リフキシマ錠 200mg

医薬品製造販売承認申請書添付資料

2.6.1 緒言

あすか製薬株式会社

目次

2.6.1 緒言 3
2.6.1.1 名称及び化学構造式 3
2.6.1.2 リファキシミンの薬理作用 3
2.6.1.3 リファキシミンの予定する効能・効果及び用法・用量 4

表

表 2.6.1-1. リファキシミンの予定する効能・効果及び用法・用量 4

2.6.1　緒言

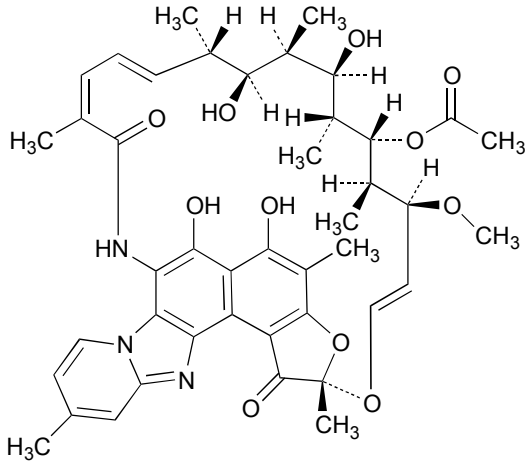
2.6.1.1　名称及び化学構造式

リファキシミン（開発コード：L-105）の名称及び化学構造式を以下に示す。

一般名：　INN　rifaximin
JAN　リファキシミン（日本名）、Rifaximin（英名）

化学名：　（日本名）
酢酸 (2*S*,16*Z*,18*E*,20*S*,21*S*,22*R*,23*R*,24*R*,25*S*,26*R*,27*S*,28*E*)-5,6,21,23-テトラヒドロキシ-27-メトキシ- 2,4,11,16,20,22,24,26-オクタメチル-1,15-ジオキソ-1,2-ジヒドロ-2,7-(エポキシペンタデカ[1,11,13]トリエノイミノ)フロ[2″,3″:7′,8′]ナフト[1′,2′:4,5]イミダゾ[1,2-*a*]ピリジン-25-イル
（英名）
(2*S*,16*Z*,18*E*,20*S*,21*S*,22*R*,23*R*,24*R*,25*S*,26*R*,27*S*,28*E*)-5,6,21,23-Tetrahydroxy-27-methoxy-2,4,11,16,20,22,24,26-octamethyl-1,15-dioxo-1,2-dihydro-2,7-(epoxypentadeca[1,11,13]trienoimino)furo[2″,3″:7′,8′]naphtho[1′,2′:4,5]imidazo[1,2-*a*]pyridin-25-yl acetate

構造式：



分子式　$C_{43}H_{51}N_3O_{11}$
分子量　785.88

2.6.1.2　リファキシミンの薬理作用

L-105 は、イタリア Alfa Wassermann 社が開発したリファマイシン系抗菌薬であり、グラム陽性菌、グラム陰性菌、好気性菌及び嫌気性菌に対して広い抗菌スペクトルを示す。その作用様式は殺菌的であり、主に細菌の RNA 合成を阻害することで抗菌活性を発揮する。

L-105 は､経口投与してもほとんど吸収されないために全身性にほとんど影響を及ぼさない特徴を有しており、消化管内のアンモニア産生菌を抑制して血中アンモニア濃度を低下させることにより、肝性脳症のパラメーター改善に効果を発揮すると考えられる。

2.6.1.3 リファキシミンの予定する効能・効果及び用法・用量

リファキシミンの予定する効能・効果及び用法・用量を表 2.6.1-1 に示す。

表 2.6.1-1. リファキシミンの予定する効能・効果及び用法・用量

効能・効果	肝性脳症における高アンモニア血症の改善
用法・用量	通常、成人にはリファキシミンとして 1 回 400 mg を 1 日 3 回食後に経口投与する。

リフキシマ錠 200mg

医薬品製造販売承認申請書添付資料

2.6.2 薬理試験の概要文

あすか製薬株式会社

目次

2.6.2 薬理試験の概要文 5
2.6.2.1 まとめ 5
2.6.2.2 効力を裏付ける試験 6
2.6.2.2.1 作用機序及び特性 6
2.6.2.2.2 *In vitro* 試験 11
2.6.2.2.3 *In vivo* 試験 18
2.6.2.2.4 薬剤耐性 22
2.6.2.3 副次的薬理試験 27
2.6.2.4 安全性薬理試験 32
2.6.2.4.1 マウスの自発運動に対する影響 32
2.6.2.4.2 Irwin 法によるマウスの行動観察評価 32
2.6.2.4.3 マウスを用いたロータロッド試験 33
2.6.2.4.4 マウスにおける痙攣誘発作用 33
2.6.2.4.5 マウスを用いたヘキソバルビタール睡眠時間に対する影響 33
2.6.2.4.6 マウスを用いたジアゼパムの抗痙攣効果に対する作用 34
2.6.2.4.7 HEK 細胞に発現させた hERG カリウムチャネルに対する L-105 の作用 34
2.6.2.4.8 麻酔イヌの心血管系及び呼吸器系に対する作用 34
2.6.2.4.9 ラットの尿量及び尿中電解質排泄に対する作用 35
2.6.2.4.10 麻酔下ネコの自律神経系に対する作用 35
2.6.2.4.11 マウス腸管内炭末輸送能に対する作用 35
2.6.2.4.12 ラットの胃腸傷害作用 36
2.6.2.4.13 ラットの胃液分泌に対する作用 36
2.6.2.5 考察及び結論 36
2.6.2.6 参考文献一覧 38

表

表 2.6.2-1. *Escherichia coli* 0124 K221 に対する L-105 及びリファンピシンの殺菌作用 7
表 2.6.2-2. *Staphylococcus aureus* FDA 209 P に対する L-105 及びリファンピシンの殺菌作用 8
表 2.6.2-3. *Staphylococcus epidermidis* RP62A に対する L-105、リファンピシン及びリファペンチンの MBC/MIC 比 8
表 2.6.2-4. L-105 処理後の細菌における病原性因子の発現 10
表 2.6.2-5. 標準菌株（13 株）に対する L-105 の抗菌活性 12
表 2.6.2-6. 臨床分離株（717 株）に対する L-105 の抗菌活性 13
表 2.6.2-7. 細菌（3 種）に対する L-105 及びリファンピシンの MIC 14
表 2.6.2-8. 好気性及び通性嫌気性菌（177 株）に対する L-105 及び各種抗菌薬の MIC 15

表 2.6.2-9. *Clostridium difficile*（93 株）に対する L-105、メトロニダゾール及びバンコマイシンの MIC 16
表 2.6.2-10. *Bacteroides* spp.（92 株）及び *Clostridium perfringens*（15 株）に対する L-105 及びリファンピシンの MIC 範囲 17
表 2.6.2-11. 臨床分離株（98 株）に対する L-105、リファンピシン及びリファマイシンの MIC 17
表 2.6.2-12. *Enterobacteriaceae*（134 株）、*Staphylococcus* spp.（39 株）及び *Enterococcus* spp.（52 株）に対する L-105 及び 25-*O*-脱アセチル体の MIC 18
表 2.6.2-13. *Staphylococcus aureus Colliva* 感染マウスに対する L-105、リファンピシン及びゲンタマイシンの *in vivo* 活性 19
表 2.6.2-14. L-105 投与前後の糞便から分離した腸球菌に対する L-105 の MIC 27
表 2.6.2-15. L-105 投与前後の糞便から分離した腸球菌に対するリファンピシンの MIC 27
表 2.6.2-16. *Helicobacter pylori*（43 株）に対する L-105 及び各種抗菌薬の MIC 28
表 2.6.2-17. *Helicobacter pylori*（40 株）に対する L-105 及び *H. pylori* 除菌薬の MIC 28
表 2.6.2-18. *Mycobacterium tuberculosis*（5 株）における L-105 処理前後の L-105 及びリファンピシンの MIC 31

図

図 2.6.2-1. ラット血中アンモニア濃度に対する作用 20
図 2.6.2-2. ラット肝性脳症モデルにおける昏睡発症に対する効果 21
図 2.6.2-3. ラット肝性脳症モデルにおけるイベント発生時の静脈血中アンモニア濃度に対する効果 22

略語一覧表

略語	省略しない形	
	日本語	英語
ATCC	アメリカンタイプカルチャーコレクション	American Type Culture Collection
CLSI	臨床検査標準協会	Clinical and Laboratory Standards Institute
C_{max}	最高血漿中濃度	Maximum Plasma Concentration
CMC	カルボキシメチルセルロース	Carboxymethyl cellulose
EAEC	腸管凝集性大腸菌	Enteroaggregative *Escherichia coli*
ED_{50}	50%有効量	Median effective dose
ESBL	基質拡張型 β-ラクタマーゼ	Extended-spectrum β-lactamase
ETEC	腸管毒素原性大腸菌	Enterotoxigenic *Escherichia coli*
HEK	ヒト胎児由来腎臓	Human embryonic kidney
hERG	ヒト遅延整流性カリウムイオンチャネル遺伝子	Human Ether-a-go-go Related Gene
IC_{50}	50%阻害濃度	Half maximal (50%) inhibitory concentration
I_{Kr}	急速活性型遅延整流カリウム電流	Rapid components of delayed rectifier potassium currents
IL	インターロイキン	Interleukin
LT	易熱性毒素	Heat-labile toxin
$LVdp/dt_{max}$	左室内圧最大上昇速度	Maximum rate of left ventricular pressure rise
MBC	最小殺菌濃度	Minimum bactericidal concentration
MIC	最小発育阻止濃度	Minimum inhibitory concentration
MIC_{50}	50%最小発育阻止濃度	50% Minimal inhibitory concentration
MIC_{90}	90%最小発育阻止濃度	90% Minimal inhibitory concentration
MMP	マトリックスメタロプロテアーゼ	Matrix metalloproteinase
PCR	ポリメラーゼ連鎖反応	Polymerase chain reaction
ST	耐熱性毒素	Heat-stable toxin

2.6.2 薬理試験の概要文

2.6.2.1 まとめ

L-105 の薬理学的特性について、細菌に対する作用を中心に *in vitro* 及び *in vivo* 試験の成績をまとめた。さらに、肝性脳症に関して実験的病態モデルを作製し、L-105 の有効性を評価した。他方、肝性脳症の治療目的に関与しない副次的薬理試験として、他の感染性疾患及びその治療薬等との相互性を考慮した交差耐性を含む試験成績をまとめた。また、安全性薬理試験の成績をまとめた。

L-105 は、細菌への[^{3}H]ウリジンの取込みを濃度依存的に抑制し、RNA 合成阻害作用を示した。L-105 は、他のリファマイシン系抗菌薬と同様に、細菌の RNA の合成阻害作用を発揮すると考えられた。L-105 は殺菌的な作用様式を示した。

L-105 は、抗菌活性以外にも様々な作用を有する。例えば、L-105 は上皮細胞の生理機能を変化させ、その結果として細菌の上皮細胞への接着抑制又は侵入抑制を示した。また、L-105 による細菌の形態学的変化、病原性因子の減少及びプラスミドの除去などは、最小発育阻止濃度（MIC）と比較して低濃度で認められた。すなわち、L-105 は MIC 以上で殺菌作用を有し、MIC 未満では細菌の形態学的変化など殺菌以外の作用を有すると考えられた。L-105 は、下痢原性 *Escherichia coli*（*E. coli*）による旅行者下痢症に対し、病原菌数を大きく減少させず（腸内細菌叢を変化させず）に、罹病期間を短縮する。このような非侵襲性の細菌性消化管感染症治療における L-105 の有効性には、殺菌作用及びそれ以外の作用が寄与していると考えられた。

標準菌株及び臨床分離株を用い、L-105 の抗菌活性を評価した。臨床分離株を用いた抗菌活性は、対照薬としてリファマイシン系抗菌薬リファンピシンなどと比較検討した。L-105 は多くの菌株に対して良好な抗菌活性を示し、抗菌スペクトルの広さ及び作用の強さはリファンピシンと同等であった。ただし、消化管吸収性に乏しいことから L-105 の作用部位は消化管に限局され、腸内細菌に対して広範な抗菌活性を発揮すると考えられた。

腸内細菌は肝性脳症の原因となる血中アンモニア濃度の上昇に関与していることから、肝性脳症における L-105 の治療効果には、腸内細菌に対する抗菌活性などが関与していると考えられた。正常ラット血中アンモニア濃度に対する L-105 経口投与の影響を評価したところ、L-105 は腸間膜静脈血中アンモニア濃度を有意に低下させた。また、L-105 の経口投与は実験的肝性脳症モデルにおける静脈血中アンモニア濃度の著明な上昇を抑制した。さらに、同モデルで見られる昏睡の発生を L-105 は用量依存的に抑制した。これらの結果から、L-105 は腸内細菌に由来する血中アンモニア濃度を低下させることにより、肝性脳症の病態を改善すると考えられた。

L-105 に対する耐性の出現機序は、RNA ポリメラーゼの点突然変異に起因するもので、リファンピシン耐性の出現機序と同様であった。耐性菌 DNA の単離及び *rpoB* 遺伝子（RNA ポリメラーゼ β サブユニットをコード）の配列決定を行った結果、コドン 513、516、522 及び 529 上の 5 種類のミスセンス突然変異が特定された。また、L-105 に対する自然耐性変異は複数の臨床分離株において異なっていたため、偶発的に自然発生すると考えられた。

副次的薬理試験として L-105 の *Helicobacter pylori*（*H. pylori*）に対する作用を検討した結果、明確な抗菌活性を示したが、MIC 以下の濃度で耐性が出現した。また、*Clostridium difficile*（*C. difficile*）

及び *Mycobacterium tuberculosis*（*M. tuberculosis*）に対する L-105 耐性菌が出現した場合、これらの菌のリファンピシン交差耐性が臨床上懸念されたが、リファンピシン交差耐性が出現する可能性は実験的に確認できなかった。L-105 は、経口投与後の消化管吸収がほとんどないために全身性の結核菌感染症に無効であり、L-105 は少なくとも全身性の結核菌感染症においてリファンピシンの感受性を変化させないと考えられた。

安全性薬理試験では、マウス、ラット、ネコ及びイヌに L-105 を単回経口投与又は十二指腸内投与して、中枢神経系、心血管系（*in vitro* の評価を含む）、呼吸器系、腎／泌尿器系、自律神経系及び胃腸管系に及ぼす影響を評価した。それぞれ、中枢神経系についてはマウスの自発運動、神経行動、運動協調性、痙攣誘発作用、ヘキソバルビタール誘発睡眠時間及びジアゼパムの抗痙攣効果に及ぼす影響を、心血管系及び呼吸器系についてはイヌの各パラメーターに及ぼす影響を、腎／泌尿器系についてはラットの尿量及び尿中電解質排泄量に及ぼす影響を、自律神経系についてはネコの瞬膜収縮及び心拍数と平均動脈圧への影響を、胃腸管系についてはマウス腸管内炭末輸送能とラットの胃に及ぼす影響を検討した結果、L-105 投与による明らかな影響は認められなかった。また、ヒト遅延整流性カリウムイオンチャネル遺伝子（hERG）由来のカリウムチャネルを安定発現させたヒト胎児由来腎臓（HEK）293 細胞を用いた *in vitro* 試験の結果、L-105 によるカリウム電流の 50%阻害濃度（IC_{50}）は 100 μmol/L 以上であり、QT 間隔延長のリスクは低いと考えられた。

2.6.2.2 効力を裏付ける試験

2.6.2.2.1 作用機序及び特性

（1） RNA 合成阻害作用

参考資料 4.2.1.1-1（概要表 2.6.3.2）

L-105 の作用機序が、他のリファマイシン誘導体の作用機序と類似するか比較検討した。この試験では、対照薬として細菌の RNA 合成を阻害するリファンピシン及び細菌のタンパク合成阻害剤であるクロラムフェニコールを用いた。*E. coli* 培養による放射性標識化合物（[^{35}S]メチオニン、[^{3}H]ウリジン、[^{3}H]チミジン）の取込みを指標とし、L-105 が細胞分裂過程のどの時点で作用するか評価した。抗菌薬及び放射性標識化合物を細菌培養液中に添加し、その 7～29 分後に試料を採取して放射性標識化合物の取込みを測定した。

[^{3}H]ウリジンの取込みの測定により、RNA 合成に及ぼす影響を評価した。L-105 及びリファンピシンは[^{3}H]ウリジンの取込みを顕著に抑制したが、クロラムフェニコールは抑制しなかった。L-105 及びリファンピシンの濃度依存性を検討したところ、両薬物は濃度依存的に[^{3}H]ウリジンの取込みを抑制した。両薬物の作用程度は共に 30 μg/mL で RNA 合成を部分的に阻害、60 μg/mL で完全に阻害するものであった。細菌のタンパクへの[^{35}S]メチオニンの取込みの測定により、タンパク合成への影響を評価した。L-105 及びリファンピシンは[^{35}S]メチオニンの取込みを抑制しなかったが、クロラムフェニコールでは[^{35}S]メチオニンの取込みを速やかに抑制した。L-105、リファ

ンピシン及びクロラムフェニコールは、[^{3}H]チミジンの取込みを抑制せず、DNA 合成を阻害しなかった。

以上の結果より、L-105 及びリファンピシンの[^{3}H]ウリジン取込み抑制作用が確認された。L-105 は、*E. coli* の RNA 合成を選択的に阻害するリファンピシンと類似した作用を有し、タンパク及び DNA の合成は阻害しなかった。

（2） 殺菌作用

参考資料 4.2.1.1-2（概要表 2.6.3.2）

L-105 の殺菌作用をリファンピシンと比較検討した。L-105 存在下における *E. coli* 0124 K221 及び *Staphylococcus aureus*（*S. aureus*）FDA 209 P の生存の程度をプレートカウント法で評価した。所定濃度の抗菌薬を対数増殖期にある細菌を含む Brain Heart Infusion 液体培地に添加し、0、2 及び 4 時間後に既知量の培地を採取した。次に採取した各培地を希釈後、カンテン平板上に塗布し、37℃ で 48 時間培養後に生菌数を測定した。

L-105 及びリファンピシンは濃度依存的に生菌数を低下させ、両薬物の作用は同程度であった（表 2.6.2-1 及び表 2.6.2-2）。L-105 は *E. coli* 0124 K221 及び *S. aureus* FDA 209 P に対してリファンピシンと同程度の殺菌作用を示した。

表 2.6.2-1. *Escherichia coli* 0124 K221 に対する L-105 及びリファンピシンの殺菌作用

濃度	0 時間	2 時間		4 時間	
		L-105	リファンピシン	L-105	リファンピシン
0 μg/mL	1.8×10^7 2.3×10^7	4.0×10^9 3.6×10^9		3.8×10^{12} 2.2×10^{12}	
3.12 μg/mL	−	1.6×10^8 1.2×10^8	3.6×10^8 2.9×10^8	2.0×10^9 1.8×10^9	6.1×10^9 5.8×10^9
6.25 μg/mL	−	1.6×10^6 2.0×10^6	5.1×10^5 8.9×10^5	2.0×10^8 9.1×10^7	1.3×10^8 3.7×10^8
12.5 μg/mL	−	7.8×10^4 1.1×10^5	5.0×10^4 6.4×10^4	6.9×10^5 2.8×10^6	1.1×10^5 9.2×10^4
25 μg/mL	−	3.6×10^4 4.2×10^4	2.8×10^4 5.6×10^4	3.7×10^5 5.2×10^5	6.6×10^4 2.1×10^5

数値は、所定時間の薬物処置した細菌の一部を 48 時間培養したときの生菌数（cells/mL）を示した。

表 2.6.2-2. *Staphylococcus aureus* FDA 209 P に対する L-105 及びリファンピシンの殺菌作用

濃度	0 時間	2 時間		4 時間	
		L-105	リファンピシン	L-105	リファンピシン
0 μg/mL	4.8×10^6 4.7×10^6	8.0×10^8 7.8×10^8		9.7×10^{10} 1.2×10^{10}	
0.001 μg/mL	–	3.1×10^8 7.2×10^8	7.8×10^8 7.6×10^8	1.5×10^9 1.3×10^9	1.8×10^{10} 7.1×10^9
0.01 μg/mL	–	7.0×10^6 5.3×10^6	4.9×10^7 5.4×10^7	2.9×10^8 1.3×10^8	3.4×10^6 3.8×10^6
0.1 μg/mL	–	5.0×10^5 5.0×10^5	4.0×10^5 5.0×10^5	1.6×10^5 1.8×10^5	1.4×10^5 1.6×10^5
1 μg/mL	–	1.1×10^4 1.0×10^4	8.0×10^4 3.0×10^4	2.4×10^5 2.6×10^5	1.3×10^5 1.5×10^5

数値は、所定時間の薬物処置した細菌の一部を 48 時間培養したときの生菌数（cells/mL）を示した。

別の試験 [1]で、*Staphylococcus epidermidis* RP62A に対する L-105 の MIC と最小殺菌濃度（MBC）が比較検討されている。この試験では対照薬としてリファンピシン及びリファペンチンを用い、MIC 及び MBC の測定は Clinical and Laboratory Standards Institute（臨床検査標準協会、CLSI）のガイドライン（2003 年）に従った段階希釈法（Mueller-Hinton 液体培地）で実施されている。また、5×10^5 CFU/mL の菌を 37°C、24 時間の培養条件で評価している。

L-105 の MIC 及び MBC は、それぞれ 0.012 及び 0.025 μg/mL（MBC/MIC 比= 2）であり、リファペンチンの MIC 及び MBC も同様であった。リファンピシンの MIC 及び MBC は共に 0.006 μg/mL であった（表 2.6.2-3）。いずれの薬物においても、MBC 及び MIC とで大差を認めないことから、L-105 の作用様式はリファンピシン及びリファペンチンと同様に殺菌的であった。

表 2.6.2-3. *Staphylococcus epidermidis* RP62A に対する L-105、リファンピシン及びリファペンチンの MBC/MIC 比

抗菌薬	MIC (μg/mL)	MBC (μg/mL)	MBC/MIC 比
L-105	0.012	0.025	2
リファンピシン	0.006	0.006	1
リファペンチン	0.012	0.025	2

（3） 上皮細胞に及ぼす影響

参考資料 4.2.1.1-3（概要表 2.6.3.2）

L-105 は腸管感染症の症状を軽減するが、多くの場合、病原菌の根絶が認められず、腸内細菌叢への影響も限定的である。したがって、L-105 治療が良好な結果を示す理由の一部は、腸の上皮細胞に作用して細菌の接着又は侵入に対して抵抗性を持たせる効果によるのではないかとの仮説に基づいて本試験を実施した。上皮細胞として喉頭癌 HEp-2 細胞、回盲腺癌 HCT-8 細胞、肺腺癌

A549 細胞及び子宮頸部類上皮癌 HeLa 細胞を用い、L-105 による影響を腸管凝集性 *E. coli*（EAEC）の接着又は侵入を指標に評価した。すなわち、各細胞にあらかじめ L-105 64 μg/mL を処理し、続いて L-105 を洗浄した。L-105 前処理後の細胞に EAEC O42 株を添加し、細胞への細菌接着又は侵入を測定した。

L-105 を 24 時間前処理した HEp-2、A549 及び HeLa 細胞への EAEC（3 時間添加）の接着は有意に低下したが、HCT-8 細胞への接着低下は認められなかった。また、同時に行ったリファンピシン（64 μg/mL）又はドキシサイクリン（64 μg/mL）の前処理（24 時間）では、いずれの細胞でも EAEC の接着は有意に低下しなかった。

L-105 による上皮細胞の変化について、他の細菌でも検討した。L-105 を 24 時間前処理した A549 細胞に *Bacillus anthracis*（*B. anthracis*）を 1 時間、L-105 を 24 時間前処理した HeLa 細胞に *Shigella sonnei*（*S. sonnei*）を 3 時間添加したところ、A549 細胞への *B. anthracis* の接着及び侵入は有意に低下したが、HeLa 細胞への *S. sonnei* の接着及び侵入には影響が認められなかった。L-105 による上皮細胞への影響は、細胞や細菌の種類によって異なることが示唆された。また、HEp-2 細胞を 64 μg/mL の L-105 で 24 時間処理すると、L-105 非処理と比較して培養上清中に放出される炎症性サイトカイン（IL-8、IL-6 など）量が減少した。

以上の結果より、L-105 は上皮細胞の生理機能を変化させる可能性が示唆された。

（4） 細菌病原性因子に及ぼす影響

参考資料 4.2.1.1-4（概要表 2.6.3.2）

旅行者下痢症患者から分離した細菌の病原性因子発現に対する L-105 の影響を、腸管毒素原性 *E. coli*（ETEC）5 株、EAEC 2 株、及び *S. sonnei* 1 株を用いて検討した。分離細菌を L-105（8、32 及び 64 μg/mL）に 4、8、18 及び 24 時間曝露し、病原性因子［耐熱性毒素（ST）及び易熱性毒素（LT）、表面接着因子（CS2/CS3、CS6）、マトリックスメタロプロテアーゼ（MMP）-9］の発現について評価した。全ての分離細菌を、アセトン又は L-105 を含有する Mueller-Hinton 液体培地中 37°C で培養した。次に、Mueller-Hinton 液体培地を MacConkey カンテン培地に塗抹して増殖させた。生育した ETEC は、Colonization Factor Antigen カンテン培地で培養後に total RNA を抽出した。ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）の後に ST、LT、CS2/CS3 及び CS6 の発現を確認した。また、MacConkey カンテン培地で生育した EAEC 及び *S. sonnei* の MMP-9 の発現をゼラチンザイモグラフィーにより解析した。

8、32 及び 64 μg/mL の L-105 に 4 及び 8 時間曝露された ETEC は、検討した全ての病原性因子（ST、LT、CS2/CS3 及び CS6）を発現していた。18 時間曝露では、8 μg/mL の L-105 で全ての病原性因子を発現していた。24 時間曝露では、8 μg/mL の L-105 では病原性因子の発現が見られず、32 又は 64 μg/mL では生存する分離株はなかった。

8 μg/mL の L-105 に 4 及び 8 時間曝露された EAEC は、MMP-9 を発現していた。18 時間曝露では 1 つの分離株で MMP-9 を発現したが、もう 1 つの株では発現が見られなかった。24 時間曝露でも両分離株は生存していたが、MMP-9 の発現は見られなかった。8 μg/mL の L-105 に 4 時間曝

露された *S. sonnei* は MMP-9 を発現していたが、それ以上の曝露時間及び L-105 濃度では MMP-9 を発現しないか生存していなかった。

以上の結果より、L-105 は ETEC、EAEC 及び *S. sonnei* の病原性因子の発現を抑制した。これらの影響は殺菌作用を示す濃度未満（8 μg/mL）で認められ、抗菌活性とは異なる作用様式が寄与していると考えられた。

表 2.6.2-4. L-105 処理後の細菌における病原性因子の発現

菌種	株数	病原性因子	曝露時間（hr）	L-105 濃度(μg/mL)		
				8	32	64
Enterotoxigenic *Escherichia coli*	5	ST、LT、CS2/CS3 及び CS6	4	+	+	+
			8	+	+	+
			18	+	−	NV
			24	−	NV	NV
Enteroaggregative *Escherichia coli*	2	MMP-9	4	+	−	−
			8	+	−	−
			18	1/2[a]	−	−
			24	−	NV	NV

+：病原性因子発現あり、−：病原性因子発現なし、NV：菌生存せず

[a] 2 株のうち 1 株で病原性因子発現あり

（5） 細菌の形態及びプラスミドに及ぼす影響

参考資料 4.2.1.1-5（概要表 2.6.3.2）

細菌の形態及び生理機能（プラスミドの保有安定性及び伝達）に対する L-105 の影響を検討した。抗菌薬の MIC は CLSI のガイドライン（2005 年）に従い、Mueller-Hinton 液体培地を用い微量液体希釈法で求めた。MIC の 1/2 濃度以下の L-105 添加後に *E. coli* の形態変化を顕微鏡で観察した。各種プラスミド保有細菌を L-105（MIC の 1/2 濃度）存在下で 20 回以上継代させた後、プラスミドの除去について検討した。また、接合時でのプラスミド保有（ドナー）菌株からレシピエント菌株へのプラスミドの伝達への L-105 の影響についても検討した。

L-105 に対する自然耐性発生率は 2.6×10^{-7} であり、L-105（MIC の 1/2 又は 1/4 濃度）存在下では 10^{-5} 程度であった。L-105 を曝露した細菌の形態を観察したところ、MIC の 1/32 という低い濃度で、*E. coli* ATCC 25922 の L-105 感受性株（MIC は 4 μg/mL）及び耐性株（MIC は 512 μg/mL 以上）の両方で細菌の形態学的変化が観察された。L-105 非存在下で増殖した株に比べ、L-105 に曝露された株の大部分は約 1/2 に短小化し、まれに 3 又は 4 倍に伸長化したものも認められた。他方、プラスミドの除去を評価したところ、プラスミドが除去された *E. coli* の割合は、4.5～70%（F*lac*：ラクトースオペロンを持つプラスミド）、0～18%（pBP507：アミカシン耐性規定因子遺伝子を持つプラスミド）、7.7～43.8%（ESBL：薬剤不活化酵素 ESBL 遺伝子を持つプラスミド）

及び 22.4～46.1%（ETEC mex264 : ETEC mex264 由来の毒素をコードするプラスミド）であった。また、*S. aureus*（2 株）の 8.4～18.2%及び<0.1～18%（Pen R：ペニシリナーゼ遺伝子を持つプラスミド）、*Morganella morganii*（*M. morganii*）の 9.5～58.6%（ESBL）、*Citrobacter freundii*（*C. freundii*）の 10.6～47.1%（ESBL）、*Proteus mirabilis*（*P. mirabilis*）の 2.3～38.7%（ESBL）及び *Klebsiella pneumoniae*（*K. pneumoniae*）の 14.3～66.6%（ESBL）でプラスミドが除去された。L-105 はドナー菌株からレシピエント菌株へのプラスミドの伝達を>99%減少させた。さらに、ESBL 産生株に対して、MIC の 1/2 濃度の L-105 を添加するとセフタジジムの抗菌活性は 2～4 倍高まった。

以上の結果より、L-105 は細菌の形態及びプラスミドの伝達などに影響を及ぼした。これら L-105 による影響は、細菌の生存及び病原性の低下につながる可能性があると考えられた。

2.6.2.2.2 *In vitro* 試験

（1） 標準菌株及び臨床分離株に対する抗菌活性

参考資料 4.2.1.1-6、4.2.1.1-7、4.2.1.1-8、4.2.1.1-9、4.2.1.1-10、4.2.1.1-11 及び 4.2.1.1-12（概要表 2.6.3.2）

標準菌株（13 株）及び臨床分離株（717 株）に対する L-105 の抗菌活性をまとめた（表 2.6.2-5 及び表 2.6.2-6）。標準菌株及び臨床分離株［*Yersinia enterocolitica*（*Y. enterocolitica*）、*Campylobacter jejuni*（*C. jejuni*）、*H. pylori*、*C. difficile* 及び *Bacteroides* spp.］に対する MIC はカンテン希釈法を用い、それ以外の分離株に対しては微量液体希釈法を用いて測定した。

L-105 は好気性及び嫌気性グラム陽性菌並びにグラム陰性菌に対し、幅広い抗菌スペクトルを示した。

表 2.6.2-5. 標準菌株（13 株）に対する L-105 の抗菌活性

菌株		MIC (μg/mL)	MIC 範囲 (μg/mL)	資料番号
通性嫌気性グラム陽性球菌	*Staphylococcus aureus* ATCC 29213	16	–	4.2.1.1-6
	Staphylococcus aureus ATCC 25923	0.002	0.001 – 0.005	4.2.1.1-7
	Enterococcus faecalis ATCC 29212	0.015	–	4.2.1.1-8
通性嫌気性グラム陰性桿菌	*Escherichia coli* ATCC 25922	16 – 32	16 – 64	4.2.1.1-7
偏性好気性グラム陰性桿菌	*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853	32	–	4.2.1.1-6
偏性嫌気性グラム陽性球菌	*Peptostreptococcus anaerobius* ATCC 27337	16	–	4.2.1.1-7
	Peptostreptococcus productus ATCC 27340	16	–	4.2.1.1-7
	Parvimonas micra ATCC 33270	2	–	4.2.1.1-7
偏性嫌気性グラム陰性桿菌	*Bacteroides fragilis* ATCC 25285	0.1 – 0.2	0.05 – 0.2	4.2.1.1-7
	Bacteroides thetaiotaomicron ATCC 29741	0.2	0.02 – 0.5	4.2.1.1-7
	Prevotella bivia ATCC 29303	4	–	4.2.1.1-7
	Fusobacterium necrophorum ATCC 25286	16	–	4.2.1.1-7
偏性嫌気性グラム陽性桿菌	*Clostridium perfringens* ATCC 13124	0.002	0.001 – 0.005	4.2.1.1-7

MIC：最小発育阻止濃度（MIC_{50} 及び MIC_{90} は参考資料の試験結果から算出できなかった）

表 2.6.2-6. 臨床分離株（717 株）に対する L-105 の抗菌活性

菌種	株数	MIC_{50} / MIC_{90} (μg/mL)	MIC 範囲 (μg/mL)	資料番号
Staphylococcus aureus オキサシリン感受性	40	0.015 / ≦0.015	≦0.015 – 0.03	4.2.1.1-9
Staphylococcus aureus オキサシリン耐性	11	≦0.015 / >8	0.015 – >8	4.2.1.1-9
Staphylococcus epidermidis	20	≦0.015 / ≦0.015	≦0.015	4.2.1.1-9
Streptococcus pneumoniae	30	≦0.03 / 0.06	≦0.03 – >4	4.2.1.1-9
Enterococcus faecalis	21	2 / 8	0.5 – >8	4.2.1.1-9
Enterococcus faecium	11	2 / >8	≦0.015 – >8	4.2.1.1-9
Neisseria spp.	16	0.5 / 2	≦0.03 – 2	4.2.1.1-9
Moraxella catarrhalis	20	≦0.03 / ≦0.03	≦0.03 – 0.06	4.2.1.1-9
Bacillus cereus	7	0.06 / –	0.03 – 0.12	4.2.1.1-9
Escherichia coli	20	8 / >8	2 – >8	4.2.1.1-9
Shigella spp.	10	4 / 8	2 – >8	4.2.1.1-9
Salmonella enteritidis	10	2 / 8	2 – >8	4.2.1.1-9
Citrobacter freundii	20	>8 / >8	>8	4.2.1.1-9
Enterobacter aerogenes	20	>8 / >8	4 – >8	4.2.1.1-9
Enterobacter cloacae	20	>8 / >8	0.25 – >8	4.2.1.1-9
Serratia marcescens	20	>8 / >8	4 – >8	4.2.1.1-9
Proteus mirabilis	20	4 / 4	1 – 4	4.2.1.1-9
Proteus vulgaris	10	4 / 4	2 – >8	4.2.1.1-9
Providencia rettgeri	10	8 / >8	2 – >8	4.2.1.1-9
Providencia stuartii	10	4 / 4	2 – 4	4.2.1.1-9
Yersinia enterocolitica	74	6.25 / 12.5	0.2 – 12.5	4.2.1.1-10
Haemophilus influenzae	58	0.25 / 2	≦0.03 – 2	4.2.1.1-9
Xanthomonas maltophilia	10	8 / <8	≦0.015 – <8	4.2.1.1-9
Acinetobacter spp.	10	2 / 4	0.06 – 4	4.2.1.1-9
Campylobacter jejuni	54	12.5 / >100	0.78 – >100	4.2.1.1-10
Helicobacter pylori	40	4 / 8	4 – 16	4.2.1.1-11
Bacteroides spp.	32	0.2 / 1	0.1 – >256	4.2.1.1-7
Clostridium difficile	93	0.004 / 128	0.004 – 128	4.2.1.1-12

MIC_{50}：50%最小発育阻止濃度

MIC_{90}：90%最小発育阻止濃度

（2） 真菌、ウイルス及び寄生虫に対する活性

参考資料 4.2.1.1-9（概要表 2.6.3.2）

真菌（*Candida* spp.）、ウイルス（Herpes virus）及び寄生虫［*Trichomonas vaginalis*（*T. vaginalis*）］に対する L-105 の活性を検討した。*Candida* spp.に対する L-105 の活性は、1%酵母ニトロゲンベース培地を用いたカンテン希釈法で増殖を評価した。接種菌量は 10^3 CFU/spot とし、48 時間後に増殖を測定した。Herpes virus に対する L-105 の活性は、ヒト肺線維芽細胞 MRC-5 に Herpes virus を接種し、細胞変性を評価した。*T. vaginalis* に対する L-105 の活性は、寄生虫の運動性、形態及び増殖を評価した。L-105 は経口投与では難吸収性であるため、適宜高濃度域まで設定した。

Candida spp.に対して、L-105 は 5000 μg/mL の濃度まで不活性であった。Herpes virus 及び *T. vaginalis* に対しても、L-105 はそれぞれ 512 及び 256 μg/mL の濃度まで不活性であった。L-105 は、*Candida* spp.、Herpes virus 及び *T. vaginalis* に対する活性を示さないと考えられた。

（3） 接種菌量による影響

参考資料 4.2.1.1-2（概要表 2.6.3.2）

L-105 の抗菌活性に及ぼす接種菌量の影響を検討した。対照薬としてリファンピシンを用いた。MIC は数種の菌株［*E. coli* ent. 0124 K221、*Salmonella wien*（*S. wien*）LP 及び *P. mirabilis* Galleri II］において Brain Heart Infusion 液体培地を用いた段階希釈法で測定した。接種菌量は 10^5～10^9 cells/mL とし、一定の培養時間後に結果を評価した。

L-105 の抗菌活性は、リファンピシリンと同様に接種菌量が 10^9 cells/mL のとき減弱した。（表 2.6.2-7）。L-105 の抗菌活性は、菌量の影響を受けると考えられた。

表 2.6.2-7. 細菌（3 種）に対する L-105 及びリファンピシンの MIC

接種菌量（cells/mL）	*Escherichia coli ent.* 0124 K221		*Salmonella wien* LP		*Proteus mirabilis* Galleri II	
	L-105 (μg/mL)	リファンピシン (μg/mL)	L-105 (μg/mL)	リファンピシン (μg/mL)	L-105 (μg/mL)	リファンピシン (μg/mL)
10^5	12 – 25	6	6 – 12	6 – 12	3 – 6	1.5 – 3
10^7	12 – 25	3 – 6	6 – 12	6 – 12	6 – 12	3 – 6
10^9	>50	>50	25 – 50	>50	>50	>50

（4） 臨床分離株に対する抗菌活性の他剤比較

1） 好気性及び通性嫌気性菌に対する活性

参考資料 4.2.1.1-13（概要表 2.6.3.2）

177 株の臨床分離菌［腸管凝集性 *E. coli*（EAEC）、腸管毒素原性 *E. coli*（ETEC）、*Shigella* spp.、*Salmonella* spp.、*Y. enterocolitica*、*Aeromonas hydrophila*、*C. jejuni*］に対する L-105 の活性を他剤と比較検討した。MIC は、CLSI のガイドライン（1997 年）に従ってカンテン希釈法を用いて測定した。精度管理菌株として *E. coli* ATCC 29522 を用いた。試験した分離株に対する MIC_{50} 及び MIC_{90} を使用した抗菌薬ごとに算出し、表 2.6.2-8 に示した。

Y. enterocolitica 及び *C. jejuni* を除いて、試験に用いた多くの細菌で L-105 の MIC_{50} 及び MIC_{90} はリファンピシンと非常に近似していた。L-105 は *E. coli*、*Shigella* spp.、*Salmonella* spp.などの腸内病原菌に対して良好な抗菌活性を示した。

表 2.6.2-8. 好気性及び通性嫌気性菌（177 株）に対する L-105 及び各種抗菌薬の MIC

菌種	株数	L-105		リファンピシン		アンピシリン		クロラムフェニコール		テトラサイクリン		ナリジクス酸		シプロフロキサシン		トリメトプリム	
		MIC_{50} (μg/mL)	MIC_{90} (μg/mL)	MIC_{50} (μg/mL)	MIC_{90} (μg/mL)	MIC_{50} (μg/mL)	MIC_{90} (μg/mL)	MIC_{50} (μg/mL)	MIC_{90} (μg/mL)	MIC_{50} (μg/mL)	MIC_{90} (μg/mL)	MIC_{50} (μg/mL)	MIC_{90} (μg/mL)	MIC_{50} (μg/mL)	MIC_{90} (μg/mL)	MIC_{50} (μg/mL)	MIC_{90} (μg/mL)
Enteroaggregative *Escherichia coli*	28	8	16	8	16	>128	>128	32	>128	>128	>128	4	16	<0.06	<0.06	16	>128
Enterotoxigenic *Escherichia coli*	38	8	16	8	16	>128	>128	16	64	>128	>128	<4	4	<0.06	<0.06	4	>128
Shigella flexneri	28	4	16	8	8	>128	>128	4	128	128	>128	<4	<4	<0.06	<0.06	≧128	≧128
Shigella sonnei	36	8	16	8	16	32	>128	4	8	>128	>128	<4	8	<0.06	<0.06	≧128	≧128
Salmonella spp.	14	4	4	16	16	16	>128	8	>128	≦4	128	4	4	<0.06	<0.06	<1	16
Yersinia enterocolitica	10	64	128	16	32	>128	>128	16	128	16	64	<4	8	<0.06	<0.06	16	16
Aeromonas hydrophila	11	8	8	4	16	>128	>128	4	128	8	>128	<4	<4	<0.06	<0.06	4	64
Campylobacter jejuni	12	256	512	>64	>64	32	>128	8	8	≦4	16	16	>256	0.06	32	128	128

MIC 範囲は、参考資料の試験結果から算出できなかった。

2） 偏性嫌気性菌に対する活性

a) *Clostridium difficile* に対する活性

参考資料 4.2.1.1-12（概要表 2.6.3.2）

C. difficile（93 株）に対する L-105 の抗菌活性を他剤と比較検討した。試験は CLSI のガイドライン（1995 年）に従って以下の条件で実施した。カンテン培地に約 10^5 CFU の細菌を接種し、嫌気性条件下 36°C、48 時間培養した。対照薬としてバンコマイシン及びメトロニダゾールを用い、カンテン希釈法により各薬物の MIC を測定した。

L-105 は *C. difficile* に対して抗菌活性を示した（表 2.6.2-9）。L-105 の MIC_{50} はメトロニダゾール又はバンコマイシンと比べて 1/30 以下であったが、L-105 の MIC 範囲はメトロニダゾール又はバンコマイシンより広範囲であった。なお、バンコマイシン及びメトロニダゾールは耐性株が認められなかったのに対して、L-105 では耐性株が認められた。実際に、L-105 の感受性のブレイクポイントがリファンピシン（1 μg/mL 以下）と同等と仮定した場合、試験した病原菌の約 26%は L-105 に耐性（MIC = 4～128 μg/mL）と考えられた。

表 2.6.2-9. *Clostridium difficile*（93 株）に対する L-105、メトロニダゾール及びバンコマイシンの MIC

抗菌薬	MIC_{50} (μg/mL)	MIC_{90} (μg/mL)	MIC 範囲 (μg/mL)
L-105	0.004	128	0.004 – 128
メトロニダゾール	0.125	0.25	0.06 – 0.25
バンコマイシン	1	2	0.25 – 4

b) *Bacteroides spp.*及び *Clostridium perfringens* に対する活性

参考資料 4.2.1.1-14（概要表 2.6.3.2）

Bacteroides fragilis（*B. fragilis*、75 株）、その他 *Bacteroides*（17 株）及び *Clostridium perfringens*（*C. perfringens*、15 株）に対する L-105 の抗菌活性をリファンピシンと比較検討した。対照薬としてリファンピシンを用い、抗菌活性の測定には微量液体希釈法を用いた。抗菌薬を 0.06～64 μg/mL の濃度に希釈して試験した。接種菌量は約 10^5 CFU/mL を用い、嫌気性条件下 37°C で 24 時間培養し、MIC を測定した。

B. fragilis、その他 *Bacteroides* 及び *C. perfringens* に対する L-105 及びリファンピシンの抗菌活性は、同程度であった（表 2.6.2-10）。

表 2.6.2-10. *Bacteroides* spp.（92 株）及び *Clostridium perfringens*（15 株）に対する L-105 及びリファンピシンの MIC 範囲

菌種	株数	MIC 範囲 (μg/mL)	
		L-105	リファンピシン
Bacteroides fragilis	75	≦0.06 – >64	≦0.06 – >64
Other *Bacteroides*	17	≦0.06 – 0.5	≦0.06
Clostridium perfringens	15	≦0.06 – 0.25	≦0.06 – 0.125

MIC_{50} 及び MIC_{90} は、参考資料の試験結果から算出できなかった。

c)　臨床分離株（98 株）に対する活性

参考資料 4.2.1.1-7（概要表 2.6.3.2）

臨床分離株(98 株)に対する L-105 の抗菌活性を他剤と比較検討した。L-105 の MIC_{50} 及び MIC_{90} はカンテン希釈法を用いて測定した。Wilkins-Chalgren カンテン培地を用い、嫌気性条件下 37°C で 24～72 時間培養した。対照薬としてリファンピシン及びリファマイシンを用いた。

L-105 は臨床分離株に対して良好な抗菌活性を示した。L-105 の活性程度はリファンピシンと同程度であり、リファマイシンより高かった（表 2.6.2-11）。

表 2.6.2-11. 臨床分離株（98 株）に対する L-105、リファンピシン及びリファマイシンの MIC

菌種	株数	L-105			リファンピシン			リファマイシン		
		MIC_{50} (μg/mL)	MIC_{90} (μg/mL)	MIC 範囲 (μg/mL)	MIC_{50} (μg/mL)	MIC_{90} (μg/mL)	MIC 範囲 (μg/mL)	MIC_{50} (μg/mL)	MIC_{90} (μg/mL)	MIC 範囲 (μg/mL)
Peptostreptococcus spp.	4	2	256	2 – 256	2	256	0.5 – 256	16	128	4 – 128
Bacteroides spp.	32	0.2	1	0.1 – >256	0.2	1	0.02 – >256	2	16	0.5 – >256
Prevotella spp.	3	2	4	1 – 4	0.5	1	0.05 – 2	4	8	1 – 16
Fusobacterium spp.	3	2	16	2 – 16	1	4	0.5 – 4	16	64	8 – 64
Clostridium spp.	38	0.001	0.005	<0.0001 – 2	<0.0001	0.0002	<0.0001 – 1	0.005	0.01	<0.0001 – 2
Bifidobacterium spp.	18	2	4	0.2 – 8	0.2	2	0.1 – 4	16	64	0.5 – 64

（5） L-105 及び代謝物 25-*O*-脱アセチル体の抗菌活性

参考資料 4.2.1.1-15（概要表 2.6.3.2）

通性嫌気性菌株（*Enterobacteriaceae* 134 株、*Staphylococcus* spp. 39 株及び *Enterococcus* spp. 52 株）に対する L-105 の活性を L-105 の代謝物である 25-*O*-脱アセチル体と比較検討した。MIC は、CLSI のガイドライン（2002 年）に従った微量液体希釈法を用いて測定した。L-105 を、試験する最大濃度の 4 倍の濃度の保存溶液（128 μg/mL）から段階希釈した。接種菌量は約 5×10^5 cells/mL とし、培養条件は 37°C で 18～24 時間とした。

Enterobacteriaceae に対する L-105 の MIC（MIC_{50} = 32 μg/mL、MIC_{90} = 32 μg/mL）は、25-*O*-脱アセチル体より高い抗菌活性を示した（表 2.6.2-12）。*Staphylococcus* spp.に対する L-105 の MIC（MIC_{50} = 0.25 μg/mL、MIC_{90} = 1 μg/mL）は、25-*O*-脱アセチル体に比べて 4 倍以上高い抗菌活性であった。また、*Enterococcus* spp.に対しても、L-105 は 25-*O*-脱アセチル体より高い抗菌活性であった。

L-105 は *Enterobacteriaceae*、*Staphylococcus* spp.及び *Enterococcus* spp.に対して L-105 の代謝物 25-*O*-脱アセチル体よりも高い抗菌活性を有することが示された。

表 2.6.2-12. *Enterobacteriaceae*（134 株）、*Staphylococcus* spp.（39 株）及び *Enterococcus* spp.（52 株）に対する L-105 及び 25-*O*-脱アセチル体の MIC

菌種	株数	化合物	MIC 範囲 (μg/mL)	MIC_{50} (μg/mL)	MIC_{90} (μg/mL)
Enterobacteriaceae	134	L-105	8 – 32	32	32
		25-*O*-脱アセチル体	128 – 256	128	256
Staphylococcus spp.	39	L-105	0.03 – 1	0.25	1
		25-*O*-脱アセチル体	0.12 – >16	2	16
Enterococcus spp.	52	L-105	2 – >16	8	>16
		25-*O*-脱アセチル体	4 – >16	>16	>16

2.6.2.2.3 *In vivo* 試験

（1） ラット糞便細菌叢に及ぼす影響

参考資料 4.2.1.1-16 及び 4.2.1.1-17（概要表 2.6.3.2）

L-105 の腸管内での作用を検証するため、ラット糞便中の好気性及び嫌気性細菌に及ぼす影響を検討した（4.2.1.1-16）。Sprague-Dawley（SD）系雌性ラットに L-105 又はリファンピシンを 1、10、30 及び 100 mg/kg/day の用量で 7 日間経口投与した（1 群 6 匹）。2 又は 7 日間投与後に糞便を回収し、好気性及び嫌気性細菌叢の定性・定量的評価を行った。糞便試料はホモジナイズし、ろ過の後に希釈した。好気性菌及び嫌気性菌を選択培地を用いて培養した。次に、コロニーの形態及びグラム染色を観察し、菌数を計測及び菌種を同定した。総好気性菌、総嫌気性菌、好気性大腸菌群、好気性球菌、嫌気性球菌及び嫌気性 *Bacteroides* について評価した。

L-105 は、総嫌気性菌、好気性大腸菌群、好気性及び嫌気性球菌の菌数を 1～30 mg/kg/day の用量で有意に減少させたが、用量依存性は認められなかった。また、L-105 は総好気性菌数を 30 mg/kg/day でのみ有意に減少させたが、用量依存性は認められなかった。嫌気性 *Bacteroides* に対してはいずれの用量においても菌数を変化させなかった。リファンピシンの作用は、30 mg/kg/day でのみ L-105 と同じ菌種において認められた。したがって、L-105 による菌数の変化にバラツキがあるものの、L-105 の腸内細菌叢に対する影響は一部の細菌に対してのみ認められると考えられた。

L-105 のラット糞便細菌叢に対する影響については、別の試験でも評価した（4.2.1.1-17）。Wistar 系雄性ラットに 50 mg/kg の L-105、50 mg/kg のネオマイシン又は 5%アラビアゴムを 2 日間経口投与（1 群 6 匹）した。糞便試料をホモジナイズし、ろ過の後に生理食塩液で希釈した。糞便細菌叢の組成を明らかにするため、各種細菌に適した選択培地を用いた段階希釈法により細菌数を求めた。

L-105 は総好気性菌及び *Salmonella* spp.に対して有意に細菌数を減少させた。ネオマイシンは *Salmonella* spp.に対してのみ有意な減少を示した。大腸菌群及び好気性 *Lactobacillus* spp.については、両抗菌薬とも無影響であった。L-105 の糞便細菌叢に対する影響は一部の細菌に対して認められ、全体的にはネオマイシンの作用と同程度であった。

（2） マウス全身性感染モデルに対する活性

参考資料 4.2.1.1-2（概要表 2.6.3.2）

全身性の感染に対する L-105 の *in vivo* 活性を評価した。*S. aureus Colliva* をマウスに感染させ、L-105、リファンピシン及びゲンタマイシンの作用を評価した。各群 10 例の雄性又は雌性 Swiss マウスに Brain Heart Infusion 液体培地で 18～24 時間培養した *S. aureus Colliva* 懸濁液 0.25 mL を腹腔内に接種し、接種後 4 日間にわたり観察した。*S. aureus Colliva* 接種から 1 時間後に L-105 を経口投与した。対照薬としてリファンピシン及びゲンタマイシンを用いた。L-105 及び対照薬の用量は 0.1～10 mg/kg とし、*in vivo* 活性は 50%有効量（ED_{50}）として表した。結果を表 2.6.2-13 に示した。

表 2.6.2-13. *Staphylococcus aureus Colliva* 感染マウスに対する L-105、リファンピシン及びゲンタマイシンの *in vivo* 活性

抗菌薬	ED_{50} (mg/kg)
L-105	>10
リファンピシン	0.15
ゲンタマイシン	>10

S. aureus Colliva 接種後 48～72 時間でコントロール動物の全例が死亡した。この致死的な感染に対し、L-105 は最大用量まで防御作用を示さなかった。また、ゲンタマイシンは L-105 と同じく防

御作用を示さなかった。一方、リファンピシンは良好な *in vivo* 活性を示し、全身性の感染に対して明確な防御作用を示した。

（3） ラット血中アンモニア濃度に対する作用

評価資料 4.2.1.1-18（概要表 2.6.3.2）

正常ラットに L-105 を経口投与し、腸間膜静脈血中のアンモニア濃度について評価した。SD 系雄性ラットに媒体（0.5% Tween80）又は L-105（1、3、10 及び 30 mg/kg）を 1 日 1 回、3 日間反復経口投与した。最終投与の 3 時間後に腸間膜静脈、後大静脈及び腹大動脈より採血し、血中のアンモニア濃度を測定した。

媒体投与群、L-105 の 1、3、10 及び 30 mg/kg 投与群の腸間膜静脈血中のアンモニア濃度は、それぞれ 1145.6 ± 177.4、772.1 ± 208.1、545.0 ± 131.9、528.5 ± 221.6 及び 622.7 ± 194.3 μg/dL であった。媒体投与群と比べて L-105 投与群のいずれの用量でも腸間膜静脈血中のアンモニア濃度の有意な低下が認められた。一方、後大静脈及び腹大動脈血中のアンモニア濃度は、媒体投与群と L-105 投与群との間に有意な差は認められなかった（図 2.6.2-1）。

以上の結果より、L-105 は正常ラットの腸間膜静脈血中のアンモニア濃度を低下させることが確認された。

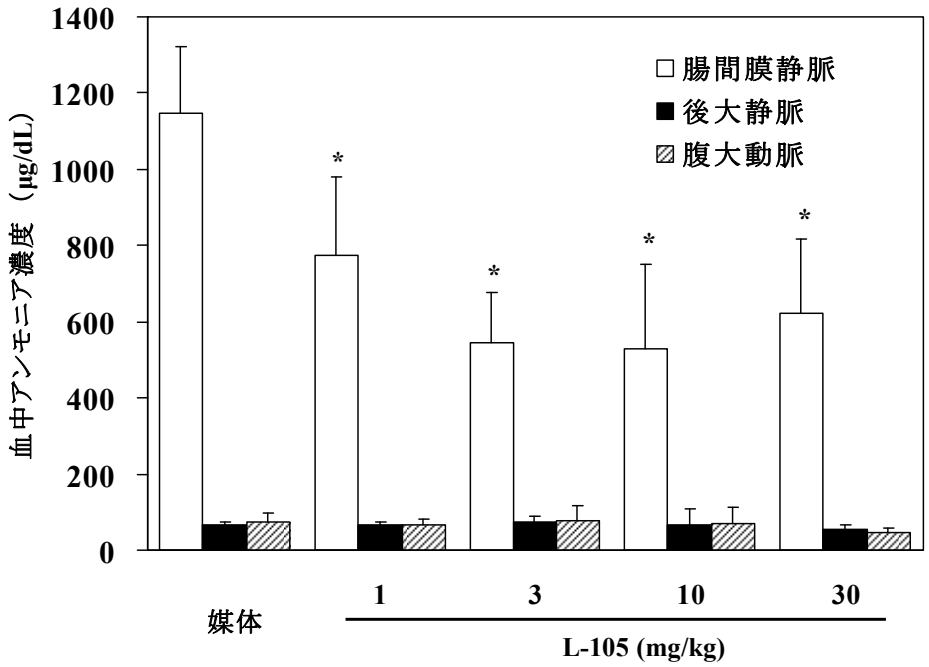


図 2.6.2-1. ラット血中アンモニア濃度に対する作用

各カラムは平均値 + 標準偏差を示す。各群 10 例、ただし、L-105 30 mg/kg 投与群の腸間膜静脈のみ 9 例。*p < 0.05（vs 媒体、Dunnett の多重比較検定）。

（4） ラット肝性脳症モデルに対する効果

評価資料 4.2.1.1-19（概要表 2.6.3.2）

門脈体循環シャント形成と部分肝切除及び門脈狭窄を組み合わせたラット肝性脳症モデルを用いて L-105 の昏睡発症の抑制効果を検証し、血中アンモニア濃度に対する作用についても評価した。門脈体循環シャントを作製した SD 系雄性ラットに媒体（0.5% Tween80）又は L-105（0.3、3、30 mg/kg）を 1 日 1 回、3 日間経口投与した。最終投与直後に約 70%部分肝切除及び門脈狭窄術を施して脳症を誘発した。脳症誘発術から昏睡発症まで 24 時間観察した。カプランマイヤー法で昏睡発生率を表記し、ログランク検定にて解析した。また、昏睡が発症したとき又は 24 時間目の測定を終了したとき（イベント発生時）に、後大静脈より採血して血中アンモニア濃度を測定した。

病態コントロールとして設定した媒体投与群では脳症誘発術後 11 時間までに 10 例中全例で昏睡が発症した。一方、L-105 の 0.3、3 及び 30 mg/kg 投与群では脳症誘発術から 24 時間までに昏睡を発症したのはそれぞれ 8/10、3/10 及び 0/10 例であった。媒体投与群と比較して L-105 の 3 及び 30 mg/kg 投与群では有意な昏睡発症の抑制が確認された（図 2.6.2-2）。

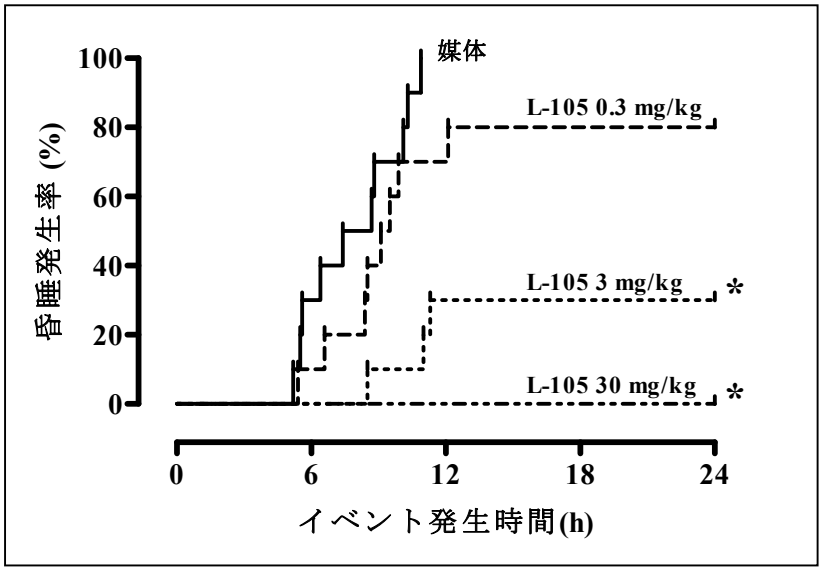


図 2.6.2-2. ラット肝性脳症モデルにおける昏睡発症に対する効果

カプランマイヤー法により昏睡発生率の分布を示し、昏睡発生時間の分布に違いがあるかどうかをログランク検定（多群の比較）により検定した。

* $p < 0.05$（vs 媒体投与群、$n = 10$）。

非処置（正常）群及び媒体（病態コントロール）投与群の血中アンモニア濃度は、それぞれ 31.1 ± 7.6 及び 1681.5 ± 674.1 μg/dL であった。媒体投与群の静脈血中のアンモニア濃度は、非処置群と比較して 50 倍以上に上昇することが確認された。一方、L-105 の 0.3、3 及び 30 mg/kg 投与群の血中アンモニア濃度は、それぞれ 1026.0 ± 642.8、387.8 ± 560.6 及び 60.2 ± 23.9 μg/dL であり、媒体投与群と比較していずれの用量でも有意に低下していることが確認された（図 2.6.2-3）。

以上より、L-105 はラット肝性脳症モデルにおいて血中アンモニア濃度の上昇を抑制し、その結果、脳症の発症を抑制することが示唆された。

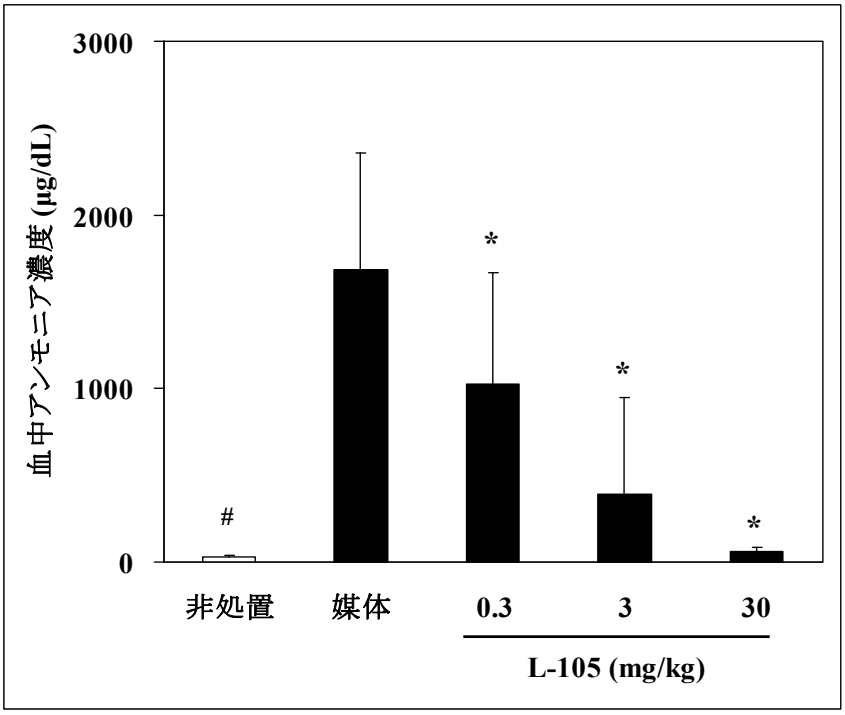


図 2.6.2-3. ラット肝性脳症モデルにおけるイベント発生時の静脈血中アンモニア濃度に対する効果

各カラムは平均値 + 標準偏差（n = 10）を示す。

# $p < 0.05$（媒体投与群 vs 非処置群、Student の *t* 検定）、

* $p < 0.05$（媒体投与群 vs L-105 投与群、パラメトリック Dunnett 型多重比較検定）。

2.6.2.2.4　　薬剤耐性

（1）　耐性機構

参考資料 4.2.1.1-20 及び 4.2.1.1-21（概要表 2.6.3.2）

L-105 耐性の分子的機序について、*Bifidobacterium* spp.の保存株を用いた 2 つの試験を実施した。RNA ポリメラーゼ β サブユニットをコードする *rpoB* の点突然変異が *E. coli* 及び *M. tuberculosis* のリファンピシン耐性を規定する主要因子と考えられているので、*Bifidobacterium infantis* BI07 を用い、耐性変異株の *rpoB* 遺伝子上の点突然変異の特性を解明することにより L-105 耐性の分子機序を検討した（4.2.1.1-20）。さらに、プロテオーム解析によって耐性表現型に関連した代謝性変化を検討した。*Bifidobacterium* spp.に対する L-105 の MIC を CLSI のガイドライン（1997 年）に従ってカンテン希釈法で測定した。メタノールに溶解した 10 mg/mL の L-105 保存溶液を用いて段階希釈し、0.031～32 μg/mL の濃度を含有する de Man-Rogosa-Sharpe（MRS）カンテン培地を作製した。耐性菌は 100 μg/mL の L-105 に耐性を示す変異株を選択した。L-105 を含まない MRS 液体培地で耐性クローンを連続培養して耐性の安定性について試験した。100、200、300 及び 400 世代

後に L-105 を含む又は含まない MRS カンテン培地でコロニーを計数した。次に点突然変異を検出するための特異的プライマーを用いた *rpoB* 遺伝子の配列決定を行った。

BI07 及び L-105 耐性 BI07 の 129 bp の *rpoB* コア領域の解析から、アミノ酸変異を伴うコドン 513 のミスセンス突然変異が認められ、抗菌薬との結合にコドン 513 でコードされるアミノ酸が役割を果たしている可能性があることが示唆された。また、BI07 及び L-105 耐性 BI07 の比較プロテオームマッピングにより、タンパク発現パターンにおける差のほとんどは、抗菌薬への曝露によって誘発されたものよりも、遺伝的にコードされたものであることが明らかになった。特に、L-105 耐性表現型及びストレスタンパクの発現量増加の関連が推定されたことから、細菌は抗菌薬存在下で代償機構を活性化している可能性が示唆された。

上記試験（4.2.1.1-20）と同様の方法で 100 µg/mL の L-105 濃度で得た自然耐性変異株を用い、遺伝子配列を検討した（4.2.1.1-21）。この試験では BI07 及び腸管内 *Bifidobacterium* spp.の *rpoB* 遺伝子配列の決定に加え、BI07 の膜透過性及び細胞膜の脂質組成についても検討した。L-105 はメタノールに溶解した保存溶液（L-105 10 mg/mL）を用いた。*Bifidobacterium* spp.を MRS 液体培地（0.05% L-システイン含有）で 18～36 時間（37°C）嫌気条件下で培養した。遺伝子配列の決定は、上記試験（4.2.1.1-20）と同方法で行った。膜透過性については、L-105 耐性 BI07 を MRS 液体培地中で L-105 100 µg/mL 存在下で培養し、培養開始後 1、2、3、4 及び 24 時間に 1 mL の培養液を採取した。培養液は遠心分離（9000 × g、5 分間）により培養液上清と菌ペレットに分離し、培養液上清中及び菌ペレットに付着した L-105 をそれぞれ酢酸エチル 300 µL で抽出した。続いて菌ペレットを溶解緩衝液［20 mmol/L Tris/HCl（pH 8）、2 mmol/L EDTA、1.2% TritonX-100 及び 20 mg/mL lysozyme］で 37°C、30 分処理して溶解し、菌溶解物中の L-105 を酢酸エチル 300 µL にて抽出した。抽出物中 L-105 量は LC-MS/MS にて測定した。また、細胞膜の脂質組成については、BI07 及び L-105 耐性 BI07 をそれぞれ MRS 液体培地及び L-105 100 µg/mL を含有する MRS 液体培地で培養した後、遠心分離（10000 × g、10 分間）により菌を回収し、70 mmol/L Tris/HCl（pH 7）で 2 回洗浄して分析時まで−80°C で保存した。分析サンプルから脂質を抽出した後、三フッ化ホウ素－メタノールで 45°C、15 分間反応させて細胞膜の構成脂肪酸をメチルエステルとした。各脂肪酸メチルエステルはヘキサンで抽出し、ガスクロマトグラフィーにて分析した。

BI07 及び L-105 耐性 BI07 のゲノム DNA の単離及び *rpoB* 遺伝子の配列決定を行った結果、コドン 513、516、522 及び 529 上の 5 種類のミスセンス突然変異が特定された。L-105 に対する耐性の機序はリファンピシンに対する耐性の機序と同様であることが確認できた。他方、耐性菌による L-105 の取込みについて検討した結果、培養液上清中、菌ペレット及び菌溶解物中の L-105 の LC-MS/MS による検出により、L-105 耐性 BI07 での抗菌薬の膜透過性の低下が示唆された。また、BI07 と L-105 耐性 BI07 の間で飽和脂肪酸と不飽和脂肪酸の割合に差が認められ、特に L-105 耐性変異株の膜は野生型細菌に比べて飽和脂肪酸の割合が高かった。飽和脂肪酸は膜に剛性を与え、抗菌薬などのストレス物質に対して抵抗性を与えるため、抗菌薬の取込みを防ぐ防御機構の存在が示唆された。以上の結果より、*Bifidobacterium* spp.における L-105 耐性機序は、RNA ポリメラーゼの点突然変異であり、リファンピシンに対する耐性機序と同様であることが確認された。また、耐性菌の性質として、膜透過性に影響を及ぼす脂肪酸組成の変化が示唆された。

（2） 自然耐性変異

参考資料 4.2.1.1-8（概要表 2.6.3.2）

L-105 に対する自然耐性変異を示す細菌の出現を検討した。アンモニア産生菌を含む好気性及び嫌気性菌を用い、試験は以下の条件で実施した。好気性菌は、好気性及び嫌気性条件下で行い、カンテン希釈法と液体希釈法の 2 つの方法で行った。なお、液体希釈法では、耐性変異の出現に最適な条件として増殖阻害濃度よりわずかに低い濃度の L-105 を細菌に曝露した。嫌気性菌株はバンコマイシンを対照薬とし、好気性菌株についてはバンコマイシン（グラム陽性）及びネオマイシン（グラム陽性及び陰性）を対照薬とした。嫌気性菌 18 株［*Finegoldia magna*（*F. magna*）2 株、*Parvimonas micra*（*P. micra*）2 株、*B. fragilis* 2 株、*Parabacteroides distasonis*（*P. distasonis*）2 株、*Fusobacterium nucleatum*（*F. nucleatum*）2 株、*C. difficile* 6 株、*C. perfringens* 2 株］及び好気性菌 28 株［*S. aureus* 4 株、*Enterococcus faecalis*（*E. faecalis*）2 株、*Enterococcus faecium*（*E. faecium*）2 株、*E. coli* 8 株、*Salmonella enteritidis*（*S. enteritidis*）2 株、*C. freundii* 2 株、*P. mirabilis* 2 株、*Proteus vulgaris*（*P. vulgaris*）2 株、*M. morganii* 2 株、*Providencia rettgeri*（*P. rettgeri*）2 株］について試験した。L-105 は、0.004～128 μg/mL の濃度範囲で試験した。抗菌薬の保存溶液の作製及び菌株の MIC の測定は、CLSI のガイドライン（1995 年）に従って行った。カンテン希釈法の手順は以下のとおりであった。抗菌薬を MIC の 2、4 及び 8 倍の濃度で含有する Wilkins-Chalgren カンテン培地に、あらかじめ 48 時間培養した菌液 0.1 mL を塗布した。37°C で培養した後にコロニーを計数した。この手順で選択された細菌において、抗菌薬の MIC 値が少なくとも 8 倍に増加した場合に耐性変異株とした。抗菌薬に対する耐性変異の発生率は、元の接種菌数に対する耐性菌数の割合として算出した。液体希釈法の手順は以下のとおりであった。コロンビア血液カンテン培地由来の 5 つの異なるコロニーを Wilkins-Chalgren 液体培地に懸濁させ、37°C で培養し、McFarland No. 0.5 濁度標準液を用いて Wilkins-Chalgren 液体培地を希釈することにより被検菌液を調製した。各濃度の抗菌薬が入った試験管に菌液 0.1 mL を接種（種菌濃度は 10^6 CFU/mL）した。菌が発育できる最高濃度の抗菌薬の入った試験管から最終培養液 0.1 mL を取り、その濃度の 2、4、8 及び 16 倍濃度の抗菌薬を含む別の一連の試験管に添加した。

1） 嫌気性菌についての結果－カンテン希釈法

L-105 に対する耐性菌の発生は総じて低頻度であった。L-105 耐性 *C. difficile* は MIC の 2 倍濃度の L-105 で 1×10^{-8} の発生率を示した。*C. perfringens* の耐性菌の発生率は MIC の 2 倍濃度で容易に選択（発生率は 10^{-6} 以上）され、MIC の 4 倍濃度で 7.2×10^{-6}、MIC の 8 倍濃度で 1.3×10^{-7} であった。類似した結果が、*F. nucleatum* でも得られた。一方、*F. magna*、*P. micra*、*B. fragilis* 及び *P. distasonis* での発生率は低率であった。また、バンコマイシン耐性は認められなかった。

2） 嫌気性菌についての結果－液体希釈法（継代法）

F. magna、*P. micra* 及び *C. difficile* は、MIC の 1/2 濃度以上の L-105 を含有した液体培地中ではほとんど増殖できなかった。*C. perfringens* における L-105 の MIC は、4 回継代後に 0.125 μg/mL から 128 μg/mL 以上へと速やかに上昇した。*F. nucleatum* の MIC は、わずか 2 又は 3 継代後に 4

～8 μg/mL から 128 μg/mL へ上昇した。*B. fragilis* 及び *P. distasonis* の MIC は、4 又は 5 継代後に 0.03～0.25 μg/mL から 128 μg/mL へ上昇した。

3） 好気性菌についての結果－カンテン希釈法：グラム陽性球菌株

L-105 に対する *S. aureus* の耐性菌の発生率は、好気的及び嫌気的条件下で MIC の 8 倍濃度で 10^{-8} のオーダーであり、低率と考えられた。*E. faecalis* の 1 株は両条件で 10^{-6}～10^{-8} の頻度で耐性変異を発生したが、もう 1 株は MIC の 2 倍濃度でほぼ 10^{-8} のオーダーであり、低率であった。*E. faecium* は好気的条件で MIC の 2 倍濃度で容易に耐性変異を発生（発生率は 10^{-5} 以上）したが、嫌気的条件では MIC の 2～4 倍濃度での発生率は 10^{-7}～10^{-8} と低率であった。すなわち、L-105 に耐性の腸球菌が自然発生したものの、その発生は試験された菌株や L-105 の濃度に依存しなかった。また、バンコマイシンへの耐性は認められなかった。

4） 好気性菌についての結果－カンテン希釈法：グラム陰性菌株

L-105 に対する *C. freundii* の耐性菌の発生率は、好気的条件下で低率（10^{-7}～10^{-8}）であり、嫌気的条件下では認められなかった。ネオマイシンへの耐性変異についてもほとんど認められなかった。L-105 に耐性の *M. morganii* 及び *P. rettgeri* は両条件で自然発生したが、偶発的であった。*P. mirabilis* の 1 株は両条件で MIC の 2～8 倍濃度で L-105 への耐性を獲得したが、もう 1 株は好気的条件でのみ耐性になった。*P. vulgaris* は条件によらず MIC の 2～8 倍濃度で L-105 への耐性を獲得した。特に嫌気的条件では MIC の 2 倍濃度で容易に発生（発生率は 10^{-5} 以上）した。*P. mirabilis* 及び *P. vulgaris* はネオマイシンへの耐性を示さなかった。L-105 に対する *E. coli* の耐性菌の発生率は MIC の 2 倍濃度で 10^{-6}～10^{-8} であったが、より高濃度では低率又は発生しなかった。*S. enteritidis* は好気的条件でのみ耐性変異を自然発生し、L-105 での発生率は MIC の 2 倍濃度で 3×10^{-6}、MIC の 8 倍濃度で 2×10^{-8} であった。ネオマイシンに対する発生率は低率であり、MIC の 8 倍濃度では発生しなかった。

5） 好気性菌についての結果－液体希釈法：グラム陽性球菌株（継代法）

S. aureus における L-105 の MIC は、好気的及び嫌気的条件下で 5 継代後に 0.008～0.06 μg/mL から 128 μg/mL 以上へ上昇した。ネオマイシン耐性は 2～5 回の継代後に発生した。バンコマイシン耐性は検出されなかった。*Enterococcus* spp.における L-105 の MIC は条件によらず、わずか 2 又は 3 継代の後に 8～32 μg/mL から 128 μg/mL 以上へ上昇した。ネオマイシン耐性も速やかに発生した。また、バンコマイシン耐性は認められなかった。

6） 好気性菌についての結果－液体希釈法：グラム陰性菌株（継代法）

L-105 耐性 *C. freundii* は好気的条件でのみ発生し、MIC は 2 継代後に 32～64 μg/mL から 128 μg/mL 以上へ上昇した。ネオマイシン耐性は好気的条件では検出されなかった。*M. morganii* における L-105 の MIC は条件によらず 2 継代後に 32 μg/mL から 128 μg/mL 以上へ上昇し、ネオマイシン耐

性は 3 又は 4 回の継代後に発生した。*P. mirabilis* 及び *P. vulgaris* は条件によらず 2 又は 3 継代後に L-105 の耐性を示し、MIC が 4～32 μg/mL から 128 μg/mL 以上へ上昇した。L-105 耐性 *E. coli* も発生し、好気的条件での MIC は多くの細菌で 16～32 μg/mL から 2 又は 3 継代後に 128 μg/mL 以上へ上昇した。嫌気的条件では 32～64 μg/mL から 2 又は 3 継代後に 128 μg/mL 以上へ上昇した。ネオマイシン耐性 *E. coli* も発生し、好気的条件では 4～8 μg/mL から 2～4 継代後に 128 μg/mL 以上へ上昇した。

以上の結果より、L-105 耐性変異は偶発的に自然発生すると考えられた。実施された条件下では、L-105 が低濃度（MIC の 2 倍濃度）存在する条件で容易に自然発生し、高濃度では低率であった。嫌気的条件下の発生率は低く、この条件下では増殖速度が遅いためと考えられた。また、L-105 耐性変異の自然発生は継代法においても示された。菌種や条件により結果のバラツキを認めるが、L-105 耐性変異の自然発生率はバンコマイシンより高いと考えられた。

（3） 各種臨床分離株における耐性変異

参考資料 4.2.1.1-2 及び 4.2.1.1-17（概要表 2.6.3.2）

臨床分離株（*E. coli* ent. 0124 K221、*E. coli* ML/35、*E. coli* Galleri、*S. wien* LP、*Salmonella* p.t.A. 0243K、*K. pneumoniae* Barboni II、*K. pneumoniae* Ottaviani、*Serratia* Galleri II、*P. vulgaris* LP）における L-105 耐性の出現について、継代法を用いて検討した（4.2.1.1-2）。対照薬としてリファンピシンを用いた。Brain Heart Infusion 液体培地で段階希釈した抗菌薬を試験管に分注し、被検菌を接種した。菌の発育が認められる最高濃度の抗菌薬が入った試験管から菌液の一定量を採取し、それより高い濃度の抗菌薬が入った試験管に接種した。操作を 48 時間ごとに繰り返した。いずれの菌も 2～6 回継代することにより耐性（MIC >100 μg/mL）が出現した。その速度及び程度は、リファンピシンと同程度であった。

また、臨床分離株（*E. coli* ent. 0124 K221、*E. coli* ML/35、*E. coli* Galleri、*S. wien* LP、*Salmonella* p.t.B. 0248K Sclavo、*K. pneumoniae* Barboni II、*K. pneumonia* Ottaviani、*Serratia* Galleri II、*P. vulgaris* LP）における L-105 耐性の出現について、継代法を用いて検討した（4.2.1.1-17）。対照薬としてネオマイシンを用いた。Brain Heart Infusion 液体培地で段階希釈した抗菌薬を試験管に分注し、被検菌を接種した。菌の発育が認められる最高濃度の抗菌薬が入った試験管から培地の一定量を採取し、それより高い濃度の抗菌薬が入った試験管に接種した。操作を 48 時間ごとに繰り返した。*Salmonella* spp.を除けば、いずれの菌も 2～4 回継代することにより耐性（MIC >100 μg/mL）が出現した。*Salmonella* spp.では 5 又は 6 回の継代により耐性（MIC >100 μg/mL）が出現した。その速度及び程度は、ネオマイシンと同程度であった。

（4） 腸球菌における耐性変異

参考資料 4.2.1.1-22（概要表 2.6.3.2）

腸球菌において L-105 耐性及びリファンピシン交差耐性を検討した。プラセボ、600 又は 1200 mg/day の L-105 を投与した患者の 0 及び 3 日目の糞便試料から腸球菌を分離した。分離した腸球菌を L-105 又はリファンピシンを含む Brain Heart Infusion カンテン培地に接種して MIC を測定し、L-105 耐性だけでなく、リファンピシン交差耐性についても評価した。

プラセボ又は L-105 3 日間投与の前後で回収した腸球菌に対する L-105 及びリファンピシンの MIC 値を表 2.6.2-14 及び表 2.6.2-15 に示した。腸球菌に対する L-105 の MIC 値は、600 又は 1200 mg/day の L-105 を投与した患者で 8～64 μg/mL の範囲であった。L-105 の MIC 値は 0 及び 3 日目の分離株で同様であった。腸球菌に対するリファンピシンの MIC 値は、600 又は 1200 mg/day の L-105 を投与した患者で 0.25～16 μg/mL の範囲であった。リファンピシンの MIC 値は 0 及び 3 日目の分離株で同様であった。これらの結果より、L-105 短期間投与後の腸球菌において L-105 耐性及びリファンピシン交差耐性は生じないことが示唆された。

表 2.6.2-14. L-105 投与前後の糞便から分離した腸球菌に対する L-105 の MIC

L-105 投与量	患者数	MIC 範囲 (μg/mL)		MIC_{50} (μg/mL)		MIC_{90} (μg/mL)	
		0 日目	3 日目	0 日目	3 日目	0 日目	3 日目
600 mg/day	9	8 – 64	8 – 64	16	16	64	64
1200 mg/day	10	8 – 64	8 – 64	32	32	64	64
プラセボ	8	8 – 64	4 – 64	16	32	64	64

表 2.6.2-15. L-105 投与前後の糞便から分離した腸球菌に対するリファンピシンの MIC

L-105 投与量	患者数	MIC 範囲 (μg/mL)		MIC_{50} (μg/mL)		MIC_{90} (μg/mL)	
		0 日目	3 日目	0 日目	3 日目	0 日目	3 日目
600 mg/day	9	1 – 16	1 – 16	2	2	16	16
1200 mg/day	10	0.25 – 8	0.5 – 8	2	2	2	2
プラセボ	8	0.25 – 8	0.25 – 8	4	4	8	8

2.6.2.3 副次的薬理試験

（1） *Helicobacter pylori* に対する活性及び *H. pylori* 耐性変異

参考資料 4.2.1.2-1 及び 4.2.1.1-11（概要表 2.6.3.3）

胃粘膜に感染して胃炎を惹起する細菌として *H. pylori* がよく知られており、*H. pylori* に対する L-105 の抗菌活性を他剤と比較検討した（4.2.1.2-1）。胃炎症状を有する患者から分離した *H. pylori* 43 株を用い、L-105、リファンピシン及びアモキシシリンの 3 種類の抗菌薬についてカンテン希釈法で MIC を測定した。抗菌薬の濃度範囲は 0.008～128 μg/mL とした。接種菌量は 5×10^8 CFU/mL

とした。L-105 については 2 つの pH 値、すなわち 7.2 及び 6.0 で試験した。カンテン平板を微好気性条件下で 37°C、72 時間培養し、MIC を測定した。

L-105 はリファンピシンと同程度の抗菌活性を示した（表 2.6.2-16）。L-105 の抗菌活性は、*H. pylori* に対する活性が最も高い化合物の 1 つであるアモキシシリンより低かった。一般に他の抗菌薬（アモキシシリン、マクロライド系、キノロン系など）では pH による影響を受けるが、L-105 は pH の低下による影響をほとんど受けなかった。

表 2.6.2-16. *Helicobacter pylori*（43 株）に対する L-105 及び各種抗菌薬の MIC

抗菌薬	MIC_{50} (μg/mL)	MIC_{90} (μg/mL)	MIC 範囲 (μg/mL)
L-105 (pH 7.2)	1	2	0.25 – 4
L-105 (pH 6.0)	4	4	0.5 – 8
リファンピシン	2	4	0.25 – 4
アモキシシリン	<0.008	0.015	<0.008 – 0.06

別の試験（4.2.1.1-11）で、*H. pylori* に対する L-105 の活性について、*H. pylori* 除菌療法で使われている薬物（メトロニダゾール、オメプラゾール、アンピシリン）と比較検討した。*H. pylori* 40 株（*H. pylori* NCTC 11638 を含む）を用い、MIC はカンテン希釈法で測定した。被検菌を 3×10^4 ～15×10^4 CFU/spot となるように接種し、37°C の微好気性環境下で 5 日間培養し MIC を測定した。MIC_{50} 値及び MIC_{90} 値を表 2.6.2-17 に示した。L-105 は、全ての菌株に対して 4～16 μg/mL で抗菌活性を示し、狭い MIC 範囲であった。L-105 の抗菌活性は、アンピシリン及びメトロニダゾールより弱く、オメプラゾールより強いものであった。

表 2.6.2-17. *Helicobacter pylori*（40 株）に対する L-105 及び *H. pylori* 除菌薬の MIC

抗菌薬	MIC_{50} (μg/mL)	MIC_{90} (μg/mL)	MIC 範囲 (μg/mL)
L-105	4	8	4 – 16
アンピシリン	0.03	0.25	0.03 – 0.5
メトロニダゾール	0.5	4	0.12 – 4
オメプラゾール	32	>128	32 – <128

上記試験により *H. pylori* における L-105 の明確な抗菌活性が確認されたが、その一方で耐性の出現を示す成績も得られている（4.2.1.2-1）。この試験では *H. pylori* 5 株を用いて耐性株を選択した。濃度勾配（0～20 μg/mL）の L-105 を含むプレートを作製した。最高濃度の L-105 での増殖を獲得するまで、5 株それぞれをこれらのプレートに連続的に接種した。抗菌薬の濃度範囲は 0.008～128 μg/mL であった。5×10^8 CFU/mL の菌液を接種し、プレートを微好気性条件下 37°C で 72 時間培養した。MIC の 8 倍濃度の L-105 を含有するプレート 10 枚に MIC が既知の 3 株を接種し、培養後にコロニー計数を行った。

L-105 に対する一次耐性を示す菌株は存在しなかったが、L-105 の濃度勾配での 3 継代後には使用した 5 つの菌株が L-105 耐性を獲得した。

以上の結果より、L-105 は *H. pylori* に対して抗菌活性を示すが、MIC 以下の濃度では 5 菌株全てが耐性を獲得した。したがって、*H. pylori* に起因する胃炎を治療する場合には、L-105 は単独療法として使用すべきではないと考えられた。なお、*H. pylori* の除菌にはプロトンポンプ阻害薬、アモキシシリン及びクラリスロマイシンの三剤併用療法が推奨されている。少なくともアモキシシリン及びクラリスロマイシンの耐性機構として酵素誘導や透過性低下などが知られており、L-105 耐性の出現機序である点突然変異とは異なると考えられた。

（2） *Clostridium difficile* に対する活性及びリファンピシン交差耐性

参考資料 4.2.1.2-2 及び 4.2.1.2-3（概要表 2.6.3.3）

C. difficile 関連下痢症は予後不良であり、耐性及び再発リスクが増加する疾患である。*C. difficile* に対して L-105 がリファンピシン交差耐性を誘導する可能性があると考え、L-105 による耐性の出現機序について検討した（4.2.1.2-2）。臨床分離株 80 株の L-105 又はリファンピシンへの感受性について、CLSI のガイドライン（2007 年）に従ってカンテン希釈法で検討した。使用した L-105 の濃度範囲は 0.0009～256 μg/mL、リファンピシンは 0.00001～256 μg/mL とした。また、耐性株の DNA を抽出し、特異的なプライマーを用いた PCR により RNA ポリメラーゼの β サブユニットをコードする *rpoB* の配列分析を行った。

全ての分離株 80 株に対する L-105 の MIC は 0.0019～>256 μg/mL、リファンピシンの MIC は 0.00006～>256 μg/mL であり、両抗菌薬とも広い MIC 範囲を示した。14 株は、L-105 に対して>32 μg/mL の MIC を示し、耐性が認められた。分子タイピング解析により、これらの 14 株のうち 9 株（64%）は、英国、欧州及び北米において複数回流行し、重症化の原因となる流行性 BI/NAP1/027 グループに属していた。これらの分離株における L-105 及びリファンピシン耐性の分子的機序について、リファマイシンの標的である RNA ポリメラーゼの β サブユニットをコードする *rpoB* の配列分析により検討した。その結果、全ての耐性株において、*rpoB* の保存領域における遺伝子配列変化に起因するアミノ酸置換が特異的に認められた。すなわち、耐性株において 7 つの異なる *rpoB* アミノ酸置換が特定され、制限酵素解析タイピングにより 5 つのグループに分けられた。複数の異なるアミノ酸置換が認められたことより、リファマイシン耐性に関連するアミノ酸置換は特定のリファマイシン耐性クローンから広まったのではなく、独立して生じたことが示唆された。また、*C. difficile* における L-105 耐性は *rpoB* の点突然変異に起因しており、リファンピシン耐性によって予測できることが示唆された。

一方、上記の結果（4.2.1.2-2）と対照的に、別の試験（4.2.1.2-3）では 359 株の *C. difficile* 分離株における L-105 耐性の有無を、リファンピシン Etest®（薬剤感受性の簡易試験法）による感受性試験で予測できなかった。この試験では *C. difficile* トキシン B が認められた患者 324 名の糞便試料を用い、*C. difficile* に対する L-105 又はリファンピシン感受性について検討した。MIC は、CLSI のガイドライン（2007 年）によるカンテン希釈法又は Etest®により測定した。L-105 をアセトンに溶解して 10240 μg/mL の濃度とし、蒸留水で連続的に 2 倍希釈して 0.016～1024 μg/mL の濃度とし

た。希釈した L-105 を Mueller-Hinton カンテン培地に添加し、*C. difficile* 分離株を接種して嫌気性条件下 37℃ で培養した。精度管理のため、*S. aureus* ATCC 29213、*E. coli* ATCC 25922 及び *C. difficile* ATCC 700057 に対する両抗菌薬の MIC を測定した。L-105 及びリファンピシンへの耐性は、任意に MIC≧32 μg/mL と定義した。*C. difficile* のコロニーを形態及び臭気で特定した後、ウマ血液を 7%含有する Trypticase Soy Broth 液体培地に入れて、−80℃ で保存した。その後 *C. difficile* のコロニーを PCR により 16S rRNA 遺伝子のコード領域で確認した。

L-105 は、359 株の *C. difficile* 分離株に対して高い抗菌活性（MIC_{50} 及び MIC_{90}：<0.01 及び 0.25 μg/mL）を示し、リファンピシン（MIC_{50} 及び MIC_{90}：<0.002 及び 4 μg/mL）より有効である可能性が示唆された。耐性については、359 株のうちの 11 株（3%）は、L-105 耐性であった。28 株（359 株の 8%）はリファンピシン耐性であり、そのうちの 6 株（359 株の 2%）は L-105 及びリファンピシン耐性であった。また、リファンピシン耐性を示した 28 株及び L-105 耐性を示した 11 株について、耐性に関与する可能性のある 4 種類のトキシン遺伝子の発現を検討したが、耐性変異とトキシン遺伝子の発現パターンは両薬物で異なっていた。以上の結果より、L-105 は *in vitro* で *C. difficile* に対して高い活性を有することが示された。359 株のうち 6 株（2%）だけがリファンピシンと L-105 の両方に耐性であり、リファンピシン耐性分離株と L-105 耐性分離株はトキシン遺伝子を含む遺伝子構成が異なると考えられた。

両試験の間の矛盾は、使用した分離株の数及び遺伝子組成が異なることなどの違いによる可能性が考えられた。また、一部の分離株については、両試験で異なった期間及び患者集団で収集されていることも原因と考えられた。*C. difficile* における L-105 とリファンピシンの交差耐性の出現の可能性やそのメカニズムは不明であった。

（3） *Mycobacterium tuberculosis* に対する活性及びリファンピシン交差耐性

参考資料 4.2.1.2-4、4.2.1.2-5、4.2.1.2-6、4.2.1.2-7（概要表 2.6.3.3）

及び評価資料 5.3.1.1-1（L-105/1-A）

結核菌に感染している患者に L-105 を投与することを想定し、L-105 のリファンピシン感受性に与える影響を検討した（4.2.1.2-4）。*M. tuberculosis* の 5 つの臨床分離株（肺結核由来 3 株、腎結核由来 2 株）を 10^8 CFU/mL（McFarland No. 1）の濃度で、6、20、90 及び 270 ng/mL の L-105 を含有する Bactec 12B 培地に接種した。培養後、L-105 添加又は非添加時の増殖について[^{14}C]fatty acid を用いた放射活性による測定法で経日的に測定した。MIC 値は CLSI のガイドライン（1990 年）に従って測定した。

6 及び 20 ng/mL の L-105 における *M. tuberculosis* 増殖速度は L-105 非添加培地中の増殖速度と同様であった。90 ng/mL の L-105 では増殖は 4、5 日遅くなった。270 ng/mL の L-105 では、最初の 10～13 日の増殖が極度に遅延するか、又は増殖が認められなかった。また、非添加条件で 10 日間培養時と同程度の増殖に達するためには、L-105 270 ng/mL 添加時では 18～23 日もの培養期間が必要であった。健康成人において 550 mg/day の L-105 単回経口投与後（食後投与）の血漿中濃度（C_{max}）は平均 4.44 ng/mL である（5.3.1.1-1；L-105/1-A）ことから、90 ng/mL 以上の非現実

的な高濃度で得られたこれらの所見を全身性の結核菌感染症に当てはめることに臨床的意義を見出すことは困難であった。

次に、L-105 処理の前後で L-105 及びリファンピシンの MIC を、放射活性による測定法で測定した。使用した菌株の MIC 値は、L-105 及びリファンピシン共に L-105 処理の前後で同じであり、耐性菌の出現は認められなかった（表 2.6.2-18）。

これらの結果より、L-105 経口投与後に血液中に吸収されるわずかな L-105 はリファンピシンの感受性に影響しないと考えられた。

表 2.6.2-18. *Mycobacterium tuberculosis*（5 株）における L-105 処理前後の L-105 及びリファンピシンの MIC

菌株	試料	L-105 MIC (μg/mL)		リファンピシン MIC (μg/mL)	
		処理前	処理後	処理前	処理後
1	喀痰	0.5	0.5	0.5	0.5
2	喀痰	0.5	0.5	0.5	0.5
3	喀痰	1.0	1.0	0.25	0.25
4	尿	0.5	0.5	0.25	0.25
5	尿	0.5	0.5	0.25	0.25

L-105 の経口投与が *M. tuberculosis* においてリファンピシン交差耐性の出現を誘発するかどうかを 2 種の *in vivo* 試験（4.2.1.2-5 及び 4.2.1.2-6）で評価した。*M. tuberculosis* として、リファマイシンを使用したことのない結核患者の喀痰から分離した病原菌（4.2.1.2-5）又は H 37 RV 株（4.2.1.2-6）を、雄性モルモットに湿重量として 0.001 mg 皮下投与して感染させた。1 群 10～15 匹からなるモルモットに 30 及び 60 mg/kg/day の L-105、又は 30 mg/kg/day のリファンピシンを経口投与した。3 又は 4 ヵ月間の投与後、モルモットを安楽死させ、肝臓、肺、鼠径リンパ節及び脾臓の試料を採取した。組織試料をホモジナイズし、単離した結核菌の *in vitro* での感受性を測定した。

剖検により対照動物及び L-105 投与動物に結核性病変が認められたのに対して、リファンピシン投与動物では結核性病変は認められなかった。L-105 投与動物由来の *M. tuberculosis* に対する L-105 の MIC 値（0.01 μg/mL）は、接種前の菌の MIC と変わらなかった（4.2.1.2-5）。また、接種後 L-105 投与動物由来の L-105 及びリファンピシンの MIC 値（0.5 μg/mL）は接種前の MIC と変化していなかった（4.2.1.2-6）。これらの結果より、L-105 の経口投与はリファンピシンとは異なり、全身性の結核菌感染症には無効であることが示唆された。また、L-105 は結核菌感染症におけるリファンピシンへの感受性に対して影響しないと考えられた。

結核の専門家による見解として、不顕性結核菌感染患者に L-105 を投与したときに、リファンピシン耐性が出現する可能性は極めて低いと考えられている（4.2.1.2-7）。すなわち、耐性株の出現には 2 条件が必要とされ、第一に薬物濃度が耐性選択に適していること、第二に細菌数が耐性変異を包含するのに十分な量（$>10^7$ 個）であることである。難吸収性の L-105 を用いた多くの薬

物動態試験から第一の条件はヒトでは満たされないこと、また、ヒトや動物の組織中及び血清中の到達濃度は結核菌の選択圧として働くには不十分であることが明らかである。加えて、結核菌が 10^5 個を超えると、結核の初期症状が現れることが知られている。そのため、診断が未確定の結核患者が、結核と無関連の感染症で L-105 治療を受ける機会は非常に低いと考えられると論じられている。この見解から、L-105 の臨床使用は結核の治療に対してほとんど影響しないと考えられた。

2.6.2.4 安全性薬理試験

マウス、ラット、イヌ及びネコに L-105 を 100～1000 mg/kg の用量範囲で単回経口投与又は十二指腸内投与し、中枢神経系、心血管系、呼吸器系、腎／泌尿器系、自律神経系及び胃腸管系に及ぼす影響を評価した。心血管系については、HEK293 細胞を用いた *in vitro* 試験でも評価した。

2.6.2.4.1 マウスの自発運動に対する影響

評価資料 4.2.1.3-1（概要表 2.6.3.4）

各群 10 匹の雄性 ICR CD-1 系マウスに、L-105 を 0（溶媒）、100、300 及び 1000 mg/kg の用量で単回経口投与した。L-105 を 0.5% Carboxymethyl cellulose（CMC）水溶液に懸濁させ、10 mL/kg の液量で強制経口投与した。陽性対照にはジアゼパムを用い、15 mg/kg の用量で単回経口投与した。活動観察用プラットフォーム上で投与 30 分後から 1 時間にわたって自発運動を測定した結果、L-105 投与による自発運動の有意な変化は認められなかった。陽性対照のジアゼパム投与群では、投与後 30～80 分に自発運動が有意に減少した。したがって、L-105 の 1000 mg/kg までを単回経口投与しても、マウスの自発運動に有意な影響を及ぼさないと判断された。

2.6.2.4.2 Irwin 法によるマウスの行動観察評価

評価資料 4.2.1.3-2（概要表 2.6.3.4）

各群 4 匹の雄性 ICR CD-1 系マウスに、L-105 を 0（溶媒）、100、300 及び 1000 mg/kg の用量で単回経口投与した。L-105 を 0.5% CMC 水溶液に懸濁させ、10 mL/kg の液量で強制経口投与した。投与の 30、90、150、300 分後及び 24 時間後に、Irwin 法により行動生理学的変化を観察した。その後は 7 日間にわたって毎日、動物の生死の確認及び一般状態観察を実施した。観察期間中に死亡は認められず、L-105 投与による行動生理学的変化は認められなかった。したがって、L-105 の 1000 mg/kg までを単回経口投与しても、マウスに行動生理学的変化を生じさせないと判断された。

2.6.2.4.3 マウスを用いたロータロッド試験

評価資料 4.2.1.3-3（概要表 2.6.3.4）

加速ロータロッド試験の訓練をした各群 10 匹の雌性 ICR CD-1 系マウスに、L-105 を 0（溶媒）、100、300 及び 1000 mg/kg の用量で単回経口投与した。L-105 を 0.5% CMC 水溶液に懸濁させ、10 mL/kg の液量で強制経口投与した。陽性対照にはメフェネシンを用い、400 mg/kg の用量で単回経口投与した。投与の 45 分後にマウスを加速したロータロッド上に乗せ、運動時間を 3 回連続測定して最長運動時間を採用した。L-105 の各用量投与群では、運動時間に有意差は認められなかった。陽性対照のメフェネシン投与群では、運動時間の有意な減少が認められた。したがって、L-105 の 1000 mg/kg までをマウスに単回経口投与しても、運動協調性に有意な影響を及ぼさないと判断された。

2.6.2.4.4 マウスにおける痙攣誘発作用

評価資料 4.2.1.3-4（概要表 2.6.3.4）

各群 10 匹の雄性 ICR CD-1 系マウスに、L-105 を 0（溶媒）、100、300 及び 1000 mg/kg の用量で単回経口投与した。L-105 を 0.5% CMC 水溶液に懸濁させ、10 mL/kg の液量で強制経口投与した。陽性対照には硫酸アンフェタミン（メトラゾール試験用）又はベメグリド（電気ショック試験用）を用い、それぞれ 30 mg/kg 又は 40 mg/kg の用量で単回経口投与した。投与の 45 分後に、各動物に痙攣を起こす閾値以下の用量でメトラゾールを経口投与、又は痙攣を起こす閾値以下の電気ショックを与え、メトラゾール投与後は 30 分間、電気ショック後は 1 分間にわたって痙攣の発症を観察した。メトラゾール誘発性痙攣及び電気ショック誘発性痙攣のいずれにおいても、L-105 投与による痙攣の誘発作用は認められなかった。陽性対照の硫酸アンフェタミン及びベメグリドの投与群では、それぞれメトラゾール誘発性痙攣及び電気ショック誘発性痙攣で有意な痙攣誘発作用が認められた。したがって、L-105 の 1000 mg/kg までをマウスに単回経口投与しても、痙攣誘発作用に有意な影響を及ぼさないと判断された。

2.6.2.4.5 マウスを用いたヘキソバルビタール睡眠時間に対する影響

評価資料 4.2.1.3-5（概要表 2.6.3.4）

各群 5 匹の雌雄 ICR CD-1 系マウスに、L-105 を 0（溶媒）、100、300 及び 1000 mg/kg の用量で単回経口投与した。L-105 を 0.5% CMC 水溶液に懸濁させ、10 mL/kg の液量で強制経口投与した。陽性対照には塩酸クロルプロマジンを用い、15 mg/kg の用量で単回経口投与した。各投与の 45 分後にヘキソバルビタールナトリウムを 100 mg/kg の用量で腹腔内投与し、睡眠時間を記録した。L-105 の 100 及び 300 mg/kg 投与群では、睡眠時間に有意な変化は認められなかった。1000 mg/kg 投与群の雌で有意な睡眠時間の延長が見られたが、雄では統計学的な有意差は認められなかった。陽性対照の塩酸クロルプロマジン投与群では、雌雄で、睡眠時間の有意な延長が認められた。

2.6.2.4.6　　マウスを用いたジアゼパムの抗痙攣効果に対する作用

評価資料 4.2.1.3-6（概要表 2.6.3.4）

各群 20 匹の雄性 ICR CD-1 系マウスに、L-105 を 0（溶媒）、100、300 及び 1000 mg/kg の用量で単回経口投与した。L-105 を 0.5% CMC 水溶液に懸濁させ、10 mL/kg の液量で強制経口投与した。陽性対照にはフルマゼニルを用い、25 mg/kg の用量で単回経口投与した。各投与の 15 分後にジアゼパムを 0.75 mg/kg の用量で単回経口投与し、その 45 分後に運動失調について評価した。さらに、メトラゾールを 85 mg/kg の用量で単回皮下投与し、間代性痙攣の発症及び腹ばい姿勢（姿勢の消失：運動失調）について 30 分間観察した。なお、別の対照として、ジアゼパムを投与せずにメトラゾールのみを投与する群も設定した。メトラゾール誘発性の痙攣及び運動失調をジアゼパムが抑制する効果に対して、L-105 の各用量投与は有意な影響を及ぼさなかった。陽性対照のフルマゼニル投与群では、ジアゼパムの抗痙攣効果を有意に減弱させた。したがって、L-105 の 1000 mg/kg までをマウスに単回経口投与しても、ジアゼパムの抗痙攣効果に対して有意な影響を及ぼさないと判断された。

2.6.2.4.7　　HEK 細胞に発現させた hERG カリウムチャネルに対する L-105 の作用

評価資料 4.2.1.3-7（概要表 2.6.3.4）

hERG カリウムチャネルを安定発現させた HEK293 細胞に L-105 を 10、30、100 及び 300 μmol/L の濃度で添加し、急速活性型遅延整流カリウム電流（I_{Kr}）の抑制を測定した。陽性対照にはテルフェナジンを用い、60 nmol/L の濃度で添加した。L-105 は、それぞれ I_{Kr} を 10 μmol/L では 6.7 ± 0.5%（n = 3）、30 μmol/L では 16.8 ± 1.0%（n = 3）、100 μmol/L では 34.5 ± 2.7%（n = 3）及び 300 μmol/L では 44.3 ± 4.9%（n = 3）抑制した。コントロールでの抑制率は、0.7 ± 0.1%（n = 3）であった。30、100 及び 300 μmol/L の濃度では I_{Kr} が有意に抑制されたが、300 μmol/L の培地中には顕微鏡下で結晶の析出が観察されたことから、IC_{50} は 100 μmol/L 以上と推定された。一方、陽性対照のテルフェナジンは、I_{Kr} を 81.6 ± 3.9%（n = 2）抑制した。

2.6.2.4.8　　麻酔イヌの心血管系及び呼吸器系に対する作用

評価資料 4.2.1.3-8（概要表 2.6.3.4）

チオペンタールナトリウム導入後 α-クロラロース/ペントバルビタールナトリウムで維持麻酔した合計 3 匹の雌性ビーグル犬に、L-105 を 0（溶媒）及び 1000 mg/kg の用量で単回十二指腸内投与した。L-105 は 0.5% CMC 水溶液に懸濁させ、5 mL/kg の液量で強制投与した。麻酔後に 30 分間の安定期間を置き、溶媒投与後 2 時間の収縮期血圧、拡張期血圧、平均血圧、心拍数、左室収縮期圧、左室内圧最大上昇速度（$LVdp/dt_{max}$）、第 II 誘導心電図、大腿血流量、大腿血管抵抗、呼吸数、換気量（1 回及び 1 分間）を測定した。その後 L-105 を投与し、投与前 30 分間は 5 分間隔、投与後 1 時間は 10 分間隔、その後は 15 分間隔で、4 時間にわたって同様に測定した。溶媒投与後に 2 時間観察した結果では、心血管系及び呼吸器系のパラメーターに目立った変化は認められなかった。L-105 を投与して 4 時間観察した結果でも、心血管系及び呼吸器系のパラメーター

に L-105 投与による明らかな影響は認められなかった。したがって、L-105 の 1000 mg/kg をビーグル犬に単回投与しても、心血管系及びは呼吸器系に影響を与えないと判断された。

2.6.2.4.9　ラットの尿量及び尿中電解質排泄に対する作用

評価資料 4.2.1.3-9（概要表 2.6.3.4）

各群 8 匹の雄性 Wistar 系ラットに、L-105 を 0（溶媒）、100、300 及び 1000 mg/kg の用量で単回経口投与した。L-105 を 0.5% CMC 水溶液に懸濁させ、25 mL/kg の液量で強制経口投与した。陽性対照にはフロセミドを用い、20 mg/kg の用量で単回経口投与した。各投与の 1、2、3、4、5 及び 24 時間後までの尿量、並びに投与後 5 時間の尿中電解質（Na^+，K^+，Cl^-）及びタンパク質の排泄量を測定した。L-105 の 1000 mg/kg 投与群では、投与 1～5 時間後までの尿量並びに投与後 5 時間の尿中 K^+排泄量及び Cl^-排泄量に有意な増加が認められたが、投与 24 時間後までの尿量及び各電解質排泄量並びに投与 5 時間後までの尿中タンパク質排泄量に有意な変化は認められなかった。100 及び 300 mg/kg 投与群では、有意な影響は認められなかった。一方、陽性対照のフロセミド投与群では、いずれの時点でも尿量及び投与後 5 時間の各電解質排泄量に有意な増加が認められ、投与後 5 時間のタンパク質排泄量に有意な減少が認められた。

2.6.2.4.10　麻酔下ネコの自律神経系に対する作用

評価資料 4.2.1.3-10（概要表 2.6.3.4）

ハロセン導入後 α-クロラロースで維持麻酔した 3 匹の雄性ネコに、溶媒（0.5% CMC 水溶液）を十二指腸内投与し、その 80 分後に L-105 を 1000 mg/kg の用量で十二指腸内投与した。L-105 は、溶媒に懸濁させて 5 mL/kg の液量で投与した。各投与後は 20 分間隔で電気刺激後の瞬膜収縮の大きさや、両側頸動脈閉塞及びノルアドレナリン静脈内投与による心拍数及び平均動脈圧の変化を測定した。L-105 投与後 2 時間にわたって測定した結果、いずれのパラメーターにも明らかな影響は認められなかった。したがって、L-105 の 1000 mg/kg をネコに単回十二指腸内投与しても、自律神経機能に影響を与えないと判断された。

2.6.2.4.11　マウス腸管内炭末輸送能に対する作用

評価資料 4.2.1.3-11（概要表 2.6.3.4）

各群 10 匹の雄性 ICR CD-1 系マウスに、L-105 を 0（溶媒）、100、300 及び 1000 mg/kg の用量で単回経口投与した。L-105 を 0.5% CMC 水溶液に懸濁させ、10 mL/kg の液量で強制経口投与した。陽性対照には硫酸モルヒネを用い、10 mg/kg の用量で単回経口投与した。各投与の 45 分後に 5%の炭末懸濁液を 0.25 mL の液量で単回経口投与し、その 30 分後に剖検して幽門括約筋からの炭末移動距離を測定した。L-105 の各用量投与群では、炭末の移動距離に有意な影響は認められなかった。陽性対照の硫酸モルヒネ投与群では、炭末の移動が有意に抑制された。したがって、L-105

の 1000 mg/kg までをマウスに単回経口投与しても、消化管運動に有意な影響を及ぼさないと判断された。

2.6.2.4.12　　ラットの胃腸傷害作用

評価資料 4.2.1.3-12（概要表 2.6.3.4）

各群 10 匹の雄性 Wistar 系ラットに、L-105 を 0（溶媒）、100、300 及び 1000 mg/kg の用量で単回経口投与した。L-105 を 0.5% CMC 水溶液に懸濁させ、10 mL/kg の液量で強制経口投与した。陽性対照にはアセチルサリチル酸を用い、200 mg/kg の用量で単回経口投与した。各投与の 5 時間後に安楽死させて胃及び十二指腸を肉眼的に観察し、充血、出血及び潰瘍形成についてスコア化した。L-105 の各用量投与群では、有意な影響は認められなかった。陽性対照のアセチルサリチル酸投与群では、胃粘膜の出血及び潰瘍のスコアに有意な増加が認められた。したがって、L-105 の 1000 mg/kg までをラットに単回経口投与しても、胃及び十二指腸に明らかな損傷を与えないと判断された。

2.6.2.4.13　　ラットの胃液分泌に対する作用

評価資料 4.2.1.3-13（概要表 2.6.3.4）

各群 10 匹の雄性 Wistar 系ラットの十二指腸（幽門括約筋から約 0.5 cm の部位）を結紮し、L-105 を 0（溶媒）、100、300 及び 1000 mg/kg の用量で十二指腸内に単回投与した。L-105 を 0.5% CMC 水溶液に懸濁させ、10 mL/kg の液量で強制投与した。陽性対照にはオメプラゾールを用い、10 mg/kg の用量で同様に投与した。各投与の 4 時間後に動物を安楽死させ、胃液量及び胃液中の電解質（H^+、Na^+、K^+及び Cl^-）濃度を測定した。さらに、胃粘膜を肉眼的に観察し、充血、出血及び潰瘍形成について評価した。L-105 の各用量投与群では、胃液の量及び電解質濃度に有意な影響は認められず、胃粘膜の観察でも影響は認められなかった。陽性対照のオメプラゾール投与群では、胃液中の H^+濃度に有意な減少が認められ、Na^+濃度に有意な増加が認められた。したがって、L-105 の 1000 mg/kg までをマウスに単回十二指腸内投与しても、胃液分泌に有意な影響を及ぼさないと判断された。

2.6.2.5　　考察及び結論

他のリファマイシン系抗菌薬と同様に、L-105 は細菌の DNA 依存性 RNA ポリメラーゼ酵素のβサブユニットに結合することによって RNA の合成を阻害すると考えられる。L-105 は、MIC 以上で殺菌作用を発揮することが確認されているが、細菌の上皮細胞への接着抑制又は侵入抑制を示すことから、上皮細胞へ作用して生理機能を変化させることも示唆されている。また、L-105 による細菌の形態学的変化、病原性因子の減少及びプラスミドの除去なども示されており、L-105 は抗菌活性以外にも様々な作用を有している。すなわち、L-105 は MIC 以上で殺菌作用及び MIC 未満で殺菌以外の作用を有すると考えられた。実際に臨床において、下痢原性 *E. coli* による旅行

者下痢症に対し、L-105 は病原菌数を大きく減少させず（腸内細菌叢を変化させず）に、罹病期間を短縮することが報告されている。このような非侵襲性の細菌性消化管感染症治療における L-105 の有効性は、抗菌活性と共に細菌あるいは腸管上皮などに対する様々な作用が寄与していると考えられた。

ラットを用いた検討において、L-105 が腸間膜静脈血中アンモニア濃度を低下させ、肝性脳症モデルで誘発される昏睡の発症を抑制することが確認された。*In vitro* 試験において L-105 の抗菌活性が示されており、L-105 の肝性脳症モデルでの効果は、ネオマイシンやバンコマイシン等の他の抗菌薬と同様に抗菌活性が寄与している可能性があると考えられた。また、L-105 はラット糞便細菌叢の一部の細菌に影響を及ぼすが、ヒト糞便細菌叢において大きな変化を認めないことから（5.3.1.1-1 ; L-105/1-A）、L-105 の抗菌活性以外の作用についても治療効果に寄与している可能性があると考えられた。

L-105 に対する耐性機序は、RNA ポリメラーゼの点突然変異であり、リファンピシン耐性の機序と同様であることが確認された。また、L-105 耐性変異は偶発的に自然発生すると考えられ、現に複数の臨床分離株において確認された。その中で *C. difficile* 及び *M. tuberculosis* については、リファンピシン交差耐性の出現が臨床的に懸念されるが、実験的に交差耐性が出現する可能性を確認できていない。また、L-105 は経口投与後の消化管吸収がほとんどないため全身性の結核菌感染症に無効であり、少なくとも全身性の結核菌感染症においてリファンピシンの感受性を変化させないと考えられた。

安全性薬理試験で中枢神経系、心血管系及び呼吸器系、腎／泌尿器系、自律神経系及び胃腸管系に及ぼす影響を検討した結果、L-105 投与による明らかな影響は認められなかった。ヘキソバルビタール誘発睡眠時間の延長や尿量及び尿中電解質排泄量の増加が一部で認められたが、いずれも軽微な影響であり、片性のみ又は 24 時間値には有意な変化が認められない等、一貫性に乏しいことから、偶発的な変化であると考えられた。また、*in vitro* 試験で I_{Kr} の抑制が認められたが、その IC_{50} 値は 100 μmol/L 以上と高く、臨床における QT 間隔延長のリスクは低いと考えられた。これらの試験では L-105 の血中濃度を測定していないが、反復投与毒性試験のトキシコキネティクス測定結果（2.6.7.3 項参照）から、1000 mg/kg の用量で単回経口投与したときの最高血漿中濃度（C_{max}）は、マウスが 10～13 ng/mL、ラットが 20～30 ng/mL 以上、イヌが 10～69 ng/mL 程度と推察される。したがって、L-105 を 1100 mg の用量で反復経口投与した肝性脳症患者の血中濃度（19.5～35.5 ng/mL、2.7.2.3.1）に近い曝露条件下で安全性を確認できたと考えられる。また、[redacted]の L-105 を投与して血中濃度を最高 6769 ng/mL まで上昇させたイヌ（2.6.6.8.4 項及び 2.6.6.8.5 項参照）では一般状態、心電図（投与 2 時間後）、尿検査を含む各種検査結果に L-105 投与の影響が認められなかったことから、血中濃度が若干高まった場合でも特段の懸念は生じないと考えられた。

以上、L-105 は殺菌作用を有し、その作用はリファマイシン系抗菌薬と同様に RNA 合成阻害に起因すると考えられた。また、L-105 は殺菌作用以外に様々な作用を有していた。L-105 は血中アンモニア濃度を低下させ、肝性脳症の病態を改善すると考えられた。安全性薬理試験では、中枢神経系、心血管系、呼吸器系、腎／泌尿器系、自律神経系及び胃腸管系に対する明らかな影響は認められなかった。

2.6.2.6 参考文献一覧

1) Villain-Guillot P, Gualtieri M, Bastide L, Leonetti J-P. *In vitro* activities of different inhibitors of bacterial transcription against *Staphylococcus epidermidis* biofilm. Antimicrob Agents Chemother. 2007 Sep; 51: 3117-21.【4.3-12】

リフキシマ錠 200mg

医薬品製造販売承認申請書添付資料

2.6.3 薬理試験概要表

あすか製薬株式会社

目次

2.6.3 薬理試験概要表 3
2.6.3.1 薬理試験：一覧表 3
2.6.3.2 効力を裏付ける試験 8
2.6.3.3 副次的薬理試験 13
2.6.3.4 安全性薬理試験 15

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：L-105

試験の種類	試験系	投与方法	実施施設	試験番号	CTD における記載箇所
効力を裏付ける試験					
RNA 合成阻害作用	*Escherichia coli*	*in vitro*	[redacted] Belg um	PD9201	4.2.1.1-1（参考資料）
殺菌作用	*E. coli* 0124 K221 及び *Staphylococcus aureus* FDA 209 P	*in vitro*	[redacted] Italy	PD8101	4.2.1.1-2（参考資料）
上皮細胞に及ぼす影響	HEp-2、HCT-8、A549 及び HeLa 細胞	*in vitro*	University of Texas school of public health, USA	PD1001	4.2.1.1-3（参考資料）
細菌病原性因子に及ぼす影響	Enterotoxigenic *E. coli*、Enteroaggregative *E. coli* 及び *Shigella sonnei*	*in vitro*	University of Texas school of public health, USA	PD1002	4.2.1.1-4（参考資料）
細菌の形態及びプラスミドに及ぼす影響	*E. coli*、*S. aureus*、*Morganella morganii*、*Citrobacter freundii*、*Proteus mirabilis* 及び *Klebsiella pneumoniae*	*in vitro*	University of Genova, Italy	PD0801	4.2.1.1-5（参考資料）
標準菌株に対する抗菌活性	*S. aureus* 及び *Pseudomonas aeruginosa*	*in vitro*	[redacted] US	PD0103	4.2.1.1-6（参考資料）
標準菌株に対する抗菌活性	標準菌株（10 株）	*in vitro*	[redacted] France	PD9302	4.2.1.1-7（参考資料）
標準菌株に対する抗菌活性	*Enterococcus faecalis*	*in vitro*	[redacted] Italy	PD9702	4.2.1.1-8（参考資料）
臨床分離株に対する抗菌活性	臨床分離株（22 種）	*in vitro*	University of Iowa college of medicine, USA	PD9301	4.2.1.1-9（参考資料）
臨床分離株に対する抗菌活性	*Yersinia enterocolitica* 及び *Campylobacter jejuni*	*in vitro*	University of Camerino, Italy	PD8701	4.2.1.1-10（参考資料）

試験の種類	試験系	投与方法	実施施設	試験番号	CTD における記載箇所
臨床分離株に対する抗菌活性	*Helicobacter pylori*	*in vitro*	University college London medical school, UK	PD9501	4.2.1.1-11（参考資料）
臨床分離株に対する抗菌活性	*Clostridium difficile*	*in vitro*	[redacted] Italy	PD9701	4.2.1.1-12（参考資料）
臨床分離株に対する抗菌活性	*Bacteroides* spp.	*in vitro*	[redacted] France	PD9302	4.2.1.1-7（参考資料）
真菌、ウイルス及び寄生虫に対する活性	*Candida* spp.、Herpes virus 及び *Trichomonas vaginalis*	*in vitro*	University of Iowa college of medicine, USA	PD9301	4.2.1.1-9（参考資料）
接種菌量による影響	*E. coli* ent. 0124 K221、*Salmonella wien* LP 及び *P. mirabilis* Galleri II	*in vitro*	[redacted] Italy	PD8101	4.2.1.1-2（参考資料）
抗菌活性（他剤比較）	*E. coli*、*Shigella flexneri*、*S. sonnei*、*Salmonella* spp.、*Yersinia enterocolitica*、*Aeromonas hydrophila* 及び *C. jejuni*	*in vitro*	University of Barcelona, Spain	PD0102	4.2.1.1-13（参考資料）
抗菌活性（他剤比較）	*C. difficile*	*in vitro*	[redacted] Italy	PD9701	4.2.1.1-12（参考資料）
抗菌活性（他剤比較）	*Bacteroides* spp.及び *Clostridium perfringens*	*in vitro*	Laboratory of bacteriology and virology, Italy	PD8401	4.2.1.1-14（参考資料）
抗菌活性（他剤比較）	*Peptostreptococcus* spp.、*Bacteroides* spp.、*Prevotella* spp.、*Fusobacterium* spp.、*Clostridium* spp.及び *Bifidobacterium* spp.	*in vitro*	[redacted] France	PD9302	4.2.1.1-7（参考資料）
抗菌活性（代謝物との比較）	*Enterobacteriaceae*、*Staphylococcus* spp.及び *Enterococcus* spp.	*in vitro*	[redacted] Italy	PD0301	4.2.1.1-15（参考資料）
糞便細菌叢に及ぼす影響	ラット/SD	経口	[redacted] Italy	PD8001	4.2.1.1-16（参考資料）
糞便細菌叢に及ぼす影響	ラット/Wister	経口	[redacted] Italy	PD8201	4.2.1.1-17（参考資料）

試験の種類	試験系	投与方法	実施施設	試験番号	CTD における記載箇所
全身性感染モデルに対する活性	マウス/Swiss	経口	[redacted] Italy	PD8101	4.2.1.1-2（参考資料）
血中アンモニア濃度に対する作用	ラット/SD	経口	あすか製薬	ARX1RE[redacted]01	4.2.1.1-18（評価資料）
肝性脳症モデルに対する効果	ラット/SD	経口	あすか製薬	ARX1RE[redacted]02	4.2.1.1-19（評価資料）
耐性機構	*Bifidobacterium infantis* BI07	*in vitro*	University of Bologna, Italy	PD0702	4.2.1.1-20（参考資料）
耐性機構	*Bifidobacterium* spp.	*in vitro*	University of Bologna, Italy	PD0803	4.2.1.1-21（参考資料）
自然耐性変異	臨床分離株（17 種）	*in vitro*	[redacted] Italy	PD9702	4.2.1.1-8（参考資料）
臨床分離株における耐性変異	*E. coli* ent. 0124 K221、*E. coli* ML/35、*E. coli* Galleri、*S. wien* LP、*Salmonella* p.t.A. 0243K、*K. pneumoniae* Barboni II、*K. pneumoniae* Ottaviani、*Serratia* Galleri II 及び *Proteus vulgaris* LP	*in vitro*	[redacted] Italy	PD8101	4.2.1.1-2（参考資料）
臨床分離株における耐性変異	*E. coli* ent. 0124 K221、*E. coli* ML/35、*E. coli* Galleri、*S. wien* LP、*Salmonella* p.t.B. 0248K Sclavo、*K. pneumoniae* Barboni II、*K. pneumonia* Ottaviani、*Serratia* Galleri II 及び *P. vulgaris* LP	*in vitro*	[redacted] Italy	PD8201	4.2.1.1-17（参考資料）
腸球菌における耐性変異	腸球菌	*in vitro*	University of Texas, USA	PD0401	4.2.1.1-22（参考資料）
副次的薬理試験					
抗菌活性と耐性変異	*H. pylori*	*in vitro*	University of Bordeaux II, France	PD9401	4.2.1.2-1（参考資料）

試験の種類	試験系	投与方法	実施施設	試験番号	CTD における記載箇所
抗菌活性	*H. pylori*	*in vitro*	University college London medical school, UK	PD9501	4.2.1.1-11（参考資料）
抗菌活性とリファンピシン交差耐性	*C. difficile*	*in vitro*	Hines Veterans Affairs hospital, USA	PD0802	4.2.1.2-2（参考資料）
抗菌活性とリファンピシン交差耐性	*C. difficile*	*in vitro*	University of Texas school of public health, USA	PD1003	4.2.1.2-3（参考資料）
抗菌活性とリファンピシン耐性獲得	*Mycobacterium tuberculosis*	*in vitro*	[redacted] Italy	PD9303	4.2.1.2-4（参考資料）
抗菌活性とリファンピシン交差耐性	モルモット	経口	University of Roma, Italy	PD8402	4.2.1.2-5（参考資料）
抗菌活性とリファンピシン交差耐性	モルモット	経口	University of Bologna, Italy	PD8702	4.2.1.2-6（参考資料）
リファンピシン交差耐性	–	–	[redacted] France	PD0105	4.2.1.2-7（参考資料）
安全性薬理試験					
中枢神経系	マウス/ICR CD-1	経口	[redacted]	PD9707	4.2.1.3-1（評価資料）
	マウス/ICR CD-1	経口	[redacted]	PD9708	4.2.1.3-2（評価資料）
	マウス/ICR CD-1	経口	[redacted]	PD9709	4.2.1.3-3（評価資料）
	マウス/ICR CD-1	経口	[redacted]	PD9710	4.2.1.3-4（評価資料）
	マウス/ICR CD-1	経口	[redacted]	PD9712	4.2.1.3-5（評価資料）
	マウス/ICR CD-1	経口	[redacted]	PD9714	4.2.1.3-6（評価資料）

試験の種類	試験系	投与方法	実施施設	試験番号	CTD における記載箇所
心血管・呼吸器系	hERG 遺伝子発現 HEK293 細胞	*in vitro*	[redacted]	PD0901	4.2.1.3-7（評価資料）
	イヌ/ Beagle	十二指腸内	[redacted]	PD9703	4.2.1.3-8（評価資料）
腎／泌尿器系	ラット/Wistar	経口	[redacted]	PD9713	4.2.1.3-9（評価資料）
自律神経系	ネコ	十二指腸内	[redacted]	PD9711	4.2.1.3-10（評価資料）
胃腸管系	マウス/ICR CD-1	経口	[redacted]	PD9704	4.2.1.3-11（評価資料）
	ラット/Wistar	経口	[redacted]	PD9705	4.2.1.3-12（評価資料）
	ラット/Wistar	十二指腸内	[redacted]	PD9706	4.2.1.3-13（評価資料）

[redacted]: [redacted] UK.

[redacted] : [redacted] USA.

2.6.3.2 効力を裏付ける試験

試験の種類： 試験名（試験番号）	菌種又は 動物種/系統	投与 方法	濃度又は投与量	性別及び 動物数/群	特記所見	記載箇所
RNA 合成阻害作用： Rifaximin is an inhibitor of bacterial RNA synthesis（PD9201）	*Escherichia coli*	*in vitro*	6～60 µg/mL	−	[^{3}H]ウリジンの取込みを抑制し、RNA 合成を阻害した。	4.2.1.1-1
殺菌作用： Rifaximin: Report on the antibacterial properties and pharmacokinetics of the product L/105（PD8101）	*E. coli* 0124 K221 及び *Staphylococcus aureus* FDA 209 P	*in vitro*	0.001～25 µg/mL	−	リファンピシンと同程度の殺菌作用を示した。	4.2.1.1-2
上皮細胞に及ぼす影響： Pretreatment of epithelial cells with rifaximin alters bacterial attachment and internalization profiles（PD1001）	HEp-2、HCT-8、A549 及び HeLa 細胞	*in vitro*	8～64 µg/mL	−	細胞や細菌の種類によって異なるものの、細菌の上皮細胞への接着及び侵入を低下し、炎症性サイトカインの放出を抑制した。	4.2.1.1-3
細菌病原性因子に及ぼす影響： Rifaximin-induced alteration of virulence of diarrhoea-producing *Escherichia coli* and *Shigella sonnei*（PD1002）	Enterotoxigenic *E. coli*、Enteroaggregative *E. coli* 及び *Shigella sonnei*	*in vitro*	8～64 µg/mL	−	病原性因子の発現を抑制した。	4.2.1.1-4
細菌の形態及びプラスミドに及ぼす影響： Effects of rifaximin on bacterial virulence mechanisms at supra- and sub-inhibitory concentrations（PD0801）	*E. coli*、*S. aureus*、*Morganella morganii*、*Citrobacter freundii*、*Proteus mirabilis* 及び *Klebsiella pneumoniae*	*in vitro*	0.002～512 µg/mL	−	L-105 感受性株及び耐性株の *E. coli* で形態を変化させた。4.5～70%の *E. coli* から F*lac* プラスミドを除去し、プラスミド伝達も抑制した。	4.2.1.1-5
標準菌株に対する抗菌活性： *In vitro* rifaximin susceptibility testing of enteric bacteria pathogens（PD0103）	*S. aureus* 及び *Pseudomonas aeruginosa*	*in vitro*	0.016～1024 µg/mL	−	抗菌活性を示した。	4.2.1.1-6
標準菌株に対する抗菌活性： Comparative *in vitro* effect of rifaximin on strict anaerobic bacteria（PD9302）	標準菌株（*S. aureus*、*E. coli* 及び *Peptostreptococcus anaerobius* など 10 株）	*in vitro*	0.001～64 µg/mL	−	抗菌活性を示した。	4.2.1.1-7

試験の種類： 試験名（試験番号）	菌種又は 動物種/系統	投与 方法	濃度又は投与量	性別及び 動物数/群	特記所見	記載箇所
標準菌株に対する抗菌活性： Rate of selection of spontaneous mutants among anaerobic and aerobic bacteria, including ammonia producing species, to rifaximin, vancomycin, and neomycin（PD9702）	*Enterococcus faecalis*	*in vitro*	0.004～128 μg/mL	−	抗菌活性を示した。	4.2.1.1-8
臨床分離株に対する抗菌活性： Antimicrobial activity and spectrum of rifaximin, a new topical rifamycin derivative（PD9301）	臨床分離株（*S. aureus*、*Staphylococcus epidermidis* 及び *Streptococcus pneumoniae* など 22 種）	*in vitro*	0.015～8 μg/mL	−	抗菌活性を示した。	4.2.1.1-9
臨床分離株に対する抗菌活性： *In vitro* antibacterial activity of rifaximin against *Clostridium difficile*, *Campylobacter jejunii* and *Yersinia* spp.（PD8701）	*Yersinia enterocolitica* 及び *Campylobacter jejuni*	*in vitro*	0.1～100 μg/mL	−	抗菌活性を示した。	4.2.1.1-10
臨床分離株に対する抗菌活性： The susceptibility of *Helicobacter pylori* to the rifamycin, rifaximin（PD9501）	*Helicobacter pylori*	*in vitro*	0.25～16 μg/mL	−	抗菌活性を示した。	4.2.1.1-11
臨床分離株に対する抗菌活性： Rifaximin: comparative *in vitro* activity of metronidazole and vancomycin against *Clostridium difficile*（PD9701）	*Clostridium difficile*	*in vitro*	0.004～128 μg/mL	−	抗菌活性を示した。	4.2.1.1-12
臨床分離株に対する抗菌活性： Comparative *in vitro* effect of rifaximin on strict anaerobic bacteria（PD9302）	*Bacteroides* spp.	*in vitro*	0.1～256 μg/mL	−	抗菌活性を示した。	4.2.1.1-7
真菌、ウイルス及び寄生虫に対する活性： Antimicrobial activity and spectrum of rifaximin, a new topical rifamycin derivative（PD9301）	*Candida* spp.、Herpes virus 及び *Trichomonas vaginalis*	*in vitro*	<4～5000 μg/mL	−	真菌、ウイルス及び寄生虫において不活性であった。	4.2.1.1-9
接種菌量による影響： Rifaximin: Report on the antibacterial properties and pharmacokinetics of the product L/105（PD8101）	*E. coli* ent. 0124 K221、*Salmonella wien* LP 及び *P. mirabilis* Galleri II	*in vitro*	3～50 μg/mL	−	接種菌量の増加により、抗菌活性は減弱した。	4.2.1.1-2

試験の種類： 試験名（試験番号）	菌種又は 動物種/系統	投与 方法	濃度又は投与量	性別及び 動物数/群	特記所見	記載箇所
抗菌活性（他剤比較）： *In vitro* activity of rifaximin against enteropathogens producing traveler's diarrhea（PD0102）	*E. coli*、*Shigella flexneri*、*S. sonnei*、*Salmonella* spp.、*Yersinia enterocolitica*、*Aeromonas hydrophila* 及び *C. jejuni*	*in vitro*	4～512 μg/mL	−	多くの細菌でリファンピシンと同程度の抗菌活性を示した。	4.2.1.1-13
抗菌活性（他剤比較）： Rifaximin: comparative *in vitro* activity of metronidazole and vancomycin against *Clostridium difficile*（PD9701）	*C. difficile*	*in vitro*	0.004～128 μg/mL	−	メトロニダゾール又はバンコマイシンより強い抗菌活性を示した。	4.2.1.1-12
抗菌活性（他剤比較）： *In vitro* activity of rifaximin and rifampicin against some anaerobic bacteria（PD8401）	*Bacteroides* spp.及び *Clostridium perfringens*	*in vitro*	0.06～64 μg/mL	−	リファンピシンと同程度の抗菌活性を示した。	4.2.1.1-14
抗菌活性（他剤比較）： Comparative *in vitro* effect of rifaximin on strict anaerobic bacteria（PD9302）	*Peptostreptococcus* spp.、*Bacteroides* spp.、*Prevotella* spp.、*Fusobacterium* spp.、*Clostridium* spp.及び *Bifidobacterium* spp.	*in vitro*	0.0001～256 μg/mL	−	抗菌活性はリファンピシンとほぼ同程度であり、リファマイシンよりは高かった。	4.2.1.1-7
抗菌活性（代謝物との比較）： Evaluation of the *in vitro* antibacterial activity of rifaximin and its metabolite, 25 desacetyl rifaximin. Technical and scientific report（PD0301）	*Enterobacteriaceae*、*Staphylococcus* spp.及び *Enterococcus* spp.	*in vitro*	0.03～32 μg/mL	−	代謝物の 25-*O*-脱アセチル体よりも高い抗菌活性を示した。	4.2.1.1-15
糞便細菌叢に及ぼす影響： Rifaximin: Report on the intestinal antibacterial activity of two new rifamycins (compound M/302 and compound L/105) in the rat（PD8001）	ラット/SD	経口	1, 10, 30, 100 mg/kg （7 日間）	♀6	糞便中の一部の細菌数を減少させたが、用量依存性はなかった。	4.2.1.1-16
糞便細菌叢に及ぼす影響： Supplementary report on the antibacterial properties *in vitro* and *in vivo* (intestinal flora of rat) of the product L/105 as compared to neomycin（PD8201）	ラット/Wister	経口	50 mg/kg （2 日間）	♂6	糞便中の一部の細菌数を減少させた。	4.2.1.1-17

試験の種類： 試験名（試験番号）	菌種又は 動物種/系統	投与 方法	濃度又は投与量	性別及び 動物数/群	特記所見	記載箇所
全身性感染モデルに対する活性： Rifaximin: Report on the antibacterial properties and pharmacokinetics of the product L/105（PD8101）	*S. aureus Colliva* 感染マウス /Swiss	経口	0.1～10 mg/kg	♂♀10	全身性感染に対して防御作用を示さなかった。	4.2.1.1-2
血中アンモニア濃度に対する作用： 正常ラット血中アンモニア濃度に及ぼす L-105 の影響（ARX1RE[redacted]01）	ラット/SD	経口	1, 3, 10, 30 mg/kg （3 日間）	♂10	腸間膜静脈血中のアンモニア濃度を低下させた。	4.2.1.1-18
肝性脳症モデルに対する効果： ラット肝性脳症モデルにおける L-105 の効果（ARX1RE[redacted]02）	ラット/SD	経口	0.3, 3, 30 mg/kg （3 日間）	♂10	肝性脳症モデルにおいて静脈血中アンモニア濃度の上昇及び昏睡の発症を抑制した。	4.2.1.1-19
耐性機構： Genetic and proteomic characterization of rifaximin resistance in *Bifidobacterium infantis* BI07（PD0702）	*Bifidobacterium infantis* BI07	*in vitro*	0.031～32 µg/mL	−	耐性菌において *rpoB* 遺伝子にミスセンス突然変異が認められた。	4.2.1.1-20
耐性機構： Molecular and phenotypic traits of *in-vitro*-selected mutants of *Bifidobacterium* resistant to rifaximin（PD0803）	*Bifidobacterium* spp.	*in vitro*	0.016～100 µg/mL	−	耐性菌において *rpoB* 遺伝子にミスセンス突然変異及び膜脂肪酸組成の変化が認められた。	4.2.1.1-21
自然耐性変異： Rate of selection of spontaneous mutants among anaerobic and aerobic bacteria, including ammonia producing species, to rifaximin, vancomycin, and neomycin（PD9702）	臨床分離株（*Finegoldia magna*、*Parvimonas micra* 及び *Bacteroides fragilis* など 17 種）	*in vitro*	0.004～128 µg/mL	−	自然耐性変異を示す細菌が出現した。	4.2.1.1-8
臨床分離株における耐性変異： Rifaximin: Report on the antibacterial properties and pharmacokinetics of the product L/105（PD8101）	*E. coli* ent. 0124 K221、*E. coli* ML/35、*E. coli* Galleri、*S. wien* LP、*Salmonella* p.t.A. 0243K、*K. pneumoniae* Barboni II、*K. pneumoniae* Ottaviani、*Serratia* Galleri II 及び *Proteus vulgaris* LP	*in vitro*	3～100 µg/mL	−	耐性株が出現し、その速度及び程度はリファンピシンと同程度であった。	4.2.1.1-2

試験の種類： 試験名（試験番号）	菌種又は 動物種/系統	投与 方法	濃度又は投与量	性別及び 動物数/群	特記所見	記載箇所
臨床分離株における耐性変異： Supplementary report on the antibacterial properties *in vitro* and *in vivo* (intestinal flora of rat) of the product L/105 as compared to neomycin （PD8201）	*E. coli* ent. 0124 K221、*E. coli* ML/35、*E. coli* Galleri、*S. wien* LP、*Salmonella* p.t.B. 0248K Sclavo、*K. pneumoniae* Barboni II、*K. pneumoniae* Ottaviani、*Serratia* Galleri II 及び *P. vulgaris* LP	*in vitro*	3～100 μg/mL	−	耐性株が出現し、その速度及び程度はネオマイシンと同程度であった。	4.2.1.1-17
腸球菌における耐性変異： Influence of rifaximin treatment on the susceptibility of intestinal Gram-negative flora and enterococci （PD0401）	L-105 投与患者の糞便から分離した腸球菌	*in vitro*	8～64 μg/mL	−	投与前後の糞便分離菌において L-105 及びリファンピシンの MIC は変化しなかった。	4.2.1.1-22

2.6.3.3 副次的薬理試験

試験の種類 （試験名及び試験番号）	菌種又は 動物種/系統	投与 方法	濃度又は投与量	性別及び 動物数/群	特記所見	記載箇所
抗菌活性と耐性変異： *In vitro* activity of rifaximin against *Helicobacter pylori*（PD9401）	*H. pylori*	*in vitro*	0.008～128 μg/mL	−	抗菌活性を示したが、MIC 以下の濃度で耐性菌が出現した。	4.2.1.2-1
抗菌活性： The susceptibility of *Helicobacter pylori* to the rifamycin, rifaximin（PD9501）	*H. pylori*	*in vitro*	0.25～16 μg/mL	−	抗菌活性を示した。	4.2.1.1-11
抗菌活性とリファンピシン交差耐性： Rifampin and rifaximin resistance in clinical isolates of *Clostridium difficile*（PD0802）	*C. difficile*	*in vitro*	0.0009～256 μg/mL	−	抗菌活性を示した。耐性株において *rpoB* アミノ酸置換が特定された。	4.2.1.2-2
抗菌活性とリファンピシン交差耐性： *In vitro* susceptibility of *Clostridium difficile* to rifaximin and rifampin in 359 consecutive isolates at a university hospital in Houston, Texas（PD1003）	*C. difficile*	*in vitro*	0.003～1024 μg/mL	−	抗菌活性を示した。リファンピシン耐性 28 株のうち 6 株が L-105 耐性であった。	4.2.1.2-3
抗菌活性とリファンピシン耐性獲得： Selection of rifampicin-resistant mycobacteria does not occur in the presence of low concentrations of rifaximin（PD9303）	*Mycobacterium tuberculosis*	*in vitro*	6～270 ng/mL 及び 0.5～1 μg/mL	−	細菌の増殖を遅延した。L-105 及びリファンピシン共に L-105 処理の前後で MIC 値は同じで、耐性は選択されなかった。	4.2.1.2-4
抗菌活性とリファンピシン交差耐性： Antimycobacterial activity of rifaximin (L/105) in experimental tuberculosis in the guinea pig（PD8402）	*M. tuberculosis* 感染モルモット	経口	30, 60 mg/kg （4 ヵ月）	♂15	全身性感染に対して無効であった。L-105 投与前後で L-105 の MIC は変化しなかった。	4.2.1.2-5

試験の種類 （試験名及び試験番号）	菌種又は 動物種/系統	投与 方法	濃度又は投与量	性別及び 動物数/群	特記所見	記載箇所
抗菌活性とリファンピシン交差耐性： Sensitivity to rifaximin and rifampicin of *Mycobacterium tuberculosis* isolated from guinea pigs treated orally with rifaximin（PD8702）	*M. tuberculosis* 感染モルモット	経口	60 mg/kg （3 ヵ月）	♂10	全身性感染に対して無効であった。L-105 投与前後で L-105 及びリファンピシンの MIC は変化しなかった。	4.2.1.2-6
リファンピシン交差耐性： Expert report on rifaximin and tuberculosis（PD0105）	–	–	–	–		4.2.1.2-7

2.6.3.4 安全性薬理試験

評価対象	動物種/系統	投与方法	投与量[a] (mg/kg)	性別及び動物数/群	特記所見	GLP適用	記載箇所
中枢神経系	マウス/ICR CD-1	経口	100, 300, 1000	♂10	自発運動に及ぼす影響は認められなかった。	適	4.2.1.3-1
	マウス/ICR CD-1	経口	100, 300, 1000	♂4	Irwin 法による観察で、行動に及ぼす影響は認められなかった。	適	4.2.1.3-2
	マウス/ICR CD-1	経口	100, 300, 1000	♀10	ロータロッド上の運動時間に及ぼす影響は認められなかった。	適	4.2.1.3-3
	マウス/ICR CD-1	経口	100, 300, 1000	♂10	メトラゾール誘発又は電気刺激による痙攣を促進しなかった。	適	4.2.1.3-4
	マウス/ICR CD-1	経口	100, 300, 1000	♂5♀5	1000 mg/kg を投与した雌では、ヘキソバルビタール誘発性睡眠時間を有意に延長させた。雄では、有意な影響は認められなかった。100 及び 300 mg/kg では、雌雄ともに有意な影響は認められなかった。	適	4.2.1.3-5
	マウス/ICR CD-1	経口	100, 300 1000	♂20	メトラゾール誘発性痙攣に対するジアゼパムの抑制作用に、影響を及ぼさなかった。	適	4.2.1.3-6
心血管・呼吸器系	hERG 遺伝子発現 HEK293 細胞	*in vitro*	10, 30, 100, 300 μmol/L	―	hERG 電流に対する IC_{50} 値は、100 μmol/L 以上であった。	適	4.2.1.3-7
	イヌ/ Beagle	十二指腸内	1000	♀3	心血管系や呼吸器系に及ぼす影響は認められなかった。	適	4.2.1.3-8
腎／泌尿器系	ラット/Wistar	経口	100, 300 1000	♂8	1000 mg/kg では、尿量及び電解質排泄（K^+及び Cl^-）の有意な増加が認められた。100 及び 300 mg/kg では、有意な影響は認められなかった。	適	4.2.1.3-9
自律神経系	ネコ	十二指腸内	1000	♂3	自律神経機能への明らかな影響は、認められなかった。	適	4.2.1.3-10
胃腸管系	マウス/ICR CD-1	経口	100, 300 1000	♂10	炭末輸送能に及ぼす影響は認められなかった。	適	4.2.1.3-11
	ラット/Wistar	経口	100, 300 1000	♂10	肉眼的観察で、胃腸障害は認められなかった。	適	4.2.1.3-12
	ラット/Wistar	十二指腸内	100, 300 1000	♂10	胃液の量や電解質含量に及ぼす影響は認められなかった。	適	4.2.1.3-13