

ヘプセラ錠 10

第 2 部 CTD の概要(サマリー)

2.6 非臨床試験の概要

グラクソ・スミスクライン株式会社

2.6. 非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.1. 緒 言

B 型慢性肝炎治療には、2000 年に保険適用された B 型肝炎ウイルス（以下、HBV）に対する抗ウイルス薬であるラミブジンが使用されている。ラミブジンは、副作用が少なく長期投与が可能であり、従来のステロイド離脱療法やインターフェロン療法より優れた治療効果が報告されている。しかし、ラミブジンの長期投与によってラミブジンに対する感受性の低下した YMDD 変異 HBV の出現による肝炎の再燃が問題になっている。

アデホビルピボキシル（以下、ADV）の活性代謝物であるアデホビルはラミブジンと同様に、HBV DNA ポリメラーゼ阻害作用によって抗 HBV 活性を示す抗ウイルス薬であり、YMDD 変異株に対しても野性株と同程度の高い抗ウイルス活性を示すことが *in vitro* 試験で明らかとなっている。

ADV の申請用量は 10mg 1 日 1 回であり、ラミブジン治療中に肝炎の再燃した B 型慢性肝炎及び B 型肝炎硬変患者に対して、ラミブジンと併用で使用される予定である。

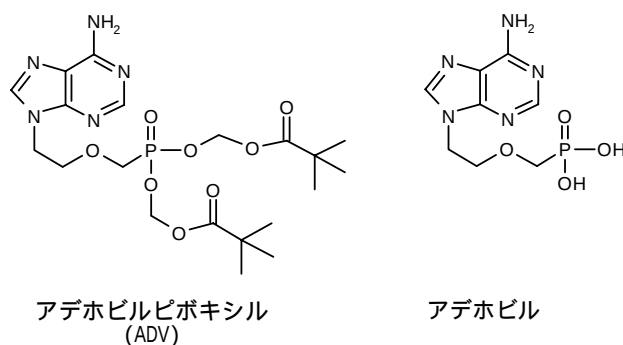


図2.6.1-1 アデホビルピボキシル及びアデホビルの化学構造

2.6.2. 薬理試験の概要文

2.6.2.1. まとめ

今回、アデホビルピボキシル（以下、ADV）を申請するにあたり、効力を裏付ける試験として作用機序に関する試験成績、ヒト B 型肝炎ウイルス（以下、HBV）に対する *in vitro* 及び *in vivo* の抗ウイルス活性に関する成績ならびに YMDD 変異ウイルスに対する *in vitro* の抗ウイルス活性の試験成績を示した。また、副次的薬理試験として、ヒト免疫不全ウイルス（以下、HIV）及びヒトヘルペスウイルスに対する *in vitro* の抗ウイルス活性に関する試験成績を示した。

作用機序

ADV は生体内でアデホビルに代謝され、更に細胞内でアデホビルニリン酸にリン酸化される。このアデホビルニリン酸が HBV に対して抗ウイルス活性を示す。

アデホビルニリン酸はリコンビナント HBV DNA ポリメラーゼを阻害し、その阻害定数（以下、 K_i 値）は $0.10\mu\text{mol/L}$ であった。一方、ヒト DNA ポリメラーゼ α 、 β あるいは γ に対する K_i 値は HBV DNA ポリメラーゼに対する K_i 値の約 10 倍（ α 及び γ ）あるいは約 700 倍（ β ）であった。また、アデホビルニリン酸は DNA ポリメラーゼ α 、 β あるいは γ により DNA に取り込まれるものの、その程度は天然基質である dATP の 1.1 ~ 6.0% であった。

In vitro 抗ウイルス活性

HBV 遺伝子をトランスフェクトした HepG2 細胞において、アデホビルは HBV の複製を抑制し、その IC_{50} 値は $0.22 \sim 0.790\mu\text{mol/L}$ であった。

アヒル B 型肝炎ウイルス（以下、DHBV）感染アヒル肝細胞において、アデホビルは培養液中の DHBV-DNA 量を減少させ、その IC_{50} 値は $0.14\mu\text{mol/L}$ であった。また、 $1\mu\text{mol/L}$ 以上で、肝細胞内の閉環 2 本鎖 DNA（以下、CCC DNA）量を低下させた。

ウッドチャック肝炎ウイルス（以下、WHV）感染ウッドチャック肝細胞において、アデホビルは $1\mu\text{mol/L}$ 以上の濃度で WHV-DNA 量を低下させた。

DHBV 感染アヒル肝細胞におけるアデホビルの抗ウイルス活性は、ラミブジンと併用することで相乗的あるいは相加的に増大した。

アデホビルの細胞毒性を示す濃度（以下、 CC_{50} 値）は HBV に対する抗ウイルス活性を示す濃度（以下、 IC_{50} 値）より 83 倍以上高濃度であり、DHBV に対しては 200 倍以上高濃度であった。

変異 HBV に対する活性

ラミブジン低感受性の YMDD 変異（M552I、M552V 及び L528M/M552V）を有する HBV DNA ポリメラーゼに対して、アデホビルニリン酸の K_i 値は野生型の 0.79 ~ 2.2 倍を示し、野生型及び YMDD 変異 HBV DNA ポリメラーゼに対して同程度の阻害活性を示した。また、アデホビルは YMDD 変異ウイルスに対して野生株と同程度の抗ウイルス活性を示した。

肝移植時の HBV 再感染予防に使用されるモノクロナル抗体 HBIg に対して低感受性の HBIg エスケープ変異 HBV に対して、アデホビルは野生株と同程度の抗ウイルス活性を示した。

In vivo での抗ウイルス活性

HBV-DNA 発現トランスジェニックマウスに ADV を 10 日間経口投与した時、0.10mg/kg/日以上で血清中 HBV-DNA 量を、1.0mg/kg/日以上で肝臓中 HBV-DNA 量をそれぞれ低下させた。

DHBV 感染アヒルにアデホビル 15mg/kg/日を 3 週間腹腔内投与した時、血清中 DHBV-DNA 量及び肝臓中 CCC DNA 量を低下させた。

WHV 感染ウッドチャックに ADV 5 あるいは 15mg/kg/日を 12 週間経口投与した時、投与 2～12 週間後まで、血清中 WHV-DNA 量を低下させた。

副次的薬理試験

HIV-1 感染 MT-2 細胞において、アデホビルは HIV の複製を抑制し、その IC₅₀ 値は 16μmol/L であった。また、各種ヘルペスウイルス感染細胞において、アデホビルは 1.1～150μmol/L の濃度で抗ウイルス活性を示した。

安全性薬理試験

中枢神経系、心血管系、呼吸系、胃腸管系及び腎 / 泌尿器系に及ぼす影響を ADV の単回投与により検討した結果、ADV 30mg/kg 以上の経口投与により、尿量及び電解質 (Na⁺、K⁺ 又は Cl⁻) 排泄量の低下ならびに胃内容物排泄の遅延がみられた。

表 2.6.2-1 効力を裏付ける試験一覧（その1）

試験の種類	試験方法	投与方法	結 果	資料番号
作用機序	HBV DNA ポリメラーゼ活性の測定	<i>in vitro</i>	アデホビルニリン酸 K_i 値： 0.10±0.01μmol/L (平均値±S.D., n=3)	4.2.1.1.1
	ヒト DNA ポリメラーゼ (α, β, γ) 活性の測定	<i>in vitro</i>	アデホビルニリン酸の K_i 値： HBV DNA ポリメラーゼに対する K_i 値の約 10 倍 (α, γ) 及び約 700 倍(β)	4.2.1.1.2/ref
	ヒト DNA ポリメラーゼ (α, β, γ) によるアデホビルニリン酸の DNA への取り込み活性の測定	<i>in vitro</i>	アデホビルニリン酸の V_{max}/K_m (取り込み活性の指標)：天然基質 dATP の 1.1%(β), 4.8%(α) 及び 6.0%(γ)	4.2.1.1.3
<i>In vitro</i> 抗ウイルス活性	HBV 発現 HepG2 細胞におけるアデホビル存在下でのウイルス DNA 量を測定	<i>in vitro</i>	抗ウイルス活性： IC_{50} 値：0.22μmol/L (HepG2 49-27 細胞) IC_{50} 値：0.790μmol/L, IC_{90} 値 9.161μmol/L (HepG2 2.2.15 細胞)	4.2.1.1.4 4.2.1.1.5
	DHBV 感染アヒル肝細胞におけるアデホビル存在下でのウイルス DNA 量を測定	<i>in vitro</i>	抗ウイルス活性： IC_{50} 値：0.14μmol/L (n=4) (8 日間培養後)	4.2.1.1.6/ref
	DHBV 感染アヒル肝細胞におけるアデホビル存在下でのウイルス DNA 量及び CCC DNA 量を測定	<i>in vitro</i>	DHBV-DNA 量の低下： IC_{50} 値：0.01μmol/L (7 日間培養後) CCC DNA 量の低下：≥ 1μmol/L	4.2.1.1.7
	WHV 感染ウッドチャック肝細胞におけるアデホビル存在下でのウイルス DNA 量及び CCC DNA 量を測定	<i>in vitro</i>	WHV-DNA 量の低下： ≥ 1μmol/L (10 ~ 24 日間培養後) CCC DNA 量に影響なし	4.2.1.1.8/ref
	DHBV 感染アヒル肝細胞におけるアデホビル及びラミブジン存在下でのウイルス DNA 量を測定	<i>in vitro</i>	併用時の抗ウイルス活性： 1:1 (アデホビル:ラミブジン)：相加的 4:1, 1:4 及び 1:9：相乗的	4.2.1.1.9/ref
	DHBV 感染アヒル肝細胞におけるアデホビル存在下でのウイルス DNA 量及び細胞毒性を測定	<i>in vitro</i>	Therapeutic index (細胞毒性(CC_{50} 値) / 抗ウイルス活性(IC_{50} 値))：20000 (DHBV)	4.2.1.1.7
抗ウイルス活性と細胞毒性	HBV 発現 HepG2 細胞におけるアデホビル存在下でのウイルス DNA 量及び細胞毒性を測定	<i>in vitro</i>	Therapeutic index：>83 (HBV)	4.2.1.1.6/ref
	HBV 発現 HepG2 細胞と HB611 細胞及び DHBV 感染アヒル肝細胞におけるアデホビル存在下でのウイルス DNA 量及び細胞毒性を測定	<i>in vitro</i>	Therapeutic index：≥ 125 (HBV) Therapeutic index：200 (DHBV)	4.2.1.1.10/ref

表 2.6.2-2 効力を裏付ける試験一覧（その2）

試験の種類	試験方法	投与方法	結 果	資料番号
YMDD 変異 HBV に対する 抗ウイルス活性	YMDD 変異 HBV DNA ポリメラーゼ活性の測定	<i>in vitro</i>	K _i 比 (変異型 K _i 値 / 野生型 K _i 値) : アデホビルニリン酸 : 0.79 ~ 2.2 ラミブジンニリン酸 : 8.0 ~ 25.2	4.2.1.1.1
	YMDD 変異 HBV 発現 HuH-7 細胞におけるアデホビル存在下でのウイルス DNA 量を測定	<i>in vitro</i>	IC ₅₀ 比 (変異型 IC ₅₀ 値 / 野生型 IC ₅₀ 値) : アデホビル : 0.2 ~ 8.4 ラミブジン : 18 ~ 8620 Emtricitabine : >42	4.2.1.1.11/ref
	YMDD 変異 HBV 発現 HepG2 細胞におけるアデホビル存在下でのウイルス DNA 量を測定			4.2.1.1.12/ref
	YMDD 変異 HBV 発現 HepG2 細胞におけるアデホビル存在下でのウイルス DNA 量を測定			4.2.1.1.13/ref
HBIG エスケープ変異 HBV に対する 抗ウイルス活性	HBIG エスケープ変異 HBV 発現 HepG2 細胞におけるアデホビル存在下でのウイルス DNA 量を測定	<i>in vitro</i>	抗ウイルス活性 (7 日間培養後) : IC ₅₀ 値 : 0.24μmol/L (野生型) IC ₅₀ 値 : 0.08μmol/L (T476N 変異) IC ₅₀ 値 : 0.10μmol/L (W501Q 変異)	4.2.1.1.14/ref
<i>In vivo</i> 抗ウイルス活性	HBV 発現トランスジェニックマウスの血清及び肝臓中のウイルス DNA 量を測定	ADV 0.10 ~ 100mg/kg/日 経口投与、10 日間	血清中 HBV-DNA 量の低下 : ≥ 0.1mg/kg/日 肝臓中 HBV-DNA 量の低下 : ≥ 1.0mg/kg/日	4.2.1.1.15/ref
	DHBV 感染アヒルの血清及び肝臓中のウイルス DNA 量を測定	アデホビル 15mg/kg/日 腹腔内投与、3 週間	投与期間中 : 血中の DHBV 増殖をほぼ完全に抑制 投与期間終了時 : CCC DNA 量は低下 3 週間の回復期間 : DHBV-DNA 量は一過性に増加、CCC DNA 量は対照群のレベルにまで増加	4.2.1.1.7
	WHV 感染ウッドチャックの血清中ウイルス DNA 量を測定	ADV 5, 15mg/kg/日 経口投与、12 週間	投与期間終了時 : WHV-DNA 量 1/45 以下 (5mg/kg/日) 及び 1/300 以下 (15mg/kg/日) に低下 6 週間の回復期間後 : いずれも対照群のレベルにまで増加	4.2.1.1.16

表 2.6.2-3 副次的薬理試験及び薬理学的相互作用試験一覧

試験の種類		試験方法	投与方法	結 果	資料番号
副次的 薬理試験	抗 HIV 活性	HIV-1 感染 MT-2 細胞における抗ウイルス活性を測定	<i>in vitro</i>	IC ₅₀ 値：16μmol/L	4.2.1.2.1/ref
	抗ヘルペ スウイルス 活性	Epstein-Barr virus 発現 P3HR-1 細胞における 抗ウイルス活性を測定	<i>in vitro</i>	IC ₅₀ 値：1.1μmol/L	4.2.1.2.2/ref
		HSV-1 及び HSV-2 感染 HeLa S3 細胞における 抗ウイルス活性を測定	<i>in vitro</i>	ID ₉₀ 値 ^a ：80μmol/L (HSV-1) ID ₉₀ 値：150μmol/L (HSV-2)	4.2.1.2.3/ref
		HHV-6 感染 HSB-2 細胞における抗ウイルス活性を測定	<i>in vitro</i>	IC ₅₀ 値：7.0μg/mL	4.2.1.2.4/ref
		Varicella-zoster virus 感染ヒト胎児肺細胞における 抗ウイルス活性を測定	<i>in vitro</i>	細胞変性効果の最小阻害濃度：10μg/mL	4.2.1.2.5/ref
		Cytomegalovirus 感染ヒト胎児肺細胞における 抗ウイルス活性を測定	<i>in vitro</i>	IC ₅₀ 値：27.9μg/mL	4.2.1.2.6/ref
薬力学的 薬物相互作用試験		該当する試験なし	-	-	-

a：ID₉₀ 値、ウイルス量を 90%抑制する濃度

表 2.6.2-4 安全性薬理試験一覧

試験の種類	試験方法 / 観察項目	動物種 / 系統	投与方法 (媒体 / 投与容量)	投与量 (mg/kg)	例数 / 群	特記所見	GLP 適用	資料番号
中枢神経系	症状・行動観察(Irwin 法)	CD-1 マウス	経 口 (50mmol/L クエン酸溶液, 20mL/kg)	0, 10, 30, 100	♂ 6	なし	適	4.2.1.3.1
心血管系・ 呼吸系	血圧, 心拍数, 左室収縮期圧・ <i>dp/dt max</i> , 心電図, 大腿動脈血 流量・血管抵抗 呼吸数, 分時換気量, 1 回換気量	ビーグル犬	十二指腸内 (50mmol/L クエン酸溶液, 3mL/kg)	0, 4, 12	♀ 3 [#]	なし	適	4.2.1.3.2
腎/泌尿器系	尿量, Na ⁺ ・K ⁺ ・Cl ⁻ 排泄量, 尿 pH	SD ラット	経 口 (50mmol/L クエン酸溶液, 20mL/kg)	0, 10, 30, 100	♂ 8	100mg/kg：尿量及び Na ⁺ ・K ⁺ ・Cl ⁻ 排泄 量の低値, 30mg/kg：尿量及び K ⁺ 排泄量の低値	適	4.2.1.3.3
胃腸管系	胃重量, 炭末輸送能	SD ラット	経 口 (50mmol/L クエン酸溶液, 20mL/kg)	0, 10, 30, 100	♂ 8	≥ 30mg/kg：胃重量の高値 (胃内容物排 泄の遅延)	適	4.2.1.3.4

#：同一動物に 2 時間間隔で投与

2.6.2.2. 効力を裏付ける試験

2.6.2.2.1. 作用機序

プロドラッグである ADV は経口投与後、小腸のエステラーゼによってアデホビルに代謝される（2.6.4.5.4 参照）。アデホビルは細胞内に取り込まれた後、主にアデニル酸キナーゼによってリン酸化されアデホビルニリン酸になる¹⁾。

アデホビルニリン酸は、HBV DNA ポリメラーゼ阻害作用及び基質として DNA に取り込まれることによる DNA 鎖遮断作用²⁾を介して、HBV-DNA の複製を阻害する（図 2.6.2-1）。

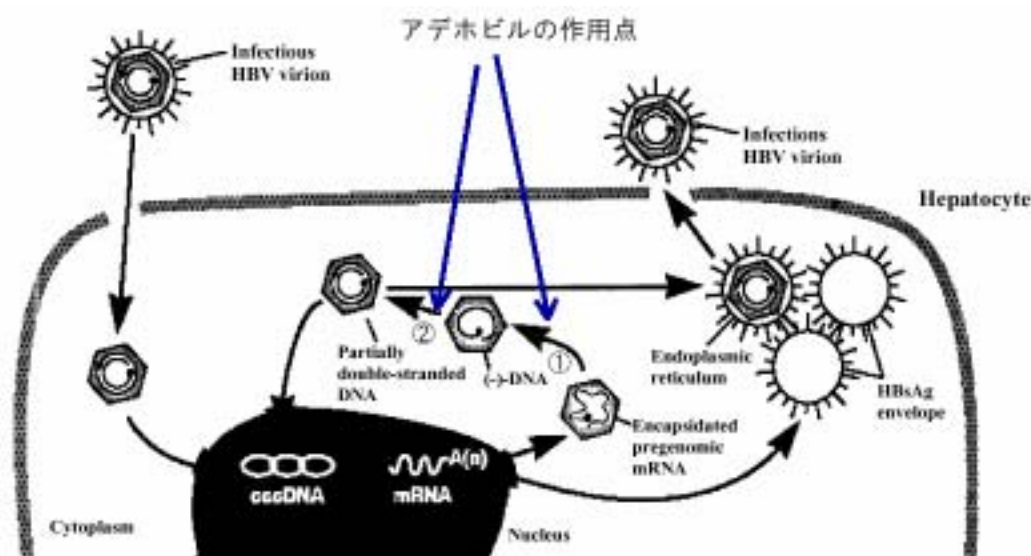


図 2.6.2-1 HBV のライフサイクルとアデホビルの作用点

アデホビルは HBV-DNA 複製過程において、いずれも HBV DNA ポリメラーゼによるプレゲノム mRNA を鋳型とする(-)鎖 DNA の合成（ ）及び（-）鎖 DNA を鋳型とする(+)鎖 DNA の合成（ ）を阻害する。

2.6.2.2.1.1. HBV DNA ポリメラーゼ阻害作用

4.2.1.1.1

【方法】

活性化ウシ胎児胸腺 DNA をリコンビナント HBV DNA ポリメラーゼ及び α -³²P-dATP とアデホビルニリン酸（0.12、0.24、0.48 μ mol/L）存在下でインキュベートした。活性化ウシ胎児胸腺 DNA への α -³²P-dATP の取り込みを指標に HBV DNA ポリメラーゼ活性を測定し、Lineweaver-Burk plot により、本酵素の dATP との親和性を表わす Michaelis-Menten 定数（以下、 K_m ）及びアデホビルの阻害定数（以下、 K_i ）を算出した。

【結果】

アデホビルニリン酸はリコンビナント HBV DNA ポリメラーゼを阻害し、その K_i 値は $0.10 \pm 0.01 \mu\text{mol/L}$ （平均値 $\pm$ S.D、 $n=3$ ）であった。本酵素の dATP に対する K_m 値は $0.38 \mu\text{mol/L}$ であり、本薬の K_i 値はその約 1/4 の値であった。

2.6.2.2.1.2. ヒト DNA ポリメラーゼに対する影響

2.6.2.2.1.2.1. ヒト DNA ポリメラーゼ阻害活性

4.2.1.1.2/ref

【方法】

活性化ウシ胎児胸腺 DNA とヒト DNA ポリメラーゼ (α 、 β あるいは γ) 及び ^3H -dATP とアデホビルニリン酸存在下で 37 でインキュベートした。活性化ウシ胎児胸腺 DNA への ^3H -dATP の取り込みを指標にヒト DNA ポリメラーゼ α 、 β あるいは γ の活性を測定し、Lineweaver-Burk plot により、これら酵素の dATP に対する K_m 値及びアデホビルニリン酸の K_i 値を算出した。

【結果】

ヒト DNA ポリメラーゼに対するアデホビルニリン酸の K_i 値は、HBV DNA ポリメラーゼに対する K_i 値の約 10 倍 (ヒト DNA ポリメラーゼ α 及び γ) あるいは約 700 倍 (ヒト DNA ポリメラーゼ β) であった (表 2.6.2-5)。

表 2.6.2-5 ヒト DNA ポリメラーゼに対する阻害活性

4.2.1.1.2/ref 表 2 を修飾

	アデホビルニリン酸 K_i 値 ($\mu\text{mol/L}$)	アデホビルニリン酸 K_i 値比 [#]	dATP K_m 値 ($\mu\text{mol/L}$)
DNA ポリメラーゼ α	1.18	11.8	2.7
DNA ポリメラーゼ β	70.4	704	5.6
DNA ポリメラーゼ γ	0.97	9.7	0.72

: ヒト DNA ポリメラーゼ / HBV DNA ポリメラーゼ

2.6.2.2.1.2.2. DNA へのアデホビルニリン酸の取り込み

4.2.1.1.3

【方法】

51 塩基 DNA を、それに相補的な 18 塩基の 5'- γ - ^{32}P -DNA 及びヒト DNA ポリメラーゼ (α 、 β あるいは γ) とアデホビルニリン酸存在下で 37 でインキュベートした。反応終了後に電気泳動し、アデホビルが付加された 19 塩基の DNA 量をオートラジオグラフィーで測定した。Lineweaver-Burk plot により、この反応における K_m 値、最大反応速度 (以下、 $V_{\max}$) 及び $V_{\max}/K_m$ を算出し、ヒト DNA ポリメラーゼによるアデホビルの DNA への取り込み活性を検討した。

【結果】

アデホビルニリン酸はヒト DNA ポリメラーゼ α 、 β 及び γ により DNA に取り込まれるものの、天然基質である dATP に比較して K_m 値は大きく、取り込み活性の指標である $V_{\max}/K_m$ 比は dATP の 1.1 ~ 6.0% であった (表 2.6.2-6)。

表 2.6.2-6 ヒト DNA ポリメラーゼによる DNA への取り込み

4.2.1.1.3 表 1～4 を修飾

	基 質	K_m ($\mu\text{mol/L}$)	$V_{\max}$ ($\text{pmol min}^{-1} \text{unit}^{-1}$)	$V_{\max}/K_m$	$V_{\max}/K_m$ 比 (dATP を 100%)
DNA ポリメラーゼ α	dATP	0.46	1.05	2.28	100
	アデホビルリン酸	2.71	0.29	0.11	4.8
DNA ポリメラーゼ β	dATP	2.34	1.05	0.45	100
	アデホビルリン酸	121	0.71	0.005	1.1
DNA ポリメラーゼ γ	dATP	0.026	2.74	105	100
	アデホビルリン酸	0.46	2.99	6.44	6.0

2.6.2.2.2. in vitro 抗ウイルス活性

HBV ならびに HBV と同じヘパドナウイルス科に属する DHBV 及び WHV に対する抗ウイルス活性を *in vitro* で検討した。

2.6.2.2.2.1. HBV に対する抗ウイルス活性

4.2.1.1.4 及び 4.2.1.1.5

【方法】

HBV 遺伝子をトランスフェクトした HepG2 細胞を被験物質存在下で 1 週間 (HepG2 49-27 細胞) あるいは 2 週間 (HepG2 2.2.15 細胞) 培養し、細胞内の HBV-DNA 量を Southern blot 法で測定した。抗ウイルス活性は、HBV-DNA 量を 50 及び 90% 抑制する濃度 (IC_{50} 値及び IC_{90} 値) で表した。アデホビルは、0.04、0.08、0.25、0.75、1.5 $\mu\text{mol/L}$ (HepG2 49-27 細胞) 及び 0.01、0.05、0.1、0.5、1、5、10 $\mu\text{mol/L}$ (HepG2 2.2.15 細胞) の濃度を使用した。

【結果】

アデホビルは HepG2 49-27 細胞中の HBV の複製を抑制し、その IC_{50} 値は 0.22 $\mu\text{mol/L}$ であった (表 2.6.2-7)。アデホビルの抗ウイルス活性は tenofovir と同程度であった。HepG2 2.2.15 細胞でのアデホビルの IC_{50} 値及び IC_{90} 値はそれぞれ 0.790 及び 9.161 $\mu\text{mol/L}$ であり (表 2.6.2-8)、また、プロドラッグ ADV の IC_{50} 値はアデホビルより低値であった。

表 2.6.2-7 HBV-DNA 発現 HepG2 49-27 細胞における in vitro 抗ウイルス活性

4.2.1.1.4 表 1 を修飾

薬 物	IC_{50} 値 ($\mu\text{mol/L}$)
アデホビル	0.22 ± 0.01
Tenofovir	0.19 ± 0.01

平均値 $\pm$ S.D. (n=6)

表 2.6.2-8 HBV-DNA 発現 HepG2 2.2.15 細胞における in vitro 抗ウイルス活性

4.2.1.1.5 表 2 を修飾

薬 物	IC_{50} 値 ($\mu\text{mol/L}$)	IC_{90} 値 ($\mu\text{mol/L}$)
アデホビル	0.790 ± 0.230	9.161 ± 13.71
ADV	0.097 ± 0.016	0.552 ± 0.437

平均値 $\pm$ S.D.

2.6.2.2.2. DHBV に対する抗ウイルス活性**2.6.2.2.2.1. DHBV-DNA 量に及ぼす影響**

4.2.1.1.6/ref

【方法】

DHBV 陽性の 2 週齢のアヒルの肝臓から単離した肝細胞をアデホビル存在下で 8 日間培養し、培養液中の DHBV-DNA 量を dot blot 法で測定した。

【結果】

アデホビルは培養液中の DHBV-DNA 量を減少させ、その IC_{50} 値は $0.14\mu\text{mol/L}$ ($n=4$) であった。

2.6.2.2.2.2. DHBV CCC DNA 量に及ぼす影響

4.2.1.1.7

【方法】

DHBV 非感染のアヒル胎児から分離した肝細胞に DHBV ($2 \times 10^9 \sim 9 \times 10^9$ ゲノム相当量) を 37 で 2 時間培養することにより感染させ、4 日後から 7 日間、薬物 (アデホビル、ラミブジンいずれも 0.1 、 1 、 $10\mu\text{mol/L}$) 存在下で培養した。培養終了後、肝細胞から DNA を抽出し、DHBV CCC DNA ^{注1)} 量及び総 DNA 量を Southern blot 法で測定した。培養液中の DHBV-DNA 量は dot blot 法で測定した。

【結果】

アデホビルは $1\mu\text{mol/L}$ 以上の濃度で肝細胞内の DHBV CCC DNA 量を低下させた (表 2.6.2-9)。総 DHBV-DNA 量に対しては、 $0.1\mu\text{mol/L}$ 以上の濃度で低下させた。ラミブジンも同様に CCC DNA 量及び総 DNA 量を低下させた。

また、アデホビル及びラミブジンは培養液中に遊離する DHBV-DNA 量も低下させ、その IC_{50} 値はそれぞれ 0.01 及び $0.1\mu\text{mol/L}$ であった。

注1) 閉環 2 本鎖 DNA

表 2.6.2-9 DHBV 感染肝細胞における CCC DNA に対する効果

4.2.1.1.7 図 1 の数値をまとめた

DNA 種	薬 物 ($\mu\text{mol/L}$)		DNA 量 (arbitrary unit)					
			D3 ^{a)}	D5	D7	D9	D11	D13
			投与 1 日前	投与 2 日目	投与 4 日目	投与 6 日目	投与後 1 日目	投与後 3 日目
CCC DNA	薬物非処理対照		96	74	64	38	58	36
	アデホビル	0.1	74	103	44	32	38	36
		1	47	56	33	17	13	15
		10	49	44	30	19	23	23
	ラミブジン	0.1	68	86	78	44	68	56
		1	74	43	29	19	14	18
		10	72	55	37	23	16	24
総 DHBV-DNA	薬物非処理対照		113	153	142	139	125	126
	アデホビル	0.1	132	84	104	40	61	28
		1	104	106	37	1	4	4
		10	125	143	71	22	24	6
	ラミブジン	0.1	128	124	85	15	26	20
		1	180	220	76	29	5	13
		10	170	90	55	19	18	6

a) DHBV 感染後の日数、D3 は感染後 3 日目。薬物は D4 から D10 まで 7 日間培養液に添加した。

2.6.2.2.3. WHV に対する抗ウイルス活性

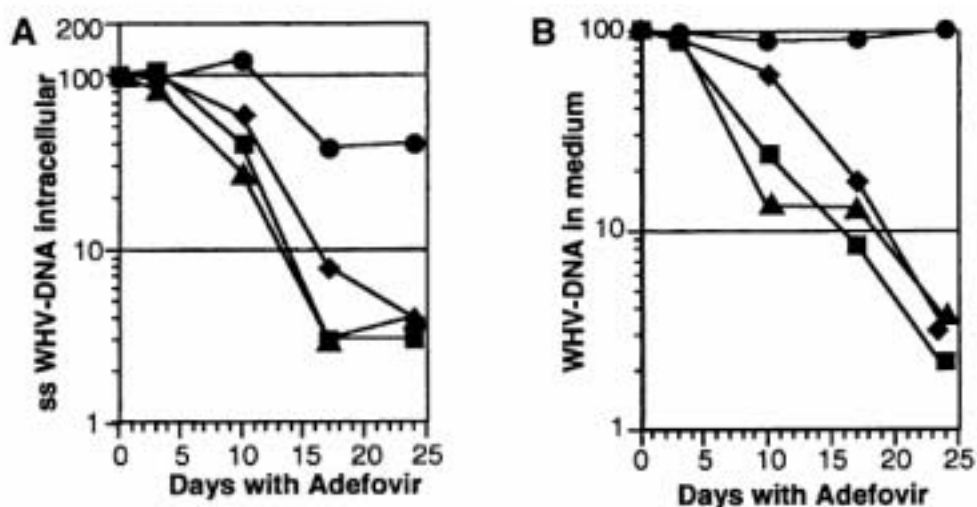
4.2.1.1.8/ref

【方法】

WHV に慢性的に感染したウッドチャックの肝臓から単離した肝細胞をアデホビル (1、10、100 $\mu\text{mol/L}$) 存在下で 24 日間培養した。培養終了後、Southern blot 法で、WHV-DNA 量及び WHV CCC DNA 量を測定した。

【結果】

アデホビルは 1 $\mu\text{mol/L}$ 以上の濃度で 10 日目以降、細胞内及び培養液中の WHV-DNA 量を低下させ、24 日目では 96%以上減少させた (図 2.6.2-2)。一方、CCC DNA 量に対して、アデホビルは影響を示さなかった (図 2.6.2-3)。

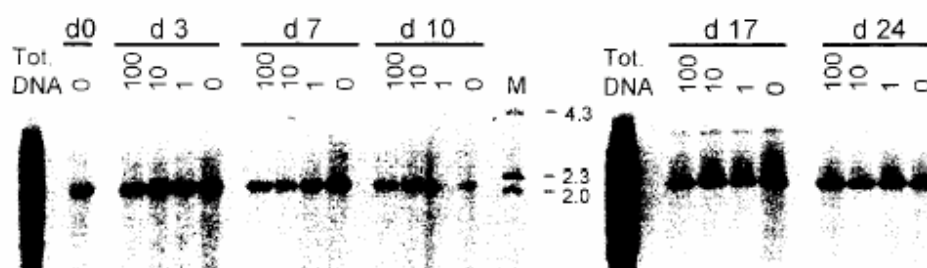


A : 細胞内の WHV-DNA 量の推移、B : 培養液中の WHV-DNA 量の推移。いずれも、培養 0 日目の WHV-DNA 量を 100 とした。ssWHV-DNA : 1 本鎖 WHV-DNA

アデホビル濃度 ● : 0、○ : 1 μmol/L、■ : 10 μmol/L、▲ : 100 μmol/L

図 2.6.2-2 WHV 感染ウッドチャック肝細胞における抗ウイルス効果

4.2.1.1.8/ref 図 2 から転載



d0 : 培養開始日、d3 ~ d24 : 培養 3 日目 ~ 24 日目、Tot. DNA : 総 DNA

図 2.6.2-3 WHV 感染ウッドチャック肝細胞における CCC DNA に対する効果

4.2.1.1.8/ref 図 5 から転載

2.6.2.2.2.4. ラミブジンとの併用効果

4.2.1.1.9/ref

〔方法〕

先天的 DHBV 感染 Pekin-Aylesbury アヒル (孵化 7 ~ 14 日齢) から肝細胞を分離し、37 °C で 1 日間培養後、アデホビル、ラミブジン (いずれも 0.008、0.016、0.032、0.064、0.13、0.26、0.51、1、2、5 μmol/L) を単独あるいは併用で培養液に添加して更に 9 日間培養した。培養終了後、肝細胞から DNA を抽出し、dot blot 法で DHBV-DNA 量を測定した。両剤の単独及び併用時の濃度反応曲線のデータより、両薬の併用効果を Loewe additivity model 及び Bliss independence model^{3,4)} を用いて検討した。

【結果】

アデホビル及びラミブジンは単独で、細胞内 DHBV-DNA 量を低下させ、その IC₅₀ 値はそれぞれ 0.12 及び 0.20 µmol/L であった（表 2.6.2-10）。4 種類の異なる配合比で併用した場合の IC₅₀ 値は総濃度として 0.06 ~ 0.13 µmol/L であり、アデホビルとラミブジンの併用効果は配合比が 4:1、1:4 及び 1:9 の場合には相乗的であり、1:1 の場合には相加的と判定された。

表 2.6.2-10 DHBV 感染アヒル肝細胞におけるラミブジンとの抗ウイルス作用の併用効果

4.2.1.1.9/ref の表 1 を修飾

薬 物		抗ウイルス 活性 [#] (IC ₅₀ 値, µmol/L)	用量反応 曲線の相 関係数 (γ^2)	Combination index (Loewe additivity model ^{#1})	IC ₅₀ 値の濃度で予想 される%inhibition (Bliss independence model ^{#2})	併用 効果
単 独	アデホビル	0.12 ± 0.01	1.0	-	-	-
	ラミブジン	0.20 ± 0.02	0.97	-	-	-
併 用 (アデホビル： ラミブジン)	4:1	0.06 ± 0.01	0.97	0.46 ± 0.15 ^a	21 ± 6.9 ^c	相乗的
	1:1	0.13 ± 0.01	0.98	0.87 ± 0.29	32 ± 10.5	相加的
	1:4	0.12 ± 0.01	0.99	0.68 ± 0.22 ^b	17 ± 5.6 ^c	相乗的
	1:9	0.13 ± 0.01	0.98	0.69 ± 0.23 ^b	20 ± 6.6 ^c	相乗的

平均値 ± S.D. (n=3)

#：併用の場合は両薬物の総濃度

a, b：統計学的有意水準それぞれ p<0.05 及び p<0.1 で 1.00 より小さい。

c：統計学的有意水準 p<0.05 で 50%より小さい。

#1：Combination index(C.I.) = $da/Da + db/Db$ の数値が 1 に近い値であれば相加的、統計学的に有意差をもって 1 以下であれば相乗的と判定される（da, db：併用効果を示す時のそれぞれの薬物濃度、Da, Db：各薬物単独で同じ効果を示すのに必要なそれぞれの濃度）。

#2：C.I. = $da/Da + db/Db = 1$ （相加的併用効果）と仮定し、併用時の 50%阻害を示す各薬物濃度 da, db をこの式に代入する。この式が成り立ち、かつそれぞれが同じ% inhibition を示す Da, Db の濃度を各薬物の濃度反応曲線から求める。この時の% inhibition が 50%に近い値であれば相加的、統計学的に有意差をもって 50% 以下であれば相乗的と判定する。

2.6.2.2.2.5. 抗ウイルス活性と細胞毒性

4.2.1.1.7, 4.2.1.1.6/ref 及び 4.2.1.1.10/ref

【方法】

HBV 遺伝子をトランスフェクトした HepG2 2.2.15 細胞及び HB611 細胞をアデホビル存在下で 9 日間培養した。培養終了後、培養液中の DNA を抽出し、HBV-DNA 量を dot blot 法で測定した。また、DHBV 陽性アヒルの肝細胞をアデホビル存在下で 7~8 日間培養し、DHBV-DNA 量を同様に測定した。細胞毒性の指標である CC₅₀ 値は 6-³H-thymidine 取り込みあるいは neutral red 法により算出した。

【結果】

アデホビルは HBV に対して抗ウイルス活性を示し、その IC₅₀ 値は 0.7 ~ 1.2 µmol/L であった。一方、細胞毒性の指標である CC₅₀ 値はヒト肝臓株化細胞で 100 µmol/L 以上であり、HBV に対する抗ウイルス活性と細胞毒性の比（therapeutic index）は 83 倍以上であった。DHBV に対しても、アデホビルは 0.01 ~ 0.2 µmol/L の IC₅₀ 値で抗ウイルス活性を示し、therapeutic index は 200 倍以上であった。

表 2.6.2-11 HBV 及び DHBV に対する抗ウイルス活性と細胞毒性

4.2.1.1.6/ref 表 1 及び 4.2.1.1.10/ref p145, p147&p148, 4.2.1.1.7 p426 & p429 本文の数値から作成

ウイルス	細胞	抗ウイルス活性 (IC ₅₀ 値, $\mu\text{mol/L}$)	細胞毒性 (CC ₅₀ 値, $\mu\text{mol/L}$)	Therapeutic Index (CC ₅₀ 値/IC ₅₀ 値)	資料番号
HBV	HepG2 2.2.15 細胞	1.2	>100	>83	4.2.1.1.6/ref
	HepG2 2.2.15 細胞	0.7	150	214	4.2.1.1.10/ref
	HB611 細胞	1.2	150	125	4.2.1.1.10/ref
DHBV	アヒル肝細胞	0.01	200 ^a	20000	4.2.1.1.7
	アヒル肝細胞	0.2	40	200	4.2.1.1.10/ref

a : neutral red 法

2.6.2.2.3. 変異 HBV に対する活性

2.6.2.2.3.1. YMDD 変異 HBV DNA ポリメラーゼに対する活性

4.2.1.1.1

B 型慢性肝疾患患者にラミブジンを長期投与することで、ラミブジンに対する感受性の低下した変異ウイルスが出現する。これらの変異ウイルスでは、HBV DNA ポリメラーゼの活性部位における保存性の高いサブドメイン C (YMDD モチーフ) の 552 番目のメチオニンがイソロイシンあるいはバリンへ変異 (M552I、M552V) しているため YMDD 変異ウイルスと呼ばれる^{5, 6, 7)}。更にこれらの変異に、同じく保存性の高いサブドメイン B 内の 528 番目のロイシンのメチオニンへの変異 (L528M) が付随する場合が多い⁸⁾。そこで、これらの変異を有する HBV DNA ポリメラーゼに対するアデホビルの阻害活性を検討した。

【方法】

YMDD 変異をもつ HBV DNA ポリメラーゼを作成し、HBV DNA ポリメラーゼ活性を、活性化ウシ胎児胸腺 DNA への α -³²P-dNTP の取り込みを指標として測定した。アデホビル二リン酸は 0.12、0.24、0.48 $\mu\text{mol/L}$ 、ラミブジン三リン酸は 0.5、1、2 $\mu\text{mol/L}$ (野生型)、1.1、2.2、4.4 $\mu\text{mol/L}$ (L528M)、2.5、5、10 $\mu\text{mol/L}$ (L528M/M552V) 及び 5、10、20 $\mu\text{mol/L}$ (M552V) の濃度をそれぞれ使用した。

【結果】

YMDD 変異 (M552I、M552V 及び L528M/M552V) をもつ HBV DNA ポリメラーゼに対するアデホビル二リン酸の K_i 値は野生型の 0.79 ~ 2.2 倍の濃度であり、野生型とほぼ同じ阻害活性を示した。一方、YMDD 変異 HBV DNA ポリメラーゼに対するラミブジン三リン酸の阻害活性は低下しており、K_i 値は野生型に比べて、8.0 ~ 25.2 倍高い値を示した (表 2.6.2-12)。

また、YMDD 変異 HBV DNA ポリメラーゼに対する阻害活性はラミブジンと同じシチジンアナログである emtricitabine では低下しており、その他の核酸アナログである penciclovir 及び lobucavir では低下していなかった⁹⁾。

表 2.6.2-12 YMDD 変異をもつ HBV DNA ポリメラーゼに対する阻害活性

4.2.1.1 表 1 を修飾

HBV DNA ポリメラーゼ	アデホビルニリン酸		ラミブジン三リン酸	
	K _i 値 (μmol/L) (平均値 ± S.D., n=3)	K _i 比 ^a	K _i 値 (μmol/L) (平均値 ± S.D., n=3)	K _i 比 ^a
野生型	0.10 ± 0.01	1	0.25 ± 0.03	1
M552I	0.13 ± 0.03	1.3	2.0 ± 0.1	8.0
M552V	0.22 ± 0.02	2.2	4.9 ± 0.4	19.6
L528M/M552V	0.079 ± 0.018	0.79	6.3 ± 2.4	25.2
L528M	0.23 ± 0.04	2.3	0.64 ± 0.04	2.6

a : 変異型 K_i 値 / 野生型 K_i 値

2.6.2.2.3.2. YMDD 変異 HBV に対する抗ウイルス活性

4.2.1.1.11/ref, 4.2.1.1.12/ref 及び 4.2.1.1.13/ref

【方法】

遺伝子工学的に作製した YMDD 変異ウイルスを感染させた HuH-7 細胞及び HepG2 細胞を用いて、アデホビル及びラミブジンの抗ウイルス活性を以下の濃度で測定した（4.2.1.1.11/ref : 各薬剤 0.0001、0.001、0.01、0.1、1、10 μmol/L、4.2.1.1.12/ref : アデホビル 0.05、0.1、0.2、0.5、1、5、10 μmol/L 及びラミブジン 0.05、0.1、0.5、1、5、10、50 μmol/L、4.2.1.1.13/ref : アデホビル 0.01、0.1、1、10、100 μmol/L 及びラミブジン 0.001、0.01、0.1、1、50 μmol/L）。

【結果】

アデホビルは YMDD 変異 HBV に対して野生株と同程度の抗ウイルス活性を示した（表 2.6.2-13）。しかし、ラミブジン及び emtricitabine の YMDD 変異 HBV に対する抗ウイルス活性は野生株と比較して大きく低下した。

表 2.6.2-13 YMDD 変異 HBV に対する抗ウイルス活性

4.2.1.1.11/ref 表 1, 4.2.1.1.12/ref 表 2 及び 4.2.1.1.13/ref 表 1 のデータを用いて作成

HBV	IC ₅₀ 値 (μmol/L) (IC ₅₀ 値比 (変異型 IC ₅₀ 値 / 野生型 IC ₅₀ 値))						
	アデホビル			ラミブジン			Emtricitabine
	4.2.1.1.11/ ref	4.2.1.1.12/ ref	4.2.1.1.13/ ref	4.2.1.1.11/ ref	4.2.1.1.12/ ref	4.2.1.1.13/ ref	4.2.1.1.11/ ref
野生株	0.58 (1.0)	3.9 (1.0)	0.08 (1.0)	0.56 (1.0)	0.47 (1.0)	0.01 (1.0)	0.24 (1.0)
IC ₅₀ の範囲 IC ₅₀ 比の範囲	0.08 - 3.9 (1.0)			0.01 - 0.56 (1.0)			
M552I	4.5 (7.8)	2.7 (0.7)	0.31 (3.9)	>80 (>143)	>50 (>106)	3.8 (380)	>10 (>42)
IC ₅₀ の範囲 IC ₅₀ 比の範囲	0.31 - 4.5 (0.7 - 7.8)			3.8 - >80 (>106 - 380)			
M552V	4.9 (8.4)	2.8 (0.7)	—	33 (59)	8.5 (18)	—	>10 (>42)
IC ₅₀ の範囲 IC ₅₀ 比の範囲	2.8 - 4.9 (0.7 - 8.4)			8.5 - 33 (18 - 59)			
L528M/M552V	2.2 (3.8)	0.64 (0.2)	0.16 (2.0)	>80 (>143)	>50 (>106)	86.2 (8620)	>10 (>42)
IC ₅₀ の範囲 IC ₅₀ 比の範囲	0.16 - 2.2 (0.2 - 3.8)			>50 - 86.2 (>106 - 8620)			
L528M	0.45 (0.8)	2.0 (0.5)	0.09 (1)	>10 (>18)	0.80 (1.7)	0.03 (3)	2.7 (11)
IC ₅₀ の範囲 IC ₅₀ 比の範囲	0.09 - 2.0 (0.5 - 1)			0.03 - >10 1.7 - >18			

-: not shown

2.6.2.2.3.3. Hepatitis B Immunogloblin-escape mutant に対する抗ウイルス活性

4.2.1.1.14/ref

肝移植時には HBV 再感染の予防のため HBs 抗原に対するモノクロナル抗体 (以下、HBIg) が使用されており、それに対して、HBIg に結合しにくい変異 HBs 抗原を持つ HBIg エスケープ変異 HBV が出現することが知られている¹⁰⁾。また、HBs 抗原遺伝子と DNA ポリメラーゼ遺伝子には重複部分があり、この変異 HBV は HBs 抗原に P120T あるいは G145R の変異を有するとともに、DNA ポリメラーゼに T476N 及び W501Q の変異を有することも知られている。そこで、このような変異 DNA ポリメラーゼを持つ HBV に対するアデホビルの抗ウイルス活性を検討した。

【方法】

HBV DNA ポリメラーゼ遺伝子に T476N あるいは W501Q の変異を持つ HBV-DNA を作成し、HepG2 細胞にトランスフェクトさせ、アデホビル (0.01、0.1、1、10、50μmol/L) 存在下で 1 週間培養した。培養終了後 DNA を抽出し、HBV-DNA 量を Southern blot 法で測定した。

【結果】

T476N 及び W501Q の変異 DNA ポリメラーゼを持つ HBV に対して、アデホビルは抗ウイルス活性を示し、IC₅₀ 値はそれぞれ 0.08 及び 0.10μmol/L であった。野生株に対する IC₅₀ 値

は $0.24\mu\text{mol/L}$ であり、これらの変異ウイルスはアデホビルに対して野生株と同程度の感受性を示した。

2.6.2.2.4. In vivo での抗ウイルス活性

2.6.2.2.4.1. HBV を発現させたトランスジェニックマウスにおける抗ウイルス活性

4.2.1.1.15/ref

【方法】

HBV-DNA を発現するトランスジェニックマウスに ADV を 1 日 1 回、10 日間経口投与した後、血清中 HBV-DNA 量を定量的 HBV PCR 法で、肝臓中の HBV-DNA 量を Southern blot 法で測定した。

【結果】

ADV は 0.1mg/kg/日 以上の用量で血清中 HBV-DNA 量を、 1.0mg/kg/日 以上の用量で肝臓中 HBV-DNA 量を、それぞれプラセボ投与群に比べて有意に低下させた（表 2.6.2-14）。

表 2.6.2-14 HBV-DNA 発現トランスジェニックマウスにおける抗ウイルス活性

4.2.1.1.15/ref 表 2 を修飾

ADV (mg/kg/日)	血清中 HBV-DNA		肝臓中 HBV-DNA	
	Log_{10} genome equivalent/mL	n	pg/ μg cell DNA	n
生理食塩液	7.2 ± 1.1	5	10.5 ± 2.4	5
0.10	$4.5 \pm 0.5^*$	5	8.3 ± 2.9	5
0.32	$4.4 \pm 0.2^*$	5	11.0 ± 6.2	5
1.0	$3.9 \pm 0.3^*$	5	$3.3 \pm 3.3^*$	5
3.2	$4.8 \pm 0.9^*$	10	$2.3 \pm 2.0^*$	15
10.0	$4.5 \pm 0.3^*$	10	$1.5 \pm 1.4^*$	10
32.0	$4.3 \pm 0.5^*$	10	$1.0 \pm 1.4^*$	10
100	$4.8 \pm 0.2^*$	10	$1.0 \pm 1.2^*$	10

*：プラセボ投与群と比べて $p \leq 0.001$ 、平均値 $\pm$ S.D.

2.6.2.2.4.2. DHBV 感染アヒルにおける抗ウイルス活性

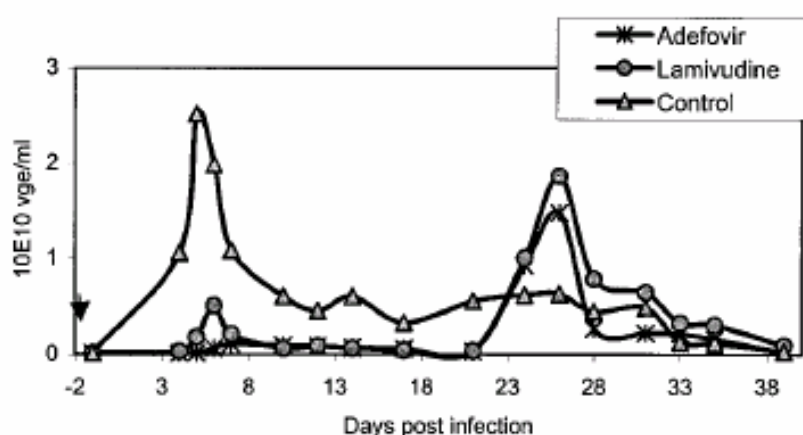
4.2.1.1.7

【方法】

5日齢のアヒルに DHBV 陽性アヒル血清 (10^7 DHBV ゲノム相当量) を静脈内投与し、DHBV を感染させた。アデホビル 30mg/kg/日及びラミブジン 100mg/kg/日を感染 1 日前と感染日に投与し、その後 20 日間アデホビル 15mg/kg/日及びラミブジン 50mg/kg/日を腹腔内投与した。投与期間中に、血清中の DHBV-DNA 量を dot blot 法で測定し、ウイルス濃度の変動をモニターした。投与終了後、アヒルの肝臓から DNA を抽出し Southern blot 法で CCC DNA 量を測定した。また、半数のアヒルについては、投与終了後、更に 3 週間、血清中の DHBV ウイルス量をモニターし、肝臓を摘出して CCC DNA 量を測定した。

【結果】

アデホビル及びラミブジンは 20 日間の投与期間中、血清中の DHBV 増殖を、ほぼ完全に抑制した。投与終了後には両薬剤投与群において血清中ウイルス量は一過性に増加した (図 2.6.2-4)。肝臓中の CCC DNA 量及び総 DHBV-DNA 量は両薬剤の投与終了時には低下したものの、3 週間の回復期間後には、対照群とほぼ同程度にまで増加した (表 2.6.2-15)。



アデホビル：30mg/kg/日 2 日間その後 15mg/kg/日 20 日間, n=10 ;
 ラミブジン：100mg/kg/日 2 日間その後 50mg/kg/日 20 日間, n=12 ;
 Control (薬物非投与), n=12

図 2.6.2-4 DHBV 感染アヒルにおける血中ウイルス濃度に対する効果

4.2.1.1.7 図 3.D から転載

表 2.6.2-15 DHBV 感染アヒルにおける肝臓中 CCC DNA 量に対する効果

4.2.1.1.7 図 4 の数値を用いて作成

薬 物	DNA 量、平均値 (arbitrary unit)			
	3 週間の薬物投与期間直後		3 週間の回復期間後	
	CCC DNA	総 DHBV-DNA	CCC DNA	総 DHBV-DNA
薬物非投与 (n=6)	46	228	201	476
アデホビル (n=5)	23	134	185	476
ラミブジン (n=6)	23	163	253	495

2.6.2.2.4.3. WHV 感染ウッドチャックにおける抗ウイルス活性

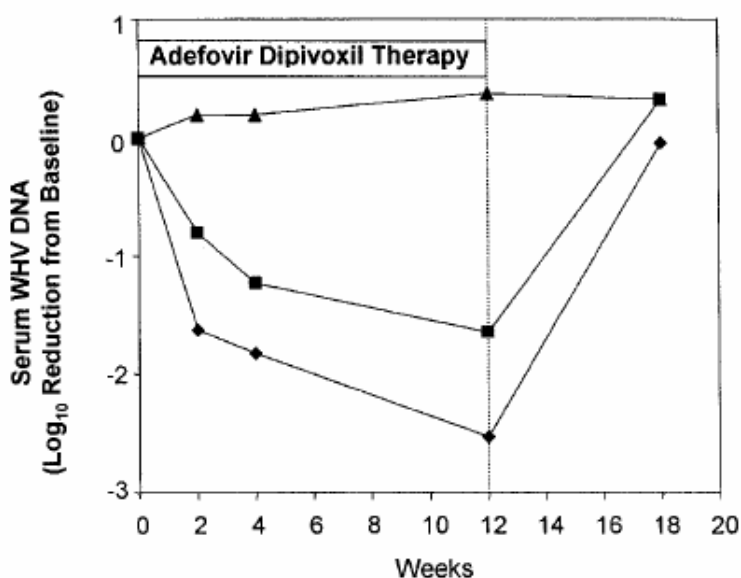
4.2.1.1.16

〔方法〕

WHV に自然感染したウッドチャックに ADV を 5 あるいは 15mg/kg/日の用量で 12 週間経口投与した。投与 2 週目、4 週目、投与終了時及びその後 6 週間の回復期間後に採血し、血清中の WHV-DNA 量を slot blot 法で測定した。

〔結果〕

ADV は 5 及び 15mg/kg/日の経口投与により、投与開始 2 週間後から血清中 WHV-DNA 量を低下させ、12 週間後にはそれぞれ投与開始時の 1/45 以下及び 1/300 以下に低下させた（図 2.6.2-5）。一方、投与終了後の 6 週間の回復期間後には、血清中 WHV-DNA 量は対照群のレベルにまで増加した。



▲ : 溶媒対照、■ : ADV 5mg/kg/日、◇ : ADV 15mg/kg/日（いずれも n=6）

図 2.6.2-5 WHV 感染ウッドチャックの血清中 DNA に対する効果

4.2.1.1.16 図 3 を転載

2.6.2.3. 副次的薬理試験**2.6.2.3.1. ヒト免疫不全ウイルス（HIV）に対する抗ウイルス活性**

4.2.1.2.1/ref

【方法】

MT-2 細胞に HIV-1_{IIIB} を感染させ、アデホビルとともに 7 日間培養した。ウイルスによる細胞変性の程度を XTT^{注2)} を用いて比色定量し、ウイルス複製の指標とした。

【結果】

アデホビルは HIV の複製を抑制し、その IC₅₀ 値は 16 μ mol/L であった。

2.6.2.3.2. ヘルペスウイルスに対する抗ウイルス活性

4.2.1.2.2/ref, 4.2.1.2.3/ref, 4.2.1.2.4/ref, 4.2.1.2.5/ref 及び 4.2.1.2.6/ref

【方法】

Epstein-Barr ウイルス発現 P3HR-1 細胞あるいはその他の各種ヘルペスウイルスを感染させた細胞を、アデホビル存在下で培養することにより抗ウイルス活性を測定した。

【結果】

アデホビルは Epstein-Barr ウイルスに対して抗ウイルス活性を示し、その IC₅₀ 値は 1.1 μ mol/L (0.3 μ g/mL) であった (表 2.6.2-16)。また、その他のヘルペスウイルスに対しても抗ウイルス活性を示した。

表 2.6.2-16 ヒトヘルペスウイルスに対する抗ウイルス活性

ウイルス	細胞	活性評価法	抗ウイルス活性 (μ g/mL or μ mol/L [#])	資料番号
Epstein-Barr virus	P3HR-1 細胞 ^c	ウイルス DNA 複製の IC ₅₀ 値	1.1 [#]	4.2.1.2.2/ref
HSV ^a -1	HeLa S3 細胞	ウイルス量の 90%抑制濃度 (ID ₉₀ 値)	80 [#]	4.2.1.2.3/ref
HSV-2			150 [#]	
HHV ^b -6	HSB-2 細胞 ^d	細胞変性効果の IC ₅₀ 値	7.0	4.2.1.2.4/ref
Varicella-zoster virus	ヒト胎児肺 線維芽細胞	細胞変性効果の最小阻害濃度	10	4.2.1.2.5/ref
Cytomegalovirus		ブランク形成の IC ₅₀ 値	27.9	4.2.1.2.6/ref

a: herpes simplex virus, b: human herpes virus, c: バーキットリンパ腫由来, d: T リンパ芽球腫由来

2.6.2.4. 安全性薬理試験

ADV の安全性薬理試験として、中枢神経系、心血管系、呼吸系、胃腸管系及び腎 / 泌尿器系に及ぼす影響を検討した (表 2.6.2-17)。

注2) 2,3-bis[2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl]-5-[(phenylamino)carbonyl]-2H-tetrazolium hydroxide

表 2.6.2-17 安全性薬理試験一覧

評価対象	動物種 / 系統	投与経路 (単回)	動物数/ 性/群	投与量 (mg/kg)	GLP 適用	実施施設 ^{#2}	資料番号
中枢神経系	CD-1 マウス	経 口	♂ 6	0 10 30 100	適		4.2.1.3.1
心血管・呼吸系	麻酔イヌ	十二指腸内	♀ 3 ^{#1}	0 4 12	適		4.2.1.3.2
腎 / 泌尿器系	SD ラット	経 口	♂ 8	0 10 30 100	適		4.2.1.3.3
胃腸管系	SD ラット	経 口	♂ 8	0 10 30 100	適		4.2.1.3.4

#1：同一動物に2時間間隔で投与

#2：(英国)、(英国)

2.6.2.4.1. 中枢神経系に及ぼす影響の検討

4.2.1.3.1

ADV の 10、30 及び 100mg/kg をマウスに単回経口投与して、Irwin 法により行動及び症状観察を行った結果、いずれの群においても行動及び症状に変化はみられず、中枢神経系に及ぼす影響は認められなかった。

2.6.2.4.2. 心血管・呼吸系に及ぼす影響の検討

4.2.1.3.2

麻酔イヌに ADV の 4 及び 12mg/kg を十二指腸内投与して、心血管系及び呼吸系に及ぼす影響を検討した結果、心血管系及び呼吸系のいずれの指標においても影響は認められなかった。

2.6.2.4.3. 腎 / 泌尿器系に及ぼす影響の検討

4.2.1.3.3

ADV の 10、30 及び 100mg/kg をラットに単回経口投与し、尿量、尿 pH 及び尿中電解質排泄量を測定した結果、100mg/kg 群では、尿量、Na⁺、K⁺及び Cl⁻排泄量の低値、30mg/kg 群では、尿量及び K⁺排泄量の低値がみられた。

2.6.2.4.4. 胃腸管系に及ぼす影響の検討

4.2.1.3.4

ADV の 10、30 及び 100mg/kg をラットに単回経口投与して、腸管炭末輸送能及び胃内容物排泄に及ぼす影響を検討した結果、いずれの群においても腸管炭末輸送能に対する影響は認められず、30mg/kg 以上の群では胃重量の高値がみられたことから胃内容物排泄の遅延が示唆された。

2.6.2.5. 薬力学的薬物相互作用試験

該当する試験は実施されていない。

2.6.2.6. 考察及び結論

効力を裏付ける試験

ADV は生体内でアデホビルに代謝され、更に細胞内でアデホビル二リン酸にリン酸化され (2.7.2.2.1.3 参照) HBV DNA ポリメラーゼ阻害活性を示す。

アデホビル二リン酸はリコンビナント HBV DNA ポリメラーゼを K_i 値 $0.10\mu\text{mol/L}$ で阻害した。一方、ヒト DNA ポリメラーゼに対する阻害活性は約 $1/10$ (DNA ポリメラーゼ α 及び γ) あるいは約 $1/700$ (DNA ポリメラーゼ β) であり、また、アデホビル二リン酸は DNA ポリメラーゼにより DNA に取り込まれるものの、その程度は天然基質である dATP の $1.1 \sim 6.0\%$ であった。

アデホビルの抗ウイルス活性と細胞毒性の比は 83 倍以上であり (2.6.2.2.2.5 参照)、また、アデホビルは $30\mu\text{mol/L}$ ($8.2\mu\text{g/mL}$) (臨床用量での C_{max} $0.0245\mu\text{g/mL}$ (2.7.2.2.2.1.1 参照) の約 330 倍の濃度) まで DNA ポリメラーゼ γ がその合成に関与するミトコンドリア DNA 量に影響を与えない¹¹⁾ ことから、アデホビルが臨床用量でヒト DNA ポリメラーゼ阻害作用を介してヒト DNA の合成に影響を及ぼす可能性は低いと考えられる。

HBV 遺伝子をトランスフェクトした HepG2 細胞において、アデホビルは HBV の複製を抑制し、その IC_{50} 値は $0.22 \sim 0.790\mu\text{mol/L}$ であった。

アデホビルは抗 HBV 活性を示す $0.1 \sim 1\mu\text{mol/L}$ 付近の濃度で、HBV と同じヘパドナウイルス科に属する DHBV 及び WHV に対して抗ウイルス活性を示した。また、DHBV に対するアデホビルの抗ウイルス活性は、ラミブジンと併用することで相乗的あるいは相加的に増大した。この結果から、両剤の併用によって HBV に対しても抗ウイルス活性が増強されることが推察される。

ラミブジンに対する感受性が低下している YMDD 変異をもつ HBV DNA ポリメラーゼに対して、アデホビル二リン酸は野生型の K_i 値とほぼ同じ値 (野生型の $0.79 \sim 2.2$ 倍) で阻害活性を示し、野生株及び YMDD 変異 HBV に対して、ほぼ同じ濃度で抗ウイルス活性を示した。これらの結果から、ラミブジンの長期治療によって高頻度に出現することが問題となっている YMDD 変異 HBV に対して、アデホビルは臨床において十分な抗ウイルス活性を示すと推察される。なお、HBV DNA ポリメラーゼの三次元分子モデルによる検討結果から、YMDD 変異をもつ HBV DNA ポリメラーゼの基質結合部位において、ラミブジン三リン酸は変異アミノ酸残基と立体障害を起こすためその部位と結合しにくくなるのに対して、アデホビル二リン酸はそのような立体障害を起こさないため YMDD 変異ウイルスに有効であると推察される⁹⁾。

HBV-DNA 発現トランスジェニックマウスに ADV を 10 日間経口投与した時、 0.10mg/kg/ 日以上で血清中 HBV-DNA 量を、 1.0mg/kg/ 日以上で肝臓中 HBV-DNA 量をそれぞれ低下させた。本実験における血清中及び肝臓中の両方の HBV に対して抗ウイルス活性を示す有効用量 1.0mg/kg/ 日投与時の C_{max} 及び AUC は、マウスに ADV $10 \sim 100\text{mg/kg/}$ 日を反復投与した

時の成績（2.6.4.3.1 参照）から、それぞれ $0.03\mu\text{g/mL}$ 及び $0.264\mu\text{g}\cdot\text{hr/mL}$ と推察され、これらの値は、日本人の健康成人男性に 10mg を 5 日間反復投与した時の C_{max} $0.0245\mu\text{g/mL}$ 及び AUC_{0-24} $0.2493\mu\text{g}\cdot\text{hr/mL}$ （2.7.2.2.2.1.1 参照）に近いことより、ADV 10mg/日 を B 型慢性肝疾患患者に投与することで抗 HBV 活性を介した B 型慢性肝疾患の治療効果が期待される。

DHBV 感染アヒルにアデホビル 15mg/kg/日 を 3 週間腹腔内投与した時、血清中 DHBV-DNA 量及び肝臓中 CCC DNA 量を低下させた。また、WHV 感染ウッドチャックに ADV 5 あるいは 15mg/kg/日 を 12 週間経口投与した時、投与 2～12 週間後まで継続して、血清中 WHV-DNA 量を低下させた。DHBV 感染アヒル及び WHV 感染ウッドチャックは抗 HBV 薬の阻害活性を検討する上で現状での最適の動物モデルであり¹²⁾、更に、ウッドチャックは WHV の慢性感染によりヒトに類似した慢性肝炎の自然発症過程を示すことから、抗 HBV 治療薬の研究に適したモデル動物と考えられており¹³⁾、アデホビルはこれらのモデル動物に対して *in vivo* で抗ウイルス活性を示すことが確認された。

以上、アデホビルの抗ウイルス活性を種々の *in vitro* 及び *in vivo* 試験で検討した結果、ADV は臨床用量で、HBV 及び YMDD 変異 HBV に対して抗ウイルス活性を示すと推察されることより、B 型慢性肝疾患の新規治療薬としての有用性が示唆される。特に、現在有効な治療法が見出されていない YMDD 変異 HBV が出現した患者に対する有効性が期待される。更に、アデホビルは HBV DNA ポリメラーゼに選択性を示しヒト DNA ポリメラーゼ阻害活性は弱く、また、抗ウイルス活性に比べて細胞毒性が弱いことから、臨床用量でヒト DNA の合成阻害に基づく重篤な副作用が発現する可能性は低いと考えられる。

副次的薬理試験

HIV-1 感染 MT-2 細胞において、アデホビルは HIV の複製を抑制し、その IC_{50} 値は $16\mu\text{mol/L}$ であった。また、各種ヘルペスウイルス感染細胞において、アデホビルは $1.1\sim 150\mu\text{mol/L}$ の濃度で抗ウイルス活性を示した。アデホビルは、HBV と同様にウイルス複製過程に DNA ポリメラーゼ / 逆転写酵素を必要とするウイルスに対して抗ウイルス活性を示すことが示唆される。

安全性薬理試験

中枢神経系、心血管系、呼吸系、胃腸管系及び腎 / 泌尿器系に及ぼす影響を単回投与により検討した結果、ADV の 30mg/kg 以上の経口投与により、尿量及び電解質 (Na^+ 、 K^+ 又は Cl^-) 排泄量の低下ならびに胃内容物排泄の遅延がみられた。しかし、臨床用量（体重 50kg として 0.2mg/kg/日 ）の 50 倍に相当する 10mg/kg においては影響が認められなかったことから、ADV の臨床使用において危惧すべき副作用が生じる可能性は低いと考えられた。

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

- 1) Robbins BL, Greenhaw J, Connelly MC, Fridland A. Metabolic pathways for activation of the antiviral agent 9-(2-phosphonylmethoxyethyl)adenine in human lymphoid cells. *Antimicrob Agents Chemother* 1995;39:2304-8.
- 2) Balzarini J, Hao Z, Herdewijn P, Johns DG, Clercq ED. Intracellular metabolism and mechanism of anti-retrovirus action of 9-(2-phosphonylmethoxyethyl)adenine, a potent anti-human immunodeficiency virus compound. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:1499-503.
- 3) Berenbaum MC. What is synergy? *Pharmacol Rev* 1989;41:93-141.
- 4) Greco WR, Bravo G, Parsons JC. The search for synergy: a critical review from a response surface perspective. *Pharmacol Rev* 1995;47:331-85.
- 5) Honkoop P, Niesters HGM, de Man RAM, Osterhaus ADME, Schalm SW. Lamivudine resistance in immunocompetent chronic hepatitis B. *J Hepatol* 1997;26:1393-5.
- 6) Bartholomew MM, Jansen RW, Jeffers LJ, Reddy KR, Johnson LC, Bunzendahl H, et al. Hepatitis-B-virus resistance to lamivudine given for recurrent infection after orthotopic liver transplantation. *Lancet* 1997;349:20-2.
- 7) Ling R, Mutimer D, Ahmed M, Boxall EH, Elias E, Dusheiko GM, et al. Selection of mutations in the hepatitis B virus polymerase during therapy of transplant recipients with lamivudine. *Hepatology* 1996;24:711-3.
- 8) Allen MI, Deslauriers M, Andrews CW, Tipples GA, Walters K-A, Tyrrell DLJ, et al. Identification and characterization of mutations in hepatitis B virus resistant to lamivudine. *Hepatology* 1998;27:1670-7.
- 9) Das K, Xiong X, Yang H, Westland CE, Gibbs CS, Sarafianos SG, et al. Molecular modeling and biochemical characterization reveal the mechanism of hepatitis B virus polymerase resistance to lamivudine (3TC) and emtricitabine (FTC). *J Virol* 2001;75:4771-9.
- 10) Cooreman MP, Van Roosmalen MH, Te Morsche R, Sunnen CMG, De Ven EMES-V, Jansen JBMJ, et al. Characterization of the reactivity pattern of murine monoclonal antibodies against wild-type hepatitis B surface antigen to G145R and other naturally occurring “a” loop escape mutations. *Hepatology* 1999;30:1287-92.
- 11) Birkus G, Gibbs CS, Cihlar T. Comparative effects of adefovir and selected nucleoside inhibitors of hepatitis B virus DNA polymerase on mitochondrial DNA in liver and skeletal muscle cells. *J Viral Hepatitis* 2003;10:50-4.
- 12) Zoulim F. Evaluation of novel strategies to combat hepatitis B virus targeting wild-type and drug-resistant mutants in experimental models. *Antivir Chem Chemother* 2001;12:131-42.
- 13) Roggendorf M, Tolle TK. The woodchuck: an animal model for hepatitis B virus infection in man. *Intervirology* 1995;38:100-12.

2.6.3. 藥理試驗概要表

2.6.3.1. 一覧表

2.6.3.1.1. 一覧表（その1）

被験物質：アデホビルピボキシル

試験の種類			試験系	投与方法	実施施設	資料番号
効力を裏付ける薬理試験	作用機序	HBV DNA ポリメラーゼ阻害	HBV DNA ポリメラーゼ	<i>in vitro</i>	Gilead Sciences 社 (米国)	4.2.1.1.1
		ヒト DNA ポリメラーゼ阻害	ヒト DNA ポリメラーゼ	<i>in vitro</i>	Gilead Sciences 社 (米国)	4.2.1.1.2/ref
		ヒト DNA ポリメラーゼによるアデホビルニリン酸の DNA への取り込み	ヒト DNA ポリメラーゼ	<i>in vitro</i>	Gilead Sciences 社 (米国)	4.2.1.1.3
	<i>In vitro</i> 抗ウイルス活性	HBV 発現 HepG2 細胞	<i>in vitro</i>	Gilead Sciences 社 (米国)	4.2.1.1.4	
					4.2.1.1.5	
		DHBV 感染アヒル肝細胞	<i>in vitro</i>	Erasmus University (オランダ)	4.2.1.1.6/ref	
		DHBV 感染アヒル肝細胞	<i>in vitro</i>	INSERM (フランス)	4.2.1.1.7	
		WHV 感染ウッドチャック肝細胞	<i>in vitro</i>	University of Hamburg (ドイツ)	4.2.1.1.8/ref	
	抗ウイルス活性と細胞毒性	DHBV 感染アヒル肝細胞	<i>in vitro</i>	Victorian Infectious Diseases Reference Laboratory (オーストラリア)	4.2.1.1.9/ref	
		DHBV 感染アヒル肝細胞	<i>in vitro</i>	INSERM (フランス)	4.2.1.1.7	
		HBV 発現 HepG2 細胞	<i>in vitro</i>	Erasmus University (オランダ)	4.2.1.1.6/ref	
		HBV 発現 HepG2 細胞と HB611 細胞及び DHBV 感染アヒル肝細胞	<i>in vitro</i>	Erasmus University (オランダ)	4.2.1.1.10/ref	

2.6.3.1.2. 一覧表（その2）

被験物質：アデホビルピボキシル

試験の種類		試験系	投与方法	実施施設	資料番号
効力を裏付ける薬理試験	YMDD 変異 HBV に対する抗ウイルス活性	YMDD 変異 HBV DNA ポリメラーゼ	<i>in vitro</i>	Gilead Sciences 社 (米国)	4.2.1.1.1
		YMDD 変異 HBV 発現 HuH-7 細胞	<i>in vitro</i>	東京大学	4.2.1.1.11/ref
		YMDD 変異 HBV 発現 HepG2 細胞	<i>in vitro</i>	Victorian Infectious Diseases Reference Laboratory (オーストラリア)	4.2.1.1.12/ref 4.2.1.1.13/ref
	HBIg エスケープ変異 HBV に対する抗ウイルス活性	HBIg エスケープ変異 HBV 発現 HepG2 細胞	<i>in vitro</i>	Gilead sciences 社 (米国)	4.2.1.1.14/ref
	<i>In vivo</i> 抗ウイルス活性	HBV 発現トランスジェニックマウス	ADV 0.10 ~ 100mg/kg/日 経口投与、10 日間	Utah State University (米国)	4.2.1.1.15/ref
		DHBV 感染アヒル	アデホビル 15mg/kg/日 腹腔内投与、 3 週間	INSERM (フランス)	4.2.1.1.7
		WHV 感染ウッドチャック	ADV 5, 15mg/kg/日 経口投与、 12 週間	University College of Veterinary Medicine (米国)	4.2.1.1.16

2.6.3.1.3. 一覧表（その3）

被験物質：アデホビルピボキシル

試験の種類		試験系	投与方法	実施施設	資料番号
副次的 薬理 試験	抗 HIV 活性	HIV-1 感染 MT-2 細胞	<i>in vitro</i>	St. Jude Children's Research Hospital (米国)	4.2.1.2.1/ref
	他のウイルスに対す る活性	Epstein-Barr virus 発現 P3HR-1 細胞	<i>in vitro</i>	University of North Carolina (米国)	4.2.1.2.2/ref
		HSV-1 及び HSV-2 感染 HeLa S3 細胞	<i>in vitro</i>	Yale University (米国)	4.2.1.2.3/ref
		HHV-6 感染 HSB-2 細胞	<i>in vitro</i>	Katholieke Universiteit Leuven (ベルギー)	4.2.1.2.4/ref
		Varicella-zoster virus 感染ヒト胎児肺細胞	<i>in vitro</i>	Katholieke Universiteit Leuven (ベルギー)	4.2.1.2.5/ref
		Cytomegalovirus 感染ヒト胎児肺細胞	<i>in vitro</i>	Katholieke Universiteit Leuven (ベルギー)	4.2.1.2.6/ref
安全性 薬理 試験	中枢神経系 (Irwin 法による 症状・行動観察)	マウス	ADV 10, 30, 100 mg/kg, 単回経口 投与	(英国)	4.2.1.3.1
	心血管系・呼吸系 (血圧, 心電図, 大腿動脈血流量, 呼吸数, 換気量)	麻酔イヌ	ADV 4, 12 mg/kg, 単回十二指腸内投 与	(英国)	4.2.1.3.2
	腎/泌尿器系 (尿量, 尿 pH, 電解質排泄量)	ラット	ADV 10, 30, 100 mg/kg, 単回経口 投与	(英国)	4.2.1.3.3
	胃腸管系 (胃重量, 炭末輸送能)	ラット	ADV 10, 30, 100 mg/kg, 単回経口 投与	(英国)	4.2.1.3.4
薬力学的薬物相互 作用試験		該当する試験なし	-	-	-

2.6.3.2. 効力を裏付ける試験

2.6.3.2.1. 概要表（その1）

試験の種類	試験方法	投与方法	結 果	資料番号
作用機序	HBV DNA ポリメラーゼ活性の測定	<i>in vitro</i>	アデホビルニリン酸 K_i 値： 0.10±0.01μmol/L (平均値±S.D., n=3)	4.2.1.1.1
	ヒト DNA ポリメラーゼ (α, β, γ) 活性の測定	<i>in vitro</i>	アデホビルニリン酸の K_i 値： HBV DNA ポリメラーゼに対する K_i 値の約 10 倍(α, γ)及び約 700 倍(β)	4.2.1.1.2/ref
	ヒト DNA ポリメラーゼ (α, β, γ) によるアデホビルニリン酸の DNA への取り込み活性の測定	<i>in vitro</i>	アデホビルニリン酸の V_{max}/K_m 比 (取り込み活性の指標)： 天然基質 dATP の 1.1%(β), 4.8%(α) 及び 6.0%(γ)	4.2.1.1.3
<i>In vitro</i> 抗ウイルス活性	HBV 発現 HepG2 細胞におけるアデホビル存在下でのウイルス DNA 量を測定	<i>in vitro</i>	抗ウイルス活性： IC ₅₀ 値：0.22μmol/L (HepG2 49-27 細胞) IC ₅₀ 値：0.790μmol/L 及び IC ₉₀ 値=9.161μmol/L (HepG2 2.2.15 細胞)	4.2.1.1.4 4.2.1.1.5
	DHBV 感染アヒル肝細胞におけるアデホビル存在下でのウイルス DNA 量を測定	<i>in vitro</i>	抗ウイルス活性： IC ₅₀ 値：0.14μmol/L (n=4) (8 日間培養後)	4.2.1.1.6/ref
	DHBV 感染アヒル肝細胞におけるアデホビル存在下でのウイルス DNA 量及び CCC DNA 量を測定	<i>in vitro</i>	DHBV-DNA 量の低下： IC ₅₀ 値：0.01μmol/L (7 日間培養後) CCC DNA 量の低下：≥ 1μmol/L	4.2.1.1.7
	WHV 感染ウッドチャック肝細胞におけるアデホビル存在下でのウイルス DNA 量及び CCC DNA 量を測定	<i>in vitro</i>	WHV-DNA 量の低下： ≥ 1μmol/L (10～24 日間培養後) CCC DNA 量に影響なし	4.2.1.1.8/ref
	DHBV 感染アヒル肝細胞におけるアデホビル及びラミブジン存在下でのウイルス DNA 量を測定	<i>in vitro</i>	併用時の抗ウイルス活性： 1:1 (アデホビル:ラミブジン)：相加的 4:1, 1:4 及び 1:9：相乗的	4.2.1.1.9/ref

2.6.3.2.2. 概要表（その2）

試験の種類	試験方法	投与方法	結 果	資料番号
抗ウイルス活性 と細胞毒性	DHBV 感染アヒル肝細胞におけるアデホビル 存在下でのウイルス DNA 量及び細胞毒性を測定	<i>in vitro</i>	Therapeutic index（細胞毒性(CC ₅₀ 値) / 抗ウイルス 活性(IC ₅₀ 値)）：20000 (DHBV)	4.2.1.1.7
	HBV 発現 HepG2 細胞におけるアデホビル 存在下でのウイルス DNA 量及び細胞毒性を測定	<i>in vitro</i>	Therapeutic index：>83 (HBV)	4.2.1.1.6/ref
	HBV 発現 HepG2 細胞と HB611 細胞及び DHBV 感染アヒル肝細胞におけるアデホビル存在下 でのウイルス DNA 量及び細胞毒性を測定	<i>in vitro</i>	Therapeutic index：≥ 125 (HBV) Therapeutic index：200 (DHBV)	4.2.1.1.10/ref
YMDD 変異 HBV に対する 抗ウイルス活性	YMDD 変異 HBV DNA ポリメラーゼ活性の測定	<i>in vitro</i>	K _i 比 (変異型 K _i 値 / 野生型 K _i 値)： アデホビルニリン酸：0.79 ~ 2.2 ラミブジンニリン酸：8.0 ~ 25.2	4.2.1.1.1
	YMDD 変異 HBV 発現 HuH-7 細胞における アデホビル存在下でのウイルス DNA 量を測定	<i>in vitro</i>	IC ₅₀ 比 (変異型 IC ₅₀ 値 / 野生型 IC ₅₀ 値)： アデホビル：0.2 ~ 8.4 ラミブジン：18 ~ 8620 Emtricitabine：>42	4.2.1.1.11/ref
	YMDD 変異 HBV 発現 HepG2 細胞における アデホビル存在下でのウイルス DNA 量を測定			4.2.1.1.12/ref
	YMDD 変異 HBV 発現 HepG2 細胞における アデホビル存在下でのウイルス DNA 量を測定			4.2.1.1.13/ref
HBIg エスケープ 変異 HBV に 対する 抗ウイルス活性	HBIg エスケープ変異 HBV 発現 HepG2 細胞に おけるアデホビル存在下でのウイルス DNA 量を 測定	<i>in vitro</i>	抗ウイルス活性（7 日間培養後）： IC ₅₀ 値：0.24μmol/L (野生型) IC ₅₀ 値：0.08μmol/L (T476N 変異) IC ₅₀ 値：0.10μmol/L (W501Q 変異)	4.2.1.1.14/ref

2.6.3.2.3. 概要表（その3）

試験の種類	試験方法	投与方法	結 果	資料番号
In vivo 抗ウイルス活性	HBV 発現トランスジェニックマウスの血清及び肝臓中のウイルス DNA 量を測定	ADV 0.10 ~ 100mg/kg/日経口投与、10 日間	血清中 HBV-DNA 量の低下 : $\geq 0.1\text{mg/kg/日}$ 肝臓中 HBV-DNA 量の低下 : $\geq 1.0\text{mg/kg/日}$	4.2.1.1.15/ref
	DHBV 感染アヒルの血清及び肝臓中のウイルス DNA 量を測定	アデホビル 15mg/kg/日 腹腔内投与、3 週間	投与期間中：血中の DHBV 増殖をほぼ完全に抑制。 投与期間終了時：CCC DNA 量は低下。 3 週間の回復期間：DHBV-DNA 量は一過性に増加、CCC DNA 量は対照群のレベルにまで増加。	4.2.1.1.7
	WHV 感染ウッドチャックの血清中ウイルス DNA 量を測定	ADV 5, 15mg/kg/日 経口投与、12 週間	投与期間終了時： WHV-DNA 量 1/45 以下（5mg/kg/日）及び 1/300 以下（15mg/kg/日）に低下。 6 週間の回復期間後： いずれも対照群のレベルにまで増加。	4.2.1.1.16

2.6.3.3. 副次的薬理試験

2.6.3.3.1. 概要表

試験の種類	試験方法	投与方法	結 果	資料番号
抗 HIV 活性	HIV-1 感染 MT-2 細胞における 抗ウイルス活性を測定	<i>in vitro</i>	IC ₅₀ 値：16μmol/L	4.2.1.2.1/ref
抗ヘルペス ウイルス活性	Epstein-Barr virus 発現 P3HR-1 細胞 における抗ウイルス活性を測定	<i>in vitro</i>	IC ₅₀ 値：1.1μmol/L	4.2.1.2.2/ref
	HSV-1 及び HSV-2 感染 HeLa S3 細胞 における抗ウイルス活性を測定	<i>in vitro</i>	ID ₉₀ 値 ^a ：80μmol/L (HSV-1) ID ₉₀ 値：150μmol/L (HSV-2)	4.2.1.2.3/ref
	HHV-6 感染 HSB-2 細胞における 抗ウイルス活性を測定	<i>in vitro</i>	IC ₅₀ 値：7.0μg/mL	4.2.1.2.4/ref
	Varicella-zoster virus 感染ヒト胎児肺細胞 における抗ウイルス活性を測定	<i>in vitro</i>	細胞変性効果の最小阻害濃度：10μg/mL	4.2.1.2.5/ref
	Cytomegalovirus 感染ヒト胎児肺細胞 における抗ウイルス活性を測定	<i>in vitro</i>	IC ₅₀ 値：27.9μg/mL	4.2.1.2.6/ref

a：ID₉₀ 値、 ウイルス量を 90%抑制する濃度

2.6.3.4. 安全性薬理試験

2.6.3.4.1. 概要表

試験の種類	試験方法 / 観察項目	動物種 / 系統	投与方法 (媒体 / 投与容量)	投与量 (mg/kg)	例数 / 群	特記所見	GLP 適用	資料番号
中枢神経系	症状・行動観察 (Irwin 法)	CD-1 マウス	経口 (50mmol/L クエン酸溶液, 20mL/kg)	0, 10, 30, 100	♂ 6	なし	適	4.2.1.3.1
心血管系・呼吸系	血圧, 心拍数, 左室収縮期圧・ $dp/dt\ max$, 心電図, 大腿動脈血流量・血管抵抗	ビーグル犬	十二指腸内 (50mmol/L クエン酸溶液, 3mL/kg)	0, 4, 12	♀ 3 ¹⁾	なし	適	4.2.1.3.2
	呼吸数, 分時換気量, 1 回換気量							
腎/泌尿器系	尿量, $Na^+ \cdot K^+ \cdot Cl^-$ 排泄量, 尿 pH	SD ラット	経口 (50mmol/L クエン酸溶液, 20mL/kg)	0, 10, 30, 100	♂ 8	100mg/kg : 尿量及び $Na^+ \cdot K^+ \cdot Cl^-$ 排泄量の低値 30mg/kg : 尿量及び K^+ 排泄量の低値	適	4.2.1.3.3
胃腸管系	胃重量, 炭末輸送能	SD ラット	経口 (50mmol/L クエン酸溶液, 20mL/kg)	0, 10, 30, 100	♂ 8	≥ 30mg/kg : 胃重量の高値 (胃内容物排泄の遅延)	適	4.2.1.3.4

1) 同一動物に 2 時間間隔で投与