試験については、10月30日に血漿中・脳中薬物濃度測定の報告書が作成され、ロシュ社はデータのレビューを行い問題のないことを確認した。11月14日に中外製薬もこの報告書を受け取り、内容を確認した。

これを受け、11月16日に新旧試験成績の不整合、推定される原因および今後の対応をまとめたカバーレターを添え、新しい幼若ラット毒性試験の報告書(草案)を厚生労働省医薬食品局安全対策課に提出した。同日、ロシュ社はEMAとFDAに同じ内容の報告を行った。

### 旧試験における脳中濃度計算における問題点

- 1) 全ての脳組織サンプルについて検量線を誤って使用したため、オセルタミビルおよびオセルタミビルカルボキシレート(活性代謝物)の濃度が実際よりも10倍高く算出されていた。
- 2) 幼若ラットの脳組織サンプル中のオセルタミビルの濃度の計算において、希釈倍率の適用を誤ったため、実際よりも50倍高く算出されていたものがあった。

上記1)2)の誤りが重なったサンプルについては、脳中のオセルタミビル濃度は、実際よりも500倍高い濃度に算出されていた。

以上の問題点は、中外製薬・ロシュ社の確認を通じて見出されたものです。ロシュ社が旧試験を委託したCROは、ロシュ社からこの問題点の指摘を受け、現在データの詳細について改めて確認を進めており、報告書が再提出される予定です。

新試験では、幼若ラットにおけるタミフルの血漿中濃度に対する脳中濃度の比は低い結果が得られています。中外製薬・ロシュ社では、旧試験での問題点を是正した場合、新試験と旧試験の脳中濃度の結果に大きな矛盾がないことを確認しています。

なお、他の試験成績の信頼性についても、改めて確認を進めております。

以上