

ラピアクタ点滴用バッグ 300mg ラピアクタ点滴用バイアル 150mg

第2部 (モジュール2) : CTD の概要 (サマリー)

2.6.1 緒言

塩野義製薬株式会社

2.6.1 目次

2.6 非臨床試験の概要文及び概要表.....	2.6.1-4
2.6.1 緒言.....	2.6.1-4
2.6.1.1 医薬品の構造及び薬理的特性	2.6.1-4
2.6.1.2 申請した臨床適応，用量及び投与期間	2.6.1-5

2.6.1 略号一覧表

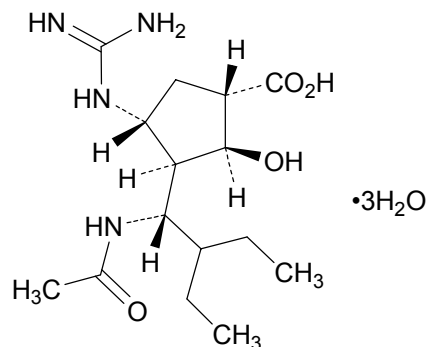
略号	略号内容
NA	ノイラミニダーゼ

2.6 非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.1 緒言

2.6.1.1 医薬品の構造及び薬理的特性

(1) 医薬品の構造



(2) 薬理的特性

- ヒト A 型及び B 型インフルエンザウイルスのノイラミニダーゼ (NA) に対して阻害活性を示し (50%阻害濃度 : A 型で 0.54~11 nmol/L, B 型で 6.8~17 nmol/L), オセルタミビルリン酸塩の活性本体であるオセルタミビルカルボン酸やザナミビルに比べて同等以上の阻害作用を示した。また, NA 活性阻害作用はインフルエンザウイルス NA に特異的であった。更に, オセルタミビルカルボン酸やザナミビルと同等以上のインフルエンザウイルスの増殖抑制作用を示した。
- ヒト A 型及び B 型インフルエンザウイルス (それぞれ 4 及び 2 株) 感染マウス致死モデルにおいて, 単回静脈内投与により用量依存的に生存率の増加が認められ (50%有効量 : A 型で 0.4~1.5 mg/kg, B 型で 0.1~1.0 mg/kg), オセルタミビルリン酸塩の 5 日間反復経口投与と同等以上の治療効果が認められた。また, 単回静脈内投与による投与量依存的な肺内ウイルス量の減少が確認され, その効果が数日間持続した。更に, ペラミビルは NA に結合した後, 容易に解離することなく, 長時間にわたって NA 活性を阻害し続けた。
- 治療開始時期が遅れた場合も有効性を発揮することが期待される。
- 免疫抑制状態にあるマウスにインフルエンザウイルスを感染させた致死モデルにおける治療効果の検討結果から, 免疫能低下が見られるハイリスク患者においては, ペラミビル水和物の反復投与が有用な治療法となる可能性が示唆された。
- NA の 274 番目のアミノ酸がヒスチジンからチロシンに置換したオセルタミビルリン酸塩耐性ウイルスに対しても, オセルタミビルリン酸塩よりも高い治療効果が期待できる。
- 高病原性鳥インフルエンザウイルス等を用いた *in vitro* 及び *in vivo* の評価結果から, 重篤な症状を呈するような新型インフルエンザウイルスが出現した際にも, 有用性の高い治療薬になると考えられる。

2.6.1.2 申請した臨床適応，用量及び投与期間

(1) 効能又は効果

A 型又は B 型インフルエンザウイルス感染症

(2) 用法及び用量

通常，成人にはペラミビルとして 300 mg を 15 分以上かけて単回点滴静注する．

重症化するおそれのある患者には，1 日 1 回 600 mg を最長 5 日間まで反復投与できる．

なお，年齢，症状に応じて適宜減量する．

ラピアクタ点滴用バッグ 300mg
ラピアクタ点滴用バイアル 150mg

第 2 部 (モジュール 2) : CTD の概要 (サマリー)

2.6.2 薬理試験の概要文

塩野義製薬株式会社

2.6.2 目次

2.6.2 薬理試験の概要文	2.6.2-5
2.6.2.1 まとめ	2.6.2-5
2.6.2.1.1 効力を裏付ける試験.....	2.6.2-5
2.6.2.1.2 安全性薬理試験.....	2.6.2-7
2.6.2.2 効力を裏付ける試験.....	2.6.2-8
2.6.2.2.1 NAに対するin vitro阻害作用	2.6.2-9
2.6.2.2.1.1 季節性ヒトインフルエンザウイルスのNAに対する阻害作用.....	2.6.2-9
2.6.2.2.1.2 様々な亜型のNAに対するペラミビルの阻害作用	2.6.2-12
2.6.2.2.1.3 ペラミビルによるNA阻害作用の選択性に関する検討	2.6.2-13
2.6.2.2.1.4 NA以外のレセプター，イオンチャネル及びトランスポーターに 対するペラミビルの結合阻害作用	2.6.2-14
2.6.2.2.2 In vitroウイルス増殖抑制作用	2.6.2-17
2.6.2.2.2.1 感染細胞からのウイルス放出に対する作用.....	2.6.2-17
2.6.2.2.2.2 感染細胞におけるプラーク形成に対する作用	2.6.2-18
2.6.2.2.2.3 感染細胞における増殖抑制作用	2.6.2-19
2.6.2.2.3 インフルエンザウイルス感染マウス致死モデルにおけるペラミ ビル水和物のin vivo治療効果	2.6.2-20
2.6.2.2.3.1 A型ウイルス感染マウス致死モデルにおける治療効果	2.6.2-20
2.6.2.2.3.2 B型ウイルス感染マウス致死モデルにおける治療効果	2.6.2-23
2.6.2.2.3.3 A型ウイルス感染マウス致死モデルにおけるTherapeutic time windowの検討.....	2.6.2-24
2.6.2.2.3.4 A型インフルエンザウイルス感染マウス致死モデルの肺内ウイ ルスに対する増殖抑制効果	2.6.2-25
2.6.2.2.3.5 ペラミビルのNAからの解離速度	2.6.2-27
2.6.2.2.3.6 マウス治療効果に影響を与える薬物動態パラメータの解析.....	2.6.2-29
2.6.2.2.4 オセルタミビルリン酸塩耐性ウイルスに対する効果	2.6.2-31
2.6.2.2.4.1 臨床分離株由来オセルタミビルリン酸塩耐性H274Y変異NAに対 する阻害効果.....	2.6.2-32
2.6.2.2.4.2 オセルタミビルリン酸塩耐性H274Y変異NAを有するA型ウイル ス感染マウス致死モデルにおける治療効果.....	2.6.2-33
2.6.2.2.4.3 既存のNA阻害剤耐性変異NAに対するペラミビルの阻害効果.....	2.6.2-34
2.6.2.2.5 免疫抑制状態におけるインフルエンザウイルス感染に対する効 果.....	2.6.2-36
2.6.2.2.6 高病原性鳥インフルエンザウイルスに対する効果	2.6.2-38
2.6.2.2.6.1 高病原性鳥インフルエンザウイルスNAに対する阻害作用.....	2.6.2-38
2.6.2.2.6.2 高病原性鳥インフルエンザウイルス感染細胞からのウイルス 放出に対する効果.....	2.6.2-38
2.6.2.2.6.3 高病原性鳥インフルエンザウイルスA/Hong Kong/483/97株	

(H5N1亜型) 感染マウス致死モデルにおける治療効果	2. 6. 2-39
2. 6. 2. 3 副次的薬理試験	2. 6. 2-41
2. 6. 2. 4 安全性薬理試験	2. 6. 2-42
2. 6. 2. 4. 1 中枢神経系に及ぼす影響	2. 6. 2-42
2. 6. 2. 4. 2 呼吸系に及ぼす影響.....	2. 6. 2-42
2. 6. 2. 4. 2. 1 ラットの呼吸機能に対する作用	2. 6. 2-42
2. 6. 2. 4. 2. 2 モルモットの呼吸機能に対する作用.....	2. 6. 2-42
2. 6. 2. 4. 3 心血管系に及ぼす影響.....	2. 6. 2-43
2. 6. 2. 4. 3. 1 無麻酔サルの血圧, 心拍数及び心電図に対する作用	2. 6. 2-43
2. 6. 2. 4. 3. 2 モルモット乳頭筋標本の心筋活動電位に対する作用	2. 6. 2-43
2. 6. 2. 4. 3. 3 hERGチャネル発現細胞のイオン電流に対する作用	2. 6. 2-43
2. 6. 2. 5 薬力学的薬物相互作用試験.....	2. 6. 2-44
2. 6. 2. 6 考察及び結論	2. 6. 2-45
2. 6. 2. 6. 1 In vitro NA活性阻害作用とin vivo治療効果.....	2. 6. 2-45
2. 6. 2. 6. 2 In vitro NA阻害活性に基づく有効性.....	2. 6. 2-46
2. 6. 2. 6. 3 遅延投与における有効性	2. 6. 2-46
2. 6. 2. 6. 4 ハイリスク患者に対する有効性	2. 6. 2-47
2. 6. 2. 6. 5 オセルタミビルリン酸塩耐性ウイルスに対する作用	2. 6. 2-47
2. 6. 2. 6. 6 新型インフルエンザウイルスに対する作用.....	2. 6. 2-48
2. 6. 2. 6. 7 安全性薬理試験.....	2. 6. 2-49
2. 6. 2. 7 図表.....	2. 6. 2-50
2. 6. 2. 8 参考文献	2. 6. 2-51

2.6.2 略号一覧表

略号	略号内容
APD _{30 (90)}	30% (90%) 再分極時の活動電位持続時間
AUC	血漿中濃度－時間曲線下面積
C ₀	時間 0 における外挿血漿中濃度
C _{max}	最高血漿中濃度
CPE	細胞変性効果
DANA	2,3-Dehydro-2-deoxy- <i>N</i> -acetylneuraminic acid
EC ₅₀	50%有効濃度
ED ₅₀	50%有効量
EID ₅₀	50%鶏卵感染価
HA	ヘマグルチニン
HEK293 細胞	ヒト胎児腎臓細胞
hERG	ヒト ether-a-go-go 関連遺伝子
H274Y 変異	274 番目のアミノ酸のヒスチジンからチロシンへの置換
IC _{50 (90)}	50% (90%) 阻害濃度
MUNANA	2'-(4-Methylumbelliferyl)- α -D- <i>N</i> -acetylneuraminic acid sodium salt hydrate
MDCK 細胞	Madin-Darby canine kidney 細胞
PK	薬物動態
RNP 複合体	分節化したウイルスゲノム RNA とウイルスたん白質との複合体
NA	ノイラミニダーゼ
TCID ₅₀	50%組織培養感染価
T>IC ₉₅	95%阻害濃度を上回る濃度を維持する時間

2.6.2 薬理試験の概要文

2.6.2.1 まとめ

2.6.2.1.1 効力を裏付ける試験

(1) NA に対する *in vitro* 阻害作用

インフルエンザウイルスのノイラミニダーゼ (NA) に対する活性阻害作用を測定した結果、ペラミビルは A 型インフルエンザウイルスの NA 活性を、50%阻害濃度 (IC_{50}) 値として 0.54～11 nmol/L の範囲で阻害した。これは既存の NA 阻害剤であるオセルタミビルリン酸塩の活性体であるオセルタミビルカルボン酸 (IC_{50} 値：1.0～14 nmol/L) やザナミビル (IC_{50} 値：2.0～14 nmol/L) と同等以上の強さであった。ペラミビルは、B 型インフルエンザウイルスの NA 活性に対しても阻害作用を有し (IC_{50} 値：6.8～17 nmol/L)、その作用はオセルタミビルカルボン酸の阻害作用 (IC_{50} 値：28～79 nmol/L) やザナミビルの阻害作用 (IC_{50} 値：14～40 nmol/L) よりも優れていた。更に多数の株を評価した結果、ほとんどの A 型及び B 型ウイルス NA に対して、ペラミビルが既存の NA 阻害剤と比べて同等以上の阻害作用を示すことが確認された。また、ペラミビルは N1 から N9 までのすべての NA 亜型に対して、同程度の阻害活性 (IC_{50} 値：0.24～1.18 nmol/L) を示したことから、将来的に出現の可能性がある新型インフルエンザウイルスに対する効果も十分期待できる。

(2) *In vitro* ウイルス増殖抑制作用

ペラミビルは、培養細胞を用いた *in vitro* インフルエンザウイルス感染試験 (感染細胞から培養上清中への子孫ウイルスの放出抑制作用、プラーク形成阻害作用及びウイルス増殖による細胞変性に対する抑制作用) においても、その NA 阻害活性に基づいたウイルス増殖抑制作用を示し、オセルタミビルカルボン酸やザナミビルと同程度又は明らかに上回るウイルス増殖抑制作用を示した。このことから、ペラミビルの有する NA 阻害によるウイルス放出抑制作用が、ウイルス増殖抑制に繋がることが示唆された。

(3) インフルエンザウイルス感染マウス致死モデルにおけるペラミビル水和物の *in vivo* 治療効果

ペラミビル水和物の *in vivo* 薬効は、季節性 A 型ウイルス (H1N1 亜型, H2N2 亜型又は H3N2 亜型) 又は B 型ウイルス感染マウス致死モデルにおいて評価した。ペラミビル水和物の単回静脈内投与により、用量依存的な生存率の増加が認められ、0.3～10 mg/kg で生存率が媒体投与群に比較して有意に改善した。一方、オセルタミビルリン酸塩の場合、10 mg/kg 単回経口投与時には生存率の有意な改善は認められず、1 mg/kg/日以上用量で 1 日 2 回 5 日間反復経口投与することによって生存率が有意に改善した。ペラミビル及びオセルタミビルリン酸塩の 50%有効量 (ED_{50}) はそれぞれ 0.1～1.5 mg/kg, 1.7～7.8 mg/kg/日であった。これらの結果から、季節性 A 型及び B 型ウイルス感染マウス致死モデルにおいて、ペラミビル水和物は単回投与で十分な治療効果を示し、投与回数及び投与量の両面においてオセルタミビルリン酸塩を上回る薬剤であることが示唆された。

ペラミビル水和物による *in vivo* 治療効果を、治療開始時期を変更することにより評価した。

A 型ウイルス感染マウスに対し、ペラミビル水和物は感染 72 時間後までに単回静脈内投与した場合に有意にマウス生存率を改善した。オセルタミビルリン酸塩は感染 60 時間後までに 5 日間の反復経口投与を開始した場合には有意にマウス生存率を改善したものの、72 時間後では改善しなかった。したがって、ペラミビル水和物はオセルタミビルリン酸塩よりも感染後の治療開始時期が遅くても効果を発揮できる可能性が示唆された。

ペラミビル水和物を A 型ウイルス感染マウスに単回静脈内投与すると、媒体投与群に比べて用量依存的に肺内ウイルス力価を低下させ、その効果は投与後数日間に渡って維持された。一方、オセルタミビルカルボン酸を単回静脈内投与した場合、肺内ウイルス力価を一時的に低下させる効果は認められたものの持続しなかった。このことから、*in vivo* マウス致死モデルにおけるペラミビル水和物とオセルタミビルリン酸塩の治療効果の差は、単に投与経路の違いによる曝露量の差だけではなく、*in vivo* におけるウイルス増殖抑制作用の違いも大きな要因であることが示唆された。また、ペラミビルは NA との解離速度がオセルタミビルカルボン酸に比べて著しく遅く、このこともペラミビル水和物がオセルタミビルカルボン酸に対して *in vivo* ウイルス増殖抑制作用の面で優位性を示す要因の一つと考えられる。

(4) オセルタミビルリン酸塩耐性ウイルスに対する効果

オセルタミビルリン酸塩耐性ウイルスとして高頻度に検出される、274 番目のアミノ酸のヒスチジンからチロシンへの置換 (H274Y 変異) NA を有するウイルスに対して、ペラミビルの有効性を検討した。H274Y 変異によるペラミビルの耐性上昇度 (NA 阻害の IC₅₀ 値の上昇) は 30～40 倍であったが、オセルタミビルカルボン酸の耐性上昇度 (約 100 倍) に比べ小さかった。

H274Y 変異 NA を有する組換えウイルスを用いた感染マウス致死モデルでは、ペラミビル水和物の単回静脈内投与により用量依存的な生存率の改善が認められ、オセルタミビルリン酸塩と比較して、より低用量で治療効果が得られることが示された。また、既存の NA 阻害剤に耐性を呈する変異 NA に対するペラミビルの阻害作用を検討した結果、既存の NA 阻害剤よりペラミビルの方が阻害作用の減弱程度の小さい変異 NA が複数検出された。

(5) 免疫抑制状態におけるインフルエンザウイルス感染に対する効果

免疫抑制状態にあるマウスにインフルエンザウイルスを感染させた致死モデルにおけるペラミビル水和物の治療効果を検討した結果、10 mg/kg の単回静脈内投与では、生存率の改善効果は認められなかったものの、同じ用量を 1 日 1 回 5 日間反復静脈内投与することにより生存率の有意な改善が認められた。一方、オセルタミビルリン酸塩は 30 mg/kg/日の 1 日 2 回 5 日間反復経口投与でも治療効果は認められず、有意な効果を得るためには 100 mg/kg/日の反復投与が必要であった。この結果から、免疫能低下が見られるハイリスク患者においては、ペラミビル水和物の反復投与が有用な治療法となる可能性が示唆された。

(6) 高病原性鳥インフルエンザウイルスに対する効果

高病原性鳥インフルエンザウイルス由来 NA に対して、ペラミビルは、0.12～0.40 nmol/L の IC₅₀ 値で阻害活性を示し、オセルタミビルカルボン酸の阻害活性 (IC₅₀ 値: 1.10～8.07 nmol/L) や

ザナミビルの阻害活性 (IC_{50} 値 : 0.99~4.88 nmol/L) を上回った。

ヒトで感染死亡例が報告されている高病原性鳥インフルエンザウイルス A/Hong Kong/483/97 株 (H5N1 亜型) を感染させたマウス致死モデルにおいて、ペラミビル水和物を 10 及び 30 mg/kg の用量で単回静脈内投与した際に、媒体投与群に比べて有意な生存率の改善が認められ、その効果は、オセルタミビルリン酸塩 (1 日 2 回 5 日間の反復経口投与) やザナミビル (1 日 2 回 5 日間の反復静脈内投与) と比べ同等以上であった。更に、10 mg/kg/日を 1 日 1 回 5 日間反復静脈内投与すると、その治療効果は増強し、生存率は 90%にまで向上した。したがって、ペラミビル水和物は、重篤な症状を呈することが報告されている高病原性鳥インフルエンザウイルス感染患者に対しても有効性及び有用性が期待できる。

2.6.2.1.2 安全性薬理試験

(1) 中枢神経系に及ぼす影響

ラットにペラミビル水和物を 20, 50 及び 100 mg/kg の用量で単回静脈内投与し、一般症状及び行動に及ぼす影響を検討した。その結果、100 mg/kg 投与群で軽度ながら、着地開脚幅の有意な増加が認められた。しかし、他の一般症状及び行動に影響が認められなかったこと、100 mg/kg 投与群における着地開脚幅の投与前値が対照群に比べ高い値であったことから、ペラミビル水和物の中枢神経系に及ぼす影響はほとんどないと考えられる。

(2) 呼吸系に及ぼす影響

無麻酔ラットにペラミビル水和物を 20, 50 及び 100 mg/kg の用量で単回静脈内投与し、呼吸数、1 回換気量及び分時換気量に及ぼす影響を検討した。その結果、ペラミビル水和物はいずれの用量でも、すべてのパラメータに対して影響を及ぼさなかった。

麻酔及び人工呼吸下でモルモットにペラミビル水和物を 1, 3 及び 10 mg/kg の単回静脈内投与し、気道抵抗、動肺コンプライアンス、血圧及び心拍数を測定した。その結果、すべてのパラメータにおいて、ペラミビル水和物に起因すると考えられる変化は観察されなかった。

(3) 心血管系に及ぼす影響

無麻酔サルに、ペラミビル水和物を 30 及び 60 mg/kg の用量で、7 日間の投与間隔にて漸増的に単回静脈内投与し、血圧、心拍数及び心電図パラメータに及ぼす影響を検討した。その結果、ペラミビル水和物はいずれの用量でも、すべてのパラメータに対して影響を及ぼさなかった。

モルモットの右心室乳頭筋標本に、ペラミビルを 3, 30 及び 300 μ mol/L (0.99, 9.85 及び 98.5 μ g/mL) の濃度で適用し、活動電位振幅、静止膜電位、脱分極最大立ち上がり速度並びに活動電位持続時間を測定した。その結果、ペラミビルはいずれの濃度でも、すべてのパラメータに対して影響を及ぼさなかった。

ヒト ether-a-go-go 関連遺伝子 (hERG) チャネルを発現させたヒト胎児腎臓細胞 (HEK293 細胞) に、ペラミビルを 300 μ mol/L の濃度で適用し、遅延整流 K^+ 電流を測定した。その結果、ペラミビルは、遅延整流 K^+ 電流のピーク電流に対して影響を及ぼさなかった。

2.6.2.2 効力を裏付ける試験

インフルエンザウイルスは、M1 たん白質で裏打ちされた脂質二重膜 (エンベロープ) で形成され、その内側に、分節化したウイルスゲノム RNA と RNA ポリメラーゼなどのウイルスたん白質との複合体 (RNP 複合体) を含んでいる。エンベロープ上には主にヘマグルチニン (HA) と NA と呼ばれる糖たん白質が存在する¹⁾。HA は、細胞表面の糖たん白質又は糖脂質の糖鎖末端に存在するシアル酸をレセプターとして認識し、細胞表面に吸着する。ウイルスはその後、細胞膜から細胞内への輸送過程であるエンドサイトーシスによって取り込まれ、エンドソーム内の酸性 pH により M1 たん白質の殻が崩壊し、エンベロープと細胞膜との膜融合が引き起こされ、RNP 複合体が細胞質内へ放出される。RNP 複合体は核内へ運ばれ、そこでゲノム RNA が複製及び転写される。複製されたゲノム RNA は子孫ウイルスの構成成分となり、転写産物は mRNA となり、細胞の翻訳機能を利用して細胞質内でウイルスたん白質が合成される。新たに合成された HA や NA は、小胞体からゴルジ体を経由して細胞膜へ運ばれ、その直下に移動した M1 たん白質が RNP 複合体を包み込むように殻を作り、子孫ウイルスの形成 (出芽) が起こる。出芽を終えた子孫ウイルスは細胞表面から遊離するが、この過程に NA が重要な機能を果たす。すなわち、NA は、HA や NA に存在するシアル酸及び細胞表面のシアル酸を、隣接する糖から除去することにより、出芽した子孫ウイルスの細胞表面からの遊離を促し、新たな細胞へ感染の場を拡げ、次の増殖サイクルが始まると考えられている。

ペラミビルは、NA によるシアル酸切断活性を阻害し、感染細胞の表面から子孫ウイルスが遊離するステップを抑制することで、ウイルスが別の細胞へ拡散することを防ぎ、結果的にウイルス増殖抑制作用を発揮すると考えられる。また、インフルエンザウイルス感染マウスにおいても、ペラミビルがウイルスの増殖を抑制することによって、ウイルスの増殖に依存した肺機能傷害を軽減し、結果的に生存率改善効果に結びついていると考えられる。そこで、*in vitro* の NA 活性阻害作用、*in vitro* のウイルス増殖抑制作用並びに *in vivo* におけるウイルス増殖抑制作用及び生存率改善効果を検討することによって、ペラミビルの有効性を評価した。一方、オセルタミビル耐性の季節性インフルエンザウイルスの増加、高病原性鳥インフルエンザウイルスのヒトへの感染、豚由来の新型インフルエンザウイルスの発生など、従来の季節性インフルエンザウイルスとはやや性質の異なるインフルエンザウイルスの感染も問題となっている。そこで、オセルタミビル耐性ウイルスや高病原性鳥インフルエンザウイルスに対するペラミビルの有効性についても評価した。

2.6.2.2.1 NA に対する *in vitro* 阻害作用

現在、ヒトで周期的に流行を繰り返すインフルエンザウイルスは、主に A 型の H1N1 亜型、H3N2 亜型及び B 型の 3 種類であり、季節性インフルエンザウイルスと呼ばれている。これらのウイルスが有する NA に対するペラミビルの活性阻害作用について検討した。また、今後、これまでとは異なる NA 亜型を有するインフルエンザウイルスが、新たに流行する可能性も考えられるため、鳥インフルエンザウイルス等を用いてすべて (N1 から N9 までの 9 種)²⁾ の NA 亜型に対するペラミビルの活性阻害作用も検討した。更に、ペラミビルの有する NA に対する活性阻害作用の選択性並びに特異性を評価する目的で、細菌由来 NA 並びにヒト由来シアリダーゼに対する阻害作用や各種レセプターに対する結合親和性も検討した。

2.6.2.2.1.1 季節性ヒトインフルエンザウイルスの NA に対する阻害作用

添付資料 4.2.1.1-01, 4.2.1.1-02, 4.2.1.1-03, 4.2.1.1-04
概要表 2.6.3.2.1.1, 2.6.3.2.1.2

ペラミビルのヒト A 型及び B 型インフルエンザウイルスの NA に対する阻害作用について、世界保健機関が推奨している NA 活性測定法³⁾ に従い、糖たん白質である Fetuin を基質として用いた試験系で評価した。

11 株の A 型インフルエンザウイルスの NA に対して、ペラミビルは IC₅₀ 値が 0.54~11 nmol/L の範囲で阻害活性を示した (表 2.6.2.2-1)。NA 阻害活性を有する既存の NA 阻害剤であるオセルタミビルリン酸塩の活性体であるオセルタミビルカルボン酸及びザナミビルの IC₅₀ 値は、それぞれ 1.0~14 nmol/L 及び 2.0~14 nmol/L の範囲であった。いずれの株に対しても、ペラミビルの IC₅₀ 値は既存の NA 阻害剤よりも小さかったことから、A 型インフルエンザウイルスの NA に対するペラミビルの *in vitro* 活性阻害作用は、既存の NA 阻害剤と同等以上と考えられる。

一方、B 型インフルエンザウイルスの NA に対して、ペラミビルは A 型インフルエンザウイルスの NA に対する阻害作用に比べて若干弱いものの、検討した 5 株の NA に対して 6.8~17 nmol/L の IC₅₀ 値を示し、オセルタミビルカルボン酸 (IC₅₀ 値: 28~79 nmol/L) やザナミビル (IC₅₀ 値: 14~40 nmol/L) に比べて強い阻害作用を示した。

表 2.6.2.2-1 インフルエンザウイルス NA に対するペラミビルの阻害作用

型	亜型	株名	IC ₅₀ (nmol/L)		
			ペラミビル	オセルタミビル カルボン酸	ザナミビル
実験室株					
A	H1N1	A/PR/8/34	1.8	9.0	3.8
A	H1N1	A/WS/33	1.4	5.7	2.6
A	H3N2	A/Kumamoto/Y5/67	0.66	1.3	4.2
A	H3N2	A/Hong Kong/8/68	0.57	1.6	3.9
A	H3N2	A/Victoria/3/75	0.54	1.0	2.0
A	H3N2	A/Osaka/7522/97	0.72	2.1	5.6
臨床分離株					
A	H1N1	A/Kadoma/3/2006	1.8	8.3	7.3
A	H1N1	A/Sendai H/1049/2007	2.0	9.1	9.1
A	H3N2	A/Kadoma/1/2003	11	14	14
A	H3N2	A/Sendai H/F494/2007	3.3	4.6	7.4
A	H3N2	A/Sendai H/F570/2007	2.9	3.9	4.6
実験室株					
B	-	B/Maryland/1/59	17	28	22
B	-	B/Lee/40	15	59	40
B	-	B/Hong Kong/5/72	14	51	36
臨床分離株					
B	-	B/Kadoma/1/2005	6.8	39	14
B	-	B/Sendai H/1051/2007	15	79	30

独立した 3 回の実験結果より平均 IC₅₀ 値を算出。1 回の実験は 2 重測定で実施。

次に、蛍光基質である 2'-(4-Methylumbelliferyl)- α -D-N-acetylneuraminic acid sodium salt hydrate (MUNANA) を用いた簡便な酵素活性測定法⁴⁾により、更に多くのウイルス株を用いてペラミビルの NA に対する阻害作用について検討した。

ペラミビルは、42 株すべての A 型ウイルスの NA に対して 2 nmol/L 未満の IC₅₀ 値を示した (表 2.6.2.2-2)。オセルタミビルカルボン酸も検討したすべての A 型ウイルスの NA に対して 2 nmol/L 未満の IC₅₀ 値を示したが、ザナミビルは約半数の株で 4 nmol/L 以上の IC₅₀ 値を示したことから、ペラミビルの NA 阻害作用は、ザナミビルに比べ強いと考えられる。また、20 株の B 型ウイルスの NA に対する阻害作用を同様の方法で検討したところ、ペラミビルは 19 株で 0.40~4.26 nmol/L の IC₅₀ 値を示し、ほとんどの株の NA に対する IC₅₀ 値が 4 nmol/L 以上であったオセルタミビルカルボン酸 (IC₅₀ 値 : 1.47~14.0 nmol/L) やザナミビル (IC₅₀ 値 : 7.12~10.9 nmol/L) に比べ、強い阻害作用を示した。ただし、残りの 1 株に対するペラミビルの IC₅₀ 値は 54.2 nmol/L であった。

表 2.6.2.2-2 インフルエンザウイルス NA に対するペラミビルの阻害作用

型	亜型	株名	IC ₅₀ (nmol/L)		
			ペラミビル	オセルタミビル カルボン酸	ザナミビル
実験室株					
A	H1N1	A/WS/33	0.31	0.98	N.D.
A	H1N1	A/PR/8/34	0.50	1.40	N.D.
A	H1N1	A/FM/1/47	0.50	0.94	1.24
A	H1N1	A/New Jersey/8/76	0.85	1.17	3.21
A	H1N1	A/NWS/33	0.91	1.45	2.39
A	H1N1	A/Osaka/12/92	0.63	1.10	1.65
A	H1N1	A/swine/Iowa/15/30	0.94	1.61	3.01
A	H1N1	A/USSR/92/77	0.56	1.46	1.43
A	H1N1	A/Weiss/43	0.54	1.54	1.52
A	H1N1	A/WSN/33	0.56	1.56	1.50
A	H2N2	A/Adachi/1/57	1.77	1.04	6.42
A	H2N2	A/Kumamoto/Y5/67	1.39	0.82	4.72
A	H2N2	A/Singapore/1/57	1.51	0.88	4.94
A	H3N2	A/Aichi	1.33	1.12	4.19
A	H3N2	A/Alice	1.32	0.83	4.85
A	H3N2	A/Victoria/3/75	0.98	0.66	N.D.
A	H3N2	A/HongKong/8/68	1.27	1.09	4.14
A	H3N2	A/Matsubara	1.52	1.16	9.07
A	H3N2	A/Mie/7519/97	1.40	1.15	8.78
A	H3N2	A/Osaka/7522/97	1.18	1.04	7.69
A	H3N2	A/Port Chalmers/1/73	1.48	0.96	6.34
臨床分離株					
A	H1N1	A/Kadoma/15/2007	0.68	1.09	1.90
A	H1N1	A/Kadoma/3/2006	0.54	1.31	N.D.
A	H1N1	A/Kadoma/4/2006	0.48	0.87	N.D.
A	H1N1	A/Sendai H/1049/2007	0.60	0.97	1.84
A	H1N1	A/Sendai H/F648/2007	0.65	0.95	1.76
A	H1N1	A/Sendai H/K133/2007	0.55	0.96	1.73
A	H3N2	A/Kadoma/71/2007	1.07	0.72	3.26
A	H3N2	A/Kadoma/31/2007	1.72	1.11	5.05
A	H3N2	A/Kadoma/1/2003	1.06	0.52	N.D.
A	H3N2	A/Kadoma/1/2004	1.13	0.59	4.15
A	H3N2	A/Kadoma/1/2005	0.92	0.54	2.91
A	H3N2	A/Kadoma/2/2005	1.10	0.80	N.D.
A	H3N2	A/Kadoma/1/2006	0.72	0.34	N.D.
A	H3N2	A/Kadoma/2/2006	0.98	0.51	N.D.
A	H3N2	A/Sendai H/38/2007	1.49	1.00	4.38
A	H3N2	A/Sendai H/721/2007	1.39	0.96	4.18
A	H3N2	A/Sendai H/F437/2007	1.07	0.72	2.80
A	H3N2	A/Sendai H/F494/2007	1.52	1.06	4.80
A	H3N2	A/Sendai H/F570/2007	1.35	0.85	3.53
A	H3N2	A/Sendai H/K78/2007	1.35	0.91	3.78
A	H3N2	A/Sendai H/K87/2007	1.51	1.00	4.53

独立した 3 回又は 2 回の実験結果より平均 IC₅₀ 値を算出。1 回の実験は 2 重又は 3 重測定で実施。
N.D. : 実施せず。

(続く)

表 2.6.2.2-2 インフルエンザウイルス NA に対するペラミビルの阻害作用 (続き)

型	亜型	株名	IC ₅₀ (nmol/L)		
			ペラミビル	オセルタミビル カルボン酸	ザナミビル
実験室株					
B	-	B/Lee/40	0.40	1.47	N.D.
B	-	B/Maryland/1/59	1.92	3.29	N.D.
B	-	B/Russia/69	1.71	4.22	N.D.
B	-	B/Hong Kong/5/72	1.80	6.07	N.D.
B	-	B/Allen/45	2.41	4.39	8.31
B	-	B/GL/1739/54	3.41	5.95	9.88
B	-	B/Kanagawa/3/76	2.48	5.29	10.1
B	-	B/Taiwan/2/62	2.28	4.66	10.2
臨床分離株					
B	-	B/Kadoma/19/2007	54.2	18.0	13.7
B	-	B/Kadoma/26/2007	2.25	8.74	7.40
B	-	B/Sendai H/1026/2007	4.12	14.0	10.2
B	-	B/Sendai H/1051/2007	4.26	13.1	10.9
B	-	B/Sendai H/40/2007	2.78	9.59	8.51
B	-	B/Sendai H/43/2007	2.33	8.95	7.48
B	-	B/Sendai H/F603/2007	2.32	9.14	7.47
B	-	B/Sendai H/F646/2007	2.27	9.04	7.13
B	-	B/Sendai H/K128/2007	2.46	8.52	7.29
B	-	B/Sendai H/K147/2007	1.82	8.31	7.12
B	-	B/Kadoma/2/2005	1.37	5.55	N.D.
B	-	B/Kadoma/1/2005	1.78	5.93	N.D.

独立した 3 回又は 2 回の実験結果より平均 IC₅₀ 値を算出。1 回の実験は 2 重又は 3 重測定で実施。

B/Kanagawa/3/76 株のみ 3 回の実験のうち 1 回が単測定で実施。

N.D.: 実施せず。

2.6.2.2.1.2 様々な亜型の NA に対するペラミビルの阻害作用

添付資料 4.2.1.1-04

概要表 2.6.3.2.1.2

異なる亜型の A 型インフルエンザウイルスが同じ細胞に感染すると、遺伝子間の交雑により新しい亜型のウイルスが生じる。その結果、従来のウイルスと比して抗原性が大きく変化した新型インフルエンザウイルスが出現すると考えられている⁵⁾。したがって、抗インフルエンザウイルス薬は、すべての亜型に対して安定した阻害作用を示すことが望ましい。そこで、N1 から N9 までのすべての NA 亜型に対する阻害活性を、MUNANA を基質とした試験系にて評価した。

ペラミビルは、検討したいずれの NA 亜型に対しても 0.24~1.18 nmol/L の範囲の IC₅₀ 値を示し、通常の季節性インフルエンザウイルス由来の NA に対する場合とほぼ同等の阻害作用を示した (表 2.6.2.2-3)。一方、対照薬であるオセルタミビルカルボン酸の IC₅₀ 値は 0.86~3.38 nmol/L であった。ペラミビルの NA 阻害活性はオセルタミビルカルボン酸に比べやや強かった。

したがって、将来的に出現の可能性がある新型インフルエンザウイルスに対する効果も十分期待できる。

表 2.6.2.2-3 様々な亜型のインフルエンザウイルス NA 活性に対するペラミビルの阻害作用

株名	亜型	IC ₅₀ (nmol/L)	
		ペラミビル	オセルタミビル カルボン酸
A/duck/Hokkaido/W159/06	H6N1	0.62	2.09
A/duck/Hokkaido/13/00	H9N2	1.12	0.86
A/duck/Hokkaido/84/02	H5N3	0.90	1.03
A/duck/Hokkaido/17/01	H2N3	0.69	0.99
A/turkey/Ontario/6118/68	H8N4	0.91	1.22
A/duck/Hokkaido/18/00	H10N4	0.51	1.22
A/duck/Alberta/60/76	H12N5	0.30	1.02
A/duck/Hokkaido/1058/01	H4N5	0.24	0.99
A/duck/England/1/56	H11N6	0.82	1.21
A/duck/Hokkaido/W186/06	H13N6	0.69	1.19
A/seal/Massachusetts/1/80	H7N7	0.85	0.86
A/chicken/Germany/N/49	H10N7	1.18	2.46
A/duck/Ukraine/1/63	H3N8	0.39	3.38
A/duck/Hokkaido/228/03	H6N8	0.35	2.19
A/duck/Memphis/546/74	H11N9	0.45	1.18
A/duck/Hokkaido/W245/04	H11N9	0.39	1.13

独立した 3 回の実験結果より平均 IC₅₀ 値を算出。1 回の実験は 3 重測定で実施。

2.6.2.2.1.3 ペラミビルによる NA 阻害作用の選択性に関する検討

添付資料 4.2.1.1-05, 4.2.1.1-06
概要表 2.6.3.2.1.3

ペラミビルの有する NA 阻害作用の選択性を検討する目的で、細菌由来 NA に対する阻害作用について MUNANA を基質とした試験系で評価した。

Arthrobacter ureafaciens, *Streptococcus pneumoniae* 及び *Vibrio cholerae* 由来 NA に対するペラミビルの IC₅₀ 値は 24.8 µmol/L ~ >1000 µmol/L であった (表 2.6.2.2-4)。陽性対照として用いたインフルエンザウイルス B/Hong Kong/5/72 の NA に対するペラミビルの IC₅₀ 値 (1.11 nmol/L) との間に 2 万倍以上の開きが認められた。

表 2.6.2.2-4 細菌由来 NA に対するペラミビルの阻害作用

	IC ₅₀ (µmol/L)	
	ペラミビル	オセルタミビル カルボン酸
細菌由来 NA		
<i>Arthrobacter ureafaciens</i>	>1000	17.6
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	>1000	10.7
<i>Vibrio cholerae</i>	24.8	277.4
インフルエンザウイルス NA		
B/Hong Kong/5/72	0.00111	0.00541

独立した 3 回の実験結果より平均 IC₅₀ 値を算出。1 回の実験は 2 重測定で実施。

また、インフルエンザウイルス由来の NA と同様に、細胞表面のたん白質に付加した糖鎖の

末端に位置するシアル酸を切断する活性を有する4種のヒトシアリダーゼ NEU1～NEU4⁶⁾ に対するペラミビルの阻害作用を評価した。各酵素は組換えたん白質として哺乳類細胞株に発現させ、その細胞溶解液及び細胞溶解液から粗精製したものを酵素源として用い、NEU1、NEU2 及び NEU4 の基質には蛍光基質である MUNANA を、NEU3 の基質には Ganglioside GM3 を用いた。陽性対照化合物としては、非選択的なシアリダーゼ阻害剤であるシアル酸類似化合物である 2,3-Dehydro-2-deoxy-*N*-acetylneuraminic acid (DANA) を用いた。

ペラミビルは、NEU1、NEU3 及び NEU4 に対して 5000 $\mu\text{mol/L}$ でも顕著な阻害作用を示さなかった (表 2.6.2.2-5)。また、NEU2 に対する IC_{50} 値は 150 $\mu\text{mol/L}$ であり、陽性対照として用いたインフルエンザウイルス A/PR/8/34 の NA に対するペラミビルの IC_{50} 値 (0.25 nmol/L) との間に約 60 万倍の開きが確認された。

以上の結果から、ペラミビルは、インフルエンザウイルス NA に対して極めて高い選択性を有すると考えられる。

表 2.6.2.2-5 ヒトシアリダーゼに対するペラミビルの阻害作用

	IC_{50} ($\mu\text{mol/L}$)	
	ペラミビル	DANA
ヒトシアリダーゼ		
NEU1	>5000	160
NEU2	150	18
NEU3	>5000	92
NEU4	>5000	3.4
インフルエンザウイルスシアリダーゼ		
A/PR/8/34	0.00025	N.D.

3 回以上の独立した実験結果より平均 IC_{50} 値を算出。

N.D.: 実施せず。

2.6.2.2.1.4 NA 以外のレセプター、イオンチャネル及びトランスポーターに対するペラミビルの結合阻害作用

添付資料 4.2.1.1-07

概要表 2.6.3.2.1.4

ペラミビルの有するインフルエンザウイルス NA に対する特異性並びに選択性を更に検証するため、ヒト、ラット等の主要なレセプター、イオンチャネル及びトランスポーターに対する結合阻害作用を検討した。選択した 63 種のレセプター、イオンチャネル又はトランスポーターに対して、それぞれの本来のリガンドとペラミビル (最終濃度: 10 $\mu\text{mol/L}$) とを競合阻害させることにより、リガンドを解離させた割合 (%) を指標として、ペラミビルの NA 以外の分子に対する特異的な結合能の有無を評価した。

その結果、ペラミビルは、インフルエンザウイルス NA に対する IC_{50} 値の 1000 倍以上の高濃度条件 (10 $\mu\text{mol/L}$) においても、いずれのレセプター、イオンチャネル及びトランスポーターに対して顕著な結合阻害作用を示さないことが確認された (表 2.6.2.2-6)。

表 2.6.2.2-6 各種レセプター，イオンチャネル及びトランスポーターとリガンドの結合に対するペ
ラミビルの阻害作用

レセプター，イオンチャネル又は トランスポーター	結合阻害 (%)		
	ペラミビル	陽性対照化合物	
Adenosine A1 (Human)	0.67	99.97	(DPCPX)
Adenosine A2a (Human)	0.00	100.00	(CGS21680)
Adenosine A2b (Human)	2.55	94.78	(DPCPX)
α1A-Adrenergic (Human)	25.46	98.37	(HEAT)
α1B-Adrenergic (Human)	0.82	99.79	(Prazosin)
α2A-Adrenergic (Human)	1.86	93.36	(Rauwolscline)
α2B-Adrenergic (Human)	0.00	98.98	(Rauwolscline)
α2C-Adrenergic (Human)	0.59	100.00	(Rauwolscline)
β1-Adrenergic (Human)	1.04	99.36	[(±)-Propranolol]
β2-Adrenergic (Human)	0.00	100.00	[(±)-Propranolol]
β3-Adrenergic (Human)	13.38	100.00	[(±)-Propranolol]
Bezodiazepine (Bovine)	0.89	99.35	(Diazepam)
Ca Channel (Type L, Benzothiazepine: Rat)	9.29	99.72	[(+)- <i>cis</i> -Diltiazem]
Ca Channel (Type L, Dihydropyridine: Rat)	1.99	100.00	(Nitrendipine)
Ca Channel (Type L, Phenylalkylamine: Rat)	2.10	98.29	[(±)-Methoxyverapamil]
Ca Channel (Type N: Rat)	0.00	100.00	(ω-Conotoxin GVIA)
Cannabinoid CB1 (Human)	15.92	98.58	[(R)-(+)-WIN55212-2]
Dopamine D1 (Human)	1.66	100.00	[R(+)-SCH-23390]
Dopamine D1A (Human)	0.87	100.00	[R(+)-SCH-23390]
Dopamine D2 (Human)	0.21	99.84	[(+)-Butaclamol]
Dopamine D2 Short (Human)	6.71	96.88	[(+)-Butaclamol]
Dopamine D2 Long (Human)	0.00	100.00	[(+)-Butaclamol]
Dopamine Transporter (Human)	0.96	100.00	(GBR12909)
GABA A (Agonist Site: Rat)	5.44	100.00	(Muscimol)
GABA A (BZ Central: Rat)	0.00	100.00	(Diazepam)
GABA A (Chloride Channel: Rat)	6.13	90.75	(Picrotoxin)
GABA Transporter (Rat)	1.14	97.23	(GABA)
GABA B1a (Human)	0.97	99.25	(CGP54626)
GABA B1b (Human)	0.05	99.96	(CGP54626)
GABA B1a+R2 (Human)	1.73	99.11	(CGP54626)
GABA B1b+R2 (Human)	1.03	99.60	(CGP54626)
Glutamate (Non-selective: Rat)	0.69	100.00	(L-Glutamic acid)
Glutamate (AMPA: Rat)	0.00	98.46	[(S)-AMPA]
Glutamate (Kainate: Rat)	3.11	100.00	(Kainic acid)
Glutamate (NMDA Agonist Site: Rat)	0.00	98.90	(L-Glutamic acid)
Glutamate (NMDA Glycine Site: Rat)	5.00	100.00	(MDL105,519)

ペラミビル濃度： 1×10^{-5} mol/L. 陽性対照化合物濃度： 1×10^{-7} , 1×10^{-6} 又は 1×10^{-5} mol/L.

2 重測定の実験結果より平均結合阻害率 (%) を算出.

結合阻害率は 100% から以下の式で得られた結合率を減ずることによって算出.

結合率 = $[(B - N) / (B_0 - N)] \times 100$ (%)

B：ペラミビル存在下での結合放射能活性 (個別データ).

B₀：ペラミビル非存在下での総結合放射能活性 (平均値).

N：非特異的結合放射能活性 (平均値).

(続く)

表 2.6.2.2-6 各種レセプター、イオンチャネル及びトランスポーターとリガンドの結合に対するペ
ラミビルの阻害作用 (続き)

レセプター、イオンチャネル又は トランスポーター	結合阻害 (%)		
	ペラミビル	陽性対照化合物	
Glutamate (NMDA Phencyclidine Site: Rat)	0.00	97.83	[(+)-MK-801]
Glutamate (NMDA Polyamine Site: Rat)	4.96	92.90	(Ifenprodil)
Histamine H1 (Human)	4.17	100.00	(Pyrilamine)
Histamine H2 (Human)	0.00	96.16	(Cimetidine)
K Channel KA (Rat)	3.20	100.00	(α -Dendrotoxin)
K Channel KATP (Rat)	0.00	100.00	(Glybenclamide)
K Channel Kv (Rat)	1.23	99.89	(Charybdotoxin)
K Channel SkCa (Rat)	0.02	100.00	(Apamin)
K Channel hREG (Human)	5.65	98.49	(BeKm-1)
Monoamine Transporter (Rabbit)	0.59	99.16	(Ketanserin)
Muscarinic (Non-selective: Rat)	0.00	99.86	(Atropine)
Muscarinic M1 (Human)	0.49	100.00	(Atropine)
Muscarinic M2 (Human)	3.26	100.00	(Atropine)
Opiate (Non-selective: Rat)	4.06	100.00	(Naloxone)
Opiate δ (Human)	2.47	95.40	(Naltriben)
Opiate κ (Human)	0.00	100.00	(U-69593)
Opiate μ (Human)	6.26	100.00	(DAMGO)
Opiate ORL1 (Human)	5.08	93.66	(Orphanin FQ)
Serotonin 5HT1A (Human)	1.17	100.00	(Serotonin)
Serotonin 5HT1B (Human)	12.07	99.72	(GR127935)
Serotonin 5HT2A (Human)	2.06	99.34	(Ketanserin)
Serotonin 5HT2B (Human)	40.42	100.00	(Serotonin)
Serotonin 5HT2C (Human)	0.00	100.00	(Mianserin)
Serotonin Transporter (Human)	2.11	100.00	(Imipramine)
Sigma (Non-selective: Guinea pig)	2.40	93.31	(Haloperidol)
Sigma $\sigma 1$ (Guinea pig)	0.80	98.22	[(+)-Pentazocine]
Vasopressin V1 (Rat)	2.19	95.09	[(Arg ⁸)-Vasopressin]

ペラミビル濃度: 1×10^{-5} mol/L. 陽性対照化合物濃度: 1×10^{-7} , 1×10^{-6} 又は 1×10^{-5} mol/L.

2 重測定の実験結果より平均結合阻害率 (%) を算出.

結合阻害率は 100% から以下の式で得られた結合率を減ずることによって算出.

$$\text{結合率} = [(B - N) / (B_0 - N)] \times 100 (\%)$$

B: ペラミビル存在下での結合放射能活性 (個別データ).

B₀: ペラミビル非存在下での総結合放射能活性 (平均値).

N: 非特異的結合放射能活性 (平均値).

2.6.2.2.2 *In vitro* ウイルス増殖抑制作用

ペラミビルは、オセルタミビルカルボン酸やザナミビルと同様に⁷⁾、インフルエンザウイルスの NA 活性を阻害することによって感染細胞の表面からウイルス粒子が遊離するステップを抑制し、子孫ウイルスが感染細胞から別の細胞に拡散することを防ぎ、結果的にウイルス増殖抑制作用を示すと考えられる。そこで、ペラミビルのインフルエンザウイルス NA 活性の阻害によるウイルス増殖抑制作用を *in vitro* の 3 種の試験系で評価した。すなわち、NA の作用点であるウイルス遊離ステップへの阻害作用を評価するウイルス放出抑制試験、ウイルス増殖によって生ずる細胞の死滅に対する抑制作用を評価するプラーク形成阻害試験及び細胞変性効果 (CPE) 抑制試験を用いて評価した。

2.6.2.2.2.1 感染細胞からのウイルス放出に対する作用

添付資料 4.2.1.1-08

概要表 2.6.3.2.2.1

インフルエンザウイルスの NA 活性が阻害されると感染細胞から産生した子孫ウイルスは細胞表面上で凝集し、その放出が抑制されると考えられている⁸⁾。そこで、ペラミビルによるインフルエンザウイルスの NA 活性阻害に起因したウイルス粒子放出抑制作用について検討した。試験には 10 種の臨床分離株を用い、RPMI2650 細胞 (ヒト鼻中隔由来細胞株) にそれぞれのウイルスを接種し、ペラミビルの存在下又は非存在下で 2 日間培養し培養上清を採取した。回収した培養上清を Madin-Darby canine kidney 細胞 (MDCK 細胞) に接種し、3~4 日間培養後の CPE を観察することにより、培養上清中のウイルス量を 50%組織培養感染価 (TCID₅₀) として算出した。また、対照群の 10%まで TCID₅₀ 値を減少させる薬物濃度を 90%阻害濃度 (IC₉₀) とした。

ペラミビルは、濃度依存的にウイルス放出を減少させ、検討した 6 種の A 型臨床分離株に対して 13~1800 nmol/L の IC₉₀ 値を示した (表 2.6.2.2-7)。対照薬のオセルタミビルカルボン酸及びザナミビルの IC₉₀ 値は、それぞれ 81 nmol/L~>5000 nmol/L 及び 310 nmol/L~>5000 nmol/L であり、6 株いずれに対してもペラミビルが最も強い活性を示したことから、ペラミビルは、対照薬に比べ強いウイルス放出抑制作用を有することが示唆された。一方、4 種の B 型臨床分離株では、ペラミビル、オセルタミビルカルボン酸及びザナミビルの IC₉₀ 値は、それぞれ 110~490 nmol/L、280 nmol/L~>1000 nmol/L 及び 130~470 nmol/L であった。4 株中 3 株では、ペラミビルはオセルタミビルカルボン酸よりも強い阻害活性を示したことから、より強いウイルス放出抑制作用を発現すること、ザナミビルとは同程度のウイルス放出抑制作用を発現することが示唆された。

表 2.6.2.2-7 インフルエンザウイルス A 型及び B 型に対するペラミビルのウイルス放出抑制作用

型	亜型	株名	IC ₉₀ (nmol/L)		
			ペラミビル	オセルタミビル カルボン酸	ザナミビル
A	H1N1	A/Kadoma/3/2006	57	>1000 ^{a)}	1000 ^{b)}
A	H1N1	2007-268	56	>1000 ^{a)}	460
A	H1N1	A/SendaiH/1049/2007	180	560 ^{c)}	>1000 ^{a)}
A	H1N1	A/SendaiH/K133/2007	13	710 ^{b)}	310
A	H3N2	A/Kadoma/1/2005	72	81 ^{b)}	>1000 ^{a)}
A	H3N2	A/SendaiH/F494/2007	1800 ^{b)}	>5000 ^{a)}	>5000 ^{a)}
B	-	B/Kadoma/1/2005	320	280 ^{c)}	170
B	-	B/Kadoma/2/2005	490	900 ^{c)}	130 ^{b)}
B	-	B/SendaiH/43/2007	150	940 ^{c)}	420
B	-	B/SendaiH/F646/2007	110	>1000 ^{a)}	470 ^{b)}

独立した 3 回の実験結果より平均 IC₉₀ 値を算出.

a) 3 回の実験の IC₉₀ 値はいずれも設定濃度以上.

b) 2 回の実験の平均 IC₉₀ 値. 他の 1 回の実験の IC₉₀ 値は設定濃度以上.

c) 1 回の実験の IC₉₀ 値. 他の 2 回の実験の IC₉₀ 値は設定濃度以上.

2.6.2.2.2.2 感染細胞におけるプラーク形成に対する作用

添付資料 4.2.1.1-09, 4.2.1.1-10

概要表 2.6.3.2.2.2

インフルエンザウイルスを細胞に感染させた後、寒天培地で培養すると、放出された子孫ウイルスにより新たな感染が広がり、これに伴い死滅した細胞によるプラークが生じる。そこで、プラーク形成を指標にした試験系を用いて、ペラミビルによるウイルス増殖抑制作用を評価した。

ウイルスには 5 種の実験室株、10 種の臨床分離株を用い、これらを MDCK 細胞に接種し、種々の濃度のペラミビルと寒天の混合液を添加し、3 日間培養した。その後、細胞をニュートラルレッドにて染色してプラーク数又はプラーク直径を指標としてペラミビルのプラーク形成阻害作用を評価した。

ペラミビルは、濃度依存的にプラーク形成を阻害し、A 型ウイルスに対して 0.064~18 nmol/L, B 型ウイルスに対して 4.8~120 nmol/L の 50%有効濃度 (EC₅₀) を示した (表 2.6.2.2-8)。この結果から、ペラミビルが *in vitro* においてウイルス増殖抑制作用を持つことが明らかとなった。また、対照薬として用いたオセルタミビルカルボン酸及びザナミビルの EC₅₀ 値との比較から、A 型ウイルスに対するペラミビルのプラーク形成阻害作用は、オセルタミビルカルボン酸及びザナミビルよりも強かった。

表 2.6.2.2-8 インフルエンザウイルス A 型及び B 型に対するペラミビルのプラーク形成阻害作用

型	亜型	株名	EC ₅₀ (nmol/L)		
			ペラミビル	オセルタミビル カルボン酸	ザナミビル
実験室株					
A	H1N1	A/WS/33	15	60	37
A	H1N1	A/PR/8/34	0.93	140	5.8
A	H3N2	A/Victoria/3/75	0.36	0.78	4.6
臨床分離株					
A	H1N1	A/Kadoma/3/06	0.48	7.5	13
A	H1N1	A/Sendai-H/K133/2007	17	200	130
A	H1N1	A/Sendai-H/1049/2007	18	360	75
A	H3N2	A/Kadoma/1/04	0.16	11	25
A	H3N2	A/Kadoma/1/05 ^{a)}	0.39	5.3	12
A	H3N2	A/Kadoma/1/06	0.064	260	3.6
A	H3N2	A/Sendai-H/F494/2007 ^{a)}	1.9	32	59
実験室株					
B	-	B/Lee/40	25	31	21
B	-	B/Maryland/1/59	26	42	29
臨床分離株					
B	-	B/Kadoma/2/05	4.8	47	7.9
B	-	B/Sendai-H/0040/2007	120	720	150
B	-	B/2007-297	52	30	7.9

独立した 3 回の実験結果より平均 EC₅₀ 値を算出。

a) プラーク直径の実測値より算出した面積で評価。

2.6.2.2.2.3 感染細胞における増殖抑制作用

添付資料 4.2.1.1-11

概要表 2.6.3.2.2.3

インフルエンザウイルス感染により MDCK 細胞は CPE を示す。CPE を指標にしたウイルス増殖能の間接的な評価から、ペラミビルのウイルス増殖抑制作用についてオセルタミビルカルボン酸との定性的な比較を試みた。

本試験で用いたインフルエンザ A 型及び B 型ウイルスを含むいずれの 6 株の実験室株に対しても、ペラミビルは MDCK 細胞の CPE を軽減し、その EC₅₀ 値は 0.013～1.739 μmol/L であった (表 2.6.2.2-9)。これに対して、オセルタミビルカルボン酸の EC₅₀ 値は 0.045～4.324 μmol/L であった。本試験においても、ペラミビルはいずれの株に対してもオセルタミビルカルボン酸よりも強いウイルス増殖抑制作用を示した。

表 2.6.2.2-9 インフルエンザウイルス A 型及び B 型に対するペラミビルの増殖抑制作用

株名	EC ₅₀ (μmol/L)	
	ペラミビル	オセルタミビルカルボン酸
A/WS/33 (H1N1)	0.236	4.324 ^{a)}
A/Victoria/3/75 (H3N2)	0.013	0.045
B/Lee/40	1.739	3.907 ^{b)}
B/Maryland/1/59	0.104	0.130
B/Russia/69	0.287	0.318
B/Hong Kong/5/72	0.788	1.994

独立した 3 回の実験結果より平均 EC₅₀ 値を算出。

a) 1 回の実験の EC₅₀ 値。他の 2 回の実験の EC₅₀ 値は設定濃度 (5 μmol/L) 以上。

b) 2 回の実験の平均 EC₅₀ 値。他の 1 回の実験の EC₅₀ 値は設定濃度 (5 μmol/L) 以上。

2.6.2.2.3 インフルエンザウイルス感染マウス致死モデルにおけるペラミビル水和物の *in vivo* 治療効果

マウスにインフルエンザウイルスを経鼻接種すると気道上皮細胞又は肺胞上皮細胞に感染し、ウイルスの増殖とともに肺炎が進行し、炎症細胞の浸潤及び肺水腫を呈する⁹⁾。接種ウイルス量に依存して肺炎は重篤化し、およそ 1 週間後に死亡する。インフルエンザウイルスの感染マウス致死モデルは、*in vivo* 評価系モデルとしては最も汎用されている試験系であり、臨床における薬剤の効果を推定するモデルとしても利用されている。そこで、ペラミビル水和物の *in vivo* における有効性について、100%致死量のウイルスを鼻腔内接種したマウス致死モデルを用いて検討した。それぞれのウイルス株感染マウス致死モデルにおける治療効果は、生存率を指標とした群間比較を行い、その有意差検定を実施した。また、ED₅₀ として、50%の生存率を得るために必要な一日あたりの投与量をロジスティック回帰分析により推定した。

2.6.2.2.3.1 A 型ウイルス感染マウス致死モデルにおける治療効果

添付資料 4.2.1.1-12, 4.2.1.1-13, 4.2.1.1-14, 4.2.1.1-15
概要表 2.6.3.2.3.1

季節性 A 型インフルエンザウイルスと同じ亜型である A/WS/33 株 (H1N1 亜型)、A/PR/8/34 株 (H1N1 亜型)、A/Kumamoto/Y5/67 株 (H2N2 亜型) 又は A/Victoria/3/75 株 (H3N2 亜型) を感染させたマウス致死モデルにおけるペラミビル水和物の治療効果を評価した。

いずれの株を感染させたマウスにおいても、ペラミビル水和物を単回静脈内投与すると、用量依存的にマウス生存率の増加が認められ、少なくとも 3 mg/kg 以上の用量で媒体投与群に対し有意な生存率の改善効果を示した (表 2.6.2.2-10, 表 2.6.2.2-11, 表 2.6.2.2-12 及び表 2.6.2.2-13)。一方、対照薬として用いたオセルタミビルリン酸塩は、10 mg/kg の用量で単回経口投与した場合には、生存率の有意な改善は認められなかったが、1 日 2 回 5 日間反復経口投与すると、用量依存的に生存率の増加が認められた。ペラミビル水和物の ED₅₀ 値が 0.4~1.5 mg/kg であったのに対し、オセルタミビルリン酸塩の ED₅₀ 値は 3.0~6.7 mg/kg/日であった。

以上より、H1N1, H2N2 及び H3N2 亜型の A 型インフルエンザウイルス感染マウス致死モデルにおいて、ペラミビル水和物は単回静脈内投与で、オセルタミビルリン酸塩の臨床使用時に

相当する用法 (1 日 2 回 5 日間反復経口投与) と同等以上の生存率改善効果を示すことが確認された。

表 2.6.2.2-10 A/WS/33 株 (H1N1 亜型) 感染マウス致死モデルにおけるペラミビル水和物の単回静脈内投与による治療効果

化合物 (投与) ^{a)}	用量 [mg/kg (/日)]	生存数 ^{b)} /総数	ED ₅₀ [mg/kg (/日)]
媒体 [0.5%メチルセルロース] (1 日 2 回 5 日間反復経口投与)	-	0/20	-
ペラミビル水和物 (単回静脈内投与)	0.3	0/10	1.5
	1	3/10	
	3	8/10 *	
	10	10/10 *	
オセルタミビルリン酸塩 (1 日 2 回 5 日間反復経口投与)	0.3	0/10	3.0
	1	0/10	
	3	5/10 *	
	10	10/10 *	
オセルタミビルリン酸塩 (単回経口投与)	10	2/10	>10

A/WS/33 株の接種量 : 5×10^3 TCID₅₀/マウス.

ペラミビルの IC₅₀ 値 : 0.31 nmol/L.

オセルタミビルカルボン酸の IC₅₀ 値 : 0.98 nmol/L.

a) 接種 48 時間後から投与開始.

b) 接種 14 日目のマウス生存数.

* : P<0.05 (媒体投与群との Fisher's exact test による比較).

表 2.6.2.2-11 A/PR/8/34 株 (H1N1 亜型) 感染マウス致死モデルにおけるペラミビル水和物の単回静脈内投与による治療効果

化合物 (投与) ^{a)}	用量 [mg/kg (/日)]	生存数 ^{b)} /総数	ED ₅₀ [mg/kg (/日)]
媒体 [0.5%メチルセルロース] (1 日 2 回 5 日間反復経口投与)	-	0/20	-
ペラミビル水和物 (単回静脈内投与)	0.1	0/10	0.4
	0.3	4/10 *	
	1	8/10 *,#	
	3	10/10 *,#	
	10	10/10 *,†	
オセルタミビルリン酸塩 (1 日 2 回 5 日間反復経口投与)	0.3	0/9	6.7
	1	2/10	
	3	3/10 *	
	10	6/10 *	
	30	8/10 *	
オセルタミビルリン酸塩 (単回経口投与)	10	1/10	>30
	30	1/10	

A/PR/8/34 株の接種量 : 4×10^2 TCID₅₀/マウス.

ペラミビルの IC₅₀ 値 : 0.503 nmol/L.

オセルタミビルカルボン酸の IC₅₀ 値 1.40 nmol/L.

a) 接種直後から投与開始.

b) 接種 14 日目のマウス生存数.

* : P<0.05 (媒体投与群との Fisher's exact test による比較).

: P<0.05 (同じ用量におけるオセルタミビルリン酸塩反復投与群との Fisher's exact test による比較).

† : P<0.05 (同じ用量におけるオセルタミビルリン酸塩単回投与群との Fisher's exact test による比較).

表 2.6.2.2-12 A/Kumamoto/Y5/67 株 (H2N2 亜型) 感染マウス致死モデルにおけるペラミビル水和物の単回静脈内投与による治療効果

化合物 (投与) ^{a)}	用量 [mg/kg (/日)]	生存数 ^{b)} /総数	ED ₅₀ [mg/kg (/日)]
媒体 [0.5%メチルセルロース] (1日2回5日間反復経口投与)	-	0/20	-
ペラミビル水和物 (単回静脈内投与)	0.1	0/10	0.9
	0.3	0/10	
	1	6/10 ^{*,#}	
	3	10/10 ^{*,#}	
	10	10/10 ^{*,†}	
オセルタミビルリン酸塩 (1日2回5日間反復経口投与)	0.3	0/10	3.4
	1	0/10	
	3	4/10 [*]	
	10	10/10 [*]	
	30	10/10 [*]	
オセルタミビルリン酸塩 (単回経口投与)	10	0/10	>30
	30	1/10	

A/Kumamoto/Y5/67 株の接種量：2.5 × 10² TCID₅₀/マウス.

ペラミビルの IC₅₀ 値：1.39 nmol/L. オセルタミビルカルボン酸の IC₅₀ 値：0.822 nmol/L

a) 接種直後から投与開始. b) 接種 14 日目のマウス生存数.

* : P<0.05 (媒体投与群との Fisher's exact test による比較).

: P<0.05 (同じ用量におけるオセルタミビルリン酸塩反復投与群との Fisher's exact test による比較).

† : P<0.05 (同じ用量におけるオセルタミビルリン酸塩単回投与群との Fisher's exact test による比較).

表 2.6.2.2-13 A/Victoria/3/75 株 (H3N2 亜型) 感染マウス致死モデルにおけるペラミビル水和物の単回静脈内投与による治療効果

化合物 (投与) ^{a)}	用量 [mg/kg (/日)]	生存数 ^{b)} /総数	ED ₅₀ [mg/kg (/日)]
媒体 [0.5%メチルセルロース] (1日2回5日間反復経口投与)	-	0/20	-
ペラミビル水和物 (単回静脈内投与)	0.1	0/10	0.6
	0.3	2/10	
	1	8/10 ^{*,#}	
	3	9/10 [*]	
	10	10/10 ^{*,†}	
オセルタミビルリン酸塩 (1日2回5日間反復経口投与)	0.3	0/10	4.3
	1	0/10	
	3	5/10 [*]	
	10	7/10 [*]	
	30	10/10 [*]	
オセルタミビルリン酸塩 (単回経口投与)	10	0/10	>30
	30	3/10 [*]	

A/Victoria/3/75 株の接種量：7.5 × 10² TCID₅₀/マウス.

ペラミビルの IC₅₀ 値：0.98 nmol/L. オセルタミビルカルボン酸の IC₅₀ 値：0.66 nmol/L.

a) 接種直後から投与開始. b) 接種 14 日目のマウス生存数.

* : P<0.05 (媒体投与群との Fisher's exact test による比較).

: P<0.05 (同じ用量におけるオセルタミビルリン酸塩反復投与群との Fisher's exact test による比較).

† : P<0.05 (同じ用量におけるオセルタミビルリン酸塩単回投与群との Fisher's exact test による比較).

2.6.2.2.3.2 B 型ウイルス感染マウス致死モデルにおける治療効果

添付資料 4.2.1.1-16, 4.2.1.1-17

概要表 2.6.3.2.3.2

B/Maryland/1/59 株又は B/Lee/40 株感染マウス致死モデルにおけるペラミビル水和物の治療効果を検討した。

ペラミビル水和物を B 型ウイルス感染マウスに単回静脈内投与すると、用量依存的にマウス生存率の増加が認められ、0.3 又は 1.0 mg/kg 以上で媒体投与群に対し有意な改善を示した (表 2.6.2.2-14 及び表 2.6.2.2-15)。一方、オセルタミビルリン酸塩は、10 又は 30 mg/kg の用量で単回経口投与した場合には、生存率の有意な改善は認められなかったが、1 日 2 回 5 日間反復経口投与すると、用量依存的に生存率の増加が認められ、1 又は 10 mg/kg/日以上での投与群で生存率の有意な改善が認められた。ペラミビル水和物の ED₅₀ 値が 0.1~1.0 mg/kg であったのに対し、オセルタミビルリン酸塩の ED₅₀ 値は 1.7~7.8 mg/kg/日であった。

以上より、A 型感染マウス致死モデルと同様に、B 型感染マウス致死モデルにおいても、ペラミビル水和物は単回静脈内投与で、オセルタミビルリン酸塩の臨床使用時に相当する用法 (1 日 2 回 5 日間反復経口投与) と同等以上の生存率改善効果を示すことが確認された。

表 2.6.2.2-14 B/Maryland/1/59 株感染マウス致死モデルにおけるペラミビル水和物の単回静脈内投与による治療効果

化合物 (投与) ^{a)}	用量 [mg/kg (/日)]	生存数 ^{b)} /総数	ED ₅₀ [mg/kg (/日)]
媒体 [0.5%メチルセルロース] (1 日 2 回 5 日間反復経口投与)	-	0/20	-
ペラミビル水和物 (単回静脈内投与)	0.03	1/10	0.1
	0.1	2/10	
	0.3	9/10 * [#]	
	1	10/10 * [#]	
	3	10/10 *	
	10	10/10 * [†]	
オセルタミビルリン酸塩 (1 日 2 回 5 日間反復経口投与)	0.3	0/10	1.7
	1	4/10 *	
	3	6/10 *	
	10	10/10 *	
オセルタミビルリン酸塩 (単回経口投与)	10	2/10	>10

B/Maryland/1/59 株の接種量 : 2.5×10^2 TCID₅₀/マウス。

ペラミビルの IC₅₀ 値 : 1.92 nmol/L。

オセルタミビルカルボン酸の IC₅₀ 値 : 3.29 nmol/L。

a) 接種直後から投与開始。

b) 接種 14 日目のマウス生存数。

* : P<0.05 (媒体投与群との Fisher's exact test による比較)。

: P<0.05 (同じ用量におけるオセルタミビルリン酸塩反復投与群との Fisher's exact test による比較)。

† : P<0.05 (同じ用量におけるオセルタミビルリン酸塩単回投与群との Fisher's exact test による比較)。

表 2.6.2.2-15 B/Lee/40 株感染マウス致死モデルにおけるペラミビル水和物の単回静脈内投与による治療効果

化合物 (投与) ^{a)}	用量 [mg/kg (/日)]	生存数 ^{b)} /総数	ED ₅₀ [mg/kg (/日)]
媒体 [0.5%メチルセルロース] (1日2回5日間反復経口投与)	-	0/20	-
ペラミビル水和物 (単回静脈内投与)	0.1	0/10	1.0
	0.3	0/10	
	1	5/10 ^{*,#}	
	3	10/10 ^{*,#}	
	10	10/10 ^{*,#,†}	
オセルタミビルリン酸塩 (1日2回5日間反復経口投与)	0.3	0/10	7.8
	1	0/10	
	3	2/10	
	10	5/10 [*]	
	30	10/10 [*]	
オセルタミビルリン酸塩 (単回経口投与)	10	0/10	>30
	30	0/10	

B/Lee/40 株の接種量：4 × 10² TCID₅₀/マウス.

ペラミビルの IC₅₀ 値：0.40 nmol/L.

オセルタミビルカルボン酸の IC₅₀ 値：1.47 nmol/L.

a) 接種直後から投与開始.

b) 接種 14 日目のマウス生存数.

* : P<0.05 (媒体投与群との Fisher's exact test による比較).

: P<0.05 (同じ用量におけるオセルタミビルリン酸塩反復投与群との Fisher's exact test による比較).

† : P<0.05 (同じ用量におけるオセルタミビルリン酸塩単回投与群との Fisher's exact test による比較).

2.6.2.2.3.3 A 型ウイルス感染マウス致死モデルにおける Therapeutic time window の検討

添付資料 4.2.1.1-18

概要表 2.6.3.2.3.3

インフルエンザウイルス感染症に対する NA 阻害剤による治療は、症状発現から限られた時間内でのみ有効であるとされ、症状発現から出来るだけ早期の治療が必要とされている⁹⁾。このことから、症状発現から有効性を示す薬剤投与までの時間、いわゆる Therapeutic time window が長いほど臨床において有用な薬剤であると考えられる。そこで、インフルエンザ感染マウス致死モデルにおいて示されたペラミビル水和物による *in vivo* 治療効果を、Therapeutic time window の観点から検討した。100%致死ウイルス量の A/WS/33 株 (H1N1 亜型) を接種したマウスに対して、接種 24, 48, 60, 72, 84 及び 96 時間後に、ペラミビル水和物を 10 mg/kg の用量で単回静脈内投与又はオセルタミビルリン酸塩を 10 mg/kg/日の用量で 1 日 2 回 5 日間経口投与して、治療効果を比較した。

ペラミビル水和物を接種 72 時間後までに投与した場合、マウス生存率が有意に改善した (表 2.6.2.2-16)。一方、オセルタミビルリン酸塩は接種 60 時間後まではマウス生存率を有意に改善したものの、72 時間後では全例のマウスが死亡した。

以上の結果から、ペラミビル水和物はオセルタミビルリン酸塩よりも Therapeutic time window が広いことが示唆された。

表 2.6.2.2-16 A/WS/33 株感染マウス致死モデルにおける治療効果に対するペラミビル水和物投与開始時期の影響

化合物 (投与)	接種後投与開始時間	用量 (mg/kg)	生存数 ^{a)} /総数
媒体 [0.5%メチルセルロース] (1 日 2 回 5 日間反復経口投与)	24	-	0/10
ペラミビル水和物 (単回静脈内投与)	24	10	10/10 *
	48	10	10/10 *
	60	10	10/10 *
	72	10	6/10 *. [#]
	84	10	0/10
オセルタミビルリン酸塩 (1 日 2 回 5 日間反復経口投与)	96	10	1/10
	24	10	10/10 *
	48	10	9/10 *
	60	10	9/10 *
	72	10	0/10
	84	10	0/10
	96	10	0/10

A/WS/33 株の接種量： 5×10^3 TCID₅₀/マウス。

ペラミビルの IC₅₀ 値：0.31 nmol/L。

オセルタミビルカルボン酸の IC₅₀ 値：0.98 nmol/L。

a) 接種 14 日目のマウス生存数。

*：P<0.05 (媒体投与群との Fisher's exact test による比較)。

#：P<0.05 (同投与開始時間におけるオセルタミビルリン酸塩投与群との Fisher's exact test による比較)。

2.6.2.2.3.4 A 型インフルエンザウイルス感染マウス致死モデルの肺内ウイルスに対する増殖抑制効果

添付資料 4.2.1.1-19

概要表 2.6.3.2.3.4

ペラミビル水和物が単回静脈内投与により *in vivo* 治療効果を示す要因を、インフルエンザウイルス感染マウス致死モデルの肺内ウイルス力価推移から検討した。

100%致死ウイルス量の A/Victoria/3/75 株 (H3N2 亜型) を接種したマウスにペラミビル水和物を、接種直後に 1~30 mg/kg の用量で単回静脈内投与し、24 時間おきに 4 日間、感染マウスの肺内ウイルス力価を測定した。また、同一感染投薬条件にてウイルス感染 14 日後の生存率を求め、肺内ウイルス力価推移と生存率との関連性を検討した。薬効を示す活性体として比較するために、対照薬にはオセルタミビルカルボン酸を用い、ペラミビル水和物と同様に、1~30 mg/kg の用量で単回静脈内投与した。

ペラミビル水和物又はオセルタミビルカルボン酸を単回静脈内投与すると、媒体投与群に比べて用量依存的に感染マウスの肺内ウイルス力価が低下した (図 2.6.2.2-1)。同一用量の比較において、ペラミビル水和物の投与群はオセルタミビルカルボン酸投与群よりも全例においてウイルス力価の有意な低下が認められた。また、投与後 3 日目以降のウイルス力価は、ペラミビル水和物投与群ではいずれの投与量においても概ね 10⁷ TCID₅₀/mL 以下であったが、オセルタミビルカルボン酸投与群ではいずれの投与量においても 10⁷ TCID₅₀/mL を越えていた。

生存率を比較した場合 (表 2.6.2.2-17)、オセルタミビルカルボン酸ではいずれの投与量にお

いても媒体投与群に比べ有意な致死抑制効果は認められなかったのに対し、ペラミビル水和物の場合は1 mg/kg 投与群においても有意な致死抑制効果が確認された。この試験系においては、投与数日間の肺内ウイルス力価が 10^7 TCID₅₀/mL を超えなければマウスは生存するものと考えられる。

このように、ペラミビル及びオセルタミビルカルボン酸は、試験に用いたウイルスに対して同等の *in vitro* NA 活性阻害作用 (IC₅₀ 値：それぞれ 0.98 及び 0.66 nmol/L) を示すが、肺内ウイルスの増殖抑制効果には顕著な差があることが示された。

したがって、ペラミビル水和物がウイルス感染マウス致死モデルにおいて単回静脈内投与で治療効果を示す要因の一つとして、ペラミビル水和物が、肺におけるウイルス増殖をウイルス感染初期から数日間抑制することが考えられる。

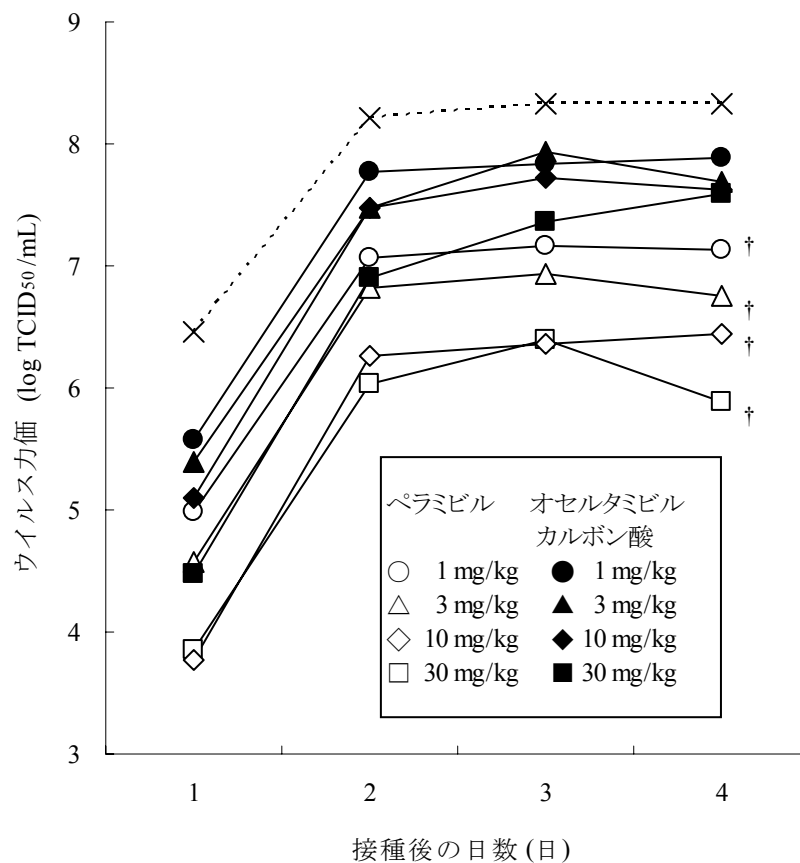


図 2.6.2.2-1 A/Victoria/3/75 株 (H3N2 亜型) 感染マウス致死モデルにおけるペラミビル水和物単回静脈内投与後の肺内ウイルス力価推移

グラフのポイントは3例のマウスの肺ウイルス力価の平均値。

グラフ中の破線は媒体投与群のウイルス力価推移を表す。

A/Victoria/3/75 株の接種量： 7.5×10^2 TCID₅₀/マウス。

ペラミビルの IC₅₀ 値：0.98 nmol/L。

オセルタミビルカルボン酸の IC₅₀ 値：0.66 nmol/L。

†: P<0.01 (同一投与量のオセルタミビルカルボン酸投与群との比較。

測定日と投与量を説明変数とした二元配置分散分析)

表 2.6.2.2-17 A/Victoria/3/75 株 (H3N2 亜型) 感染マウス致死モデルにおけるペラミビル水和物の単回静脈内投与による治療効果

化合物 ^{a)}	用量 (mg/kg)	生存数 ^{b)} /総数
媒体 [生理食塩水]	-	0/20
ペラミビル水和物	1	6/10 ^{*,#}
	3	9/10 ^{*,#}
	10	10/10 ^{*,#}
	30	10/10 ^{*,#}
オセルタミビルカルボン酸	1	0/10
	3	0/10
	10	0/10
	30	1/10

A/Victoria/3/75 株 (H3N2 亜型) の接種量: 7.5×10^2 TCID₅₀/マウス.

ペラミビルの IC₅₀ 値: 0.98 nmol/L.

オセルタミビルカルボン酸の IC₅₀ 値: 0.66 nmol/L.

a) 接種直後より投与開始. b) 接種 14 日目のマウス生存数

*: $P < 0.05$ (媒体投与群との Fisher's exact test による比較).

#: $P < 0.05$ (同じ用量におけるオセルタミビルカルボン酸投与群との Fisher's exact test による比較).

2.6.2.2.3.5 ペラミビルの NA からの解離速度

添付資料 4.2.1.1-20, 参考資料 4.2.1.1-31

概要表 2.6.3.2.3.5

インフルエンザウイルス感染マウス致死モデルにおいて、ペラミビル水和物の単回静脈内投与により、肺のウイルス増殖がウイルス感染初期から数日間抑制される要因を探るため、ペラミビルが NA に結合した後の、NA からの解離速度に関して検討した。

ペラミビルと N9 型精製 NA を混合して複合体を形成させた後、カラムで抽出した NA-ペラミビル複合体の NA 活性の回復状況を経時的な基質の分解を指標として測定することで、ペラミビルと NA との解離速度を評価した。対照薬としてオセルタミビルカルボン酸を用いた。

NA 単独では、基質添加後 1 時間後に、ほぼ 100%の活性が認められるのに対し、ペラミビルと複合体を形成させた NA では酵素活性の回復が遅く、基質添加 4 時間後においても、NA 単独の 10%以下の回復に留まった (図 2.6.2.2-2)。これに対し、オセルタミビルカルボン酸と複合体を形成させた NA では、基質添加により経時的に NA 活性は回復を示し、基質添加 4 時間後には、NA 単独のほぼ 80%の活性回復が認められた。

また、上記と同様の検討をより長時間にわたって実施した結果、ペラミビルと複合体を形成させた NA の活性回復は基質添加後 24 時間でも NA 単独の 30%程度にとどまった (図 2.6.2.2-3)。これに対し、オセルタミビルカルボン酸と複合体を形成させた NA では、基質添加 24 時間後には NA 単独の約 94%の活性回復が認められた。

これらの結果から、ペラミビルは NA 酵素に結合した後、容易に解離することなく、オセルタミビルカルボン酸に比べて、より長時間にわたって NA 活性を阻害する可能性が示された。したがって、ペラミビル水和物が単回静脈内投与によりオセルタミビルカルボン酸に比べ感染マウス肺内ウイルス増殖を強く阻害する要因の一つとして、ペラミビルとオセルタミビルカル

ボン酸で NA との解離速度が大きく異なっていることが考えられる。

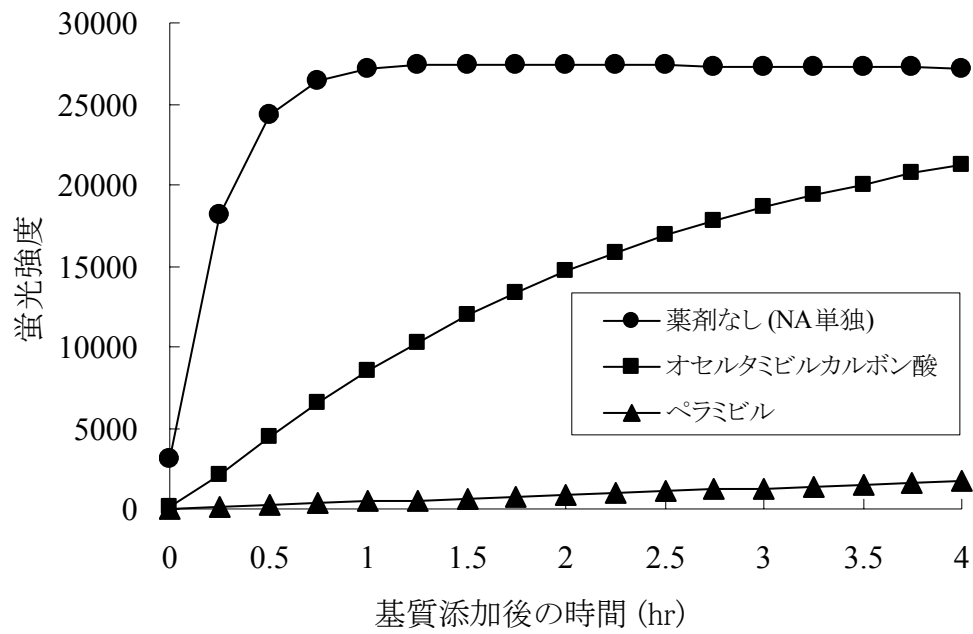


図 2.6.2.2-2 NA 阻害剤との複合体形成後の NA 活性の回復 (基質添加 4 時間後まで)
独立した 3 回の実験結果より平均値を算出. 1 回の実験は 2 重測定で実施.

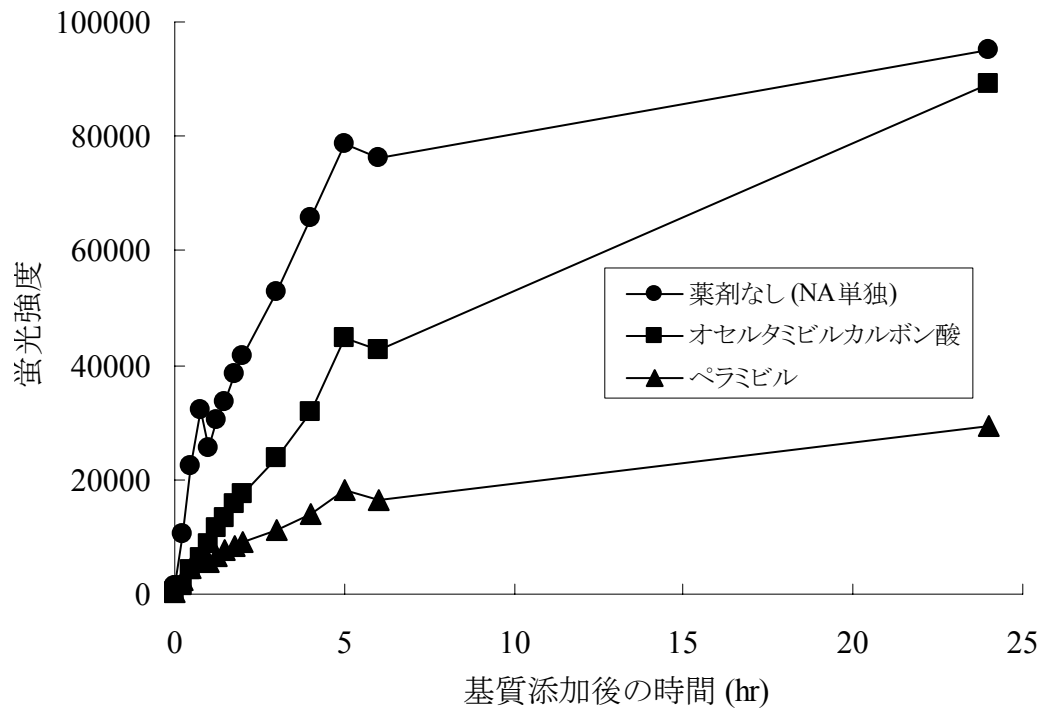


図 2.6.2.2-3 NA 阻害剤との複合体形成後の NA 活性の回復 (基質添加 24 時間後まで)
2 重測定で実施した 1 回の実験結果.

2.6.2.2.3.6 マウス治療効果に影響を与える薬物動態パラメータの解析

添付資料 4.2.2.2-06, 4.2.1.1-21, 4.2.1.1-22

概要表 2.6.5.3.6, 2.6.3.2.3.6

インフルエンザウイルス感染マウス致死モデルにおけるペラミビル水和物単回静脈内投与による生存率改善効果とマウス血漿中濃度推移との関係を明らかにするため、次の検討を実施した。

ペラミビル水和物の総投与量を 6 パターン (0.25, 0.5, 1, 2, 4 又は 8 mg/kg), 投与スケジュールを図 2.6.2.2-4 に示すように 3 パターン [ウイルス接種後 48 時間に単回投与, 6 時間おき (48 及び 54 時間) に 2 分割投与又は 3 時間おき (48, 51, 54 及び 57 時間) に 4 分割投与] に分け, 合計 18 パターンの方法で, A/WS/33 株感染マウスに投与し, 薬力学的効果であるマウス生存率を比較した。別途, 感染マウスを用いて測定, 算出した薬物動態 (PK) パラメータを基に, 効果に相関する PK パラメータを解析した。

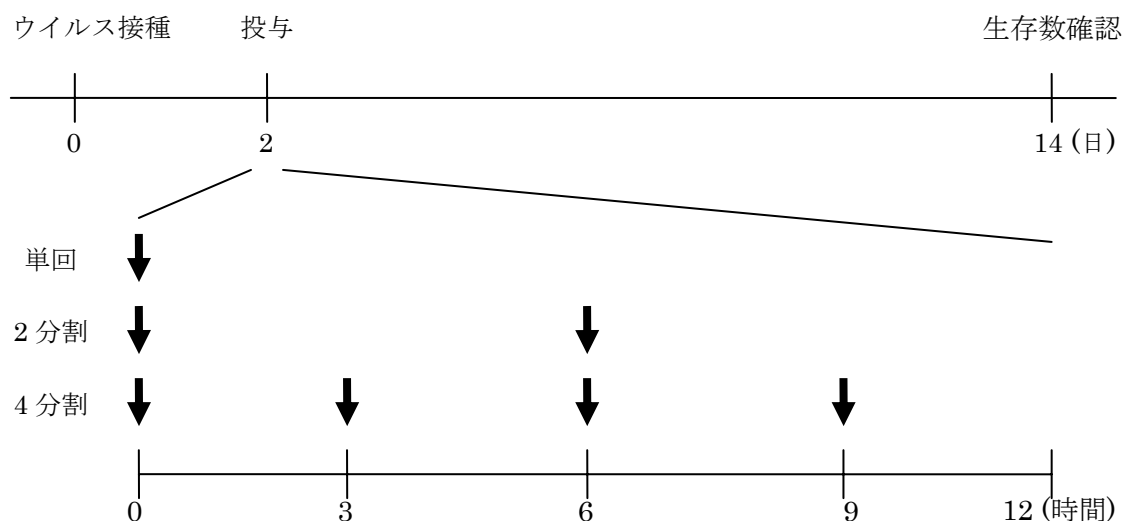


図 2.6.2.2-4 ペラミビル水和物投与デザイン

投与タイミングを矢印で示す。

その結果、血漿中ペラミビルの血漿中濃度－時間曲線下面積 (AUC) はほぼ用量に比例して増加し (表 2.6.2.2-18), いずれの投与スケジュールにおいても用量依存的にマウス生存率の改善が認められた (表 2.6.2.2-19)。今回の試験では, 9 時間の間に単回から 4 回まで投与回数を変化させて薬効に及ぼす影響を観察することにより, 1 回当たりの投与量を増やすことと, 投与回数を増やして総曝露量を増やすことの, 薬効向上に対する寄与を検討した。その結果, 1 回当たりの投与量が同一でも投与回数を増やすことにより薬効が向上したこと, 投与回数とは無関係に総投与量が 2 mg/kg 以上であればほぼ全例のマウスが生存したことから, 今回の投与条件では, 総投与量が薬効に寄与する程度が高いことが示された。

表 2.6.2.2-18 A/WS/33 株感染マウス致死モデルにおけるペラミビル単回静脈内投与後の血漿中
ペラミビルの PK パラメータ

Dose (mg/kg)	C ₀ (μg/mL)	AUC _{inf} (μg·hr/mL)	t _{1/2} (hr)	CL _{tot} (mL/hr/kg)	Vdss (mL/kg)
0.4	2.11	0.516	3.32 ^{a)}	775	454
2	9.07	2.51	2.42 ^{a)}	798	456
10	60.5	14.5	5.13 ^{b)}	688	435

PK パラメータは 4 例の平均血漿中濃度を用いて算出。

a) t_{1/2} (4-6 hr)・

b) t_{1/2} (6-24 hr)・

AUC_{inf}：時間 0 から無限大時間までの血漿中濃度－時間曲線下面積。

t_{1/2}：消失半減期。

CL_{tot}：全身クリアランス。

Vdss：定常状態における分布容積。

表 2.6.2.2-19 A/WS/33 株感染マウス致死モデルにおけるペラミビル水和物単回，2 分割又は 4 分
割静脈内投与の薬力学的効果

化合物	投与回数 ^{a)} (投与間隔)	用量 (mg/kg) [1 回の用量 (mg/kg)]	生存数 ^{b)} /総数
ペラミビル 水和物	1 回	0.25	0/10
		0.5	1/10
		1	4/10
		2	9/10
		4	10/10
		8	10/10
	2 回 (6 時間)	0.25 [0.125]	3/10
		0.5 [0.25]	2/10
		1 [0.5]	6/10
		2 [1]	10/10
		4 [2]	10/10
		8 [4]	10/10
	4 回 (3 時間)	0.25 [0.0625]	1/10
		0.5 [0.125]	2/10
		1 [0.25]	5/10
		2 [0.5]	10/10
		4 [1]	10/10
		8 [2]	10/10
媒体 [生理食塩液]	4 回 (3 時間)	0	0/20

A/WS/33 株の接種量：5 × 10³ TCID₅₀/マウス。

ペラミビルの IC₅₀ 値：0.31 nmol/L。

a) 接種 48 時間後から投与開始。

b) 接種 14 日目のマウス生存数。

更に，AUC，最高血漿中濃度 [C_{max}：本試験では時間 0 における外挿血漿中濃度 (C₀) に相当する] 又は A/WS/33 株の NA に対する 95% 阻害濃度を上回る濃度を維持する時間 (T>IC₉₅) を横軸に，マウス生存率を縦軸にプロットし，ロジスティック曲線を当てはめた (図 2.6.2.2-5)。その結果，ロジスティック曲線への当てはまりの度合いを表す赤池情報量規準¹¹⁾ は，AUC，C_{max} 及び T>IC₉₅ に対してそれぞれ 113.750，150.643 及び 123.684 であり，AUC がマウス生存

率改善効果に最も相関するパラメータであることが示唆された。ただし、 $T>IC_{95}$ や C_{max} のマウス生存率改善効果への相関を否定する結果ではなかった。なお、この試験において 95% のマウスが生存するために必要な AUC, C_{max} 及び $T>IC_{95}$ は、それぞれ $2.9 \mu\text{g}\cdot\text{hr/mL}$, $7.9 \mu\text{g/mL}$ 及び 23 hr と算出された。

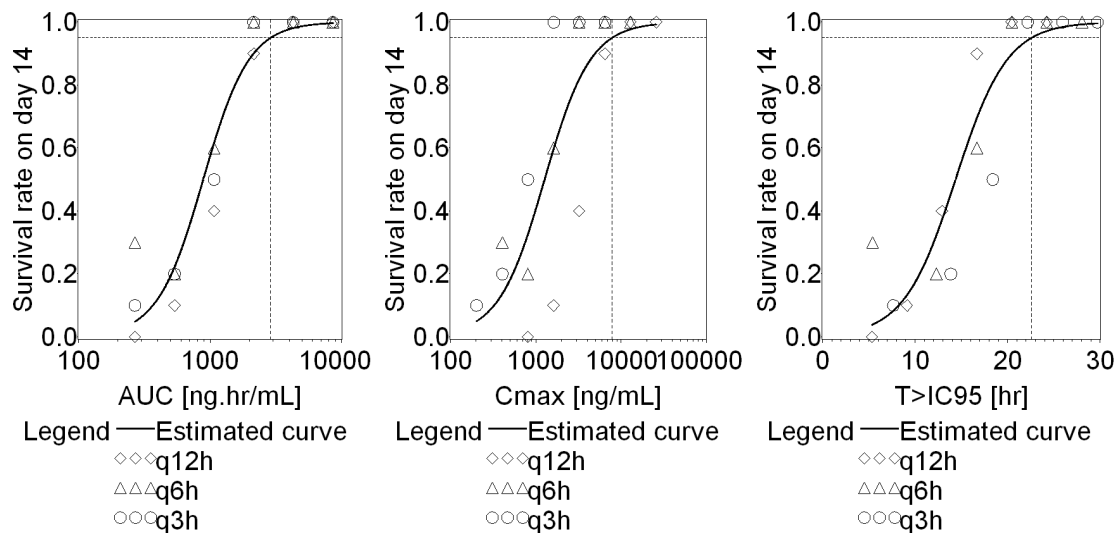


図 2.6.2.2-5 A/WS/33 株感染マウス致死モデルにおけるペラミビル水和物静脈内投与時の AUC, C_{max} 又は $T>IC_{95}$ と生存率の関係

q12h : 単回投与.

q6h : 2 分割投与.

q3h : 4 分割投与.

2.6.2.2.4 オセルタミビルリン酸塩耐性ウイルスに対する効果

日本では、2007～2008 年のインフルエンザシーズンに分離された A 型 (H1N1 亜型) のうち、オセルタミビルリン酸塩に耐性を示す H274Y 変異 NA の発生率が増加傾向を示し、2008～2009 年のシーズンにおいては同亜型のほぼ 100% の NA が、H274Y 変異を持つことが明らかとなっている¹²⁾。日本以外の各国の各地域においても同様の傾向が認められており、社会的に大きな問題となっている。そこで、H274Y 変異を有するウイルスに対するペラミビルの有効性を、*in vitro* NA 阻害試験及び *in vivo* 感染マウス致死モデルにおける生存率改善効果の両面から検討した。また、H274Y 変異以外にも、オセルタミビルリン酸塩やザナミビル、又は両薬剤に耐性を示す変異 NA が報告されている^{13,14,15)}。それらは A 型 H1N1 亜型、H3N2 亜型、B 型それぞれについて *in vitro* の耐性ウイルス分離試験や薬剤治療中の患者から見出されている。今後どの変異ウイルスも新たに流行する可能性があるため、これら薬剤耐性変異 NA に対するペラミビルの阻害作用も検討した。

2.6.2.2.4.1 臨床分離株由来オセルタミビルリン酸塩耐性 H274Y 変異 NA に対する阻害効果

添付資料 4.2.1.1-23

概要表 2.6.3.2.4.1

H274Y 変異 NA に対するペラミビルの阻害作用について、2005 年から 2008 年にかけてインフルエンザウイルス感染患者から分離されたウイルスを対象とし、蛍光基質 MUNANA を用いて評価した。変異 NA に対する IC₅₀ 値を野生型 NA に対する IC₅₀ 値で除したものを耐性上昇度として耐性の指標に用いた。

H274Y 変異 NA に対するペラミビル及びオセルタミビルカルボン酸の IC₅₀ 値は、それぞれ 19.9～88.9 nmol/L 及び 112～378 nmol/L であり、野生型 NA に対する IC₅₀ 値 (数 nmol/L) から上昇したが、ザナミビルの IC₅₀ 値は変異の有無で顕著な差は生じなかった (表 2.6.2.2-20)。本試験で使用した株における H274Y 変異による平均耐性上昇度は、ペラミビルで 37 倍、オセルタミビルカルボン酸で 118 倍であった。

表 2.6.2.2-20 オセルタミビルリン酸塩感受性及び耐性株に対するペラミビルの阻害活性

型	亜型	株名	NA 変異	IC ₅₀ (nmol/L)					
				ペラミビル	オセルタミビル カルボン酸		ザナミビル		
A	H1N1	A/Yokohama/55/2005	-	0.597		1.33		1.37	
A	H1N1	A/Yokohama/75/2007	-	0.753	平均値	1.46	平均値	1.91	平均値
A	H1N1	A/Yokohama/92/2007	-	1.56	0.968	3.89	1.91	9.48	4.01
A	H1N1	A/Yokohama/15/2008	-	0.600		1.11		1.69	
A	H1N1	A/Yokohama/52/2008	-	1.33		1.77		5.60	
A	H1N1	A/Yokohama/67/2006	H274Y	19.9		292		2.11	
A	H1N1	A/Yokohama/88/2006	H274Y	23.4		316		1.92	
A	H1N1	A/Yokohama/91/2007	H274Y	21.9		139		1.26	
A	H1N1	A/Yokohama/22/2008	H274Y	22.7		192		1.72	
A	H1N1	A/Yokohama/35/2008	H274Y	24.3	平均値	187	平均値	1.41	平均値
A	H1N1	A/Yokohama/30/2008	H274Y	27.5	35.4	195	225	1.40	1.73
A	H1N1	A/Yokohama/31/2008	H274Y	22.7		184		1.60	
A	H1N1	A/Yokohama/34/2008	H274Y	21.3		160		1.25	
A	H1N1	A/Yokohama/77/2008	H274Y	88.9		378		1.89	
A	H1N1	A/Yokohama/78/2008	H274Y	71.5		325		1.84	
A	H1N1	A/Yokohama/79/2008	H274Y	45.7		112		2.63	

独立した 3 回の実験結果より平均 IC₅₀ 値を算出。

2.6.2.2.4.2 オセルタミビルリン酸塩耐性 H274Y 変異 NA を有する A 型ウイルス感染マウス致死モデルにおける治療効果

添付資料 4.2.1.1-24, 4.2.1.1-25
概要表 2.6.3.2.4.2

オセルタミビルリン酸塩に耐性を示す H274Y 変異 NA を持つ A 型 (H1N1 亜型) ウイルスに対して、ペラミビル水和物の *in vivo* 治療効果を検討した。

In vivo 治療効果検討に先立ち、NA に H274Y 変異をもつ組換えウイルスを作製し、*in vitro* の NA 阻害試験を実施した。

A/PR/8/34 株 (H1N1 亜型) 及び A/WSN/33 株 (H1N1 亜型) をベースとした H274Y 変異 NA に対するペラミビルの IC₅₀ 値は、それぞれ 21.5 及び 18.2 nmol/L であり、耐性上昇度は 30～39 倍であった (表 2.6.2.2-21)。一方、オセルタミビルカルボン酸の場合、どちらの株についても H274Y 変異導入による耐性上昇度は約 100 倍であった。

このうち、A/PR/8/34 株ベースの H274Y 変異ウイルスを用いて感染マウス致死モデルにおける治療効果を評価した。100%致死量の変異ウイルスをマウスに接種し、接種直後よりペラミビル水和物を 1～100 mg/kg の用量で単回静脈内投与、オセルタミビルリン酸塩を 1～100 mg/kg/日の用量で 1 日 2 回 5 日間反復経口投与した。それぞれの投薬群において ED₅₀ 値を推定し、生存率改善効果を比較した。

ペラミビル水和物は単回静脈内投与で用量依存的に生存率の改善を示し、3 mg/kg 以上の用量では媒体投与群に対して有意な生存率の改善が認められ、その ED₅₀ 値は 2.4 mg/kg であった (表 2.6.2.2-22)。一方、オセルタミビルリン酸塩の反復経口投与では 30 mg/kg/日以上用量で媒体投与群に対して有意な生存率の改善が認められ、その ED₅₀ 値は 28.4 mg/kg/日であった。

以上の結果から、H274Y 変異 NA を有するウイルスを感染させたマウス致死モデルにおいて、ペラミビル水和物は単回投与で治療効果が得られ、薬効に必要な用量もオセルタミビルリン酸塩よりも低いことが示された。

表 2.6.2.2-21 H274Y 変異導入によるペラミビルの感受性の変化

組換えウイルス				ペラミビル		オセルタミビル カルボン酸		ザナミビル	
型	亜型	株名	NA 変異	IC ₅₀ (nmol/L)	FR	IC ₅₀ (nmol/L)	FR	IC ₅₀ (nmol/L)	FR
A	H1N1	A/PR/8/34	-	0.545	-	1.35	-	1.17	-
A	H1N1	A/PR/8/34	H274Y	21.5	39	150	111	1.65	1
A	H1N1	A/WSN/33	-	0.615	-	1.13	-	1.39	-
A	H1N1	A/WSN/33	H274Y	18.2	30	152	134	1.60	1

独立した 3 回の実験結果より平均 IC₅₀ 値を算出。

FR：耐性上昇度。

表 2.6.2.2-22 H274Y 変異 NA を有する A/PR/8/34 株感染マウス致死モデルにおけるペラミビル水和物の単回静脈内投与による治療効果

化合物 (投与) ^{a)}	用量 [mg/kg (/日)]	生存数 ^{b)} /総数	ED ₅₀ [mg/kg (/日)]
媒体 [0.5%メチルセルロース] (1日2回5日間反復経口投与)	-	0/20	-
ペラミビル水和物 (単回静脈内投与)	1	2/10	2.4
	3	7/10 ^{*,#}	
	10	8/10 ^{*,#}	
	30	9/10 [*]	
	100	10/10 [*]	
オセルタミビルリン酸塩 (1日2回5日間反復経口投与)	1	0/10	28.4
	3	0/10	
	10	0/10	
	30	5/9 [*]	
	100	9/9 [*]	

H274Y 変異 NA を有する A/PR/8/34 株の接種量：6.4 × 10⁵ TCID₅₀/マウス。

a) 接種直後から投与開始。

b) 接種 14 日目のマウス生存数。

* : P<0.05 (媒体投与群との Fisher's exact test による比較)。

: P<0.05 (同じ用量におけるオセルタミビルリン酸塩反復投与群との Fisher's exact test による比較)。

2.6.2.2.4.3 既存の NA 阻害剤耐性変異 NA に対するペラミビルの阻害効果

添付資料 4.2.1.1-26

概要表 2.6.3.2.4.3

オセルタミビルリン酸塩やザナミビル、又は両薬剤に耐性を示す NA の変異アミノ酸は、*in vitro* の耐性ウイルス分離試験や治療中の患者から、ウイルスの型や亜型によらず複数個所報告されている^{13,14,15)}。また、A 型 (H1N1 亜型) における H274Y 変異 NA を持つウイルスが現在世界的に蔓延していること¹²⁾ を考えると、薬剤耐性を獲得した別の変異 NA を持つウイルスが流行する可能性は否定できない。そこで、既存の NA 阻害剤に耐性を呈する変異 NA に対するペラミビルの阻害活性を測定した。

酵素源として NA をコードするプラスミドを用いて 293T 細胞に発現させた組換え NA たん白質を、基質として MUNANA を用いて評価した。

オセルタミビルカルボン酸又はザナミビルが耐性上昇を示したのに対し、ペラミビルが NA 阻害作用を維持している変異 NA は、N1 亜型の N294S、N2 亜型の E119V 及び N294S 並びに B 型の S250G であった (表 2.6.2.2-23)。

N1 亜型の N294S は、オセルタミビルカルボン酸に対して 28 倍の耐性上昇を示したが、ペラミビルに対しては約 6 倍の耐性上昇にとどまった。また、N2 亜型の E119V 及び N294S は、オセルタミビルカルボン酸に対してそれぞれ 73 及び 160 倍の耐性上昇を示したが、ペラミビルに対しては約 3 倍の上昇にとどまった。更に、B 型の S250G はザナミビルに対して 17 倍の耐性上昇を示したが、ペラミビルに対する感受性は全く変化を示さなかった。なお、3 剤いずれも 10 倍以上の耐性上昇を示す変異として、N2 亜型の E119G、E119A、E119D、D151V、D151A、D151N、D151G 及び R292K 並びに B 型の R152K、D198Y 及び R371K が確認された。

以上の結果より、N1 亜型の N294S、N2 亜型の E119V 及び N294S 並びに B 型の S250G 変異

NA のように、オセルタミビルカルボン酸又はザナミビルよりペラミビルの方が阻害作用の減弱程度の少ない変異 NA が存在することが確認された。

表 2.6.2.2-23 変異 NA に対するペラミビルの阻害作用

型	亜型	変異	ペラミビル		オセルタミビル カルボン酸		ザナミビル	
			IC ₅₀ (nmol/L)	FR	IC ₅₀ (nmol/L)	FR	IC ₅₀ (nmol/L)	FR
A	N1	-	0.28	1.0	1.3	1.0	1.0	1.0
A	N1	H274Y	17	61	180	140	0.76	0.76
A	N1	N294S	1.6	5.9	36	28	1.6	1.6
A	N2	-	0.82	1.0	0.50	1.0	2.8	1.0
A	N2	E119G	>1000	>1200	>1000	>2000	>1000	>350
A	N2	E119A	>1000	>1200	>1000	>2000	>1000	>350
A	N2	E119D	>1000	>1200	>1000	>2000	>1000	>350
A	N2	E119V	2.9	3.5	37	73	11	3.9
A	N2	D151V	>1000	>1200	340	680	>1000	>350
A	N2	D151A	81	100	31	62	>1000	>350
A	N2	D151N	120	150	100	210	840	300
A	N2	D151E	2.4	2.9	1.5	3.0	7.2	2.6
A	N2	D151G	73	89	34	69	960	340
A	N2	R292K	140	170	>1000	>2000	86	30
A	N2	N294S	2.5	3.0	78	160	16	5.6
B	-	-	3.5	1.0	21	1.0	12	1.0
B	-	R152K	>1000	>290	>1000	>49	460	40
B	-	D198N	9.3	2.7	69	3.3	34	2.9
B	-	D198Y	110	31	430	21	200	17
B	-	D198E	30	8.5	91	4.4	56	4.9
B	-	N221K	9.9	2.8	31	1.5	16	1.4
B	-	I222T	36	10	100	4.9	22	1.9
B	-	S250G	3.2	0.91	27	1.3	200	17
B	-	H274Y	82	24	52	2.5	6.0	0.52
B	-	R371K	310	89	>1000	>49	230	20
B	-	G402S	7.2	2.1	46	2.2	41	3.6

独立した 3 回の実験結果より平均 IC₅₀ 値を算出。

アミノ酸の位置はすべて N2 numbering による。

FR：耐性上昇度。

2.6.2.2.5 免疫抑制状態におけるインフルエンザウイルス感染に対する効果

添付資料 4.2.1.1-27

概要表 2.6.3.2.5

健常人はインフルエンザウイルスに対し、感染初期には自然免疫の非特異的防御機能により、後期にはウイルス抗原によって誘導される獲得免疫の特異的作用により、効率よくウイルスを排除する¹⁶⁾。ところが、がんや糖尿病などの慢性疾患患者は免疫機能が低下していることから、いわゆるインフルエンザのハイリスクグループとして認識されており、感染・発症した場合に重症化しやすいことが知られている¹⁷⁾。そこで、このような免疫能の低下しているハイリスクグループに対するペラミビル水和物の有効性について、免疫抑制状態を惹起したマウスを用いた感染致死モデルにより検討した。

シクロホスファミドを感染数日前から投与して好中球減少症を惹起したマウスに対して、100%致死ウイルス量の A/WS/33 株を接種し、接種 48 時間後からペラミビル水和物を 1~100 mg/kg の用量で単回静脈内投与又は 1~100 mg/kg/日の用量で 1 日 1 回 5 日間反復静脈内投与した。対照薬としてオセルタミビルリン酸塩を、1~100 mg/kg/日の用量で 1 日 2 回 5 日間反復経口投与した。また、免疫抑制効果の対照群として、免疫抑制処理していないマウスに対し、接種 48 時間後からペラミビル水和物を 0.1~10 mg/kg の用量で単回静脈内投与、オセルタミビルリン酸塩を 0.1~10 mg/kg/日の用量で 1 日 2 回 5 日間反復経口投与した。各条件下における治療効果を生存率で評価し、ED₅₀ 値を推定した。

免疫抑制処理していないマウスにウイルスを感染させた場合、ペラミビル水和物の単回静脈内投与及びオセルタミビルリン酸塩の 1 日 2 回 5 日間反復経口投与での ED₅₀ 値は、それぞれ 2.4 及び 2.8 mg/kg/日であり、生存率改善効果は薬剤間でほぼ同等であった (表 2.6.2.2-24)。一方、免疫抑制処理したマウスにウイルスを感染させた場合、ペラミビル水和物単回静脈内投与及びオセルタミビルリン酸塩 1 日 2 回 5 日間反復経口投与では、100 mg/kg 投与時に生存率の改善が認められる程度であったが、ペラミビル水和物を 1 日 1 回 5 日間反復静脈内投与すると、10 mg/kg/日から有意な生存率の改善が認められ、ED₅₀ 値は 6.8 mg/kg/日であった。

以上から、マウスがインフルエンザウイルス感染から回復するためには宿主免疫が関与している可能性が示された。また、ペラミビル水和物は免疫力が低下した宿主に対しても、反復静脈内投与することでインフルエンザ症状を回復させることが期待でき、その効果はオセルタミビルリン酸塩を上回ると考えられる。

表 2.6.2.2-24 免疫抑制処理した A/WS/33 株感染マウス致死モデルにおけるペラミビル水和物の
反復静脈内投与による治療効果

免疫抑制処理 ^{a)}	化合物 (投与)	用量 [mg/kg (/日)]	生存数 ^{b)} /総数	ED ₅₀ [mg/kg (/日)]
なし	媒体 [0.5%メチルセルロース] (1 日 2 回 5 日間反復経口投与)	-	0/20	-
	ペラミビル水和物 (単回静脈内投与)	0.1	0/10	2.4
		0.3	0/10	
		1	0/10	
		3	7/10 *	
		10	10/10 *	
	オセルタミビルリン酸塩 (1 日 2 回 5 日間反復経口投与)	0.1	0/10	2.8
		0.3	0/10	
		1	2/10	
		3	5/10 *	
		10	9/10 *	
あり	媒体 [0.5%メチルセルロース] (1 日 2 回 5 日間反復経口投与)	-	0/20	-
	ペラミビル水和物 (単回静脈内投与)	1	0/10	> 100
		3	0/10	
		10	0/10	
		30	0/10	
		100	4/10 *	
	ペラミビル水和物 (1 日 1 回 5 日間反復静脈内投与)	1	0/10	6.8
		3	1/9	
		10	8/10 *,#,†	
		30	9/10 *,#,†	
		100	10/10 *,#	
	オセルタミビルリン酸塩 (1 日 2 回 5 日間反復経口投与)	1	0/10	78.6
		3	0/10	
		10	0/10	
		30	0/10	
		100	7/10 *	

A/WS/33 株の接種量 : 2.0×10^4 TCID₅₀/マウス.

ペラミビルの IC₅₀ 値 : 0.31 nmol/L. オセルタミビルカルボン酸の IC₅₀ 値 : 0.98 nmol/L.

a) シクロホスファミド 50 mg/kg 腹腔内投与 (ウイルス感染 -1, 3 及び 7 日目) により処理.

b) 接種 21 日目のマウス生存数.

* : P<0.05 (媒体投与群との Fisher's exact test による比較).

: P<0.05 (同じ用量におけるペラミビル水和物単回投与群との Fisher's exact test による比較).

† : P<0.05 (同じ用量におけるオセルタミビルリン酸塩投与群との Fisher's exact test による比較).

2.6.2.2.6 高病原性鳥インフルエンザウイルスに対する効果

1997年に香港で、高病原性鳥インフルエンザウイルス (H5N1 亜型) に感染したヒトが死亡するケースが始めて報告され、その後もアジアを中心に鳥から直接感染したと考えられる感染例が散発的ではあるが継続的に発生し、すでに数百例の患者が世界保健機関に報告されている¹⁸⁾。また、別の地域では少数ではあるが、H7N3 亜型や H7N7 亜型のヒトへの感染例も報告されている¹⁹⁾。現時点では、このような高病原性鳥インフルエンザウイルスはヒトからヒトへの感染力が弱いと考えられているものの、ヒトからヒトへの感染力が強いインフルエンザウイルスに変異して流行する可能性も懸念されている。したがって、このような高病原性鳥インフルエンザウイルスに有効性を示す抗インフルエンザウイルス薬の必要性は非常に大きいと考えられる。そこで、ペラミビルの有効性を、*in vitro* の NA 活性阻害作用、*in vitro* のウイルス放出抑制作用及び *in vivo* 感染マウス致死モデルに対する治療効果により評価した。

2.6.2.2.6.1 高病原性鳥インフルエンザウイルス NA に対する阻害作用

添付資料 4.2.1.1-28

概要表 2.6.3.2.6.1

高病原性鳥インフルエンザウイルスに対するペラミビルの NA 活性阻害作用を、基質として Fetuin を用いた酵素活性測定法³⁾にて評価した。

ヒトでの感染死亡例が報告されている A/Hong Kong/483/97 株²⁰⁾を含めた 5 株の NA に対して、ペラミビルは 0.12~0.40 nmol/L の IC₅₀ 値を示した (表 2.6.2.2-25)。これに対して、オセルタミビルカルボン酸は 1.10~8.07 nmol/L、ザナミビルは 0.99~4.88 nmol/L の IC₅₀ 値であり、検討に用いたいずれの株についてもペラミビルの方が低濃度で阻害作用を示すことが確認された。

表 2.6.2.2-25 高病原性鳥インフルエンザウイルス NA に対するペラミビルの活性阻害作用

株名	亜型	IC ₅₀ (nmol/L)		
		ペラミビル	オセルタミビル カルボン酸	ザナミビル
A/Hong Kong/483/97	H5N1	0.23	5.00	1.38
A/chicken/Yamaguchi/7/04	H5N1	0.40	6.18	0.99
A/whooper swan/Mongolia/3/05	H5N1	0.39	8.07	1.77
A/chicken/Italy/99	H7N1	0.26	7.63	1.72
A/chicken/Netherlands/03	H7N7	0.12	1.10 ^{a)}	4.88

独立した 3 回の実験結果より平均 IC₅₀ 値を算出。

a) 2 回の実験の平均 IC₅₀ 値

2.6.2.2.6.2 高病原性鳥インフルエンザウイルス感染細胞からのウイルス放出に対する効果

添付資料 4.2.1.1-29

概要表 2.6.3.2.6.2

MDCK 細胞に高病原性鳥インフルエンザウイルスを接種し、ペラミビルの存在下又は非存在下で 2 日間培養して、培養上清を採取した。採取した培養上清を新たな MDCK 細胞に接種し、72 時間培養後の CPE を観察することにより、培養上清中のウイルス量を TCID₅₀ 値として算出した。また、対照群の 10% まで TCID₅₀ 値を減少させる薬物濃度を IC₉₀ とした。

ヒトでの感染死亡例が報告されている A/Hong Kong/483/97 株を含めた 5 株の NA に対して、ペラミビルは 1.0～7.5 nmol/L の IC₉₀ 値を示した (表 2.6.2.2-26)。これに対して、オセルタミビルカルボン酸は 1.8～54 nmol/L、ザナミビルは 2.5～37 nmol/L の IC₉₀ 値であった。検討に用いた 5 株中 4 株において、ペラミビルによるウイルス放出抑制作用が対照薬に比べ強いことが示された。

表 2.6.2.2-26 高病原性鳥インフルエンザウイルスに対するペラミビルの増殖抑制作用

株名	亜型	IC ₉₀ (nmol/L)		
		ペラミビル	オセルタミビル カルボン酸	ザナミビル
A/Hong Kong/483/97	H5N1	1.7	20	37
A/chicken/Yamaguchi/7/04	H5N1	1.0	5.2	2.5
A/whooper swan/Mongolia/3/05	H5N1	1.1	6.9	7.9
A/chicken/Italy/99	H7N1	7.5	54	31
A/chicken/Netherlands/03	H7N7	2.6	1.8	11

独立した 3 回の実験結果より平均 IC₉₀ 値を算出。

2.6.2.2.6.3 高病原性鳥インフルエンザウイルス A/Hong Kong/483/97 株 (H5N1 亜型) 感染マウス致死モデルにおける治療効果

添付資料 4.2.1.1-30

概要表 2.6.3.2.6.3

高病原性鳥インフルエンザウイルスは、季節性インフルエンザウイルスとは異なり、呼吸器のみならず、腸、脾臓、肝臓、腎臓といった複数の臓器に感染することにより高い致死率を示すことが報告されている²¹⁾。マウスへの感染においても、全身の臓器で増殖し、多臓器不全となって死亡することから、このマウスモデルはワクチンの評価に利用されている²²⁾。そこで、ヒトでの感染死亡例が報告されている高病原性鳥インフルエンザウイルス A/Hong Kong/483/97 株 (H5N1 亜型) に対するペラミビル水和物の治療効果を、マウス致死モデルを用いて評価した。なお、本試験のウイルス量は 50%鶏卵感染価 (EID₅₀) として算出した。

100%致死量のウイルスをマウスに接種した直後に、ペラミビル水和物を 10 又は 30 mg/kg の用量で単回静脈内投与した場合、媒体投与群に比べて生存率の有意な改善が認められた (表 2.6.2.2-27)。更に、ペラミビル水和物を 1 日 1 回 5 日間反復静脈内投与すると治療効果は増強し、10 mg/kg/日の用量では同用量投与のオセルタミビルリン酸塩及びザナミビルを有意に上回り、30 mg/kg/日の用量では全例のマウスが生存した。

以上の結果から、高病原性鳥インフルエンザウイルス感染マウス致死モデルに対して、ペラミビル水和物はオセルタミビルリン酸塩及びザナミビルよりも有効性が高いことが示唆された。

表 2.6.2.2-27 A/Hong Kong/483/97 株感染マウス致死モデルにおけるペラミビル水和物の単回及び反復静脈内投与による治療効果

化合物 (投与)	用量 [mg/kg (/日)]	生存数 ^{a)} /総数
媒体 [0.5%メチルセルロース] (1 日 2 回 5 日間反復経口投与)	-	0/20
ペラミビル水和物 (単回静脈内投与)	10 30	6/10 * 7/10 *
ペラミビル水和物 (1 日 1 回 5 日間反復静脈内投与)	10 30	9/10 *, ^{#,†} 10/10 *, [†]
オセルタミビルリン酸塩 (1 日 2 回 5 日間反復経口投与)	10 30	3/10 * 7/10 *
ザナミビル (1 日 2 回 5 日間反復静脈内投与)	10 30	1/10 5/10 *

A/Hong Kong/483/97 株の接種量：100 EID₅₀/マウス.

a) 接種 14 日目のマウス生存数.

* : P<0.05 (媒体投与群との Fisher's exact test による比較).

: P<0.05 (同じ用量におけるオセルタミビルリン酸塩投与群との Fisher's exact test による比較).

† : P<0.05 (同じ用量におけるザナミビル投与群との Fisher's exact test による比較).

2.6.2.3 副次的薬理試験

該当する試験なし

2.6.2.4 安全性薬理試験

概要表 2.6.3.4

ペラミビル水和物の安全性を薬理的観点から評価する目的で、ラット、モルモット及びサル (*in vivo* 試験) 並びにモルモット乳頭筋及び hERG 導入細胞 (*in vitro* 試験) を用いて、中枢神経系、呼吸系及び心血管系に対する作用を検討した。各試験はすべて GLP 基準に準拠して実施した。

2.6.2.4.1 中枢神経系に及ぼす影響

添付資料 4.2.1.3-01

雄性 SD 系ラット (6 週齢) を 1 群あたり 6 例使用した。ペラミビル水和物を 20, 50 及び 100 mg/kg の用量で単回静脈内投与し、投与前と投与後 15, 30, 60, 120 及び 240 分における一般症状及び行動について、機能観察総合評価法²³⁾を用いて検討した。対照群には媒体 (生理食塩液) を投与した。各時点において、目視及び触診にて一般症状 (体位/姿勢、痙攣、呼吸、体温、筋の緊張度、流涙、流涎など) を観察した後、オープンフィールド内での行動 (常同行動、異常行動、自発運動、眼瞼下垂及び歩行) を観察し、最後に体性神経系 (カタレプシー、反射反応、聴覚反応、痛覚反応、正向反射、着地開脚幅、握力など) に及ぼす影響を調べた。

その結果、ペラミビル水和物の 20 及び 50 mg/kg 投与群では、いずれの観察項目にも影響は認められなかったが、100 mg/kg 投与群では、投与後 15 及び 240 分において、対照群との比較で、軽度ではあるが、有意な着地開脚幅の増加が認められた。しかし、他の一般症状及び行動の観察項目に影響は認められず、着地開脚幅の 100 mg/kg 投与群における投与前値が、対照群に比べ高い値であったことから、ペラミビル水和物の中枢神経系に及ぼす影響はほとんどないと考えられる。

2.6.2.4.2 呼吸系に及ぼす影響

2.6.2.4.2.1 ラットの呼吸機能に対する作用

添付資料 4.2.1.3-02

雄性 SD 系ラット (7 週齢) を 1 群あたり 8 例使用した。ラットを whole-body plethysmograph チャンバー内に入れ、約 30 分間馴化させた後、無麻酔無拘束下で投与前における呼吸数、1 回換気量及び分時換気量を測定した。次に、ペラミビル水和物を 20, 50 及び 100 mg/kg の用量で単回静脈内投与し [対照群は媒体 (生理食塩液) を投与]、投与後 15, 30, 60, 120 及び 240 分における各パラメータを測定した。

その結果、ペラミビル水和物は、いずれの用量においても、すべてのパラメータに対して影響を及ぼさなかった。

2.6.2.4.2.2 モルモットの呼吸機能に対する作用

添付資料 4.2.1.3-03

雄性 Hartley 系モルモット (6~8 週齢) を 1 群あたり 8 例使用した。実験は麻酔下で気管カニューレを挿管し、人工呼吸下で実施した。ペラミビル水和物を 1, 3 及び 10 mg/kg の用量で単回静脈内投与し [対照群は媒体 (生理食塩液) を投与]、投与前 15, 10 及び 5 分と投与後 0, 5,

10, 15, 20, 25, 30, 40, 50 及び 60 分における気道抵抗, 動肺コンプライアンス (呼吸時における肺の伸展性の指標), 血圧及び心拍数を測定した。

その結果, ペラミビル水和物はいずれの用量においても, すべてのパラメータに対して, ペラミビル水和物に起因すると考えられる影響を及ぼさなかった。

2.6.2.4.3 心血管系に及ぼす影響

2.6.2.4.3.1 無麻酔サルの血圧, 心拍数及び心電図に対する作用

添付資料 4.2.1.3-04

雄性カニクイザル (4~5 歳) を 4 例使用した。媒体 (生理食塩液) 並びにペラミビル水和物の 30 及び 60 mg/kg の用量を, 7 日間の投与間隔で漸増的に単回静脈内投与 (投与容量: 5 mL/kg) し, テレメトリー法を用いて, 投与前と投与後 30, 60, 120 及び 240 分の血圧, 心拍数及び心電図パラメータ (PR 間隔, QRS 時間, QT 間隔及び補正 QT) を測定した。

その結果, ペラミビル水和物はいずれの用量においても, すべてのパラメータに影響を及ぼさなかった。

2.6.2.4.3.2 モルモット乳頭筋標本の心筋活動電位に対する作用

添付資料 4.2.1.3-05

雄性 Hartley 系モルモット (4~5 週齢) から摘出した右心室乳頭筋標本を 1 群あたり 5 例使用した。ペラミビル水和物を生理食塩液に溶解し, 細胞外液で 3, 30 及び 300 $\mu\text{mol/L}$ (0.99, 9.85 及び 98.5 $\mu\text{g/mL}$) の濃度に希釈した後, 標本に適用した。1 Hz 電気刺激時の活動電位を記録し, 波形から, 活動電位振幅, 静止膜電位, 脱分極最大立ち上がり速度並びに 30 及び 90%再分極時の活動電位持続時間 (APD_{30} 及び APD_{90}) を測定した。更に, APD_{90} と APD_{30} の差を算出した。

その結果, ペラミビルはいずれの濃度においても, すべてのパラメータに影響を及ぼさなかった。

2.6.2.4.3.3 hERG チャネル発現細胞のイオン電流に対する作用

添付資料 4.2.1.3-06

hERG チャネルを発現させた HEK293 細胞を 1 群あたり 3 例使用した。ペラミビル水和物を生理食塩液に溶解し, 300 $\mu\text{mol/L}$ (98.5 $\mu\text{g/mL}$) の濃度で細胞に適用した。細胞を -80 mV で電圧固定し, 20 mV の脱分極電位を 1 秒間与えた後, -80 mV の再分極ランプ電位 (-0.5 V/s) を与えた時の遅延整流 K^+ 電流のピーク電流を測定した。

その結果, ペラミビルは遅延整流 K^+ 電流のピーク電流に対して影響を及ぼさなかった。

2.6.2.5 薬力学的薬物相互作用試験

該当する試験なし

2.6.2.6 考察及び結論

2.6.2.6.1 *In vitro* NA 活性阻害作用と *in vivo* 治療効果

ペラミビルはインフルエンザウイルスの NA 活性阻害作用を有する抗インフルエンザウイルス薬であり、多様なインフルエンザウイルス株の NA に対して IC_{50} 値として数 nmol/L レベルの阻害活性を有している。実験室株及び臨床分離株のほとんどの A 型及び B 型ウイルス NA に対して、既存の NA 阻害剤であるオセルタミビルカルボン酸やザナミビルに比べて同等以上の阻害作用を示すと共に、これまでにヒトでの流行が確認されていない NA 亜型に対しても、季節性インフルエンザウイルス NA と同レベルの阻害作用を示した。ペラミビルによる NA 活性阻害作用は、インフルエンザウイルス NA に特異的であり、細菌由来 NA やヒトシアリダーゼにはほとんど阻害作用を示さなかった。このように、ペラミビルはインフルエンザウイルス NA に高い選択性を持ち、様々な NA に対して同レベルで阻害作用を示す特徴を有する。

また、培養細胞上清中への子孫ウイルスの放出抑制作用、プラーク形成抑制及びウイルス増殖による細胞変性に対する抑制作用を評価した結果、ペラミビルは、いずれの試験においてもオセルタミビルカルボン酸やザナミビルと同等以上のインフルエンザウイルスの増殖抑制作用を示した。これら *in vitro* 試験の結果から、ペラミビルがインフルエンザウイルスの NA 活性を阻害することによって感染細胞の表面から子孫ウイルスが遊離するステップを抑制することで、ウイルスが感染細胞から別の細胞に拡散することを防ぎ、結果的にウイルス増殖抑制作用を示すことが明らかとなった (図 2.6.2.6-1)。

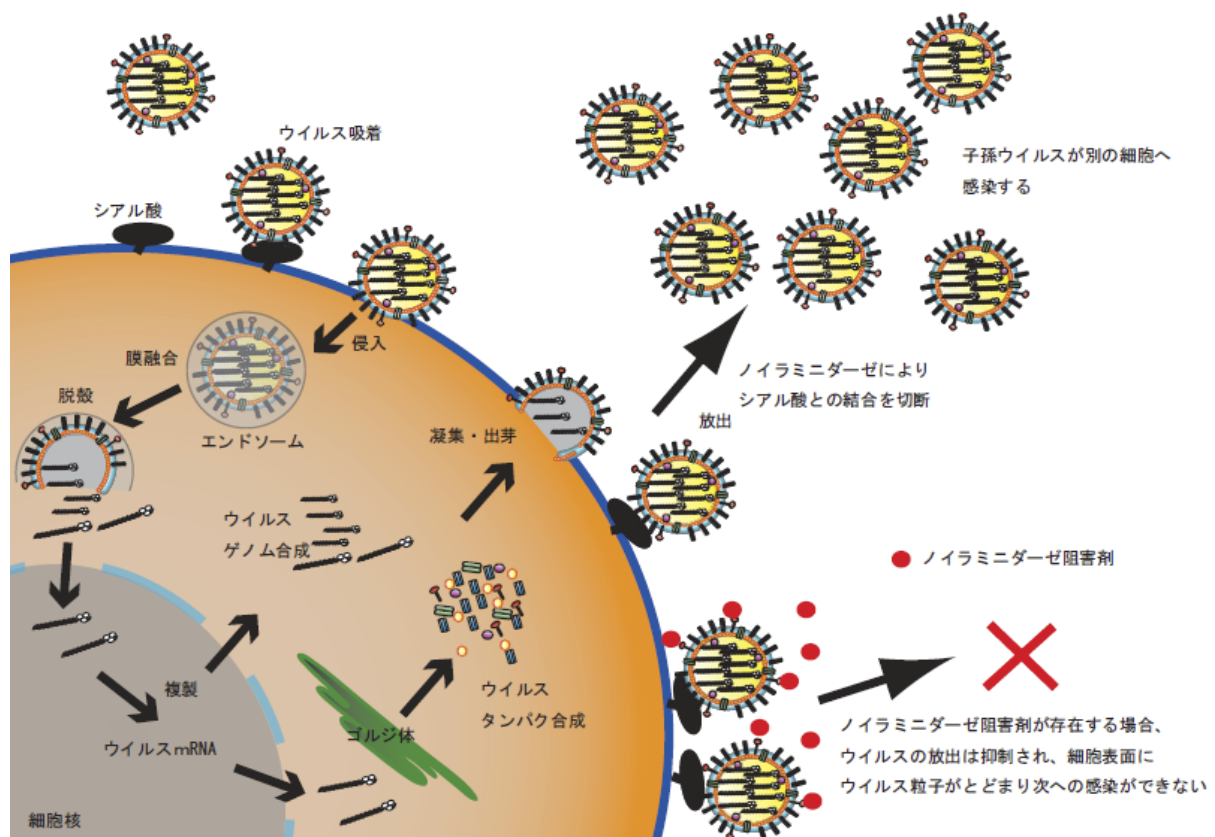


図 2.6.2.6-1 インフルエンザウイルスのライフサイクルと NA 阻害剤の作用機序

更に、マウスに季節性インフルエンザウイルスを経鼻接種し、気道上皮細胞又は肺胞上皮細胞に感染させることによって、ウイルスの増殖と共に肺炎が進行し、死亡に至る致死性感染モデルを用いて、ペラミビル水和物の有効性を評価したところ、ペラミビル水和物の単回静脈内投与による投与量依存的な肺内ウイルス量の減少が確認された。この結果から、ペラミビル水和物は、*in vivo*においてもNA活性を阻害することにより、ウイルス増殖抑制作用を発現し、感染に伴う致死率の改善を示すと考えられる。また、対照薬のオセルタミビルカルボン酸も、単回静脈内投与にて投与初期のウイルス量は減少するが、ペラミビル水和物は、その効果が数日間持続する点に特徴がある。ペラミビルと複合体を形成させたNAの活性回復はオセルタミビルカルボン酸に比べ極めて遅く、ペラミビルはNAに結合した後、容易に解離することなく、長時間にわたってNA活性を阻害し続け、その結果、肺内ウイルス量減少作用が長時間持続すると考えられる。

2.6.2.6.2 *In vitro* NA 阻害活性に基づく有効性

インフルエンザウイルスは、常にHAやNAが変異することにより、毎年のようにその抗原性を少しずつ変化させて流行を続けていく⁵⁾。複数の型、亜型が、冬から春にかけてのインフルエンザシーズンの中で時期をずらしながら流行し、シーズン内又はシーズン間でそれぞれの感染者数が大きく異なる場合があり、インフルエンザが原因と推定される死亡率もシーズン毎の変動が激しい²⁴⁾。抗インフルエンザウイルス薬は、このように多様性を有するインフルエンザウイルスに対し、将来出現する株も含めて、安定して有効性を示す必要がある。ペラミビル水和物の場合、*in vitro* 及び *in vivo* の評価結果からインフルエンザウイルスに対する有効性を推定することは可能と考えられる。

A型インフルエンザウイルス (A/WS/33 株) 感染マウス致死モデルにおける生存率を薬効評価指標とし、ペラミビル水和物のPK/PD解析を実施した。その結果、薬剤の曝露量を表すAUCが薬効発現に最も相関することが示唆され、95%のマウス生存率を得るのに必要なAUCは2.9 µg·hr/mLと算出された。

その他の季節性A型又はB型ウイルス株を感染させたマウス致死モデルにおいても、ペラミビル水和物を3 mg/kgの用量で単回静脈内投与すると、80～100%のマウスが生存することが示された。マウス致死モデルに用いたウイルス株のNAに対するペラミビルのIC₅₀値は、0.31～1.92 nmol/Lと標準的な季節性インフルエンザに対するIC₅₀値の範疇に収まるものであり、A/WS/33株で得られた結果と類似した結果が多くの株で得られたものと考えている。近年のA型及びB型を含む多くの株のNA阻害作用の検討結果では、ペラミビルはほとんどの株に対して4 nmol/L以下であった。したがって、ペラミビルが数nmol/LのIC₅₀値を示す標準的な季節性インフルエンザウイルスに対し、ペラミビルはA/WS/33株感染マウス致死モデルで得られたAUCで一定の有効性を示すと考えられる。

2.6.2.6.3 遅延投与における有効性

現在多くのインフルエンザ患者に処方されているオセルタミビルリン酸塩やザナミビル水和物は発症から48時間以内の処方開始が有効性発現に必要とされている¹⁰⁾。このTherapeutic time

window が広がることは、抗インフルエンザウイルス薬としての有用性が高まることを意味する。そこで、A 型ウイルス感染マウス致死モデルを用いて、ウイルス接種後の治療開始時期を変えた時の有効性を評価したところ、オセルタミビルリン酸塩は、接種 60 時間後まで有意な効果を示したが、72 時間後では全例のマウスが死亡した。これに対し、ペラミビル水和物は接種 72 時間後までの投与で有意な治療効果を示した。以上の結果より、ペラミビル水和物は治療開始時期が遅れた場合も有効性を発揮することが示唆された。

2.6.2.6.4 ハイリスク患者に対する有効性

慢性の呼吸器疾患や糖尿病に罹患している患者や免疫機能が低下した状態にある患者などの、いわゆるハイリスク患者にとって、インフルエンザウイルス感染は時として重症化し致死的な病態を呈する場合がある¹⁷⁾。このような患者に対するペラミビル水和物の有効性を推定する目的で、好中球減少症マウスにインフルエンザウイルスを感染させた致死モデルにおけるペラミビル水和物の治療効果（生存率改善効果）を検討した。ペラミビル水和物の単回静脈内投与群は、100 mg/kg の用量にて 40% の生存率を示し、媒体投与群と比較して有意差は認められたものの、十分な有効性ではなかった。しかし、ペラミビル水和物の 1 日 1 回 5 日間反復静脈内投与群では 10 mg/kg/日の用量にて 80% のマウスが生存し、高い有効性が確認された。一方、オセルタミビルリン酸塩の 1 日 2 回 5 日間反復経口投与群では、30 mg/kg/日の用量での生存率は 0% であり、100 mg/kg/日の用量で 70% の生存率が認められた。

以上の結果から、ペラミビル水和物は、ハイリスク患者に対して反復投与することにより、NA 阻害作用をより長期間維持することで、オセルタミビルリン酸塩よりも低用量で治療効果を示すことが期待される。

2.6.2.6.5 オセルタミビルリン酸塩耐性ウイルスに対する作用

NA の 274 番目のアミノ酸がヒスチジンからチロシンに置換し、オセルタミビルリン酸塩に対して耐性となる A/H1N1 亜型ウイルスが、2007～2008 年のインフルエンザシーズンから、世界各地で高頻度に検出されるようになった¹²⁾。日本においても 2008～2009 年のシーズンには、全国各地における A/H1N1 分離株のほぼ 100% が、この H274Y 変異 NA を持つことが明らかになっている。

日本で分離されたオセルタミビルリン酸塩耐性株の NA に対する阻害作用を検討した結果、ペラミビルの NA 阻害作用は H274Y 変異により減弱化するものの、IC₅₀ 値の上昇（耐性上昇度：37 倍）は、オセルタミビルカルボン酸の耐性上昇度（118 倍）に比べ小さいことが確認された。

この阻害活性の低下が *in vivo* 治療効果にどの程度影響を与えるかを検討するため、実験室株である A/PR/8/34 (H1N1 亜型) 株をベースとした H274Y 変異 NA を有する組換えウイルスを作製し、これを 100% 致死量で感染させたマウスを用い、ペラミビル水和物による治療効果を検討した。この組換えウイルスは先に検討した臨床分離株と同様に、ペラミビル及びオセルタミビルカルボン酸に対して、それぞれ約 40 倍及び約 100 倍の耐性上昇度を示した。この組換えウイルスは、マウスにおける増殖能が顕著に減少しており、100% 致死を獲得するためには野生株の 1600 倍量の接種ウイルス量が必要であったが、構築したオセルタミビルリン酸塩耐性ウイルス

感染マウス致死モデルにおいて、ペラミビル水和物は 3 mg/kg の単回静脈内投与により生存率を有意に改善させることが示され、その ED₅₀ 値は 2.4 mg/kg であった。野生型の A/PR/8/34 株感染マウス致死モデルにおいて、ペラミビル水和物が示す ED₅₀ 値は 0.4 mg/kg であり、この値と比べると、オセルタミビルリン酸塩耐性株の場合は 6 倍高い用量が必要であることが示唆されたが、依然としてペラミビル水和物は、単回静脈内投与にて治療効果を示した。

本試験系では、オセルタミビルリン酸塩耐性株の接種ウイルス量が野生株のそれと大きく異なるため、オセルタミビルリン酸塩耐性株と野生株に対するペラミビル水和物の ED₅₀ 値を単純に比較して有効性を示す投与量を考察することは難しい。しかしながら、少なくとも、このオセルタミビルリン酸塩耐性変異ウイルスに対し、ペラミビル水和物はオセルタミビルリン酸塩よりも少ない投与量及び単回投与で有効性を示すことから、オセルタミビルリン酸塩耐性株に対してもオセルタミビルリン酸塩よりも高い治療効果が期待できる。

2.6.2.6.6 新型インフルエンザウイルスに対する作用

ペラミビルは、高病原性鳥インフルエンザウイルス由来 NA に対しても NA 活性阻害作用を示し、その IC₅₀ 値は 0.12~0.40 nmol/L で、オセルタミビルカルボン酸やザナミビルによる阻害作用より強かった。また、ウイルス放出抑制作用についても、オセルタミビルカルボン酸やザナミビルに比べ、強い阻害活性を示した。

マウス²²⁾ 及びフェレット²⁵⁾ の高病原性鳥インフルエンザウイルス感染致死モデルは、ヒトで認められている病態と同様に、全身感染による多臓器不全で死亡するモデルである。ヒトにおいて感染死亡例が報告されている A/Hong Kong/483/97 株 (H5N1 亜型) を感染させたマウス致死モデルにおいては、ペラミビル水和物を 10 及び 30 mg/kg の用量で単回静脈内投与した際に、有効性を示した。病原性が強いため、用量は季節性インフルエンザウイルス株に比して高いが、オセルタミビルリン酸塩 (1 日 2 回 5 日間の反復経口投与) やザナミビル (1 日 2 回 5 日間の反復静脈内投与) と比べて同等以上の治療効果を示した。また、反復投与することにより更に高い有効性を示すことから、臨床における高い治療効果が示唆された。ペラミビル水和物は、同じくヒトにおいて死亡例のある A/Vietnam/1203/04 株 (H5N1 亜型) を感染させたマウス²⁶⁾ 及びフェレット²⁷⁾ において、臓器ウイルス量を有意に減少させ、生存率を改善する治療効果を有していることも報告されている。

更に、N1 から N9 までのすべての NA 亜型に対して同レベルで NA 活性阻害作用を示すことを併せると、将来的にどの亜型の新型インフルエンザウイルスが出現・蔓延した場合でも、ペラミビル水和物が有効性を示すことが期待できる。

2009 年 4 月にメキシコで見出された豚由来の新型インフルエンザ (A/H1N1 亜型) についても、Center of Disease Control において、臨床分離株を対象とした既存薬及び開発中の薬剤の NA 阻害作用が検討され、ペラミビルが本ウイルスの NA 活性を IC₅₀ 値として 0.06~0.26 nmol/L の範囲で阻害し、この値は季節性インフルエンザウイルス NA に対する IC₅₀ 値 (0.16 nmol/L) と同程度であることが報告された²⁸⁾。

ペラミビル水和物は静脈内投与により、薬剤の全身への曝露を即時に実現でき、服用が困難な状態にある患者にも処方できる。したがって、全身の臓器で増殖し、重篤な症状を呈するよ

うな新型インフルエンザウイルスが出現した際にも、ペラミビル水和物は有用性の高い治療薬になると考えられる。

2.6.2.6.7 安全性薬理試験

ペラミビル水和物の 20 及び 50 mg/kg の単回静脈内投与では、ラットの一般症状及び行動に影響を及ぼさなかったが、100 mg/kg では媒体投与群に比べ有意な着地開脚幅の増加が観察された。着地開脚試験は末梢性の神経障害又は中枢抑制作用の指標とされているが²⁹⁾、他の一般症状及び行動には影響が認められなかった上に、100 mg/kg 投与群における着地開脚幅の投与前値が対照群に比べ高かった。なお、ラットにペラミビル水和物の 200 mg/kg を 2 回に分割して静脈内投与（1 回目投与後 4 時間に 2 回目を投与：1 回の投与は 100 mg/kg）した時における 1 回目投与時の C_0 は 455 $\mu\text{g/mL}$ であった [2.6.7.5.1 項参照]。一方、臨床試験において、日本人健康成人男性に最も高用量である 800 mg を単回静脈内投与した場合でも、血漿中ペラミビルの C_{max} は 85.2 $\mu\text{g/mL}$ であった [2.7.2.2.2 項参照]。したがって、ペラミビル水和物が臨床で中枢神経系に影響を及ぼす可能性は低いと考えられる。

ペラミビル水和物は、20、50 及び 100 mg/kg の単回静脈内投与で、無麻酔ラットの呼吸数、1 回換気量及び分時換気量に影響を及ぼさず、麻酔モルモットにおいても 1、3 及び 10 mg/kg の単回静脈内投与で、気道抵抗、動肺コンプライアンス、血圧及び心拍数に影響を及ぼさなかった。これらのことから、ペラミビル水和物が臨床で呼吸系に影響を及ぼす可能性は低いと考えられる。

ペラミビル水和物は、サルへの 30 及び 60 mg/kg の単回静脈内投与で、血圧、心拍数及び心電図パラメータに影響を及ぼさなかった。なお、サルにペラミビル水和物の 120 mg/kg を 2 回に分割して静脈内投与（1 回目投与後 4 時間に 2 回目を投与：1 回の投与は 60 mg/kg）した時における 1 回目投与時の C_0 は 497 $\mu\text{g/mL}$ であった [2.6.7.5.2 項参照]。また、モルモットの摘出右心室乳頭筋標本における心筋活動電位に対し、ペラミビルは 300 $\mu\text{mol/L}$ (98.5 $\mu\text{g/mL}$) までの濃度で、活動電位振幅、静止膜電位、脱分極最大立ち上がり速度及び活動電位持続時間に影響を及ぼさなかった。更に、ペラミビルは 300 $\mu\text{mol/L}$ の濃度で hERG チャネルの遅延整流 K^+ 電流にも影響を及ぼさなかった。これらのことから、ペラミビル水和物が臨床で心血管系に影響を及ぼす可能性は低いと考えられる。

以上より、ペラミビル水和物が用法・用量の範囲内で中枢神経系、呼吸系及び心血管系に影響を及ぼす可能性は低いと考えられる。

2.6.2.7 図表

図表は、本文中の適切な場所に記載した.

2.6.2.8 参考文献

- 1) Palese P, Shaw ML. Orthomyxoviridae: The viruses and their replication. In: Knipe DM, Howley PM. Fields Virology. 5th ed. Philadelphia: Wolters Kluwer Lippincott Williams & Wilkins 2007; 1647-74.
- 2) Fouchier RAM, Munster V, Wallensten A, Bestebroer TM, Herfst S, Smith D, et al. Characterization of a novel influenza A virus hemagglutinin subtype (H16) obtained from black-headed gulls. J Virol 2005; 79 (5): 2814-22.
- 3) Aymard HM, Coleman MT, Dowdle WR, Laver WG, Schild GC, Webster RG. Influenzavirus neuraminidase and neuraminidase-inhibition test procedures. Bull WHO 1973; 48: 199-202.
- 4) Potier M, Mameli L, Bélisle M, Dallaire L, Melançon SB. Fluorometric assay of neuraminidase with a sodium (4-methylumbelliferyl- α -D-N-acetylneuraminate) substrate. Anal Biochem 1979; 94 (2): 287-96.
- 5) Wright PF, Neumann G, Kawaoka Y. Orthomyxoviruses. In: Knipe DM, Howley PM. Fields Virology. 5th ed. Philadelphia: Wolters Kluwer Lippincott Williams & Wilkins 2007; 1691-740.
- 6) Miyagi T, Yamaguchi K. Biochemistry of glycans: sialic acids. In Kamerling JP, Boons G, Lee YC, Suzuki A, Taniguchi N, Voragen AGJ. Comprehensive glycoscience. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier BV 2007; 297-322.
- 7) Gubareva LV, Nedyalkova MS, Novikov DV, Murti KG, Hoffmann E, Hayden FG. A release-competent influenza A virus mutant lacking the coding capacity for the neuraminidase active site. J Gen Virol 2002; 83: 2683-92.
- 8) Liu C, Eichelberger MC, Compans RW, Air GM. Influenza type A virus neuraminidase does not play a role in viral entry, replication, assembly, or budding. J Virol 1995; 69 (2): 1099-106.
- 9) Sidwell RW. A consideration of animal models used for study of influenza virus inhibitors. International Congress Series 2001; 1219: 835-8.
- 10) 菅谷 憲夫. 抗インフルエンザウイルス薬. 有効性と安全性. 日本臨床 2006; 64 (10): 1840-44.
- 11) Akaike H. Information theory and an extension of the maximum likelihood principle. In: Kotz S, Johnson NL. Reproduced in Breakthroughs in Statistics, I, Foundations and Basic Theory. New York: Springer-Verlag 1992; 610-24.
- 12) 2008/09 インフルエンザシーズンにおけるインフルエンザ (A/H1N1) オセルタミビル耐性株 (H275Y*) の国内発生状況 [第 2 報]. 国立感染症研究所. 病原微生物検出情報 IASR 2009; 30: 101-6.
- 13) Gubareva LV. Molecular mechanisms of influenza virus resistance to neuraminidase inhibitors. Virus Res 2004; 103: 199-203.
- 14) Baz M, Abed Y, McDonald J, Boivin G. Characterization of multidrug-resistant influenza A/H3N2 viruses shed during 1 year by an immunocompromised child. Clin Infect Dis 2006; 43: 1555-61.
- 15) Hatakeyama S, Sugaya N, Ito M, Yamazaki M, Ichikawa M, Kimura K, et al. Emergence of

- influenza B viruses with reduced sensitivity to neuraminidase inhibitors. JAMA 2007; 297 (13): 1435-42.
- 16) 鶴留 雅人, 伊藤 康彦. 宿主細胞反応と免疫応答 呼吸器粘膜の感染防御機構. 日本臨床 2006; 64 (10): 1808-12.
 - 17) Whitley RJ, Monto AS. Prevention and treatment of influenza in high-risk groups: children, pregnant women, immunocompromised hosts, and nursing home residents. J Infect Dis 2006; 194: S133-8
 - 18) 森兼 啓太. H5N1 ウイルスの最近の流行状況. インフルエンザ 2008; 9 (2): 119-25.
 - 19) Joseph T, McAuliffe J, Lu B, Jin H, Kemble G, Subbarao K. Evaluation of replication and pathogenicity of avian influenza A H7 subtype viruses in a mouse model. J Virol 2007; 81 (19): 10558-66.
 - 20) Yuen KY, Chan PKS, Peiris M, Tsang DNC, Que TL, Shortridge KF, et al. Clinical features and rapid viral diagnosis of human disease associated with avian influenza A H5N1 virus. Lancet 1998; 351: 467-71.
 - 21) Ng WF, To KF. Pathology of human H5N1 infection: new findings. Lancet 2007; 370: 1106-8.
 - 22) Li S, Liu C, Klimov A, Subbarao K, Perdue ML, Mo D, et al. Recombinant influenza A virus vaccines for the pathogenic human A/Hong Kong/97 (H5N1) viruses. J Infect Dis 1999; 179: 1132-8.
 - 23) Mattsson JL, Spencer PJ, Albee RR. A performance standard for clinical and functional observational battery examinations of rats. J Am Coll Toxicol 1996; 15: 239-54.
 - 24) <http://syndromic-surveillance.net/choukashibou/>
 - 25) Zitzow LA, Rowe T, Morken T, Shieh WJ, Zaki S, Katz JM. Pathogenesis of avian influenza A (H5N1) viruses in ferrets. J Virol 2002; 76 (9): 4420-9.
 - 26) Boltz DA, Ilyushina NA, Arnold CS, Babu YS, Webster RG, Govorkova EA. Intramuscularly administered neuraminidase inhibitor peramivir is effective against lethal H5N1 influenza virus in mice. Antiviral Res 2008; 80: 150-7.
 - 27) Yun NE, Linde NS, Zacks MA, Barr IG, Hurt AC, Smith JN et al. Injectable peramivir mitigates disease and promotes survival in ferrets and mice infected with the highly virulent influenza virus, A/Vietnam/1203/04 (H5N1). Virol 2008; 374: 198-209.
 - 28) <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm58d0428a1.htm>
 - 29) Edwards PM, Parker VH. A simple, sensitive and objective method for early assessment of acrylamide neuropathy in rats. Toxicol Appl Pharmacol 1977; 40: 589-91.

ラピアクタ点滴用バッグ 300mg ラピアクタ点滴用バイアル 150mg

第 2 部 (モジュール 2) : CTD の概要 (サマリー)

2.6.3 薬理試験概要表

塩野義製薬株式会社

2.6.3 目次

2.6.3 薬理試験概要表	2.6.3-5
2.6.3.1 薬理試験： 一覧表.....	2.6.3-5
2.6.3.2 効力を裏付ける試験.....	2.6.3-10
2.6.3.2.1 NAに対するin vitro阻害作用	2.6.3-10
2.6.3.2.1.1 季節性ヒトインフルエンザウイルスのNAに対する阻害作用.....	2.6.3-10
2.6.3.2.1.2 様々な亜型のNAに対するペラミビルの阻害作用	2.6.3-17
2.6.3.2.1.3 ペラミビルによるNA阻害作用の選択性に関する検討	2.6.3-19
2.6.3.2.1.4 NA以外のレセプター，イオンチャネル及びトランスポーターに 対するペラミビルの結合阻害作用	2.6.3-22
2.6.3.2.2 In vitroウイルス増殖抑制作用	2.6.3-27
2.6.3.2.2.1 感染細胞からのウイルス放出に対する作用.....	2.6.3-27
2.6.3.2.2.2 感染細胞におけるプラーク形成に対する作用	2.6.3-29
2.6.3.2.2.3 感染細胞における増殖抑制効果	2.6.3-32
2.6.3.2.3 インフルエンザウイルス感染マウス致死モデルにおけるペラミ ビル水和物のin vivo治療効果	2.6.3-33
2.6.3.2.3.1 A型ウイルス感染マウス致死モデルにおける治療効果	2.6.3-33
2.6.3.2.3.2 B型ウイルス感染マウス致死モデルにおける治療効果	2.6.3-41
2.6.3.2.3.3 A型ウイルス感染マウス致死モデルにおけるTherapeutic time windowの検討.....	2.6.3-45
2.6.3.2.3.4 A型インフルエンザウイルス感染マウス致死モデルの肺内ウイ ルス増殖抑制効果.....	2.6.3-47
2.6.3.2.3.5 ペラミビルのNAからの解離	2.6.3-50
2.6.3.2.3.6 マウス治療効果に影響を与える薬物動態パラメータの解析.....	2.6.3-54
2.6.3.2.4 オセルタミビルリン酸塩耐性ウイルスに対する効果	2.6.3-57
2.6.3.2.4.1 臨床分離株由来オセルタミビルリン酸塩耐性H274Y変異NAに対 する阻害効果.....	2.6.3-57
2.6.3.2.4.2 オセルタミビルリン酸塩耐性H274Y変異NAを有するA型ウイル ス感染マウス致死モデルにおける治療効果.....	2.6.3-59
2.6.3.2.4.3 既存のNA阻害剤耐性変異NAに対するペラミビルの阻害効果.....	2.6.3-62
2.6.3.2.5 免疫抑制状態におけるインフルエンザウイルス感染に対する効 果.....	2.6.3-64
2.6.3.2.6 高病原性鳥インフルエンザウイルスに対する効果	2.6.3-67
2.6.3.2.6.1 高病原性鳥インフルエンザウイルスNAに対する阻害作用.....	2.6.3-67
2.6.3.2.6.2 高病原性鳥インフルエンザウイルス感染細胞からのウイルス 放出に対する効果.....	2.6.3-68
2.6.3.2.6.3 高病原性鳥インフルエンザウイルスA/Hong Kong/483/97株 (H5N1亜型) 感染マウス致死モデルにおける治療効果	2.6.3-69
2.6.3.3 副次的薬理試験	2.6.3-71

2.6.3.4 安全性薬理試験	2.6.3-72
2.6.3.5 薬力学的薬物相互作用試験.....	2.6.3-73

2.6.3 略号一覧表

略号	略号内容
AUC	血漿中濃度－時間曲線下面積
C _{max}	最高血漿中濃度
EC ₅₀	50%有効濃度
ED ₅₀	50%有効量
EID ₅₀	50%鶏卵感染価
ET ₅₀	50%有効時間
FR	耐性上昇度
HEK293 細胞	ヒト胎児腎臓細胞
hERG	ヒト ether-a-go-go 関連遺伝子
H274Y 変異	274 番目のアミノ酸のヒスチジンからチロシンへの置換
IC _{50 (90)}	50% (90%) 阻害濃度
MUNANA	2'-(4-Methylumbelliferyl)- α -D- <i>N</i> -acetylneuraminic acid sodium salt hydrate
MDCK 細胞	Madin-Darby canine kidney 細胞
NA	ノイラミニダーゼ
TCID ₅₀	50%組織培養感染価
T>IC ₉₅	95%阻害濃度を上回る濃度を維持する時間

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：ペラミビル水和物

試験の種類	試験系	投与方法	実施施設	試験番号	試験報告書添付場所
効力を裏付ける試験					
季節性ヒトインフルエンザウイルスのノイラミニダーゼ (NA) に対する阻害作用 (Fetuin を基質として用いた試験)	インフルエンザウイルス	<i>In vitro</i> , 0.0032～250 nmol/L	塩野義製薬	S-021812-EB-116-N	4.2.1.1-01
季節性ヒトインフルエンザウイルスの NA に対する阻害作用 [2'-(4-Methylumbelliferyl)- α -D-N-acetylneuraminic acid sodium salt hydrate (MUNANA) を基質として用いた試験 (1)]	インフルエンザウイルス	<i>In vitro</i> , 0.032～100 nmol/L	塩野義製薬	PMV-EB-037-N	4.2.1.1-02
季節性ヒトインフルエンザウイルスの NA に対する阻害作用 [MUNANA を基質として用いた試験 (2)]	インフルエンザウイルス	<i>In vitro</i> , 0.032～100 nmol/L	塩野義製薬	S-021812-EB-111-N	4.2.1.1-03
様々な亜型の NA に対するペラミビルの阻害作用	インフルエンザウイルス	<i>In vitro</i> , 0.032～100 nmol/L	塩野義製薬	PMV-EB-033-N	4.2.1.1-04
ペラミビルによる NA 阻害作用の選択性に関する検討 (細菌由来 NA に対するペラミビルの阻害作用)	細菌由来 NA 及びインフルエンザウイルス	<i>In vitro</i> , 0.032 nmol/L～1000 μ mol/L	塩野義製薬	PMV-EB-032-N	4.2.1.1-05
ペラミビルによる NA 阻害作用の選択性に関する検討 (ヒトシアリダーゼに対するペラミビルの阻害作用)	組換えヒトシアリダーゼ NEU1～NEU4	<i>In vitro</i> , 0.32～5000 μ mol/L	塩野義製薬	S-021812-EB-130-N	4.2.1.1-06
NA 以外のレセプター、イオンチャネル及びトランスポーターに対するペラミビルの結合阻害作用	63 種類のレセプター、イオンチャネル及びトランスポーター	<i>In vitro</i> , 10 μ mol/L	██████████	S-021812-EF-127-N (AL-4143-G)	4.2.1.1-07

(続く)

2.6.3.1 薬理試験： 一覧表 (続き)

被験物質：ペラミビル水和物

試験の種類	試験系	投与方法	実施施設	試験番号	試験報告書添付場所
効力を裏付ける試験 (続き)					
感染細胞からのウイルス放出に対する作用	インフルエンザウイルス, RPMI2650細胞及び Madin-Darby canine kidney 細胞 (MDCK 細胞)	<i>In vitro</i> , 0.32～5000 nmol/L	塩野義製薬	PMV-EB-035-N	4.2.1.1-08
感染細胞におけるプラーク形成に対する作用 (実験室株)	インフルエンザウイルス及び MDCK 細胞	<i>In vitro</i> , 0.0128～1000 nmol/L	塩野義製薬	S-021812-EB-115-N	4.2.1.1-09
感染細胞におけるプラーク形成に対する作用 (臨床分離株)	インフルエンザウイルス及び MDCK 細胞	<i>In vitro</i> , 0.0128～1000 nmol/L	塩野義製薬	S-021812-EB-108-N	4.2.1.1-10
感染細胞における増殖抑制効果	インフルエンザウイルス及び MDCK 細胞	<i>In vitro</i> , 3.91～5000 nmol/L	塩野義製薬	PMV-EB-034-N	4.2.1.1-11
A 型ウイルス感染マウス致死モデルにおける治療効果 (A/WS/33 株)	A/WS/33 ウイルス感染マウス	静脈内, 単回, 0.3～10 mg/kg	塩野義製薬	PMV-EB-038-N	4.2.1.1-12
A 型ウイルス感染マウス致死モデルにおける治療効果 (A/PR/8/34 株)	A/PR/8/34 ウイルス感染マウス	静脈内, 単回, 0.1～10 mg/kg	塩野義製薬	S-021812-EB-103-N	4.2.1.1-13
A 型ウイルス感染マウス致死モデルにおける治療効果 (A/Kumamoto/Y5/67 株)	A/Kumamoto/Y5/67 ウイルス感染マウス	静脈内, 単回, 0.1～10 mg/kg,	塩野義製薬	S-021812-EB-104-N	4.2.1.1-14
A 型ウイルス感染マウス致死モデルにおける治療効果 (A/Victoria/3/75 株)	A/Victoria/3/75 ウイルス感染マウス	静脈内, 単回, 0.1～10 mg/kg	塩野義製薬	S-021812-EB-105-N	4.2.1.1-15

(続く)

2.6.3.1 薬理試験： 一覧表 (続き)

被験物質：ペラミビル水和物

試験の種類	試験系	投与方法	実施施設	試験番号	試験報告書添付場所
効力を裏付ける試験 (続き)					
B 型ウイルス感染マウス致死モデルにおける治療効果 (B/Maryland/1/59 株)	B/Maryland/1/59 ウイルス感染マウス	静脈内, 単回, 0.03～10 mg/kg	塩野義製薬	PMV-EB-039-N	4.2.1.1-16
B 型ウイルス感染マウス致死モデルにおける治療効果 (B/Lee/40 株)	B/Lee/40 ウイルス感染マウス	静脈内, 単回, 0.1～10 mg/kg	塩野義製薬	S-021812-EB-106-N	4.2.1.1-17
A 型ウイルス感染マウス致死モデルにおける Therapeutic time window の検討	A/WS/33 ウイルス感染マウス	静脈内, 単回, 10 mg/kg	塩野義製薬	S-021812-EB-058-N	4.2.1.1-18
A 型インフルエンザウイルス感染マウス致死モデルの肺内ウイルス増殖抑制効果	A/Victoria/3/75 ウイルス感染マウス	静脈内, 単回, 1～30 mg/kg	塩野義製薬	S-021812-EB-123-N	4.2.1.1-19
ペラミビルの NA からの解離 (基質添加 4 時間後まで)	組換え N9 NA	<i>In vitro</i> , 100 nmol/L	塩野義製薬	PMV-EB-036-N	4.2.1.1-20
ペラミビルの NA からの解離 (基質添加 24 時間後まで)	組換え N9 NA	<i>In vitro</i> , 100 nmol/L	■	PB001-CSA63005	4.2.1.1-31
マウス治療効果に影響を与える薬物動態パラメータの解析	A/WS/33 ウイルス感染マウス	静脈内, 単回, 2 分割又は 4 分割, 0.25～8 mg/kg/回 (単回), 0.125～4 mg/kg/回 (2 分割) 又は 0.0625～2 mg/kg/回 (4 分割)	塩野義製薬	S-021812-EB-052-N	4.2.1.1-21
	なし	なし	塩野義製薬	S-021812-EB-053-N	4.2.1.1-22
臨床分離株由来オセルタミビルリン酸塩耐性 274 番目のアミノ酸のヒスチジンからチロシンへの置換 (H274Y 変異) NA に対する阻害効果	インフルエンザウイルス	<i>In vitro</i> , 0.032～12500 nmol/L	塩野義製薬	S-021812-EB-117-N	4.2.1.1-23

(続く)

2.6.3.1 薬理試験： 一覧表 (続き)

被験物質：ペラミビル水和物

試験の種類	試験系	投与方法	実施施設	試験番号	試験報告書添付場所
効力を裏付ける試験 (続き)					
オセルタミビルリン酸塩耐性 H274Y 変異 NA を有する A 型ウイルス感染マウス致死モデルにおける治療効果 (H274Y 変異導入によるペラミビルの感受性の変化)	組換えインフルエンザウイルス	<i>In vitro</i> , 0.032～100 nmol/L	塩野義製薬	S-021812-EB-135-N	4.2.1.1-24
オセルタミビルリン酸塩耐性 H274Y 変異 NA を有する A 型ウイルス感染マウスに対する治療効果 (H274Y 変異 NA を有する A/PR/8/34 株感染マウス致死モデルにおけるペラミビル水和物の単回静脈内投与による治療効果)	H274Y 変異 NA を有する組換え A/PR/8/34 ウイルス感染マウス	静脈内, 単回, 1～100 mg/kg	塩野義製薬	S-021812-EB-134-N	4.2.1.1-25
既存の NA 阻害剤耐性変異 NA に対するペラミビルの阻害効果	組換え NA	<i>In vitro</i> , 0.064～1000 nmol/L	塩野義製薬	S-021812-EB-133-N	4.2.1.1-26
免疫抑制状態におけるインフルエンザウイルス感染に対する効果	A/WS/33 ウイルス感染マウス	免疫抑制処理なし 静脈内, 単回, 0.1～10 mg/kg 免疫抑制処理あり 静脈内, 単回又は 1 日 1 回 5 日間反復, 1～100 mg/kg (単回) 又は 1～100 mg/kg/日 (反復)	塩野義製薬	S-021812-EB-131-N	4.2.1.1-27
高病原性鳥インフルエンザウイルス NA に対する阻害作用	高病原性鳥インフルエンザウイルス	<i>In vitro</i> , 0.0064～100 nmol/L	■■■■■	S-021812-EB-060-N	4.2.1.1-28
高病原性鳥インフルエンザウイルス感染細胞からのウイルス放出に対する効果	高病原性鳥インフルエンザウイルス及び MDCK 細胞	<i>In vitro</i> , 0.0256～2000 nmol/L	■■■■■	S-021812-EB-061-N	4.2.1.1-29

(続く)

2.6.3.1 薬理試験： 一覧表 (続き)

被験物質：ペラミビル水和物

試験の種類	試験系	投与方法	実施施設	試験番号	試験報告書添付場所
効力を裏付ける試験 (続き)					
高病原性鳥インフルエンザウイルス A/Hong Kong/483/97 株 (H5N1 亜型) 感染マウス致死モデルにおける治療効果	A/Hong Kong/483/97 ウィルス感染マウス	静脈内, 単回又は1日1回5日間反復, 10~30 mg/kg (単回) 又は 10~30 mg/kg/日 (反復)	████████	S-021812-EB-082-N	4.2.1.1-30
安全性薬理試験					
中枢神経系					
一般症状及び行動に及ぼす影響	ラット	静脈内, 単回, 20, 50, 100 mg/kg	████████	PMV-SF-004-L (SG07086)	4.2.1.3-01
呼吸系					
呼吸数, 1 回及び分時換気量に及ぼす影響	ラット	静脈内, 単回, 20, 50, 100 mg/kg	████████	PMV-SF-005-L (SG07087)	4.2.1.3-02
気道抵抗, 動肺コンプライアンス, 血圧, 心拍数に及ぼす影響	モルモット	静脈内, 単回, 1, 3, 10 mg/kg	████████	DS00321 (DTNO1000)	4.2.1.3-03
心血管系					
血圧, 心拍数, 心電図パラメータに及ぼす影響	サル	静脈内, 単回, 30, 60 mg/kg	████████	PMV-SF-006-L (SG07088)	4.2.1.3-04
乳頭筋標本の心筋活動電位に及ぼす影響	モルモット	<i>In vitro</i> , 3, 30, 300 µmol/L	████████ ████████ ████████ ████████	PMV-SF-007-L (B070292)	4.2.1.3-05
心筋イオンチャンネルに及ぼす影響	ヒト ether-a-go-go 関連遺伝子 (hERG) チャンネル発現ヒト胎児腎臓細胞 (HEK293 細胞)	<i>In vitro</i> , 300 µmol/L	████████	070117.CDS	4.2.1.3-06

2.6.3-9

2.6.3.2 効力を裏付ける試験

2.6.3.2.1 NA に対する *in vitro* 阻害作用

2.6.3.2.1.1 季節性ヒトインフルエンザウイルスの NA に対する阻害作用

(1) Fetuin を基質として用いた試験

被験物質：ペラミビル水和物
試験報告書添付場所：4.2.1.1-01
試験番号：S-021812-EB-116-N

対照物質	オセルタミビルカルボン酸及びザナミビル
動物種/標本	インフルエンザウイルス
試験方法	Fetuin を基質として用い、N-アセチルノイラミン酸遊離を定量する酵素阻害
評価項目	NA 阻害作用，50%阻害濃度 (IC ₅₀)
試験条件及び評価方法	25 µL のウイルス NA と 25 µL の試験物質 [ペラミビル (最終濃度：0.0032～250 nmol/L)，オセルタミビルカルボン酸 (最終濃度：0.08～1250 nmol/L) 及びザナミビル (最終濃度：0.08～1250 nmol/L)] を混合し，室温で 1 時間インキュベートした後，50 µL の Fetuin (最終濃度：12.5 mg/mL) を加え混合し，37°C で 17 時間インキュベートした．50 µL の過ヨウ素酸試薬を加え混合し，室温で 20 分間インキュベートした後，亜ヒ酸試薬を加え混合した．チオバルビツール酸試薬を 1.25 mL 加え混合し，80°C で 15 分間インキュベートした後，1 分間氷中にて冷却した．1.5 mL の Warrenoff 試薬を加え混合し，遠心後上層をマルチウェルプレートに採取後，549 nm の吸光度を測定した．

(続く)

2.6.3.2.1.1 季節性ヒトインフルエンザウイルスの NA に対する阻害作用 (続き)

インフルエンザウイルス NA に対するペラミビルの阻害作用

型	亜型	株名	IC ₅₀ (nmol/L)		
			ペラミビル	オセルタミビル カルボン酸	ザナミビル
実験室株					
A	H1N1	A/PR/8/34	1.8	9.0	3.8
A	H1N1	A/WS/33	1.4	5.7	2.6
A	H3N2	A/Kumamoto/Y5/67	0.66	1.3	4.2
A	H3N2	A/Hong Kong/8/68	0.57	1.6	3.9
A	H3N2	A/Victoria/3/75	0.54	1.0	2.0
A	H3N2	A/Osaka/7522/97	0.72	2.1	5.6
臨床分離株					
A	H1N1	A/Kadoma/3/2006	1.8	8.3	7.3
A	H1N1	A/Sendai H/1049/2007	2.0	9.1	9.1
A	H3N2	A/Kadoma/1/2003	11	14	14
A	H3N2	A/Sendai H/F494/2007	3.3	4.6	7.4
A	H3N2	A/Sendai H/F570/2007	2.9	3.9	4.6
実験室株					
B	-	B/Maryland/1/59	17	28	22
B	-	B/Lee/40	15	59	40
B	-	B/Hong Kong/5/72	14	51	36
臨床分離株					
B	-	B/Kadoma/1/2005	6.8	39	14
B	-	B/Sendai H/1051/2007	15	79	30

独立した 3 回の実験結果より平均 IC₅₀ 値を算出。1 回の実験は 2 重測定で実施。

(続く)

2.6.3.2.1.1 季節性ヒトインフルエンザウイルスの NA に対する阻害作用 (続き)

(2) MUNANA を基質として用いた試験 (1)

被験物質：ペラミビル水和物
試験報告書添付場所：4.2.1.1-02
試験番号：PMV-EB-037-N

対照物質	オセルタミビルカルボン酸
動物種/標本	インフルエンザウイルス
試験方法	MUNANA を基質として用い，4-methylumbelliferone 遊離を定量する酵素阻害
評価項目	NA 阻害作用，IC ₅₀
試験条件及び評価方法	試験物質 [ペラミビル及びオセルタミビルカルボン酸 (最終濃度：0.032～100 nmol/L)]，反応緩衝液 [最終濃度：33 mmol/L 2-(N-Morpholino) ethanesulfonic acid, 4 mmol/L CaCl ₂ 及び 120 mmol/L NaCl]，MUNANA 溶液 (最終濃度：10 µmol/L) 並びにウイルス NA を各 25 µL ずつ混合し，37°C で 30 分間インキュベート後，遊離した 4-methylumbelliferone の蛍光を 360/460 nm にて測定した。

(続く)

2.6.3.2.1.1 季節性ヒトインフルエンザウイルスの NA に対する阻害作用 (続き)

インフルエンザウイルス NA に対するペラミビルの阻害作用

型	亜型	株名	IC ₅₀ (nmol/L)	
			ペラミビル	オセルタミビル カルボン酸
実験室株				
A	H1N1	A/WS/33	0.31	0.98
A	H3N2	A/Victoria/3/75	0.98	0.66
臨床分離株				
A	H1N1	A/Kadoma/3/2006	0.54	1.31
A	H1N1	A/Kadoma/4/2006	0.48	0.87
A	H3N2	A/Kadoma/1/2003	1.06	0.52
A	H3N2	A/Kadoma/2/2005	1.10	0.80
A	H3N2	A/Kadoma/1/2006	0.72	0.34
A	H3N2	A/Kadoma/2/2006	0.98	0.51
実験室株				
B	-	B/Lee/40	0.40	1.47
B	-	B/Maryland/1/59	1.92	3.29
B	-	B/Russia/69	1.71	4.22
B	-	B/Hong Kong/5/72	1.80	6.07
臨床分離株				
B	-	B/Kadoma/2/2005	1.37	5.55
B	-	B/Kadoma/1/2005	1.78	5.93

独立した 3 回の実験結果より平均 IC₅₀ 値を算出. 1 回の実験は 3 重測定で実施.

(続く)

2.6.3.2.1.1 季節性ヒトインフルエンザウイルスの NA に対する阻害作用 (続き)

(3) MUNANA を基質として用いた試験 (2)

被験物質：ペラミビル水和物
試験報告書添付場所：4.2.1.1-03
試験番号：S-021812-EB-111-N

対照物質	オセルタミビルカルボン酸及びザナミビル
動物種/標本	インフルエンザウイルス
試験方法	MUNANA を基質として用い、4-methylumbelliferone 遊離を定量する酵素阻害
評価項目	NA 阻害作用, IC ₅₀
試験条件及び評価方法	試験物質 [ペラミビル, オセルタミビルカルボン酸及びザナミビル (最終濃度: 0.032~100 nmol/L)], 反応緩衝液 [最終濃度: 33 mmol/L 2-(N-Morpholino) ethanesulfonic acid, 4 mmol/L CaCl ₂ 及び 120 mmol/L NaCl], MUNANA 溶液 (最終濃度: 10 µmol/L) 並びにウイルス NA を各 25 µL ずつ混合し, 37°C で 30 分間インキュベート後, 遊離した 4-methylumbelliferone の蛍光を 355/460 nm にて測定した.

インフルエンザウイルス NA に対するペラミビルの阻害作用

型	亜型	株名	IC ₅₀ (nmol/L)		
			ペラミビル	オセルタミビル カルボン酸	ザナミビル
実験室株					
A	H1N1	A/FM/1/47	0.50	0.94	1.24
A	H1N1	A/New Jersey/8/76	0.85	1.17	3.21
A	H1N1	A/NWS/33	0.91	1.45	2.39
A	H1N1	A/Osaka/12/92	0.63	1.10	1.65
A	H1N1	A/swine/Iowa/15/30	0.94	1.61	3.01
A	H1N1	A/USSR/92/77	0.56	1.46	1.43
A	H1N1	A/Weiss/43	0.54	1.54	1.52
A	H1N1	A/WSN/33	0.56	1.56	1.50
A	H2N2	A/Adachi/1/57	1.77	1.04	6.42

独立した 3 回又は 2 回の実験結果より平均 IC₅₀ 値を算出。1 回の実験は 2 重測定で実施。

(続く)

2.6.3.2.1.1 季節性ヒトインフルエンザウイルスの NA に対する阻害作用 (続き)

インフルエンザウイルス NA に対するペラミビルの阻害作用 (続き)

型	亜型	株名	IC ₅₀ (nmol/L)		
			ペラミビル	オセルタミビル カルボン酸	ザナミビル
実験室株 (続き)					
A	H2N2	A/Kumamoto/Y5/67	1.39	0.82	4.72
A	H2N2	A/Singapore/1/57	1.51	0.88	4.94
A	H3N2	A/Aichi	1.33	1.12	4.19
A	H3N2	A/Alice	1.32	0.83	4.85
A	H3N2	A/HongKong/8/68	1.27	1.09	4.14
A	H3N2	A/Matsubara	1.52	1.16	9.07
A	H3N2	A/Mie/7519/97	1.40	1.15	8.78
A	H3N2	A/Osaka/7522/97	1.18	1.04	7.69
A	H3N2	A/Port Chalmers/1/73	1.48	0.96	6.34
臨床分離株					
A	H1N1	A/Kadoma/15/2007 (2007-268)	0.68	1.09	1.90
A	H1N1	A/Sendai H/1049/2007	0.60	0.97	1.84
A	H1N1	A/Sendai H/F648/2007	0.65	0.95	1.76
A	H1N1	A/Sendai H/K133/2007	0.55	0.96	1.73
A	H3N2	A/Kadoma/71/2007 (2007-334)	1.07	0.72	3.26
A	H3N2	A/Kadoma/31/2007 (2007-336)	1.72	1.11	5.05
A	H3N2	A/Kadoma/1/2004	1.13	0.59	4.15
A	H3N2	A/Kadoma/1/2005	0.92	0.54	2.91
A	H3N2	A/Sendai H/38/2007	1.49	1.00	4.38
A	H3N2	A/Sendai H/721/2007	1.39	0.96	4.18
A	H3N2	A/Sendai H/F437/2007	1.07	0.72	2.80
A	H3N2	A/Sendai H/F494/2007	1.52	1.06	4.80
A	H3N2	A/Sendai H/F570/2007	1.35	0.85	3.53

独立した 3 回又は 2 回の実験結果より平均 IC₅₀ 値を算出. 1 回の実験は 2 重測定で実施.

(続く)

2.6.3.2.1.1 季節性ヒトインフルエンザウイルスの NA に対する阻害作用 (続き)

インフルエンザウイルス NA に対するペラミビルの阻害作用 (続き)

型	亜型	株名	IC ₅₀ (nmol/L)		
			ペラミビル	オセルタミビル	ザナミビル
臨床分離株 (続き)					
A	H3N2	A/Sendai H/K78/2007	1.35	0.91	3.78
A	H3N2	A/Sendai H/K87/2007	1.51	1.00	4.53
実験室株					
B	-	B/Allen/45	2.41	4.39	8.31
B	-	B/GL/1739/54	3.41	5.95	9.88
B	-	B/Kanagawa/3/76	2.48	5.29	10.1
B	-	B/Taiwan/2/62	2.28	4.66	10.2
臨床分離株					
B	-	B/Kadoma/19/2007 (2007-297)	54.2	18.0	13.7
B	-	B/Kadoma/26/2007 (2007-319)	2.25	8.74	7.40
B	-	B/Sendai H/1026/2007	4.12	14.0	10.2
B	-	B/Sendai H/1051/2007	4.26	13.1	10.9
B	-	B/Sendai H/40/2007	2.78	9.59	8.51
B	-	B/Sendai H/43/2007	2.33	8.95	7.48
B	-	B/Sendai H/F603/2007	2.32	9.14	7.47
B	-	B/Sendai H/F646/2007	2.27	9.04	7.13
B	-	B/Sendai H/K128/2007	2.46	8.52	7.29
B	-	B/Sendai H/K147/2007	1.82	8.31	7.12

独立した 3 回又は 2 回の実験結果より平均 IC₅₀ 値を算出. 1 回の実験は 2 重測定で実施.

B/Kanagawa/3/76 株のみ 3 回の実験のうち 1 回が単測定で実施.

2.6.3.2.1.2 様々な亜型の NA に対するペラミビルの阻害作用

被験物質：ペラミビル水和物
試験報告書添付場所：4.2.1.1-04
試験番号：PMV-EB-033-N

対照物質	オセルタミビルカルボン酸
動物種/標本	インフルエンザウイルス
試験方法	MUNANA を基質として用い，4-methylumbelliferone 遊離を定量する酵素阻害
評価項目	NA 阻害作用，IC ₅₀
試験条件及び評価方法	試験物質 [ペラミビル及びオセルタミビルカルボン酸 (最終濃度：0.032～100 nmol/L)]，反応緩衝液 [最終濃度：33 mmol/L 2-(N-Morpholino) ethanesulfonic acid, 4 mmol/L CaCl ₂ 及び 120 mmol/L NaCl]，MUNANA 溶液 (最終濃度：10 µmol/L) 並びにウイルス NA を各 25 µL ずつ混合し，37°C で 30 分間インキュベート後，遊離した 4-methylumbelliferone の蛍光を 360/460 nm にて測定した。

(続く)

2.6.3.2.1.2 様々な亜型の NA に対するペラミビルの阻害作用 (続き)

様々な亜型のインフルエンザウイルス NA 活性に対するペラミビルの阻害作用

株名	亜型	IC ₅₀ (nmol/L)	
		ペラミビル	オセルタミビル カルボン酸
A/PR/8/34	H1N1	0.50	1.40
A/duck/Hokkaido/W159/06	H6N1	0.62	2.09
A/duck/Hokkaido/13/00	H9N2	1.12	0.86
A/duck/Hokkaido/84/02	H5N3	0.90	1.03
A/duck/Hokkaido/17/01	H2N3	0.69	0.99
A/turkey/Ontario/6118/68	H8N4	0.91	1.22
A/duck/Hokkaido/18/00	H10N4	0.51	1.22
A/duck/Alberta/60/76	H12N5	0.30	1.02
A/duck/Hokkaido/1058/01	H4N5	0.24	0.99
A/duck/England/1/56	H11N6	0.82	1.21
A/duck/Hokkaido/W186/06	H13N6	0.69	1.19
A/seal/Massachusetts/1/80	H7N7	0.85	0.86
A/chicken/Germany/N/49	H10N7	1.18	2.46
A/duck/Ukraine/1/63	H3N8	0.39	3.38
A/duck/Hokkaido/228/03	H6N8	0.35	2.19
A/duck/Memphis/546/74	H11N9	0.45	1.18
A/duck/Hokkaido/W245/04	H11N9	0.39	1.13

独立した 3 回の実験結果より平均 IC₅₀ 値を算出. 1 回の試験は 3 重測定で実施.

2.6.3.2.1.3 ペラミビルによる NA 阻害作用の選択性に関する検討

(1) 細菌由来 NA に対するペラミビルの阻害作用

被験物質：ペラミビル水和物
試験報告書添付場所：4.2.1.1-05
試験番号：PMV-EB-032-N

対照物質	オセルタミビルカルボン酸
動物種/標本	細菌由来 NA 及びインフルエンザウイルス
試験方法	MUNANA を基質として用い、4-methylumbelliferone 遊離を定量する酵素阻害
評価項目	NA 阻害作用, IC ₅₀
試験条件及び評価方法	試験物質 [ペラミビル及びオセルタミビルカルボン酸 (最終濃度：0.032 nmol/L～1000 μmol/L)], 反応緩衝液 [最終濃度：33 mmol/L 2-(N-Morpholino) ethanesulfonic acid, 4 mmol/L CaCl ₂ 及び 120 mmol/L NaCl], MUNANA 溶液 (最終濃度：10 μmol/L) 並びにウイルス NA を各 25 μL ずつ混合し, 37°C で 30 分間インキュベート後, 遊離した 4-methylumbelliferone の蛍光を 360/460 nm にて測定した.

細菌由来 NA に対するペラミビルの阻害作用

	IC ₅₀ (μmol/L)	
	ペラミビル	オセルタミビル カルボン酸
細菌由来 NA		
<i>Arthrobacter ureafaciens</i>	>1000	17.6
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	>1000	10.7
<i>Vibrio cholerae</i>	24.8	277.4
インフルエンザウイルス NA		
B/Hong Kong/5/72	0.00111	0.00541

独立した 3 回の実験結果より平均 IC₅₀ 値を算出. 1 回の実験は 3 重測定で実施.

2.6.3.2.1.3 ペラミビルによる NA 阻害作用の選択性に関する検討 (続き)

(2) ヒトシアリダーゼに対するペラミビルの阻害作用

被験物質：ペラミビル水和物
 試験報告書添付場所：4.2.1.1-06
 試験番号：S-021812-EB-130-N

対照物質	なし
動物種/標本	組換えヒトシアリダーゼ NEU1～NEU4
試験方法	MUNANA を基質として用い、4-methylumbelliferone 遊離を定量する酵素阻害 (NEU1, NEU2 及び NEU4) Ganglioside GM3 を基質として用い、N-アセチルノイラミン酸遊離を定量する酵素阻害 (NEU3)
評価項目	NA 阻害作用, IC ₅₀
試験条件及び評価方法	【NEU1, NEU2 及び NEU4】ペラミビル (最終濃度：0.32～5000 µmol/L) 50 µL, 反応緩衝液 (最終濃度：0.1 mol/L sodium acetate) 20 µL, MUNANA 溶液 (最終濃度：20 µmol/L) 20 µL 及びヒトシアリダーゼ 10 µL を混合し、37°C で 30 分間インキュベート後、遊離した 4-methylumbelliferone の蛍光を 360/460 nm にて測定した。【NEU3】ペラミビル (最終濃度：0.32～5000 µmol/L) 50 µL, 反応緩衝液 (最終濃度：0.1 mol/L sodium acetate) 20 µL, TritonX-100 (最終濃度：0.1%) 10 µL, Ganglioside GM3 溶液 (最終濃度：200 µmol/L) 10 µL 及びヒトシアリダーゼ 10 µL を混合し、37°C で 60 分間インキュベートした。50 µL の過ヨウ素酸試薬を加え混合し、室温で 20 分間インキュベートした後、亜ヒ酸試薬を加え混合した。チオバルビツール酸試薬を 1.25 mL 加え混合し、80°C で 15 分間インキュベートした後、1 分間氷中にて冷却した。1.5 mL の Warrenoff 試薬を加え混合し、遠心後上層をマルチウエルプレートに採取後、549 nm の吸光度を測定した。

(続く)

2.6.3.2.1.3 ペラミビルによる NA 阻害作用の選択性に関する検討 (続き)

ヒトシアリダーゼに対するペラミビルの阻害作用

	IC ₅₀ (μmol/L)	
	ペラミビル	DANA
ヒトシアリダーゼ		
NEU1	>5000	160
NEU2	150	18
NEU3	>5000	92
NEU4	>5000	3.4
インフルエンザウイルス シアリダーゼ		
A/PR/8/34	0.00025	N.D.

3 回以上の独立した実験結果より平均 IC₅₀ 値を算出.

N.D. : 実施せず.

DANA : 2,3-Dehydro-2-deoxy-N-acetylneuraminic acid.

2.6.3.2.1.4 NA 以外のレセプター，イオンチャネル及びトランスポータに対するペラミビルの結合阻害作用

被験物質：ペラミビル水和物
試験報告書添付場所：4.2.1.1-07
試験番号：S-021812-EF-127-N (AL-4143-G)

対照物質	なし
動物種/標本	ヒト、ラット、ウシ、ウサギ、モルモット/63 種類のレセプター，イオンチャネル及びトランスポータ
試験方法	各種レセプター，イオンチャネル及びトランスポータとそれぞれのリガンドとの結合に対するペラミビルの結合阻害試験
評価項目	一定濃度のペラミビルが放射性リガンドの受容体に対する結合を阻害する割合 (%)
試験条件及び評価方法	ペラミビル (最終濃度：10 $\mu\text{mol/L}$)，反応緩衝液 (組成は受容体に依る)， ^3H 又は ^{125}I 標識リガンド (最終濃度はリガンドに依る) 及びレセプター，イオンチャネル又はトランスポータを混合し，一定条件にて反応させた．反応後，反応液をフィルターに通して，フィルター上にレセプター，イオンチャネル又はトランスポータを吸着させた．フィルターを緩衝液で洗浄後，放射活性を測定した．

(続く)

2.6.3.2.1.4 NA 以外のレセプター，イオンチャネル及びトランスポーターに対するペラミビルの結合阻害作用（続き）

各種レセプター，イオンチャネル及びトランスポーターとリガンドの結合に対するペラミビルの阻害作用

レセプター，イオンチャネル又は トランスポーター	結合阻害 (%)		
	ペラミビル	陽性対照化合物	
Adenosine A1 (Human)	0.67	99.97	(DPCPX)
Adenosine A2a (Human)	0.00	100.00	(CGS21680)
Adenosine A2b (Human)	2.55	94.78	(DPCPX)
α 1A-Adrenergic (Human)	25.46	98.37	(HEAT)
α 1B-Adrenergic (Human)	0.82	99.79	(Prazosin)
α 2A-Adrenergic (Human)	1.86	93.36	(Rauwolscine)
α 2B-Adrenergic (Human)	0.00	98.98	(Rauwolscine)
α 2C-Adrenergic (Human)	0.59	100.00	(Rauwolscine)
β 1-Adrenergic (Human)	1.04	99.36	[($\pm$)-Propranolol]
β 2-Adrenergic (Human)	0.00	100.00	[($\pm$)-Propranolol]
β 3-Adrenergic (Human)	13.38	100.00	[($\pm$)-Propranolol]
Bezodiazepine (Bovine)	0.89	99.35	(Diazepam)
Ca Channel (Type L, Benzothiazepine: Rat)	9.29	99.72	[(+)- <i>cis</i> -Diltiazem]
Ca Channel (Type L, Dihydropyridine: Rat)	1.99	100.00	(Nitrendipine)
Ca Channel (Type L, Phenylalkylamine: Rat)	2.10	98.29	[($\pm$)-Methoxyverapamil]
Ca Channel (Type N: Rat)	0.00	100.00	(ω -Conotoxin GVIA)
Cannabinoid CB1 (Human)	15.92	98.58	[(<i>R</i>)-(+)-WIN55212-2]

ペラミビル濃度： 1×10^{-5} mol/L. 陽性対照化合物濃度： 1×10^{-7} ， 1×10^{-6} 又は 1×10^{-5} mol/L.

2 重測定の実験結果より平均結合阻害率 (%) を算出.

結合阻害率は 100% から以下の式で得られた結合率を減ずることによって算出.

結合率 = $[(B - N) / (B_0 - N)] \times 100$ (%)

B：ペラミビル存在下での結合放射能活性 (個別データ).

B₀：ペラミビル非存在下での総結合放射能活性 (平均値).

N：非特異的結合放射能活性 (平均値).

(続く)

2.6.3.2.1.4 NA 以外のレセプター、イオンチャネル及びトランスポーターに対するペラミビルの結合阻害作用 (続き)

各種レセプター、イオンチャネル及びトランスポーターとリガンドの結合に対するペラミビルの阻害作用 (続き)

レセプター、イオンチャネル又は トランスポーター	結合阻害 (%)		
	ペラミビル	陽性対照化合物	
Dopamine D1 (Human)	1.66	100.00	[R(+)-SCH-23390]
Dopamine D1A (Human)	0.87	100.00	[R(+)-SCH-23390]
Dopamine D2 (Human)	0.21	99.84	[(+)-Butaclamol]
Dopamine D2 Short (Human)	6.71	96.88	[(+)-Butaclamol]
Dopamine D2 Long (Human)	0.00	100.00	[(+)-Butaclamol]
Dopamine Transporter (Human)	0.96	100.00	(GBR12909)
GABA A (Agonist Site: Rat)	5.44	100.00	(Muscimol)
GABA A (BZ Central: Rat)	0.00	100.00	(Diazepam)
GABA A (Chloride Channel: Rat)	6.13	90.75	(Picrotoxin)
GABA Transporter (Rat)	1.14	97.23	(GABA)
GABA B1a (Human)	0.97	99.25	(CGP54626)
GABA B1b (Human)	0.05	99.96	(CGP54626)
GABA B1a+R2 (Human)	1.73	99.11	(CGP54626)
GABA B1b+R2 (Human)	1.03	99.60	(CGP54626)

ペラミビル濃度 : 1×10^{-5} mol/L. 陽性対照化合物濃度 : 1×10^{-7} , 1×10^{-6} 又は 1×10^{-5} mol/L.

2 重測定の実験結果より平均結合阻害率 (%) を算出.

結合阻害率は 100% から以下の式で得られた結合率を減ずることによって算出.

結合率 = $[(B - N) / (B_0 - N)] \times 100$ (%)

B : ペラミビル存在下での結合放射能活性 (個別データ).

B₀ : ペラミビル非存在下での総結合放射能活性 (平均値).

N : 非特異的結合放射能活性 (平均値).

(続く)

2.6.3.2.1.4 NA 以外のレセプター，イオンチャネル及びトランスポーターに対するペラミビルの結合阻害作用（続き）

各種レセプター，イオンチャネル及びトランスポーターとリガンドの結合に対するペラミビルの阻害作用（続き）

レセプター，イオンチャネル又は トランスポーター	結合阻害 (%)		
	ペラミビル	陽性対照化合物	
Glutamate (Non-selective: Rat)	0.69	100.00	(L-Glutamic acid)
Glutamate (AMPA: Rat)	0.00	98.46	[(S)-AMPA]
Glutamate (Kainate: Rat)	3.11	100.00	(Kainic acid)
Glutamate (NMDA Agonist Site: Rat)	0.00	98.90	(L-Glutamic acid)
Glutamate (NMDA Glycine Site: Rat)	5.00	100.00	(MDL105,519)
Glutamate (NMDA Phencyclidine Site: Rat)	0.00	97.83	[(+)-MK-801]
Glutamate (NMDA Polyamine Site: Rat)	4.96	92.90	(Ifenprodil)
Histamine H1 (Human)	4.17	100.00	(Pyrilamine)
Histamine H2 (Human)	0.00	96.16	(Cimetidine)
K Channel KA (Rat)	3.20	100.00	(α -Dendrotoxin)
K Channel KATP (Rat)	0.00	100.00	(Glybenclamide)
K Channel Kv (Rat)	1.23	99.89	(Charybdotoxin)
K Channel SkCa (Rat)	0.02	100.00	(Apamin)
K Channel hREG (Human)	5.65	98.49	(BeKm-1)
Monoamine Transporter (Rabbit)	0.59	99.16	(Ketanserin)
Muscarinic (Non-selective) (Rat)	0.00	99.86	(Atropine)
Muscarinic M1 (Human)	0.49	100.00	(Atropine)
Muscarinic M2 (Human)	3.26	100.00	(Atropine)

ペラミビル濃度： 1×10^{-5} mol/L. 陽性対照化合物濃度： 1×10^{-7} ， 1×10^{-6} 又は 1×10^{-5} mol/L.

2 重測定の実験結果より平均結合阻害率 (%) を算出.

結合阻害率は 100% から以下の式で得られた結合率を減ずることで算出.

結合率 = $[(B - N) / (B_0 - N)] \times 100$ (%)

B：ペラミビル存在下での結合放射能活性 (個別データ)

B₀：ペラミビル非存在下での総結合放射能活性 (平均値)

N：非特異的結合放射能活性 (平均値)

(続く)

2.6.3.2.1.4 NA 以外のレセプター，イオンチャネル及びトランスポーターに対するペラミビルの結合阻害作用（続き）

各種レセプター，イオンチャネル及びトランスポーターとリガンドの結合に対するペラミビルの阻害作用（続き）

レセプター，イオンチャネル又は トランスポーター	結合阻害 (%)		
	ペラミビル	陽性対照化合物	
Opiate (Non-selective: Rat)	4.06	100.00	(Naloxone)
Opiate δ (Human)	2.47	95.40	(Naltriben)
Opiate κ (Human)	0.00	100.00	(U-69593)
Opiate μ (Human)	6.26	100.00	(DAMGO)
Opiate ORL1 (Human)	5.08	93.66	(Orphanin FQ)
Serotonin 5HT1A (Human)	1.17	100.00	(Serotonin)
Serotonin 5HT1B (Human)	12.07	99.72	(GR127935)
Serotonin 5HT2A (Human)	2.06	99.34	(Ketanserin)
Serotonin 5HT2B (Human)	40.42	100.00	(Serotonin)
Serotonin 5HT2C (Human)	0.00	100.00	(Mianserin)
Serotonin Transporter (Human)	2.11	100.00	(Imipramine)
Sigma (Non-selective: Guinea pig)	2.40	93.31	(Haloperidol)
Sigma $\sigma 1$ (Guinea pig)	0.80	98.22	[(+)-Pentazocine]
Vasopressin V1 (Rat)	2.19	95.09	([Arg ⁸]-Vasopressin)

ペラミビル濃度： 1×10^{-5} mol/L. 陽性対照化合物濃度： 1×10^{-7} , 1×10^{-6} 又は 1×10^{-5} mol/L.

2 重測定の実験結果より平均結合阻害率 (%) を算出.

結合阻害率は 100% から以下の式で得られた結合率を減ずることによって算出.

結合率 = $[(B - N) / (B_0 - N)] \times 100$ (%)

B：ペラミビル存在下での結合放射能活性(個別データ)

B₀：ペラミビル非存在下での総結合放射能活性 (平均値)

N：非特異的結合放射能活性 (平均値)

2.6.3.2.2 *In vitro* ウイルス増殖抑制作用

2.6.3.2.2.1 感染細胞からのウイルス放出に対する作用

被験物質：ペラミビル水和物
試験報告書添付場所：4.2.1.1-08
試験番号：PMV-EB-035-N

対照物質	オセルタミビルカルボン酸及びザナミビル
動物種/標本	インフルエンザウイルス，RPMI2650 細胞（ヒト鼻中隔由来細胞株）及び MDCK 細胞
試験方法	ウイルス感染細胞から放出されるウイルス粒子の産生抑制効果
評価項目	ウイルス産生抑制作用，90%阻害濃度（IC ₉₀ ）
試験条件及び評価方法	マルチウェルプレートに培養した RPMI2650 細胞にウイルスを接種し，37℃ で 1 時間インキュベートした．細胞表面を培地で洗浄後，試験物質 [ペラミビル，オセルタミビルカルボン酸及びザナミビル（最終濃度：0.32～5000 nmol/L）] 及びトリプシン（最終濃度：2 µg/mL）を含む培地を添加し，37℃ で 2 日間インキュベートし，培養上清を採取した．培養上清を MDCK 細胞に接種し，3～4 日間培養後の細胞変性効果を観察することにより，培養上清中のウイルス量を 50%組織培養感染価（TCID ₅₀ ）として算出し，対照群の 10%まで TCID ₅₀ 値を減少させる薬物濃度を IC ₉₀ 値とした．

(続く)

2.6.3.2.2.1 感染細胞からのウイルス放出に対する作用 (続き)

インフルエンザウイルス A 型及び B 型に対するペラミビルのウイルス放出抑制作用

型	亜型	株名	IC ₉₀ (nmol/L)		
			ペラミビル	オセルタミビル カルボン酸	ザナミビル
A	H1N1	A/Kadoma/3/2006	57	>1000 ^{a)}	1000 ^{b)}
A	H1N1	2007-268	56	>1000 ^{a)}	460
A	H1N1	A/SendaiH/1049/2007	180	560 ^{c)}	>1000 ^{a)}
A	H1N1	A/SendaiH/K133/2007	13	710 ^{b)}	310
A	H3N2	A/Kadoma/1/2005	72	81 ^{b)}	>1000 ^{a)}
A	H3N2	A/SendaiH/F494/2007	1800 ^{b)}	>5000 ^{a)}	>5000 ^{a)}
B	-	B/Kadoma/1/2005	320	280 ^{c)}	170
B	-	B/Kadoma/2/2005	490	900 ^{c)}	130 ^{b)}
B	-	B/SendaiH/43/2007	150	940 ^{c)}	420
B	-	B/SendaiH/F646/2007	110	>1000 ^{a)}	470 ^{b)}

独立した 3 回の実験結果より平均 IC₉₀ 値を算出.

a) 3 回の実験の IC₉₀ 値はいずれも設定濃度以上.

b) 2 回の実験の平均 IC₉₀ 値. 他の 1 回の実験の IC₉₀ 値は設定濃度以上.

c) 1 回の実験の IC₉₀ 値. 他の 2 回の実験の IC₉₀ 値は設定濃度以上.

2.6.3.2.2.2 感染細胞におけるプラーク形成に対する作用

(1) 実験室株

被験物質：ペラミビル水和物
 試験報告書添付場所：4.2.1.1-09
 試験番号：S-021812-EB-115-N

対照物質	オセルタミビルカルボン酸及びザナミビル
動物種/標本	インフルエンザウイルス及び MDCK 細胞
試験方法	ウイルスが形成するプラークの抑制効果
評価項目	プラーク形成抑制作用, 50%有効濃度 (EC ₅₀)
試験条件及び評価方法	マルチウェルプレートに培養した MDCK 細胞にウイルスを接種し, 37°C で 1 時間インキュベートした. 細胞表面を平衡塩溶液で洗浄後, 試験物質 [ペラミビル (最終濃度: 0.0128~1000 nmol/L), オセルタミビルカルボン酸 (最終濃度: 0.064~1000 nmol/L) 及びザナミビル (最終濃度: 0.064~1000 nmol/L)], トリプシン (最終濃度: 2 µg/mL) 及びアガーノーブル (最終濃度: 0.8%) を含む培地 3 mL を重層し, 37°C で 3 日間インキュベートした. 3 日後, 0.01%ニュートラルレッド溶液を 1 mL 重層し, 37°C で 2 時間以上インキュベートした. ニュートラルレッド水溶液を除去後, 形成されたプラーク数を計測した.

インフルエンザウイルス A 型及び B 型実験室株に対するペラミビルのプラーク形成阻害作用

型	亜型	株名	EC ₅₀ (nmol/L)		
			ペラミビル	オセルタミビル カルボン酸	ザナミビル
A	H1N1	A/WS/33	15	60	37
A	H1N1	A/PR/8/34	0.93	140	5.8
A	H3N2	A/Victoria/3/75	0.36	0.78	4.6
B	-	B/Lee/40	25	31	21
B	-	B/Maryland/1/59	26	42	29

独立した 3 回の実験結果より平均 EC₅₀ 値を算出.

(続く)

2.6.3.2.2.2 感染細胞におけるプラーク形成に対する作用 (続き)

(2) 臨床分離株

被験物質：ペラミビル水和物
試験報告書添付場所：4.2.1.1-10
試験番号：S-021812-EB-108-N

対照物質	オセルタミビルカルボン酸及びザナミビル
動物種/標本	インフルエンザウイルス及び MDCK 細胞
試験方法	ウイルスが形成するプラークの抑制効果
評価項目	プラーク形成抑制作用, EC ₅₀
試験条件及び評価方法	マルチウェルプレートに培養した MDCK 細胞にウイルスを接種し, 37°C で 1 時間インキュベートした. 細胞表面を平衡塩溶液で洗浄後, 試験物質 [ペラミビル (最終濃度: 0.0128~1000 nmol/L), オセルタミビルカルボン酸 (最終濃度: 0.064~1000 nmol/L) 及びザナミビル (最終濃度: 0.064~1000 nmol/L)], トリプシン (最終濃度: 2 µg/mL) 及びアガーノーブル (最終濃度: 0.8%) を含む培地 3 mL を重層し, 37°C で 3 日間インキュベートした. 3 日後, 0.01%ニュートラルレッド溶液を 1 mL 重層し, 37°C で 2~3 時間インキュベートした. ニュートラルレッド水溶液を除去後, 形成されたプラーク数を計測した.

(続く)

2.6.3.2.2.2 感染細胞におけるプラーク形成に対する作用 (続き)

インフルエンザウイルス A 型及び B 型臨床分離株に対するペラミビルのプラーク形成阻害作用

型	亜型	株名	EC ₅₀ (nmol/L)		
			ペラミビル	オセルタミビル カルボン酸	ザナミビル
A	H1N1	A/Kadoma/3/06	0.48	7.5	13
A	H1N1	A/Sendai-H/K133/2007	17	200	130
A	H1N1	A/Sendai-H/1049/2007	18	360	75
A	H3N2	A/Kadoma/1/04	0.16	11	25
A	H3N2	A/Kadoma/1/05 ^{a)}	0.39	5.3	12
A	H3N2	A/Kadoma/1/06	0.064	260	3.6
A	H3N2	A/Sendai-H/F494/2007 ^{a)}	1.9	32	59
B	-	B/Kadoma/2/05	4.8	47	7.9
B	-	B/Sendai-H/0040/2007	120	720	150
B	-	B/2007-297	52	30	7.9

独立した 3 回の試験結果より平均 IC₅₀ 値を算出.

a) プラーク直径の実測値より算出した面積で評価.

2.6.3.2.2.3 感染細胞における増殖抑制効果

被験物質：ペラミビル水和物
 試験報告書添付場所：4.2.1.1-11
 試験番号：PMV-EB-034-N

対照物質	オセルタミビルカルボン酸
動物種/標本	インフルエンザウイルス及び MDCK 細胞
試験方法	ウイルスによる細胞変性効果の抑制作用
評価項目	ウイルス増殖抑制作用, EC ₅₀
試験条件及び評価方法	試験物質 [ペラミビル及びオセルタミビルカルボン酸 (最終濃度: 3.91~5000 nmol/L)] を含む培地 50 µL, ウイルス液 50 µL, トリプシン (6 µg/mL) を含む細胞浮遊液 100 µL を混合し, 37°C で 3 日間インキュベートした. インキュベート後 10 µL の WST-8 試薬を添加し, 37°C で 2 時間インキュベートした. 10 µL の 10%ラウリル硫酸ナトリウム溶液を加え混合し, 450 nm の吸光度を測定した.

インフルエンザウイルス A 型及び B 型に対するペラミビルの増殖抑制作用

株名	EC ₅₀ (µmol/L)	
	ペラミビル	オセルタミビルカルボン酸
A/WS/33 (H1N1)	0.236	4.324 ^{a)}
A/Victoria/3/75 (H3N2)	0.013	0.045
B/Lee/40	1.739	3.907 ^{b)}
B/Maryland/1/59	0.104	0.130
B/Russia/69	0.287	0.318
B/Hong Kong/5/72	0.788	1.994

独立した 3 回の実験結果より平均 EC₅₀ 値を算出.
 a) 1 回の実験の EC₅₀ 値. 他の 2 回の実験の EC₅₀ 値は設定濃度 (5 µmol/L) 以上.
 b) 2 回の実験の平均 EC₅₀ 値. 他の 1 回の実験の EC₅₀ 値は設定濃度 (5 µmol/L) 以上.

2.6.3.2.3 インフルエンザウイルス感染マウス致死モデルにおけるペラミビル水和物の *in vivo* 治療効果

2.6.3.2.3.1 A 型ウイルス感染マウス致死モデルにおける治療効果

(1) A/WS/33 株

被験物質：ペラミビル水和物
試験報告書添付場所：4.2.1.1-12
試験番号：PMV-EB-038-N

対照物質	オセルタミビルリン酸塩
動物種	BALB/c 雌マウス
試験方法	A 型インフルエンザウイルス (A/WS/33 株) 感染マウスの致死抑制試験
評価項目	致死抑制効果の有意差検定, 50%有効量 (ED ₅₀ : 50%の生存率を得るために必要な一日あたりの投与量)
試験条件及び評価方法	麻酔下において 100%致死量の A/WS/33 ウイルスをマウスに接種し, 接種 48 時間後より試験物質投与を開始した. ペラミビル水和物は, 生理食塩水に溶解して, 0.3, 1, 3 及び 10 mg/kg を単回静脈内投与した. オセルタミビルリン酸塩は, 0.5%メチルセルロース水溶液に溶解して, 0.3, 1, 3 及び 10 mg/kg/日にて 1 日 2 回 5 日間反復経口投与又は 10 mg/kg を単回経口投与した. 媒体投与群には 0.5%メチルセルロースを 1 日 2 回 5 日間反復経口投与した. ウイルス接種より 14 日間観察し, ウイルス感染マウスの生存率を指標として, ペラミビル投与群と媒体投与群, オセルタミビルリン酸塩投与群と媒体投与群, ペラミビル投与群とオセルタミビルリン酸塩投与群それぞれを Fisher's exact test により比較した. また, ED ₅₀ 値をロジスティック回帰分析により推定した.

(続く)

2.6.3.2.3.1 A型ウイルス感染マウス致死モデルにおける治療効果 (続き)

A/WS/33 株 (H1N1 亜型) 感染マウス致死モデルにおけるペラミビル水和物の単回静脈内投与による治療効果

化合物 (投与) ^{a)}	用量 [mg/kg (/日)]	生存数 ^{b)} /総数	ED ₅₀ [mg/kg (/日)]
媒体 [0.5%メチルセルロース] (1日2回5日間反復経口投与)	-	0/20	-
ペラミビル水和物 (単回静脈内投与)	0.3	0/10	1.5
	1	3/10	
	3	8/10 *	
	10	10/10 *	
オセルタミビルリン酸塩 (1日2回5日間反復経口投与)	0.3	0/10	3.0
	1	0/10	
	3	5/10 *	
	10	10/10 *	
オセルタミビルリン酸塩 (単回経口投与)	10	2/10	>10

A/WS/33 株の接種量 : 5×10^3 TCID₅₀/マウス.ペラミビルの IC₅₀ 値 : 0.31 nmol/L.オセルタミビルカルボン酸の IC₅₀ 値 : 0.98 nmol/L.

a) 接種 48 時間後から投与開始.

b) 接種 14 日目のマウス生存数.

* : P<0.05 (媒体投与群との Fisher's exact test による比較).

(続く)

2.6.3.2.3.1 A型ウイルス感染マウス致死モデルにおける治療効果（続き）

(2) A/PR/8/34 株

被験物質：ペラミビル水和物
試験報告書添付場所：4.2.1.1-13
試験番号：S-021812-EB-103-N

対照物質	オセルタミビルリン酸塩
動物種	BALB/c 雌マウス
試験方法	A 型インフルエンザウイルス (A/PR/8/34 株) 感染マウスの致死抑制試験
評価項目	致死抑制効果の有意差検定, ED ₅₀
試験条件及び評価方法	麻酔下において 100%致死量の A/PR/8/34 ウイルスをマウスに接種し、接種後直ぐに試験物質投与を開始した。ペラミビル水和物は、生理食塩水に溶解して、0.1, 0.3, 1, 3 及び 10 mg/kg を単回静脈内投与した。オセルタミビルリン酸塩は、0.5%メチルセルロース水溶液に溶解して、0.3, 1, 3, 10 及び 30 mg/kg/日にて 1 日 2 回 5 日間反復経口投与又は 10 及び 30 mg/kg を単回経口投与した。媒体投与群には 0.5%メチルセルロースを 1 日 2 回 5 日間反復経口投与した。ウイルス接種より 14 日間観察し、ウイルス感染マウスの生存率を指標として、ペラミビル投与群と媒体投与群、オセルタミビルリン酸塩投与群と媒体投与群、ペラミビル投与群とオセルタミビルリン酸塩投与群それぞれを Fisher's exact test により比較した。また、ED ₅₀ 値をロジスティック回帰分析により推定した。

(続く)

2.6.3.2.3.1 A型ウイルス感染マウス致死モデルにおける治療効果 (続き)

A/PR/8/34 株 (H1N1 亜型) 感染マウス致死モデルにおけるペラミビル水和物の単回静脈内投与による治療効果

化合物 (投与) ^{a)}	用量 [mg/kg (/日)]	生存数 ^{b)} /総数	ED ₅₀ [mg/kg (/日)]
媒体 [0.5%メチルセルロース] (1日2回5日間反復経口投与)	-	0/20	-
ペラミビル水和物 (単回静脈内投与)	0.1	0/10	0.4
	0.3	4/10 *	
	1	8/10 *,#	
	3	10/10 *,#	
	10	10/10 *,†	
オセルタミビルリン酸塩 (1日2回5日間反復経口投与)	0.3	0/9	6.7
	1	2/10	
	3	3/10 *	
	10	6/10 *	
	30	8/10 *	
オセルタミビルリン酸塩 (単回経口投与)	10	1/10	>30
	30	1/10	

A/PR/8/34 株の接種量：4 × 10² TCID₅₀/マウス.ペラミビル IC₅₀ 値：0.503 nmol/L.オセルタミビルカルボン酸 IC₅₀ 値：1.40 nmol/L.

a) 接種直後から投与開始.

b) 接種 14 日目のマウス生存数.

* : P<0.05 (媒体投与群との Fisher's exact test による比較).

: P<0.05 (同じ用量におけるオセルタミビルリン酸塩反復投与群との Fisher's exact test による比較).

† : P<0.05 (同じ用量におけるオセルタミビルリン酸塩単回投与群との Fisher's exact test による比較).

(続く)

2.6.3.2.3.1 A型ウイルス感染マウス致死モデルにおける治療効果（続き）

(3) A/Kumamoto/Y5/67 株

被験物質：ペラミビル水和物
試験報告書添付場所：4.2.1.1-14
試験番号：S-021812-EB-104-N

対照物質	オセルタミビルリン酸塩
動物種	BALB/c 雌マウス
試験方法	A 型インフルエンザウイルス (A/Kumamoto/Y5/67 株) 感染マウスの致死抑制試験
評価項目	致死抑制効果の有意差検定, ED ₅₀
試験条件及び評価方法	麻酔下において 100%致死量の A/Kumamoto/Y5/67 ウイルスをマウスに接種し、接種後直ぐに試験物質投与を開始した。ペラミビル水和物は、生理食塩水に溶解して、0.1, 0.3, 1, 3 及び 10 mg/kg を単回静脈内投与した。オセルタミビルリン酸塩は、0.5%メチルセルロース水溶液に溶解して、0.3, 1, 3, 10 及び 30 mg/kg/日にて 1 日 2 回 5 日間反復経口投与又は 10 及び 30 mg/kg を単回経口投与した。媒体投与群には 0.5%メチルセルロースを 1 日 2 回 5 日間反復経口投与した。ウイルス接種より 14 日間観察し、ウイルス感染マウスの生存率を指標として、ペラミビル投与群と媒体投与群、オセルタミビルリン酸塩投与群と媒体投与群、ペラミビル投与群とオセルタミビルリン酸塩投与群それぞれを Fisher's exact test により比較した。また、ED ₅₀ 値をロジスティック回帰分析により推定した。

(続く)

2.6.3.2.3.1 A型ウイルス感染マウス致死モデルにおける治療効果 (続き)

A/Kumamoto/Y5/67 株 (H2N2 亜型) 感染マウス致死モデルにおけるペラミビル水和物の単回静脈内投与による治療効果

化合物 (投与) ^{a)}	用量 [mg/kg (/日)]	生存数 ^{b)} /総数	ED ₅₀ [mg/kg (/日)]
媒体 [0.5%メチルセルロース] (1日2回5日間反復経口投与)	-	0/20	-
ペラミビル水和物 (単回静脈内投与)	0.1	0/10	0.9
	0.3	0/10	
	1	6/10 ^{*,#}	
	3	10/10 ^{*,#}	
	10	10/10 ^{*,†}	
オセルタミビルリン酸塩 (1日2回5日間反復経口投与)	0.3	0/10	3.4
	1	0/10	
	3	4/10 [*]	
	10	10/10 [*]	
	30	10/10 [*]	
オセルタミビルリン酸塩 (単回経口投与)	10	0/10	>30
	30	1/10	

A/Kumamoto/Y5/67 株の接種量：2.5 × 10² TCID₅₀/マウス.ペラミビルの IC₅₀ 値：1.39 nmol/L. オセルタミビルカルボン酸の IC₅₀ 値：0.822 nmol/L.

a) 接種直後から投与開始. b) 接種 14 日目のマウス生存数.

* : P<0.05 (媒体投与群との Fisher's exact test による比較).

: P<0.05 (同じ用量におけるオセルタミビルリン酸塩反復投与群との Fisher's exact test による比較).

† : P<0.05 (同じ用量におけるオセルタミビルリン酸塩単回投与群との Fisher's exact test による比較).

(続く)

2.6.3.2.3.1 A 型ウイルス感染マウス致死モデルにおける治療効果 (続き)

(4) A/Victoria/3/75 株

被験物質：ペラミビル水和物
試験報告書添付場所：4.2.1.1-15
試験番号：S-021812-EB-105-N

対照物質	オセルタミビルリン酸塩
動物種	BALB/c 雌マウス
試験方法	A 型インフルエンザウイルス (A/Victoria/3/75 株) 感染マウスの致死抑制試験
評価項目	致死抑制効果の有意差検定, ED ₅₀
試験条件及び評価方法	麻酔下において 100%致死量の A/Victoria/3/75 ウイルスをマウスに接種し, 接種後直ぐに試験物質投与を開始した。ペラミビル水和物は, 生理食塩水に溶解して, 0.1, 0.3, 1, 3 及び 10 mg/kg を単回静脈内投与した。オセルタミビルリン酸塩は, 0.5%メチルセルロース水溶液に溶解して, 0.3, 1, 3, 10 及び 30 mg/kg/日にて 1 日 2 回 5 日間反復経口投与又は 10 及び 30 mg/kg を単回経口投与した。媒体投与群には 0.5% メチルセルロースを 1 日 2 回 5 日間反復経口投与した。ウイルス接種より 14 日間観察し, ウイルス感染マウスの生存率を指標として, ペラミビル投与群と媒体投与群, オセルタミビルリン酸塩投与群と媒体投与群, ペラミビル投与群とオセルタミビルリン酸塩投与群それぞれを Fisher's exact test により比較した。また, ED ₅₀ 値をロジスティック回帰分析により推定した。

(続く)

2.6.3.2.3.1 A型ウイルス感染マウス致死モデルにおける治療効果 (続き)

A/Victoria/3/75 株 (H3N2 亜型) 感染マウス致死モデルにおけるペラミビルの単回静脈内投与による治療効果

化合物 (投与) ^{a)}	用量 [mg/kg (/日)]	生存数 ^{b)} /総数	ED ₅₀ [mg/kg (/日)]
媒体 [0.5%メチルセルロース] (1日2回5日間反復経口投与)	-	0/20	-
ペラミビル水和物 (単回静脈内投与)	0.1	0/10	0.6
	0.3	2/10	
	1	8/10 ^{*,#}	
	3	9/10 [*]	
	10	10/10 ^{*,†}	
オセルタミビルリン酸塩 (1日2回5日間反復経口投与)	0.3	0/10	4.3
	1	0/10	
	3	5/10 [*]	
	10	7/10 [*]	
	30	10/10 [*]	
オセルタミビルリン酸塩 (単回経口投与)	10	0/10	>30
	30	3/10 [*]	

A/Victoria/3/75 株の接種量：7.5 × 10² TCID₅₀/マウス.ペラミビルの IC₅₀ 値：0.98 nmol/L.オセルタミビルカルボン酸の IC₅₀ 値：0.66 nmol/L.

a) 接種直後から投与開始.

b) 接種 14 日目のマウス生存数.

* : P<0.05 (媒体投与群との Fisher's exact test による比較).

: P<0.05 (同じ用量におけるオセルタミビルリン酸塩反復投与群との Fisher's exact test による比較).

† : P<0.05 (同じ用量におけるオセルタミビルリン酸塩単回投与群との Fisher's exact test による比較).

2.6.3.2.3.2 B 型ウイルス感染マウス致死モデルにおける治療効果

(1) B/Maryland/1/59 株

被験物質：ペラミビル水和物
試験報告書添付場所：4.2.1.1-16
試験番号：PMV-EB-039-N

対照物質	オセルタミビルリン酸塩
動物種	BALB/c 雌マウス
試験方法	B 型インフルエンザウイルス (B/Maryland/1/59 株) 感染マウスの致死抑制試験
評価項目	致死抑制効果の有意差検定, ED ₅₀
試験条件及び評価方法	麻酔下において 100%致死量の B/Maryland/1/59 ウイルスをマウスに接種し、接種後直ぐに試験物質投与を開始した。ペラミビル水和物は、生理食塩水に溶解して、0.03, 0.1, 0.3, 1, 3 及び 10 mg/kg を単回静脈内投与した。オセルタミビルリン酸塩は、0.5%メチルセルロース水溶液に溶解して、0.3, 1, 3 及び 10 mg/kg/日にて 1 日 2 回 5 日間反復経口投与又 10 mg/kg を単回経口投与した。媒体投与群には 0.5%メチルセルロースを 1 日 2 回 5 日間反復経口投与した。ウイルス接種より 14 日間観察し、ウイルス感染マウスの生存率を指標として、ペラミビル投与群と媒体投与群、オセルタミビルリン酸塩投与群媒体投与群、ペラミビル投与群とオセルタミビルリン酸塩投与群それぞれを Fisher's exact test により比較した。また、ED ₅₀ 値をロジスティック回帰分析により推定した。

(続く)

2.6.3.2.3.2 B型ウイルス感染マウス致死モデルにおける治療効果 (続き)

B/Maryland/1/59 株感染マウス致死モデルにおけるペラミビル水和物の単回静脈内投与による治療効果

化合物 (投与) ^{a)}	用量 [mg/kg (/日)]	生存数 ^{b)} /総数	ED ₅₀ [mg/kg (/日)]
媒体 [0.5%メチルセルロース] (1日2回5日間反復経口投与)	-	0/20	-
ペラミビル水和物 (単回静脈内投与)	0.03	1/10	0.14
	0.1	2/10	
	0.3	9/10 ^{*,#}	
	1	10/10 ^{*,#}	
	3	10/10 [*]	
	10	10/10 ^{*,†}	
オセルタミビルリン酸塩 (1日2回5日間反復経口投与)	0.3	0/10	1.73
	1	4/10 [*]	
	3	6/10 [*]	
	10	10/10 [*]	
オセルタミビルリン酸塩 (単回経口投与)	10	2/10	>10

B/Maryland/1/59 株の接種量：2.5 × 10² TCID₅₀/マウス.ペラミビルの IC₅₀ 値：1.92 nmol/L. オセルタミビルカルボン酸の IC₅₀ 値：3.29 nmol/L.

a) 接種直後から投与開始. b) 接種 14 日目のマウス生存数.

* : P<0.05 (媒体投与群との Fisher's exact test による比較).

: P<0.05 (同じ用量におけるオセルタミビルリン酸塩反復投与群との Fisher's exact test による比較).

† : P<0.05 (同じ用量におけるオセルタミビルリン酸塩単回投与群との Fisher's exact test による比較).

(続く)

2.6.3.2.3.2 B 型ウイルス感染マウス致死モデルにおける治療効果 (続き)

(2) B/Lee/40 株

被験物質：ペラミビル水和物
試験報告書添付場所：4.2.1.1-17
試験番号：S-021812-EB-106-N

対照物質	オセルタミビルリン酸塩
動物種	BALB/c 雌マウス
試験方法	B 型インフルエンザウイルス (B/Lee/40 株) 感染マウスの致死抑制試験
評価項目	致死抑制効果の有意差検定, ED ₅₀
試験条件及び評価方法	麻酔下において 100%致死量の B/Lee/40 ウイルスをマウスに接種し, 接種後直ぐに試験物質投与を開始した. ペラミビル水和物は, 生理食塩水に溶解して, 0.1, 0.3, 1, 3 及び 10 mg/kg を単回静脈内投与した. オセルタミビルリン酸塩は, 0.5%メチルセルロース水溶液に溶解して, 0.3, 1, 3, 10 及び 30 mg/kg/日にて 1 日 2 回 5 日間反復経口投与又は 10 及び 30 mg/kg を単回経口投与した. 媒体投与群には 0.5%メチルセルロースを 1 日 2 回 5 日間反復経口投与した. ウイルス接種より 14 日間観察し, ウイルス感染マウスの生存率を指標として, ペラミビル投与群と媒体投与群, オセルタミビルリン酸塩投与群と媒体投与群, ペラミビル投与群とオセルタミビルリン酸塩投与群それぞれを Fisher's exact test により比較した. また, ED ₅₀ 値をロジスティック回帰分析により推定した.

(続く)

2.6.3.2.3.2 B型ウイルス感染マウス致死モデルにおける治療効果 (続き)

B/Lee/40 株感染マウス致死モデルにおけるペラミビル水和物の単回静脈内投与による治療効果

化合物 (投与) ^{a)}	用量 [mg/kg (/日)]	生存数 ^{b)} /総数	ED ₅₀ [mg/kg (/日)]
媒体 [0.5%メチルセルロース] (1日2回5日間反復経口投与)	-	0/20	-
ペラミビル水和物 (単回静脈内投与)	0.1	0/10	1.0
	0.3	0/10	
	1	5/10 ^{*,#}	
	3	10/10 ^{*,#}	
	10	10/10 ^{*,#,†}	
オセルタミビルリン酸塩 (1日2回5日間反復経口投与)	0.3	0/10	7.8
	1	0/10	
	3	2/10	
	10	5/10 [*]	
	30	10/10 [*]	
オセルタミビルリン酸塩 (単回経口投与)	10	0/10	>30
	30	0/10	

B/Lee/40 株の接種量：4 × 10² TCID₅₀/マウス.ペラミビルの IC₅₀ 値：0.40 nmol/L.オセルタミビルカルボン酸の IC₅₀ 値：1.47 nmol/L

a) 接種直後から投与開始.

b) 接種 14 日目のマウス生存数.

* : P<0.05 (媒体投与群との Fisher's exact test による比較).

: P<0.05 (同じ用量におけるオセルタミビルリン酸塩反復投与群との Fisher's exact test による比較).

† : P<0.05 (同じ用量におけるオセルタミビルリン酸塩単回投与群との Fisher's exact test による比較).

2.6.3.2.3.3 A 型ウイルス感染マウス致死モデルにおける Therapeutic time window の検討

被験物質：ペラミビル水和物
試験報告書添付場所：4.2.1.1-18
試験番号：S-021812-EB-058-N

対照物質	オセルタミビルリン酸塩
動物種	BALB/c 雌マウス
試験方法	A 型インフルエンザウイルス (A/WS/33 株) 感染マウスの致死抑制試験
評価項目	致死抑制効果の有意差検定, 50%有効時間 (ET ₅₀)
試験条件及び評価方法	麻酔下において 100%致死量の A/WS/33 ウイルスをマウスに接種し, 接種 24, 48, 60, 72, 84 又は 96 時間後より試験物質投与を開始した. ペラミビル水和物は, 生理食塩水に溶解して, 10 mg/kg を単回静脈内投与した. オセルタミビルリン酸塩は, 0.5%メチルセルロース水溶液に溶解して, 10 mg/kg/日にて 1 日 2 回 5 日間反復経口投与した. 媒体投与群にはウイルス接種 24 時間後より 0.5%メチルセルロースを 1 日 2 回 5 日間反復経口投与した. ウイルス接種より 14 日間観察し, ウイルス感染マウスの生存率を指標として, ペラミビル投与群と媒体投与群, オセルタミビルリン酸塩投与群と媒体投与群, ペラミビル投与群とオセルタミビルリン酸塩投与群それぞれを Fisher's exact test により比較した.

(続く)

2.6.3.2.3.3 A型ウイルス感染マウス致死モデルにおける Therapeutic time window の検討 (続き)

A/WS/33 株感染マウス致死モデルにおける治療効果に対するペラミビル水和物投与開始時期の影響

化合物 (投与)	接種後投与 開始時間	用量 (mg/kg)	生存数 ^{a)} /総数	ET ₅₀ (時間)
媒体 [0.5%メチルセルロース] (1日2回5日間反復経口投与)	24	-	0/10	-
ペラミビル水和物 (単回静脈内投与)	24	10	10/10 *	74
	48	10	10/10 *	
	60	10	10/10 *	
	72	10	6/10 ^{*,#}	
	84	10	0/10	
	96	10	1/10	
オセルタミビルリン酸塩 (1日2回5日間反復経口投与)	24	10	10/10 *	63
	48	10	9/10 *	
	60	10	9/10 *	
	72	10	0/10	
	84	10	0/10	
	96	10	0/10	

A/WS/33 株の接種量 : 5×10^3 TCID₅₀/マウス.ペラミビルの IC₅₀ 値 : 0.31 nmol/L.オセルタミビルカルボン酸の IC₅₀ 値 : 0.98 nmol/L.

a) 接種 14 日目のマウス生存数.

* : P<0.05 (媒体投与群との Fisher's exact test による比較).

: P<0.05 (同投与開始時間におけるオセルタミビルリン酸塩投与群との Fisher's exact test による比較).

2.6.3.2.3.4 A 型インフルエンザウイルス感染マウス致死モデルの肺内ウイルス増殖抑制効果

被験物質：ペラミビル水和物
試験報告書添付場所：4.2.1.1-19
試験番号：S-021812-EB-123-N

対照物質	オセルタミビルカルボン酸
動物種	BALB/c 雌マウス
試験方法	A 型インフルエンザウイルス (A/Victoria/3/75 株) 感染マウスの肺内ウイルス量測定試験及び致死抑制試験
評価項目	ウイルス感染マウス肺内のウイルス量，致死抑制効果の有意差検定
試験条件及び評価方法	麻酔下において 100%致死量の A/Victoria/3/75 ウイルスをマウスに接種し，接種後直ぐに試験物質投与を開始した．ペラミビル水和物及びオセルタミビルカルボン酸は，それぞれ生理食塩水に溶解して，1，3，10 及び 30 mg/kg を単回静脈内投与した．媒体投与群には生理食塩水を単回静脈内投与した．ウイルス接種後 4 日間毎日各群 3 匹より肺を回収し，リン酸緩衝生理食塩水で懸濁して肺ホモジネートを作製した．各ホモジネート試料を MDCK 細胞に感染させ，TCID ₅₀ 法にてウイルス量を決定した．媒体投与群との比較及び同一投与量における各薬剤間との比較は，肺回収日と投与量とを説明変数とした二元配置分散分析により実施した．また，同一投与条件におけるウイルス感染マウスの生存率を指標として，ペラミビル投与群と媒体投与群，オセルタミビルカルボン酸投与群と媒体投与群，ペラミビル投与群とオセルタミビルカルボン酸投与群それぞれを Fisher's exact test により比較した．

(続く)

2.6.3.2.3.4 A 型インフルエンザウイルス感染マウス致死モデルの肺内ウイルス増殖抑制効果 (続き)

A 型インフルエンザウイルス感染マウス致死モデルにおけるペラミビルの単回静脈内投与後の肺内ウイルス力価推移

化合物	用量 (mg/kg)	肺内ウイルス力価 ($\log_{10}$ TCID ₅₀ /mL)				P value [†]	
		day 1	day 2	day 3	day 4	vs 媒体投与群	vs オセルタミビル カルボン酸 投与群
ペラミビル水和物	1	4.99 ± 0.32	7.07 ± 0.16	7.17 ± 0.40	7.13 ± 0.24	P<0.01	P<0.01
	3	4.57 ± 0.07	6.82 ± 0.40	6.93 ± 0.51	6.75 ± 0.36	P<0.01	P<0.01
	10	3.77 ± 0.12	6.27 ± 0.12	6.36 ± 0.45	6.45 ± 0.14	P<0.01	P<0.01
	30	3.85 ± 0.13	6.04 ± 0.62	6.40 ± 0.27	5.88 ± 0.12	P<0.01	P<0.01
オセルタミビル カルボン酸	1	5.58 ± 0.20	7.77 ± 0.16	7.83 ± 0.12	7.89 ± 0.05	P<0.01	-
	3	5.39 ± 0.36	7.48 ± 0.55	7.94 ± 0.27	7.69 ± 0.11	P<0.01	-
	10	5.10 ± 0.40	7.47 ± 0.36	7.72 ± 0.43	7.62 ± 0.33	P<0.01	-
	30	4.47 ± 0.53	6.90 ± 0.18	7.36 ± 0.07	7.59 ± 0.53	P<0.01	-
媒体 [生理食塩水]	-	6.45 ± 0.36	8.36 ± 0.17	8.64 ± 0.18	8.72 ± 0.55	-	-

A/Victoria/3/75 株 (H3N2 亜型) の接種量 : 7.5×10^2 TCID₅₀/マウス.

表中の値は 3 例のマウス肺内ウイルス力価の平均値 ± 標準偏差を表す.

† : 測定日と投与量を説明変数とした二元配置分散分析.

(続く)

2.6.3.2.3.4 A 型インフルエンザウイルス感染マウス致死モデルの肺内ウイルス増殖抑制効果 (続き)

A 型インフルエンザウイルス感染マウス致死モデルにおけるペラミビル水和物の単回静脈内投与による治療効果

化合物 ^{a)}	用量 [mg/kg (/日)]	生存数 ^{b)} /総数
媒体 [生理食塩水]	-	0/20
ペラミビル水和物	1	6/10 ^{*,#}
	3	9/10 ^{*,#}
	10	10/10 ^{*,#}
	30	10/10 ^{*,#}
オセルタミビルカルボン酸	1	0/10
	3	0/10
	10	0/10
	30	1/10

A/Victoria/3/75 株 (H3N2 亜型) の接種量 : 7.5×10^2 TCID₅₀/マウス.ペラミビルの IC₅₀ 値 : 0.98 nmol/L.オセルタミビルカルボン酸の IC₅₀ 値 : 0.66 nmol/L.

a) 接種直後より投与開始. b) 接種 14 日目のマウス生存数

* : P<0.05 (媒体投与群との Fisher's exact test による比較).

: P<0.05 (同じ用量におけるオセルタミビルカルボン酸投与群との Fisher's exact test による比較).

2.6.3.2.3.5 ペラミビルの NA からの解離

(1) 基質添加 4 時間後まで

被験物質：ペラミビル水和物
試験報告書添付場所：4.2.1.1-20
試験番号：PMV-EB-036-N

対照物質	オセルタミビルカルボン酸
動物種/標本	組換え N9 NA (BN9SLA81-171-11194)
試験方法	MUNANA を基質として用い，4-methylumbelliferone 遊離を定量する酵素阻害
評価項目	NA 阻害作用
試験条件及び評価方法	試験物質 [ペラミビル及びオセルタミビルカルボン酸 (1 μmol/L)] 10 μL，N9 NA 2 μL，反応緩衝液 [最終濃度：33 mmol/L 2-(N-Morpholino) ethanesulfonic acid，4 mmol/L CaCl ₂ 及び 120 mmol/L NaCl] 25 μL 並びに蒸留水 63 μL を混合し，37°C で 1 時間インキュベートした．NA 単独は試験物質の代わりに 10 μL の蒸留水を使用した．反応後 Bio-Spin 6 column に通し，試験物質と NA の複合体のみを精製し，検査対象試料とした．すなわち，検査対象試料 45 μL，反応緩衝液 [最終濃度：33 mmol/L 2-(N-Morpholino) ethanesulfonic acid，4 mmol/L CaCl ₂ 及び 120 mmol/L NaCl] 25 μL，MUNANA 溶液 (最終濃度：75 μmol/L)] 25 μL 並びに蒸留水 5 μL を混合し，室温で 4 時間インキュベートし，経時的に遊離した 4-methylumbelliferone の蛍光を 360/460 nm にて測定した．

(続く)

2.6.3.2.3.5 ペラミビルの NA からの解離 (続き)

NA 阻害剤との複合体形成後の NA 活性の回復 (基質添加 4 時間後まで)

反応時間 (hr)	蛍光強度 (平均値 ± 標準偏差)			
	薬剤なし (NA単独)	オセルタミビルカルボン酸	ペラミビル	background control
0.00	3387 ± 664	333 ± 6	266 ± 20	250 ± 25
0.25	18465 ± 1632	2327 ± 388	376 ± 28	256 ± 27
0.50	24537 ± 1390	4662 ± 811	485 ± 38	259 ± 27
0.75	26743 ± 1071	6829 ± 1201	595 ± 45	262 ± 25
1.00	27447 ± 871	8795 ± 1550	702 ± 54	264 ± 26
1.25	27647 ± 759	10561 ± 1809	816 ± 63	265 ± 26
1.50	27719 ± 726	12182 ± 2050	925 ± 73	268 ± 24
1.75	27716 ± 748	13611 ± 2229	1036 ± 88	269 ± 25
2.00	27689 ± 708	14916 ± 2364	1146 ± 102	271 ± 26
2.25	27668 ± 701	16081 ± 2474	1253 ± 114	272 ± 25
2.50	27654 ± 726	17130 ± 2542	1360 ± 129	276 ± 27
2.75	27620 ± 722	18058 ± 2567	1467 ± 142	278 ± 26
3.00	27601 ± 695	18922 ± 2584	1572 ± 151	281 ± 27
3.25	27578 ± 738	19694 ± 2595	1675 ± 169	281 ± 25
3.50	27547 ± 698	20344 ± 2561	1774 ± 179	284 ± 25
3.75	27513 ± 714	20975 ± 2544	1872 ± 191	286 ± 25
4.00	27498 ± 715	21537 ± 2496	1971 ± 202	289 ± 25

独立した 3 回の実験結果より平均値 ± 標準偏差を算出.

(続く)

2.6.3.2.3.5 ペラミビルの NA からの解離 (続き)

(2) 基質添加 24 時間後まで

被験物質：ペラミビル水和物
試験報告書添付場所：4.2.1.1-31
試験番号：PB001-CSA63005

対照物質	オセルタミビルカルボン酸
動物種/標本	組換え N9 NA
試験方法	MUNANA を基質として用い、4-methylumbelliferone 遊離を定量する酵素阻害
評価項目	NA 阻害作用
試験条件及び評価方法	試験物質 [ペラミビル及びオセルタミビルカルボン酸 (1 $\mu\text{mol/L}$)] 20 μL と反応緩衝液 [最終濃度：33 mmol/L 2-(N-Morpholino) ethanesulfonic acid 及び 4 mmol/L CaCl_2] で 50 倍希釈した N9 NA 180 μL を混合し、37°C で 1 時間インキュベートした。NA 単独は試験物質の代わりに 20 μL の蒸留水を使用した。反応後 Bio-Spin 6 column に通し、検査対象試料とした。すなわち、検査対象試料 50 μL ，反応緩衝液 [最終濃度：32.5 mmol/L 2-(N-Morpholino) ethanesulfonic acid 及び 4 mmol/L CaCl_2] 30 μL ，MUNANA 溶液 [最終濃度：75 $\mu\text{mol/L}$] 20 μL を混合し、室温で 24 時間インキュベートし、経時的に遊離した 4-methylumbelliferone の蛍光を 360/450 nm にて測定した。

(続く)

2.6.3.2.3.5 ペラミビルの NA からの解離 (続き)

NA 阻害剤との複合体形成後の NA 活性の回復 (基質添加 24 時間後まで)			
反応時間 (hr)	蛍光強度		
	薬剤なし (NA 単独)	オセルタミビル カルボン酸	ペラミビル
0	1258	336	517
0.25	10513	1571	2323
0.5	22483	4064	4554
0.75	32165	6424	6405
1	25475	8722	5601
1.25	30246	11624	6747
1.5	33541	13129	7527
1.75	38338	15728	8497
2	41588	17618	9216
3	52813	23893	11343
4	65583	31973	13881
5	78548	44793	18277
6	76282	42532	16277
24	95267	89245	29377

2 重測定で実施した 1 回の実験結果.

2.6.3.2.3.6 マウス治療効果に影響を与える薬物動態パラメータの解析

被験物質：ペラミビル水和物

試験報告書添付場所：4.2.1.1-21，試験番号：S-021812-EB-052-N	
対照物質	なし
動物種	BALB/c 雌マウス
試験方法	A 型インフルエンザウイルス (A/WS/33 株) 感染マウス致死モデルにおけるペラミビルの薬力学的試験
評価項目	ウイルス感染マウス致死抑制効果 (生存数の測定)
試験条件及び評価方法	麻酔下において 100%致死量の A/WS/33 ウイルスをマウスに接種し，接種 48 時間後に被験物質投与を開始した．ペラミビル水和物を生理食塩水に溶解し，総投与量を 6 パターン (0.25, 0.5, 1, 2, 4 又は 8 mg/kg)，投与スケジュールを 3 パターン [ウイルス接種後 48 時間に単回投与，6 時間おき (48 及び 54 時間に) 2 分割投与又は 3 時間おき (48, 51, 54 及び 57 時間に) 4 分割投与] に分け，合計 18 パターンの方法で静脈内投与した．ウイルス感染 14 日目にそれぞれの投与パターンにおけるマウスの生存数を比較した．
試験報告書添付場所：4.2.1.1-22，試験番号：S-021812-EB-053-N	
試験方法	ペラミビルの血漿中濃度及びウイルス感染マウス致死モデルにおける薬力学的効果を指標とする解析
評価項目	各薬物動態パラメータのロジスティック曲線への当てはまり度合い (赤池情報量基準) と 95%致死抑制量
試験条件及び評価方法	A/WS/33 感染マウスにおけるペラミビルの血漿中濃度より算出された薬物動態パラメータ [最高血漿中濃度 (C _{max} : 本試験では時間 0 における外挿血漿中濃度に相当する)，血漿中濃度－時間曲線下面積 (AUC) 又は A/WS/33 株の NA に対する 95%阻害濃度を上回る濃度を維持する時間 (T>IC ₉₅)] を横軸に，マウス生存率を縦軸にプロットし，ロジスティック曲線を当てはめた．ロジスティック曲線への当てはまりの度合いを表す赤池情報量基準より，どの薬物動態パラメータに最も良く影響を受けるのかを判断した．

(続く)

2.6.3.2.3.6 マウス治療効果に影響を与える薬物動態パラメータの解析 (続き)

A/WS/33 株感染マウス致死モデルにおけるペラミビル水和物単回，2 分割又は 4 分割静脈内投与の薬力学的効果

化合物	投与回数 ^{a)} (投与間隔)	用量 (mg/kg) [1 回の用量 (mg/kg)]	生存数 ^{b)} /総数
ペラミビル 水和物	1 回	0.25	0/10
		0.5	1/10
		1	4/10
		2	9/10
		4	10/10
		8	10/10
	2 回 (6 時間)	0.25 [0.125]	3/10
		0.5 [0.25]	2/10
		1 [0.5]	6/10
		2 [1]	10/10
		4 [2]	10/10
		8 [4]	10/10
	4 回 (3 時間)	0.25 [0.0625]	1/10
		0.5 [0.125]	2/10
		1 [0.25]	5/10
		2 [0.5]	10/10
		4 [1]	10/10
		8 [2]	10/10
媒体 [生理食塩液]	4 回 (3 時間)	0	0/20

A/WS/33 株の接種量： 5×10^3 TCID₅₀/マウス.ペラミビルの IC₅₀ 値：0.31 nmol/L.

a) 接種 48 時間後から投与開始.

b) 接種 14 日目のマウス生存数.

(続く)

2.6.3.2.3.6 マウス治療効果に影響を与える薬物動態パラメータの解析 (続き)

A 型インフルエンザウイルス感染マウスに対するペラミビル水和物による治療効果と推定薬物動態パラメータ値

投与回数 (投与間隔)	用量 (mg/kg) [1 回の用量 (mg/kg)]	生存数 ^{a)} /総数	Cmax (ng/mL)	AUC (ng·hr/mL)	T>IC ₉₅ (hr)
単回	8	10/10	25848	8611	24.24
	4	10/10	12924	4306	20.46
	2	9/10	6462	2153	16.69
	1	4/10	3231	1076	12.91
	0.5	1/10	1616	538	9.14
	0.25	0/10	808	269	5.36
2 回 (6 時間)	8 [4]	10/10	12952	8611	28.03
	4 [2]	10/10	6476	4306	24.25
	2 [1]	10/10	3238	2153	20.48
	1 [0.5]	6/10	1619	1076	16.7
	0.5 [0.25]	2/10	809	538	12.3
	0.25 [0.125]	3/10	405	269	5.43
4 回 (3 時間)	8 [2]	10/10	6508	8611	29.73
	4 [1]	10/10	3254	4306	25.96
	2 [0.5]	10/10	1627	2153	22.18
	1 [0.25]	5/10	814	1076	18.41
	0.5 [0.125]	2/10	407	538	13.88
	0.25 [0.0625]	1/10	203	269	7.66

a) 感染 14 日目の生存数.

2.6.3.2.4 オセルタミビルリン酸塩耐性ウイルスに対する効果

2.6.3.2.4.1 臨床分離株由来オセルタミビルリン酸塩耐性 H274Y 変異 NA に対する阻害効果

被験物質：ペラミビル水和物
試験報告書添付場所：4.2.1.1-23
試験番号：S-021812-EB-117-N

対照物質	オセルタミビルカルボン酸及びザナミビル
動物種/標本	インフルエンザウイルス
試験方法	MUNANA を基質として用い、4-methylumbelliferone 遊離を定量する酵素阻害
評価項目	NA 阻害作用, IC ₅₀
試験条件及び評価方法	試験物質 [ペラミビル (最終濃度 : 0.032~12500 nmol/L), オセルタミビルカルボン酸 (最終濃度 : 0.032~12500 nmol/L) 及びザナミビル (最終濃度 : 0.032~100 nmol/L)], 反応緩衝液 [最終濃度 : 33 mmol/L 2-(N-Morpholino) ethanesulfonic acid, 4 mmol/L CaCl ₂ 及び 120 mmol/L NaCl], MUNANA 溶液 (最終濃度 : 10 µmol/L) 並びにウイルス NA を各 25 µL ずつ混合し, 37°C で 30 分間インキュベート後, 遊離した 4-methylumbelliferone の蛍光を 355/460 nm にて測定した.

(続く)

2.6.3.2.4.1 臨床分離株由来オセルタミビルリン酸塩耐性 H274Y 変異 NA に対する阻害効果 (続き)

オセルタミビルリン酸塩感受性及び耐性株に対するペラミビルの阻害活性

型	亜型	株名	NA 変異	IC ₅₀ (nmol/L)					
				ペラミビル	オセルタミビル カルボン酸		ザナミビル		
A	H1N1	A/Yokohama/55/2005	-	0.597		1.33		1.37	
A	H1N1	A/Yokohama/75/2007	-	0.753	平均値	1.46	平均値	1.91	平均値
A	H1N1	A/Yokohama/92/2007	-	1.56	0.968	3.89	1.91	9.48	4.01
A	H1N1	A/Yokohama/15/2008	-	0.600		1.11		1.69	
A	H1N1	A/Yokohama/52/2008	-	1.33		1.77		5.60	
A	H1N1	A/Yokohama/67/2006	H274Y	19.9		292		2.11	
A	H1N1	A/Yokohama/88/2006	H274Y	23.4		316		1.92	
A	H1N1	A/Yokohama/91/2007	H274Y	21.9		139		1.26	
A	H1N1	A/Yokohama/22/2008	H274Y	22.7		192		1.72	
A	H1N1	A/Yokohama/35/2008	H274Y	24.3	平均値	187	平均値	1.41	平均値
A	H1N1	A/Yokohama/30/2008	H274Y	27.5	35.4	195	225	1.40	1.73
A	H1N1	A/Yokohama/31/2008	H274Y	22.7		184		1.60	
A	H1N1	A/Yokohama/34/2008	H274Y	21.3		160		1.25	
A	H1N1	A/Yokohama/77/2008	H274Y	88.9		378		1.89	
A	H1N1	A/Yokohama/78/2008	H274Y	71.5		325		1.84	
A	H1N1	A/Yokohama/79/2008	H274Y	45.7		112		2.63	

独立した 3 回の実験結果より平均 IC₅₀ 値を算出.

2.6.3.2.4.2 オセルタミビルリン酸塩耐性 H274Y 変異 NA を有する A 型ウイルス感染マウス致死モデルにおける治療効果

(1) H274Y 変異導入によるペラミビルの感受性の変化

被験物質：ペラミビル水和物
試験報告書添付場所：4.2.1.1-24
試験番号：S-021812-EB-135-N

対照物質	オセルタミビルカルボン酸及びザナミビル
動物種/標本	組換えインフルエンザウイルス
試験方法	MUNANA を基質として用い、4-methylumbelliferone 遊離を定量する酵素阻害
評価項目	NA 阻害作用, IC ₅₀
試験条件及び評価方法	試験物質 [ペラミビル (最終濃度：0.032～100 nmol/L), オセルタミビルカルボン酸 (最終濃度：4～12500 nmol/L) 及びザナミビル (最終濃度：0.032～100 nmol/L)], 反応緩衝液 [最終濃度：33 mmol/L 2-(N-Morpholino) ethanesulfonic acid, 4 mmol/L CaCl ₂ 及び 120 mmol/L NaCl], MUNANA 溶液 (最終濃度：10 μmol/L) 並びにウイルス NA を各 25 μL ずつ混合し, 37°C で 30 分間インキュベート後, 遊離した 4-methylumbelliferone の蛍光を 355/460 nm にて測定した. 変異 NA に対する IC ₅₀ 値を野生型 NA に対する IC ₅₀ 値で除したものを耐性上昇度 (FR) として, 耐性の指標に用いた.

H274Y 変異導入によるペラミビルの感受性の変化

組換えウイルス				ペラミビル		オセルタミビルカルボン酸		ザナミビル	
型	亜型	株名	NA 変異	IC ₅₀ (nmol/L)	FR	IC ₅₀ (nmol/L)	FR	IC ₅₀ (nmol/L)	FR
A	H1N1	A/PR/8/34	-	0.545	-	1.35	-	1.17	-
A	H1N1	A/PR/8/34	H274Y	21.5	39	150	111	1.65	1
A	H1N1	A/WSN/33	-	0.615	-	1.13	-	1.39	-
A	H1N1	A/WSN/33	H274Y	18.2	30	152	134	1.60	1

独立した 3 回の実験結果より平均 IC₅₀ 値を算出.

(続く)

2.6.3.2.4.2 オセルタミビルリン酸塩耐性 H274Y 変異 NA を有する A 型ウイルス感染マウス致死モデルにおける治療効果 (続き)

(2) H274Y 変異 NA を有する A/PR/8/34 株感染マウス致死モデルにおけるペラミビル水和物の単回静脈内投与による治療効果

被験物質：ペラミビル水和物
試験報告書添付場所：4.2.1.1-25
試験番号：S-021812-EB-134-N

対照物質	オセルタミビルリン酸塩
動物種	BALB/c 雌マウス
試験方法	H274Y 変異 NA を有する組換え A 型インフルエンザウイルス (A/PR/8/34 株) 感染マウスの致死抑制試験
評価項目	致死抑制効果の有意差検定, ED ₅₀
試験条件及び評価方法	麻酔下において 100%致死量の H274Y 変異を有する組換え A/PR/8/34 ウイルスをマウスに接種し, 接種後直ぐに試験物質投与を開始した. ペラミビル水和物は, 生理食塩水に溶解して, 1, 3, 10, 30 及び 100 mg/kg を単回静脈内投与した. オセルタミビルリン酸塩は, 0.5%メチルセルロース水溶液に溶解して, 1, 3, 10, 30 及び 100 mg/kg/日にて 1 日 2 回 5 日間反復経口投与した. 媒体投与群には 0.5%メチルセルロースを 1 日 2 回 5 日間反復経口投与した. ウイルス接種より 14 日間観察し, ウイルス感染マウスの生存率を指標として, ペラミビル投与群と媒体投与群, オセルタミビルリン酸塩投与群と媒体投与群, ペラミビル投与群とオセルタミビルリン酸塩投与群それぞれを Fisher's exact test により比較した. また, ED ₅₀ 値をロジスティック回帰分析により推定した.

(続く)

2.6.3.2.4.2 オセルタミビルリン酸塩耐性 H274Y 変異 NA を有する A 型ウイルス感染マウス致死モデルにおける治療効果 (続き)

H274Y 変異 NA を有する A/PR/8/34 株感染マウス致死モデルにおけるペラミビル水和物の単回静脈内投与による治療効果

化合物 (投与) ^{a)}	用量 [mg/kg (/日)]	生存数 ^{b)} /総数	ED ₅₀ [mg/kg (/日)]
媒体 [0.5%メチルセルロース] (1 日 2 回 5 日間反復経口投与)	-	0/20	-
ペラミビル水和物 (単回静脈内投与)	1	2/10	2.4
	3	7/10 ^{*,#}	
	10	8/10 ^{*,#}	
	30	9/10 [*]	
	100	10/10 [*]	
オセルタミビルリン酸塩 (1 日 2 回 5 日間反復経口投与)	1	0/10	28.4
	3	0/10	
	10	0/10	
	30	5/9 [*]	
	100	9/9 [*]	

H274Y 変異 NA を有する A/PR/8/34 株の接種量 : 6.4×10^5 TCID₅₀/マウス.

a) 接種直後から投与開始.

b) 接種 14 日目のマウス生存数.

* : P<0.05 (媒体投与群との Fisher's exact test による比較).

: P<0.05 (同じ用量におけるオセルタミビルリン酸塩反復投与群との Fisher's exact test による比較).

2.6.3.2.4.3 既存の NA 阻害剤耐性変異 NA に対するペラミビルの阻害効果

被験物質：ペラミビル水和物
試験報告書添付場所：4.2.1.1-26
試験番号：S-021812-EB-133-N

対照物質	オセルタミビルカルボン酸及びザナミビル
動物種/標本	組換え NA
試験方法	MUNANA を基質として用い，4-methylumbelliferone 遊離を定量する酵素阻害
評価項目	NA 阻害作用，IC ₅₀
試験条件及び評価方法	試験物質 [ペラミビル，オセルタミビルカルボン酸及びザナミビル (最終濃度：0.064～1000 nmol/L)]，反応緩衝液 [最終濃度：33 mmol/L 2-(N-Morpholino) ethanesulfonic acid，4 mmol/L CaCl ₂ 及び 120 mmol/L NaCl]，MUNANA 溶液 (最終濃度：100 μmol/L) 並びにウイルス NA を各 25 μL ずつ混合し，37°C で 60 分間インキュベート後，遊離した 4-methylumbelliferone の蛍光を 355/460 nm にて測定した．変異 NA に対する IC ₅₀ 値を野生型 NA に対する IC ₅₀ 値で除したものを FR として，耐性の指標に用いた．

(続く)

2.6.3.2.4.3 既存の NA 阻害剤耐性変異 NA に対するペラミビルの阻害効果 (続き)

変異 NA に対するペラミビルの阻害作用

型	亜型	変異	ペラミビル		オセルタミビル カルボン酸		ザナミビル	
			IC ₅₀ (nmol/L)	FR	IC ₅₀ (nmol/L)	FR	IC ₅₀ (nmol/L)	FR
A	N1	-	0.28	-	1.3	-	1.0	-
A	N1	H274Y	17	61	180	140	0.76	0.76
A	N1	N294S	1.6	5.9	36	28	1.6	1.6
A	N2	-	0.82	-	0.50	-	2.8	-
A	N2	E119G	>1000	>1200	>1000	>2000	>1000	>350
A	N2	E119A	>1000	>1200	>1000	>2000	>1000	>350
A	N2	E119D	>1000	>1200	>1000	>2000	>1000	>350
A	N2	E119V	2.9	3.5	37	73	11	3.9
A	N2	D151V	>1000	>1200	340	680	>1000	>350
A	N2	D151A	81	100	31	62	>1000	>350
A	N2	D151N	120	150	100	210	840	300
A	N2	D151E	2.4	2.9	1.5	3.0	7.2	2.6
A	N2	D151G	73	89	34	69	960	340
A	N2	R292K	140	170	>1000	>2000	86	30
A	N2	N294S	2.5	3.0	78	160	16	5.6
B	-	-	3.5	-	21	-	12	-
B	-	R152K	>1000	>290	>1000	>49	460	40
B	-	D198N	9.3	2.7	69	3.3	34	2.9
B	-	D198Y	110	31	430	21	200	17
B	-	D198E	30	8.5	91	4.4	56	4.9
B	-	N221K	9.9	2.8	31	1.5	16	1.4
B	-	I222T	36	10	100	4.9	22	1.9
B	-	S250G	3.2	0.91	27	1.3	200	17
B	-	H274Y	82	24	52	2.5	6.0	0.52
B	-	R371K	310	89	>1000	>49	230	20
B	-	G402S	7.2	2.1	46	2.2	41	3.6

独立した 3 回の実験結果より平均 IC₅₀ 値を算出。

アミノ酸の位置はすべて N2 numbering による。

2.6.3.2.5 免疫抑制状態におけるインフルエンザウイルス感染に対する効果

被験物質：ペラミビル水和物
試験報告書添付場所：4.2.1.1-27
試験番号：S-021812-EB-131-N

対照物質	オセルタミビルリン酸塩
動物種	BALB/c 雌マウス
試験方法	A 型インフルエンザウイルス (A/WS/33 株) 感染マウスの致死抑制試験
評価項目	致死抑制効果の有意差検定, ED ₅₀
試験条件及び評価方法	免疫抑制剤シクロホスファミドを生理食塩水に溶解し、ウイルス接種の 1 日前, 3 及び 7 日後に 50 mg/kg でマウスに腹腔内投与し、マウスを免疫抑制状態にした。一方、免疫抑制非処理群には、生理食塩水を同条件にて腹腔内投与した。麻酔下において 100%致死量の A/WS/33 ウイルスをマウスに接種し、接種 48 時間後より試験物質投与を開始した。ペラミビル水和物は、生理食塩水に溶解し、免疫抑制処理群には 1, 3, 10, 30 及び 100 mg/kg を単回静脈内投与又は 1, 3, 10, 30 及び 100 mg/kg/日にて 1 日 1 回 5 日間反復静脈内投与し、免疫抑制非処理群には 0.1, 0.3, 1, 3 及び 10 mg/kg を単回静脈内投与した。オセルタミビルリン酸塩は、0.5%メチルセルロース水溶液に溶解し、免疫抑制処理群には 1, 3, 10, 30 及び 100 mg/kg/日にて、免疫抑制非処理群には 0.1, 0.3, 1, 3 及び 10 mg/kg/日にて、それぞれ 1 日 2 回 5 日間反復経口投与した。媒体投与群には 0.5%メチルセルロースを 1 日 2 回 5 日間反復経口投与した。ウイルス接種より 21 日間観察し、ウイルス感染マウスの生存率を指標として、ペラミビル投与群と媒体投与群、オセルタミビルリン酸塩投与群と媒体投与群、ペラミビル投与群とオセルタミビルリン酸塩投与群それぞれを Fisher's exact test により比較した。また、ED ₅₀ 値をロジスティック回帰分析により推定した。

(続く)

2.6.3.2.5 免疫抑制状態におけるインフルエンザウイルス感染に対する効果 (続き)

免疫抑制処理した A/WS/33 株感染マウス致死モデルにおけるペラミビル水和物の反復静脈内投与による治療効果

免疫抑制処理 ^{a)}	化合物 (投与)	用量 [mg/kg (/日)]	生存数 ^{b)} /総数	ED ₅₀ [mg/kg (/日)]
なし	媒体 [0.5%メチルセルロース] (1日2回5日間反復経口投与)	-	0/20	-
	ペラミビル水和物 (単回静脈内投与)	0.1	0/10	2.4
		0.3	0/10	
		1	0/10	
		3	7/10 *	
		10	10/10 *	
	オセルタミビルリン酸塩 (1日2回5日間反復経口投与)	0.1	0/10	2.8
		0.3	0/10	
		1	2/10	
		3	5/10 *	
		10	9/10 *	

A/WS/33 株の接種量 : 2×10^4 TCID₅₀/マウス.ペラミビルの IC₅₀ 値 : 0.31 nmol/L. オセルタミビルカルボン酸の IC₅₀ 値 : 0.98 nmol/L.

a) シクロホスファミド 50 mg/kg 腹腔内投与 (ウイルス感染 -1, 3 及び 7 日目) により処理.

b) 接種 21 日目のマウス生存数.

* : P<0.05 (媒体投与群との Fisher's exact test による比較).

(続く)

2.6.3.2.5 免疫抑制状態におけるインフルエンザウイルス感染に対する効果 (続き)

免疫抑制処理した A/WS/33 株感染マウス致死モデルにおけるペラミビル水和物の反復静脈内投与による治療効果 (続き)

免疫抑制処理 ^{a)}	化合物 (投与)	用量 [mg/kg (/日)]	生存数 ^{b)} /総数	ED ₅₀ [mg/kg (/日)]
あり	媒体 [0.5%メチルセルロース] (1日2回5日間反復経口投与)	-	0/20	-
	ペラミビル水和物 (単回静脈内投与)	1	0/10	> 100
		3	0/10	
		10	0/10	
		30	0/10	
		100	4/10 *	
	ペラミビル水和物 (1日1回5日間反復静脈内投与)	1	0/10	6.8
		3	1/9	
		10	8/10 *,#,†	
		30	9/10 *,#,†	
		100	10/10 *,#	
	オセルタミビルリン酸塩 (1日2回5日間反復経口投与)	1	0/10	78.6
		3	0/10	
		10	0/10	
		30	0/10	
		100	7/10 *	

A/WS/33 株の接種量：2×10⁴ TCID₅₀/マウス.ペラミビルの IC₅₀ 値：0.31 nmol/L. オセルタミビルカルボン酸の IC₅₀ 値：0.98 nmol/L.

a) シクロホスファミド 50 mg/kg 腹腔内投与 (ウイルス感染 -1, 3 及び 7 日目) により処理.

b) 接種 21 日目のマウス生存数.

* : P<0.05 (媒体投与群との Fisher's exact test による比較).

: P<0.05 (同じ用量におけるペラミビル水和物単回投与群との Fisher's exact test による比較).

† : P<0.05 (同じ用量におけるオセルタミビルリン酸塩投与群との Fisher's exact test による比較).

2.6.3.2.6 高病原性鳥インフルエンザウイルスに対する効果

2.6.3.2.6.1 高病原性鳥インフルエンザウイルス NA に対する阻害作用

被験物質：ペラミビル水和物
 試験報告書添付場所：4.2.1.1-28
 試験番号：S-021812-EB-060-N

対照物質	オセルタミビルカルボン酸及びザナミビル
動物種/標本	高病原性鳥インフルエンザウイルス
試験方法	Fetuin を基質として用い、N-アセチルノイラミン酸遊離を定量する酵素阻害
評価項目	NA 阻害作用, IC ₅₀
試験条件及び評価方法	25 µL のウイルス NA と 25 µL の試験物質 [ペラミビル, オセルタミビルカルボン酸及びザナミビル (最終濃度：0.0064～100 nmol/L)] を混合し、室温で 1 時間インキュベートした後、50 µL の Fetuin (最終濃度：12.5 mg/mL) を加え混合し、37°C で 16～18 時間インキュベートした。50 µL の過ヨウ素酸試薬を加え混合し、室温で 20 分間インキュベートした後、亜ヒ酸試薬を加え混合した。チオバルビツール酸試薬を 1.25 mL 加え混合し、80°C で 15 分間インキュベートした後、氷中にて 1 分間冷却した。1.5 mL の Warrenoff 試薬を加え混合し、遠心後上層をマルチウェルプレートに採取後、550nm の吸光度を測定した。

高病原性鳥インフルエンザウイルス NA に対するペラミビルの活性阻害作用

株名	亜型	IC ₅₀ (nmol/L)		
		ペラミビル	オセルタミビル カルボン酸	ザナミビル
A/Hong Kong/483/97	H5N1	0.23	5.00	1.38
A/chicken/Yamaguchi/7/04	H5N1	0.40	6.18	0.99
A/whooper swan/Mongolia/3/05	H5N1	0.39	8.07	1.77
A/chicken/Italy/99	H7N1	0.26	7.63	1.72
A/chicken/Netherlands/03	H7N7	0.12	1.10 ^{a)}	4.88

独立した 3 回の実験結果より平均 IC₅₀ 値を算出。

a) 2 回の実験の平均 IC₅₀ 値

2.6.3.2.6.2 高病原性鳥インフルエンザウイルス感染細胞からのウイルス放出に対する効果

被験物質：ペラミビル水和物
試験報告書添付場所：4.2.1.1-29
試験番号：S-021812-EB-061-N

対照物質	オセルタミビルカルボン酸及びザナミビル
動物種/標本	高病原性鳥インフルエンザウイルス及び MDCK 細胞
試験方法	ウイルス感染細胞から放出されるウイルス粒子の産生抑制効果
評価項目	ウイルス増殖産生抑制作用，90%阻害濃度 (IC ₉₀)
試験条件及び評価方法	マルチウェルプレートに培養した MDCK 細胞にウイルスを接種し，35°C で 1 時間インキュベートした．細胞表面を平衡塩溶液で洗浄後，試験物質 [ペラミビル，オセルタミビルカルボン酸及びザナミビル (最終濃度：0.0256～2000 nmol/L)] を含む培地を添加し，35°C で 2 日間インキュベートした．2 日後の培養上清中のウイルス量を 35°C，3 日間のインキュベーションにより TCID ₅₀ 値として算出し，対照群の 10% まで TCID ₅₀ 値を減少させる薬物濃度を IC ₉₀ 値とした．

高病原性鳥インフルエンザウイルスに対するペラミビルの増殖抑制作用

株名	亜型	IC ₉₀ (nmol/L)		
		ペラミビル	オセルタミビル カルボン酸	ザナミビル
A/Hong Kong/483/97	H5N1	1.7	20	37
A/chicken/Yamaguchi/7/04	H5N1	1.0	5.2	2.5
A/whooper swan/Mongolia/3/05	H5N1	1.1	6.9	7.9
A/chicken/Italy/99	H7N1	7.5	54	31
A/chicken/Netherlands/03	H7N7	2.6	1.8	11

独立した 3 回の実験結果より平均 IC₉₀ 値を算出．

2.6.3.2.6.3 高病原性鳥インフルエンザウイルス A/Hong Kong/483/97 株 (H5N1 亜型) 感染マウス致死モデルにおける治療効果

被験物質：ペラミビル水和物
試験報告書添付場所：4.2.1.1-30
試験番号：S-021812-EB-082-N

対照物質	オセルタミビルリン酸塩及びザナミビル
動物種/標本	BALB/c 雌マウス
試験方法	高病原性鳥インフルエンザウイルス (A/Hong Kong/483/97 株) 感染マウスの致死抑制試験
評価項目	致死抑制効果の有意差検定
試験条件及び評価方法	麻酔下において 100%致死量の A/Hong Kong/483/97 ウイルスをマウスに接種し、接種直後より試験物質投与を開始した。ペラミビル水和物は、生理食塩水に溶解して、10 及び 30 mg/kg を単回静脈内投与又は 10 及び 30 mg/kg/日にて 1 日 1 回 5 日間反復静脈内投与した。オセルタミビルリン酸塩は、0.5%メチルセルロース水溶液に溶解して、10 及び 30 mg/kg/日にて 1 日 2 回 5 日間反復経口投与した。ザナミビルは、生理食塩水に溶解して、10 及び 30 mg/kg/日にて 1 日 2 回 5 日間反復静脈内投与した。媒体投与群には 0.5%メチルセルロースを 1 日 2 回 5 日間反復経口投与した。ウイルス接種より 14 日間観察し、ウイルス感染マウスの生存率を指標として、ペラミビル投与群と媒体投与群、オセルタミビルリン酸塩投与群と媒体投与群、ザナミビル投与群と媒体投与群、ペラミビル投与群とオセルタミビルリン酸塩投与群、ペラミビル投与群とザナミビル投与群それぞれを Fisher's exact test により比較した。なお、本試験のウイルス量は 50%鶏卵感染価 (EID ₅₀) として算出した。

(続く)

2.6.3.2.6.3 高病原性鳥インフルエンザウイルス A/Hong Kong/483/97 株 (H5N1 亜型) 感染マウス致死モデルにおける治療効果 (続き)

A/Hong Kong/483/97 株感染マウス致死モデルにおけるペラミビル水和物の単回及び反復静脈内投与による治療効果

化合物 (投与)	用量 [mg/kg (/日)]	生存数 ^{a)} /総数
媒体 [0.5%メチルセルロース] (1 日 2 回 5 日間反復経口投与)	-	0/20
ペラミビル水和物 (単回静脈内投与)	10 30	6/10 * 7/10 *
ペラミビル水和物 (1 日 1 回 5 日間反復静脈内投与)	10 30	9/10 *,#,† 10/10 *,†
オセルタミビルリン酸塩 (1 日 2 回 5 日間反復経口投与)	10 30	3/10 * 7/10 *
ザナミビル (1 日 2 回 5 日間反復静脈内投与)	10 30	1/10 5/10 *

A/Hong Kong/483/97 株の接種量 : 100 EID₅₀/マウス.

a) 接種 14 日目のマウス生存数.

* : P<0.05 (媒体投与群との Fisher's exact test による比較).

: P<0.05 (同じ用量におけるオセルタミビルリン酸塩投与群との Fisher's exact test による比較).

† : P<0.05 (同じ用量におけるザナミビル投与群との Fisher's exact test による比較).

2.6.3.3 副次的薬理試験

該当する試験なし

2.6.3.4 安全性薬理試験

被験物質：ペラミビル水和物

評価対象となる組織	試験の種類	動物種/系統	投与方法	投与量 ^{a)} (mg/kg)	性別及び動物数/群	特記すべき所見	GLP適用	試験番号
中枢神経系	一般症状及び行動に及ぼす影響	ラット/SD	静脈内	20, 50, 100	M6/群	100 mg/kg：着地開脚幅の増加	適	PMV-SF-004-L (SG07086)
呼吸系	呼吸数, 1 回及び分時換気量に及ぼす影響	ラット/SD	静脈内	20, 50, 100	M8/群	影響なし	適	PMV-SF-005-L (SG07087)
	気道抵抗, 動肺コンプライアンス, 血圧, 心拍数に及ぼす影響	モルモット /Hartley	静脈内	1, 3, 10	M8/群	影響なし	適	DS00321 (DTNO1000)
心血管系	血圧, 心拍数, 心電図パラメータに及ぼす影響	サル/カニクイ	静脈内	30, 60	M4/群	影響なし	適	PMV-SF-006-L (SG07088)
	乳頭筋標本の心筋活動電位に及ぼす影響	モルモット /Hartley	栄養液中に適用	3, 30, 300 µmol/L	M5/群	影響なし	適	PMV-SF-007-L (B070292)
	心筋イオンチャンネルに及ぼす影響	hERG チャンネル 発現 HEK293 細胞	灌流液中に適用	300 µmol/L	3/群	影響なし	適	070117.CDS

a) 特にことわりがない限り単回投与。

2.6.3.5 薬力学的薬物相互作用試験

該当する試験なし