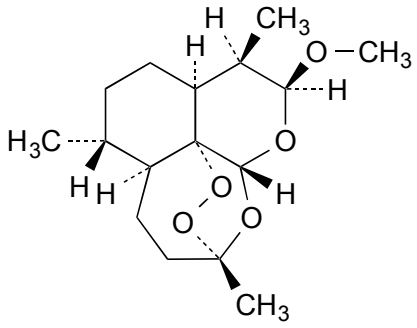
2.6.1 緒言

1 緒言

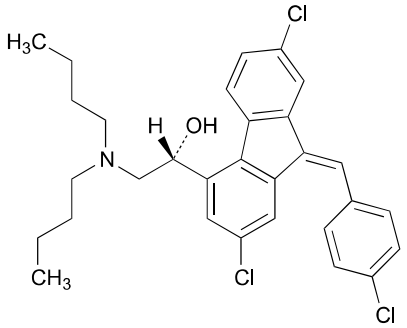
本剤は，アルテメテル（artemether，以下，Arm）及びルメファントリン（lumefantrine，以下，Lmf）の配合剤（配合比 1：6）であり，合併症のない急性熱帯熱マラリアの治療薬として開発された。Arm 及び Lmf の化学構造を以下に示す（Figure 1-1）。

Figure 1-1 Arm 及び Lmf の化学構造

Arm



Lmf



及び鏡像異性体

Arm は経口投与後に活性代謝物である dihydroartemisinin（DHA）に代謝され，Arm と DHA は主に炭素中心ラジカルを発生することにより，赤血球内のマラリア原虫を殺滅すると考えられている。Lmf はマラリア原虫によるヘモグロビンの消化産物であるヘムの重合阻害が主な作用機序として考えられている。非臨床試験では，Arm 及び Lmf を併用することで熱帯熱マラリアの原因病原体である *Plasmodium falciparum*（*P. falciparum*）の速やかな減少・消失，並びに耐性株の発現を抑制することが示された。また，臨床試験では，本剤を経口投与したときの安全性，忍容性，薬物動態，及び有効性が検討されており，合併症のない急性熱帯熱マラリア患者に対する忍容性及び有効性が示されている。

本剤の効能又は効果（案），並びに用法及び用量（案）を以下に示す。

【効能又は効果】

合併症のない急性熱帯熱マラリア

【用法及び用量】

通常，体重 35 kg 以上の患者には 1 回 4 錠（アルテメテル／ルメファントリンとして 80 mg／480 mg）を初回，初回投与後 8 時間，その後は 1 日 2 回朝，夕を 2 日間，計 6 回，食事と共に経口投与する。

通常，体重 5 kg 以上 35 kg 未満の患者には体重に応じて 1 回 1 錠～3 錠（アルテメテル／ルメファントリンとして 20 mg／120 mg～60 mg／360 mg）を初回，初回投与後 8 時間，その後は 1 日 2 回朝，夕を 2 日間，計 6 回，食事と共に経口投与する。

体重別の 1 回投与量は，下記のとおりである。

5～15 kg 未満： 20 mg／120 mg（1 錠）

15～25 kg 未満： 40 mg／240 mg（2 錠）

25～35 kg 未満： 60 mg／360 mg（3 錠）

35 kg 以上： 80 mg／480 mg（4 錠）

2.6.2 薬理試験の概要文

目　次

目　次 2
表 一 覧 3
図 一 覧 4
略号一覧 5
用語の定義一覧 5
1 薬理試験の概要文 6
1.1 まとめ 6
2 効力を裏付ける試験 8
2.1 *P. falciparum* に対する *in vitro* 抗マラリア原虫活性 8
2.1.1 Artemisinin 及び Lmf の *P. falciparum*（新鮮分離株）に対する抗マラリア原虫活性 9
2.1.2 Lmf 立体異性体の抗マラリア原虫活性 11
2.1.3 Arm 及び Lmf 代謝物の抗マラリア原虫活性 12
2.1.4 Arm/Lmf による抗マラリア原虫活性増強作用 14
2.1.5 Arm，Lmf 及び Arm/Lmf に対する耐性発現 16
2.2 *In vivo* 試験 16
2.2.1 Arm，Lmf 及び Arm/Lmf による *in vivo* 抗マラリア原虫活性（マウスでの検討） 16
2.2.2 Arm，Lmf 及び Arm/Lmf による *in vivo* 抗マラリア原虫活性（サルでの検討） 18
2.2.3 Arm，Lmf 及び Arm/Lmf に対する *in vivo* 耐性発現検討 18
2.3 作用機序 20
2.3.1 Arm の作用機序 20
2.3.2 Lmf の作用機序 21
3 副次的薬理試験 21
3.1 *In vitro* 薬理試験 21
3.1.1 Arm 及び Lmf の神経伝達物質受容体に対する *in vitro* での結合親和性 21
3.1.2 Arm 又は DHA と Lmf の併用による神経細胞への影響 21
3.2 *In vivo* 薬理試験 23
4 安全性薬理試験 24
4.1 Arm の hERG 電流に及ぼす作用に関する予備試験 24
4.2 Arm の hERG 電流に及ぼす作用に関する試験 25
4.3 DHA の hERG 電流に及ぼす作用に関する予備試験 25
4.4 DHA の hERG 電流に及ぼす作用に関する試験 25
4.5 Lmf の hERG 電流に及ぼす作用に関する試験 25
4.6 モルモット摘出乳頭筋の活動電位に及ぼす作用に関する試験 26

4.7 モルモット摘出心房に及ぼす作用に関する試験 27
4.8 ラットを用いた心血管系及び腎臓に関する試験 27
5 薬力学的薬物相互作用試験 27
6 考察及び結論 27
7 参考文献 30

表 一 覧

Table 2-1 *P. falciparum* に対する Arm，DHA 及び artemisinin の EC 値の相関性 8
Table 2-2 Artemisinin，Lmf，クロロキン，キニーネ及びメフロキンの *P. falciparum* タンザニア分離株に対する抗マラリア原虫活性 9
Table 2-3 Artemisinin，Lmf，クロロキン，キニーネ及びメフロキンの *P. falciparum* 中国分離株に対する抗マラリア原虫活性 10
Table 2-4 Artemisinin，Lmf，クロロキン，キニーネ及びメフロキンの *P. falciparum* タイ分離株（1994 年及び 1995 年）に対する抗マラリア原虫活性 11
Table 2-5 Artemisinin，Lmf，クロロキン，キニーネ及びメフロキンの *P. falciparum* タイ分離株（1996 年）に対する抗マラリア原虫活性 11
Table 2-6 Lmf 立体異性体の *P. falciparum* T-996 及び LS-21 株に対する抗マラリア原虫活性 12
Table 2-7 Lmf 立体異性体及びラセミ体の *P. falciparum* タンザニア分離株に対する抗マラリア原虫活性 12
Table 2-8 Arm，DHA，クロロキン，naphthoquine，piperaquine，pyronaridine，Lmf 及び artesunate の *P. falciparum* パプアニューギニア分離株に対する抗マラリア原虫活性 13
Table 2-9 Arm，DHA，artesunate 及び artemisinin の *P. falciparum* に対する抗マラリア原虫活性 13
Table 2-10 *P. falciparum* F-32，FCR-3 及び K-1 株に対する Lmf 及び Desbutyl-Lmf の EC 値 14
Table 2-11 Arm/Lmf の T-996 及び LS-21 株に対する原虫寄生阻害率 15
Table 2-12 Arm，Lmf 及び Arm/Lmf 投与による原虫寄生阻害率 17
Table 2-13 Arm，Lmf 及び Arm/Lmf（1：0.1875～1：2）投与時における ED 値 17
Table 2-14 Arm，Lmf 及び Arm/Lmf の抗マラリア原虫活性 18
Table 2-15 Arm，Lmf 及び Arm/Lmf の反復投与及び反復継代後のマラリア原虫株に対する ED50 値 19
Table 4-1 安全性薬理試験一覧 24
Table 4-2 抗マラリア薬の hERG 阻害作用の比較 26

図 一 覧

Figure 2-1 Arm/Lmf の予想 EC 値と実測値，及び併用濃度比の関係..... 16
Figure 3-1 Lmf 及び DHA の併用による神経突起伸長阻害率（1 回目）..... 22
Figure 3-2 Lmf 及び DHA の併用による神経突起伸長阻害率（2 回目）..... 23
Figure 3-3 Lmf 及び Arm の併用による神経突起伸長阻害率..... 23

略号一覧

略号	省略していない表現（英）	省略していない表現（日）
AMP	adenosine monophosphate	アデノシン一リン酸
Arm	artemether	アルテメテル
Arm/Lmf	artemether/lumefantrine	アルテメテル／ルメファントリン
ATP	adenosine triphosphate	アデノシン三リン酸
BMM	blood medium mixture	赤血球混合培地
Bt_2cAMP	dibutyryl cyclic adenosine monophosphate	ジブチリルサイクリック AMP
Ca	calcium	カルシウム
DHA	dihydroartemisinin	-
Desbutyl-Lmf	desbutyl-lumefantrine	desbutyl-ルメファントリン
EC50/90/99	50/90/99% effective concentration	50/90/99%有効濃度
ED50/90	50/90% effective dose	50/90%有効用量
IC50	50% Inhibitory concentration	50%阻害濃度
Lmf	lumefantrine	ルメファントリン
SERCA	sarcoplasmic/endoplasmic reticulum $Ca2^{+}$-ATPase	筋小胞体／小胞体カルシウム ATP アーゼ

用語の定義一覧

用語	定義
薬剤名の表記方法	JAN を取得している薬剤はカタカナ表記，未取得の薬剤は英語表記とした。
併用投与の表記方法	併用投与による試験では，併用した薬剤とその用量又は濃度を「／」で示した。 例）アルテメテルとルメファントリンの併用投与→ Arm/Lmf 2/12 mg/kg

1 薬理試験の概要文

1.1 まとめ

リアメット配合錠はアルテメテル（Arm）及びルメファントリン（Lmf，benflumetol）を 1：6 の配合比で含有する，マラリア，特に熱帯熱マラリアの治療を目的とした強力な経口抗マラリア薬である。Arm は，古くからマラリアの症状を軽減する漢方薬として使用されていたヨモギ属植物 *artemisia annua* からの抽出物である artemisinin の誘導体として開発，利用されてきた（Vinetz et al. 2013）。また，Lmf は，他のアリルアミノクラス II 抗マラリア薬（キニーネ，メフロキン及び halofantrine 等）と構造的に類似するアリルアミノアルコールである。Arm とその活性代謝物である dihydroartemisinin（DHA），Lmf とその活性代謝物である desbutyl-ルメファントリン（desbutyl-lumefantrine，Desbutyl-Lmf）の薬理作用を明らかにし，また，2 剤併用時の抗マラリア原虫活性及び耐性発現を評価するため，種々の *in vitro* 及び *in vivo* 試験を実施した。

In vitro 試験では，一部の検討では Arm ではなく artemisinin を使用し，artemisinin 及び Lmf の熱帯熱マラリア原虫（*Plasmodium falciparum*，以下，*P. falciparum*）新鮮分離株に対する活性を検討した。artemisinin 及び Lmf の EC50 値は，それぞれ 21.06～27.37 及び 5.933～9.844 nM（タンザニア分離株），652.5 及び 24.0 nM（中国分離株），10.24～35.85 及び 7.042～25.91 nM（タイ分離株）であった。Lmf 立体異性体の抗マラリア原虫活性比較検討において，*P. falciparum* 実験室適応株に対する（+）及び（−）Lmf の EC50 値は，それぞれ 0.8993 及び 1.024 nM（T-996 株），1.023 及び 0.9130 nM（LS-21 株）であった。また，タンザニア新鮮分離株に対する（+）及び（−）Lmf，及びラセミ体の EC50 値は，それぞれ 8.870，9.710 及び 12.44 nM であり，Lmf 立体異性体及びラセミ体の抗マラリア原虫活性に差異は認められなかった。Arm 及び DHA，Lmf 及び Desbutyl-Lmf の抗マラリア原虫活性を比較したところ，*P. falciparum* パプアニューギニア新鮮分離株に対する Arm 及び DHA の EC50 値はそれぞれ 5.7 及び 5.2 nM，主にサハラ以南で感染したマラリア患者からの *P. falciparum* 新鮮分離株に対する Arm 及び DHA の EC50 値はそれぞれ 10.3 及び 3.62 nM であり，抗マラリア原虫活性は同等か DHA のほうがやや高いことが示唆された。また，*P. falciparum* 実験室適応株に対する Lmf 及び Desbutyl-Lmf の EC50 値は，それぞれ 1.765 及び 1.037 nM（F-32 株），1.235 及び 0.7064 nM（FCR-3 株），1.675 及び 1.261 nM（K-1 株）であり，抗マラリア原虫活性は Desbutyl-Lmf のほうがやや高いことが示された。Arm/Lmf の抗マラリア原虫活性検討では，T-996 及び LS-21 株のいずれに対しても，広範囲の用量の組み合わせで原虫寄生阻害率は 90%以上を示し，また，単剤での活性から予想される Arm/Lmf の EC 値と比べ実際の EC 値は低値であり，相加作用を示した。Arm，Lmf 及び Arm/Lmf に対する耐性発現の可能性を *P. falciparum* K-1 株を用いて検討したが，これらに対し感受性は低下せず，*in vitro* では耐性発現は認められなかった。

In vivo 試験では，げっ歯類マラリア原虫である *Plasmodium berghei*（*P. berghei*）及び霊長類マラリア原虫である *Plasmodium knowlesi*（*P. knowlesi*）を用いてマラリア感染マウス及びサルモデルを作製し，Arm，Lmf 及び Arm/Lmf による抗マラリア原虫活性を評価した。マラリア感染マウスモデルにおける Arm 及び Lmf の原虫寄生阻害率はそれぞれ最高で 82.1%及び 91.7%であったのに対し，Arm/Lmf の投与により複数の用量及び用量比で 95%以上の阻害が認められた。マラリア感染サルモデルにおいては，投与開始時の原虫寄生率から 90%低下させるのに要する時間及び完全消失に要する時間で抗マラリア原虫活性を評価した。Arm 2 mg/kg 投与群では投与開始 20.9 時間後に原虫寄生率は 90%低下したが完全消失には至らなかった。Lmf 12 mg/kg 投与群の原虫寄生率 90 及び 100%低下時間はそれぞれ 52.4 及び 96.0 時間であり，3 例中 1 例で再燃が認められた。一方，Arm/Lmf 2/8 及び 2/12 mg/kg 投与群ではそれぞれ約 20 及び 48.0～56.0 時間と速やかにマラリア原虫を消失し，再燃も認められなかったことから，単剤による治療と比べ併用のほうがマラリア原虫をより速やかに減少・消失させ，また再燃もきたしにくいことが示唆された。また，Arm/Lmf に対する耐性発現の可能性を，マウスを用いた 2 つの方法により検討した。薬剤を投与したマウスから別のマウスへ *P. berghei* を反復継代することで，原虫寄生率が 2%に達するまでの時間が短縮される。この時間短縮が繰り返し発現した時点でマラリア原虫を分取し，薬剤の 4 日間連続投与試験における ED50 値を親株と比較して耐性発現を検証した。その結果，Lmf への耐性の発現は比較的容易に認められたが，Arm 及び Arm/Lmf に対しては頻回に継代した後でも ED50 値の上昇は認められなかった。また，別の耐性誘導試験において，頻回継代後の Arm，Lmf 及び Arm/Lmf 群の ED90 値は，親株と比べそれぞれ 6 倍強，200 倍以上及び 2.9 倍に上昇し，Arm/Lmf はそれぞれの単剤投与と比べ耐性の発現する可能性が低いことが示唆された。

Arm 及び Lmf の正確な作用機序は明らかにされていない。現在までに得られている知見では，Arm や DHA が有するエンドペルオキシド架橋がマラリア原虫によるヘモグロビンの消化産物であるヘム鉄と反応して炭素中心ラジカルとなり，このラジカルが赤血球内のマラリア原虫を傷害して死を誘発すると考えられている。また，筋小胞体／小胞体カルシウム ATP アーゼ（SERCA）の阻害作用やミトコンドリア膜電位の脱分極誘発による機能抑制作用が抗マラリア原虫活性に関与していることも示唆されている。一方，Lmf はマラリア原虫にとって有毒なヘムから毒性のない重合体であるヘモゾインへの重合を阻害することでヘムを蓄積し，抗マラリア原虫活性を発揮すると考えられている。

副次的薬理試験では，Arm 及び Lmf の神経伝達物質受容体に対する結合親和性を評価したところ，10 μM の濃度では，Arm は 5 種類（アドレナリン α1，セロトニン 3，ヒスタミン H1，アデノシン 1 及び N-メチル-D-アスパラギン酸受容体），Lmf は 3 種類（セロトニン 3，オピオイド μ 及びカイニン酸受容体）の神経伝達物質受容体に対して弱い相互作用を示した。また，マウス神経芽細胞腫 NB2a 細胞を用いて神経毒性作用を検討したが，Lmf と併用することによる Arm 又は DHA の神経毒性の増強を示唆する結果は得られなかった。

安全性薬理試験では，Lmf 及び Desbutyl-Lmf で hERG 電流の阻害作用がみられ， Arm 及び DHA でも軽度の阻害作用が認められた。ラットを用いた心血管系に関する試験では心電図に異常はみられなかったが，イヌを用いた探索的試験では，Arm の経口投与及び筋肉内投与により一部の個体で QTc 間隔の延長が認められた。したがって，本剤の臨床使用における QTc 間隔延長リスクを否定することはできないと考える。

2 効力を裏付ける試験

本項では，Arm 及び Lmf の薬理作用を明らかにするため，また，Arm/Lmf による併用効果及び薬剤耐性発現の可能性について明らかにするため，種々の *in vitro* 及び *in vivo* 試験を実施した。また，現在までに得られている知見から，Arm 及び Lmf の作用機序について考察した。

2.1 *P. falciparum* に対する *in vitro* 抗マラリア原虫活性

Arm の *in vitro* 抗マラリア原虫活性を評価するための予備試験では，Arm やその主代謝物である DHA をプラスチック製プレートにプレコートすると，不可逆的吸着によって Arm は数日以内に，DHA は 2 ヵ月以内に失活するが，Arm の類縁体である artemisinin は 6 ヵ月まで安定であることが明らかとなった。そこで，本試験では，artemisinin による Arm の抗マラリア活性の間接的な評価の妥当性を検討するために，用時調製したマイクロプレートを用いて，タイにおいて熱帯熱マラリア患者より分離した *P. falciparum* の Arm，DHA 及び artemisinin に対する *in vitro* 感受性試験を実施し，各薬剤の EC 値を算出した。得られた Arm と artemisinin，若しくは DHA と artemisinin の EC 値を分離株ごとにプロットし，相関係数を算出した。その結果，Arm 及び artemisinin の EC50，EC90 及び EC99 値に対する相関係数はそれぞれ 0.7965，0.8857 及び 0.9990，DHA 及び artemisinin の EC50，EC90 及び EC99 値に対する相関係数はそれぞれ 0.9408，0.9899 及び 0.9852 と統計学的に有意な相関性がみられた。したがって，*P. falciparum* の薬剤感受性を検討する上で，Arm や DHA ではなく artemisinin で代用可能であることが示された（Table 2-1，[Table 2.6.3.1-RD-2010-01001]）。

Table 2-1 *P. falciparum* に対する Arm，DHA 及び artemisinin の EC 値の相関性

EC 値	Arm / artemisinin (n = 15)		DHA / artemisinin (n = 22)	
	相関係数	p 値	相関係数	p 値
EC50	0.7965	< 0.001	0.9408	< 0.001
EC90	0.8857	< 0.001	0.9899	< 0.001
EC99	0.9990	< 0.001	0.9852	< 0.001

Source：Table 2.6.3.1-RD-2010-01001

タイにおいて熱帯熱マラリア患者より分離した *P. falciparum* に対する Arm，DHA 及び artemisinin の抗マラリア原虫活性を測定し，プロビット法により EC 値を求めた。その後，Arm 及び artemisinin，若しくは DHA 及び artemisinin の EC 値を分離株ごとにプロットし，相関係数を算出した。

2.1.1 Artemisinin 及び Lmf の *P. falciparum*（新鮮分離株）に対する抗マラリア原虫活性

2.1 項に示すように，薬剤をマイクロプレートにプレコートしても *P. falciparum* に対する Arm と artemisinin の感受性は相関することから，2.1.1.1～2.1.1.3 項では artemisinin 及び Lmf の *P. falciparum* に対する抗マラリア原虫活性の検討結果を記載する。

2.1.1.1 Artemisinin 及び Lmf の *P. falciparum* タンザニア分離株に対する抗マラリア原虫活性

本試験では，1992 年から 1993 年の間にタンザニアにおいて，マラリアの臨床症状を有し，他のマラリア原虫種との複合感染のない熱帯熱マラリア患者，又は，明らかな症状はないが慢性的にマラリア原虫に感染している，他のマラリア原虫種との複合感染のない熱帯熱マラリア患者より分離した *P. falciparum* に対する artemisinin 及び Lmf の抗マラリア原虫活性について検討した。*P. falciparum* が寄生した赤血球を患者より分離し，RPMI1640 培地と混合することで赤血球混合培地（BMM）を調製した。この BMM を被験薬がプレコートされたマイクロプレートに播種し，37°C で 24 時間培養後，各ウェルより塗抹標本（ギムザ染色）を作製し（以下，ギムザ法），相対原虫寄生率から EC 値を算出した。被験薬には artemisinin，Lmf，クロロキン，キニーネ及びメフロキンを用いた。Artemisinin の EC50，EC90 及び EC99 値はそれぞれ 21.06～27.37，95.67～112.5 及び 265.4～441.1 nM と分離年度によって *P. falciparum* の感受性に大きな差異は認められなかった。また，Lmf については，1992 年分離株と比べ 1993 年分離株に対する EC 値のほうが低値であり，感受性が上昇した（Table 2-2，[Table 2.6.3.1-RD-2010-00990]，[Table 2.6.3.1-RD-2010-00991]）。

Table 2-2 Artemisinin，Lmf，クロロキン，キニーネ及びメフロキンの *P. falciparum* タンザニア分離株に対する抗マラリア原虫活性

EC 値	Artemisinin		Lmf		クロロキン		キニーネ		メフロキン	
(nM)	1992 年	1993 年	1992 年	1993 年	1992 年	1993 年	1992 年	1993 年	1992 年	1993 年
n	61	42	64	141	24	48	54	65	37	53
EC50	21.06	27.37	9.844	5.933	433.4	894.8	199.4	163.0	383.5	162.2
EC90	112.5	95.67	37.97	17.01	2829	3693	1049	646.1	696.5	351.1
EC99	441.1	265.4	114.1	40.14	13057	11733	4062	1986	1133	659.1

Source：Table 2.6.3.1-RD-2010-00990，Table 2.6.3.1-RD-2010-00991

顕微鏡下で塗抹標本における *P. falciparum* 寄生及び非寄生赤血球を計数し，薬剤非添加群の原虫寄生率を C，被験薬添加群の原虫寄生率を Z としたとき，被験薬添加群の相対原虫寄生率 A を以下の式により算出した。
$A = 100 \times Z / C$

種々の濃度の薬剤で得られた相対原虫寄生率 A から，プロビット法を用いて EC 値を算出した。

P. falciparum タンザニア分離株に対する各被験薬の EC 値を分離した年別で示す。

2.1.1.2 Artemisinin 及び Lmf の *P. falciparum* 中国分離株に対する抗マラリア原虫活性

本試験では，1992 年に中国においてマラリアの臨床症状を有し，他のマラリア原虫種との複合感染のない熱帯熱マラリア患者より分離した *P. falciparum* に対する artemisinin 及び Lmf の抗マラリア原虫活性について検討した。患者より分離した *P. falciparum* 寄生赤血球を用いて調製した BMM を被験薬がプレコートされたマイクロプレートに播種し，37.5°C で 24～28 時間培養後，ギムザ法により相対原虫寄生率と EC 値を算出した。被験薬には artemisinin，Lmf，クロロキン，キニーネ及びメフロキンを用いた。Artemisinin の EC50，EC90 及び EC99 値はそれぞれ 652.5，1917 及び 3888 nM であった。また，Lmf の EC50，EC90 及び EC99 値はそれぞれ 24.0，80.0 及び 213.1 nM であった（Table 2-3，[Table 2.6.3.1-RD-2010-00987]）。

Table 2-3 Artemisinin，Lmf，クロロキン，キニーネ及びメフロキンの *P. falciparum* 中国分離株に対する抗マラリア原虫活性

EC 値（nM）	Artemisinin	Lmf	クロロキン	キニーネ	メフロキン
EC50	652.5	24.0	2625	603.0	680.5
EC90	1917	80.0	10272	1929	1712
EC99	3888	213.1	31238	4978	3634

Source：Table 2.6.3.1-RD-2010-00987
相対原虫寄生率及び EC 値の算出方法は，2.1.1.1 項と同様
n = 51

2.1.1.3 Artemisinin 及び Lmf の *P. falciparum* タイ分離株に対する抗マラリア原虫活性

本試験では，1994 年から 1995 年の間にタイにおいて，マラリアの臨床症状を有し，他のマラリア原虫種との複合感染のない熱帯熱マラリア患者より分離した *P. falciparum* に対する artemisinin 及び Lmf の抗マラリア原虫活性について検討した。試験方法及び被験薬は培養温度を 37.5°C とする以外は 2.1.1.1 項に記載の方法と同様である。Artemisinin の EC50，EC90 及び EC99 値はそれぞれ 24.93～35.85，244.6～436.4 及び 1573～3347 nM であった。また，Lmf の EC50，EC90 及び EC99 値はそれぞれ 7.042～17.14，28.83～81.70 及び 90.94～291.7 nM であった（Table 2-4，[Table 2.6.3.1-RD-2010-00992]）。

Table 2-4　Artemisinin，Lmf，クロロキン，キニーネ及びメフロキンの *P. falciparum* タイ分離株（1994 年及び 1995 年）に対する抗マラリア原虫活性

EC 値	Artemisinin		Lmf		クロロキン		キニーネ		メフロキン	
(nM)	1994 年	1995 年	1994 年	1995 年	1994 年	1995 年	1994 年	1995 年	1994 年	1995 年
n	51	40	45	43	19	12	25	11	44	17
EC50	35.85	24.93	7.042	17.14	1566	840.5	549.9	256.8	781.4	472.7
EC90	436.4	244.6	28.83	81.70	7391	2852	1825	1315	2511	1174
EC99	3347	1573	90.94	291.7	26185	7721	4850	4979	6502	2464

Source：Table 2.6.3.1-RD-2010-00992

P. falciparum タイ分離株に対する各被験薬の EC 値を分離した年別で示す。

また，1996 年に分離された *P. falciparum* を用いて追跡試験を実施した。Artemisinin の EC50，EC90 及び EC99 値はそれぞれ 10.24，60.37 及び 256.4 nM であった。また，Lmf の EC50，EC90 及び EC99 値はそれぞれ 25.91，142.3 及び 570.3 nM であった（Table 2-5，[Table 2.6.3.1-RD-2010-00993]）。

Table 2-5　Artemisinin，Lmf，クロロキン，キニーネ及びメフロキンの *P. falciparum* タイ分離株（1996 年）に対する抗マラリア原虫活性

EC 値（nM）	Artemisinin	Lmf	クロロキン	キニーネ	メフロキン
n	41	40	24	21	24
EC50	10.24	25.91	1350	412.2	568.9
EC90	60.37	142.3	4167	1541	1337
EC99	256.4	570.3	10445	4515	2684

Source：Table 2.6.3.1-RD-2010-00993

2.1.2　Lmf 立体異性体の抗マラリア原虫活性

2.1.2.1　Lmf 立体異性体の抗マラリア原虫活性比較

抗マラリア薬の立体異性体は *in vivo* 及び *in vitro* のいずれにおいても活性の程度が異なる可能性があることが知られている。Lmf には立体異性体が存在することから，本試験では実験室適応株であり，クロロキン及びピリメタミン耐性を示す *P. falciparum* T-996 株（タイ分離株），及びクロロキン耐性・ピリメタミン低感受性を示す LS-21 株（インド分離株）に対する Lmf 立体異性体の抗マラリア原虫活性を評価した。原虫寄生率が 0.4～0.5%，ヘマトクリット値が 5%となるよう調製された BMM をマイクロプレートに播種し，さらに終濃度が 0.001～100.0 nM となるよう（+）及び（−）Lmf を添加した。マイクロプレートを低酸素濃度下，37.5°C で 48 時間培養後，ギムザ法により相対原虫寄生率から EC 値を算出した。Table 2-6 に示すように，T-996 株に対する（+）及び（−）Lmf の EC50 値はそれぞれ 0.8993 及び 1.024 nM，EC90 値はそれぞれ 19.86 及び 18.71 nM，EC99 値はそれぞれ 138.9 及び 131.9 nM であった。また，LS-21 株に対する（+）及

び（−）Lmf の EC50 値はそれぞれ 1.023 及び 0.9130 nM，EC90 値はそれぞれ 39.18 及び 25.38 nM，EC99 値はそれぞれ 453.6 及び 238.4 nM であり，Lmf 立体異性体の抗マラリア原虫活性に差異は認められなかった（Table 2-6，[Table 2.6.3.1-RD-2010-00996]）。

Table 2-6　Lmf 立体異性体の *P. falciparum* T-996 及び LS-21 株に対する抗マラリア原虫活性

EC 値（nM）	T-996		LS-21	
	(+)Lmf	(−)Lmf	(+)Lmf	(−)Lmf
EC50	0.8993	1.024	1.023	0.9130
EC90	19.86	18.71	39.18	25.38
EC99	138.9	131.9	453.6	238.4

Source：[Table 2.6.3.1-RD-2010-00996]
n = 3

2.1.2.2　Lmf 立体異性体及びラセミ体の抗マラリア原虫活性比較

本試験では，タンザニアにおいてマラリアの臨床症状を有し，他のマラリア原虫種との複合感染のない熱帯熱マラリア患者，又は，明らかな症状はないが慢性的にマラリア原虫に感染している，他のマラリア原虫種との複合感染のない熱帯熱マラリア患者より分離した *P. falciparum* に対する Lmf 立体異性体及びラセミ体の抗マラリア原虫活性を評価した。試験方法は 2.1.1.2 項に記載の方法と同様である。ラセミ体及び（+）及び（−）Lmf の EC50 値はそれぞれ 12.44，8.870 及び 9.710 nM，EC90 値はそれぞれ 46.98，42.39 及び 41.12 nM，EC99 値はそれぞれ 138.8，151.8 及び 133.4 nM であり，Lmf 立体異性体及びラセミ体の抗マラリア原虫活性に差異は認められなかった（Table 2-7，[Table 2.6.3.1-RD-2010-00997]）。

Table 2-7　Lmf 立体異性体及びラセミ体の *P. falciparum* タンザニア分離株に対する抗マラリア原虫活性

EC 値（nM）	ラセミ体 Lmf	（+）Lmf	（−）Lmf
EC50	12.44	8.870	9.710
EC90	46.98	42.39	41.12
EC99	138.8	151.8	133.4

Source：[Table 2.6.3.1-RD-2010-00997]
n = 29

2.1.3　Arm 及び Lmf 代謝物の抗マラリア原虫活性

Arm 及び Lmf は経口投与後，それぞれ活性代謝物の DHA 及び Desbutyl-Lmf に変換される（[2.6.4-5.1 項]）ことから，これら代謝物の抗マラリア原虫活性について検討する。

2.1.3.1 DHA

2011 年から 2013 年の間にパプアニューギニアにおいて，他のマラリア原虫種との複合感染のない熱帯熱マラリア患者より *P. falciparum* が寄生した赤血球を分離し，原虫寄生率が 0.5～1%，ヘマトクリット値が 1%となるよう RPMI1640 培地を用いて調製された BMM をマイクロプレートに播種し，種々の濃度の被験薬とともに 48 時間培養した。細胞溶解液及び Sybr green を添加し，暗所にて 15 分間培養後，マイクロプレートリーダーにより測定した蛍光強度を基に IC50 値を算出した。被験薬にはクロロキン，naphthoquine，piperaquine，pyronaridine，Lmf，artesunate，Arm 及び DHA を用いた。Table 2-8 に示すように，Arm 及び DHA の IC50 値はそれぞれ 5.7 及び 5.2 nM であった（Table 2-8，Koleala et al. 2015）。

Table 2-8 Arm，DHA，クロロキン，naphthoquine，piperaquine，pyronaridine，Lmf 及び artesunate の *P. falciparum* パプアニューギニア分離株に対する抗マラリア原虫活性

被験薬	Arm	DHA	クロロキン	Naphthoquine	Piperaquine	Pyronaridine	Lmf	Artesunate
n	48	50	48	47	47	45	44	50
IC50 値（nM）	5.7	5.2	87	4.2	21.0	8.0	1.5	6.1

Source：Koleala et al. 2015

また，大部分がサハラ以南のアフリカからカナダに帰国後にマラリアと診断された患者より *P. falciparum* に寄生した赤血球を分離し，分離直後に試験する場合には原虫寄生率が 0.05～0.2%，ヘマトクリット値が 1.5%，分離した赤血球を保存後に試験する場合には原虫寄生率が 1～1.2%，ヘマトクリット値が 0.5%となるよう RPMI1640 培地を用いて BMM を調製した。BMM をマイクロプレートに播種して種々の濃度の被験薬とともに，37℃ で 72 時間培養し，前者の場合はマイクロプレートを凍結・融解後，HRPII ELISA アッセイにより，後者の場合は Sybr green I により IC50 値を算出した。被験薬には Arm，DHA，artesunate 及び artemisinin を用いた。Arm 及び DHA の IC50 値は，それぞれ，10.3 及び 3.62 nM であった（Table 2-9，Pillai et al. 2012）。

Table 2-9 Arm，DHA，artesunate 及び artemisinin の *P. falciparum* に対する抗マラリア原虫活性

被験薬	Arm	DHA	Artesunate	Artemisinin
IC50 値（nM）	10.3	3.62	5.39	12.3

Source：Pillai et al. 2012
n = 28

2.1.3.2 Desbutyl-Lmf

本試験では，実験室適応株であるクロロキン耐性 *P. falciparum* F-32 株（タンザニア分離株），クロロキン耐性 FCR-3 株（ガンビア分離株）及びクロロキン低感受性 K-1 株（タイ分離株）を用

いて，Lmf 及び Desbutyl-Lmf の抗マラリア原虫活性を比較した。Lmf 及び Desbutyl-Lmf の終濃度は 0.1～300 nM とした。その結果，試験に用いた 3 種のマラリア原虫株に対し，Lmf は近似した EC 値を示した。同様の結果は Desbutyl-Lmf においても認められた。また，EC50，EC90 及び EC99 値のいずれにおいても，Lmf より Desbutyl-Lmf のほうが低値であった（Table 2-10，[Table 2.6.3.1-RD-2010-00986]）。

Table 2-10　*P. falciparum* F-32，FCR-3 及び K-1 株に対する Lmf 及び Desbutyl-Lmf の EC 値

被験薬	EC 値（nM）	F-32	FCR-3	K-1
Lmf	EC50	1.765	1.235	1.675
	EC90	62.55	53.91	41.83
	EC99	1147	1171	576.8
Desbutyl -Lmf	EC50	1.037	0.7064	1.261
	EC90	23.94	13.71	28.55
	EC99	309.5	153.8	363.3

Source：[Table 2.6.3.1-RD-2010-00986]

2.1.4　Arm/Lmf による抗マラリア原虫活性増強作用

本試験ではクロロキン及びピリメタミン耐性 *P. falciparum* T-996 株（タイ分離株），及びクロロキン耐性・ピリメタミン低感受性 LS-21 株（インド分離株）に対する Arm，Lmf 及び Arm/Lmf の抗マラリア原虫活性を 2.1.2.1 項と同様の方法で評価した。Arm 及び Lmf の終濃度は，それぞれ 0.001～1000 及び 0.002～200 nM とし，Arm/Lmf は，両剤とも終濃度が 0.01～100 nM の範囲内で組み合わせて試験した。Arm の T-996 及び LS-21 株に対する EC50 値はそれぞれ 0.2849 及び 0.1762 nM，EC90 値はそれぞれ 35.45 及び 7.112 nM，EC99 値はそれぞれ 1811 及び 145.0 nM であった。また，Lmf の T-996 及び LS-21 株に対する EC50 値はそれぞれ 2.301 及び 1.912 nM，EC90 値はそれぞれ 293.0 及び 95.61 nM，EC99 値はそれぞれ 15249 及び 2321 nM であった。Table 2-11 に示すように，T-996 及び LS-21 株のいずれに対しても広範囲の用量の組み合わせで Arm/Lmf の原虫寄生阻害率は 90%以上を示した。また，単剤での活性から予想される Arm/Lmf の EC 値で実際の試験により得られた EC 値を除すと，Arm と Lmf の配合比が 10：1 から 1：30 の間では，両原虫株に対するすべての値が 1 を下回っており，相加作用を示した（Figure 2-1，[Table 2.6.3.1-RD-2010-00995]）。

Table 2-11 Arm/Lmf の T-996 及び LS-21 株に対する原虫寄生阻害率

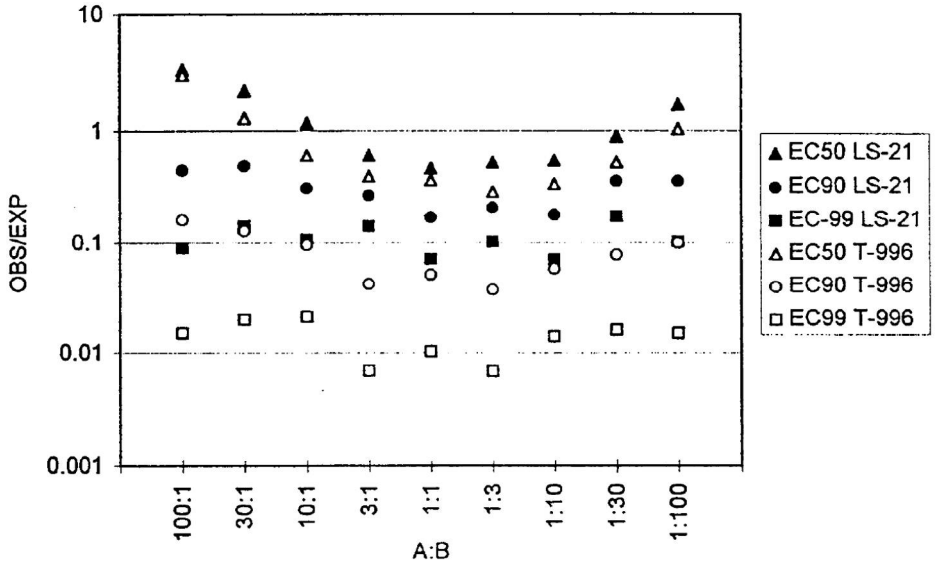
Arm (nM)	原虫寄生阻害率（%）							
	Lmf (nM)							
	0.01	0.03	0.1	0.3	1	10	30	100
T-996 株								
0.01	11.5	14.0	22.5	30.0	39.5	39.0	49.5	93.0
0.03	20.0	26.0	36.5	38.0	47.5	50.0	64.5	97.5
0.1	44.5	45.5	37.5	50.0	65.5	64.0	74.5	100.0
0.3	51.5	55.0	52.0	63.5	77.5	82.0	85.5	100.0
1	62.5	64.0	70.5	79.5	83.5	84.0	90.0	100.0
3	75.5	67.0	79.5	85.0	94.0	92.0	94.0	100.0
10	95.5	97.5	98.5	97.5	100.0	94.5	100.0	100.0
30	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
100	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
LS-21 株								
0.01	9.5	13.5	15.5	29.5	36.0	37.5	63.0	96.0
0.03	25.0	27.0	32.5	39.0	43.0	49.0	79.0	97.0
0.1	37.0	40.0	49.5	44.0	54.5	51.5	86.5	100.0
0.3	41.5	55.5	57.0	57.0	70.5	63.0	84.0	100.0
1	65.5	73.5	67.5	71.5	81.5	79.0	95.0	100.0
3	86.0	89.0	87.0	93.5	90.5	88.5	97.5	100.0
10	95.5	100.0	98.0	95.5	100.0	98.0	100.0	100.0
30	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
100	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0

Source：[Table 2.6.3.1-RD-2010-00995]

顕微鏡下で塗抹標本における *P. falciparum* 寄生及び非寄生赤血球を計数し，薬剤非添加群の原虫寄生率を C，被験薬添加群の原虫寄生率を Z としたとき，被験薬添加群の原虫寄生阻害率 I を以下の式により算出した。

$I = 100 \times (1 - Z / C)$

Figure 2-1　　Arm/Lmf の予想 EC 値と実測値，及び併用濃度比の関係



Source：[Table 2.6.3.1-RD-2010-00995]

A：Arm，B：Lmf

Arm/Lmf の併用濃度比を横軸に，Arm 及び Lmf 単剤での抗マラリア原虫活性から予想される Arm/Lmf の EC 値（EXP）で実際の試験により得られた EC 値（OBS）を除した値を縦軸に示す。

2.1.5　Arm，Lmf 及び Arm/Lmf に対する耐性発現

抗マラリア薬に対する耐性の発現は，現在市販されているほとんどの抗マラリア薬で問題となっていることから（木村 2002），Arm/Lmf に対するマラリア原虫の耐性発現の可能性を検討した。本試験ではクロロキン耐性 *P. falciparum* K1 株（タイ分離株）を Arm，Lmf 及び Arm/Lmf の EC50 値に相当する濃度を含有する培地で培養し，原虫寄生率が 1%となるよう 2～3 日おきに被験薬含有培地で希釈することで薬剤耐性の誘発を試みた。しかし，*P. falciparum* K1 株の Arm，Lmf 及び Arm/Lmf に対する感受性は低下せず，*in vitro* では耐性発現は認められなかった（[Table 2.6.3.1-RD-2010-01004]）。

2.2　*In vivo* 試験

本項では *in vivo* における Arm，Lmf 及び Arm/Lmf による抗マラリア原虫活性及び耐性発現の可能性を検討するため，マラリア感染マウス及びサルモデルを用いて評価した。

2.2.1　Arm，Lmf 及び Arm/Lmf による *in vivo* 抗マラリア原虫活性（マウスでの検討）

Arm，Lmf 及び Arm/Lmf の抗マラリア原虫活性をマラリア感染マウスモデルで評価した。げっ歯類マラリア原虫である *P. berghei* K173 N 株を感染させた赤血球 1×10^7 個/0.2 mL BMM を KM マウスに腹腔内投与し，マラリア感染マウスを作製した。マウスへの *P. berghei* 接種日より被験薬を 1 日 1 回，4 日間連続で経口投与し，4 日目のマウス末梢血を用いてギムザ法により原虫寄生

阻害率を算出した。被験薬は溶媒，Arm，Lmf 及び Arm/Lmf で，Arm は 0.25，0.5，1，2 及び 4 mg/kg，Lmf は 0.1875，0.2，0.375，0.5，0.75，1，1.5 及び 2 mg/kg の用量で投与した。Arm 及び Lmf の試験最高用量における原虫寄生阻害率はそれぞれ 82.1%及び 91.7%であり，マラリア原虫を完全に消失できなかったが，Arm/Lmf の投与により複数の用量及び用量比で 95%以上の阻害が認められた（Table 2-12）。Table 2-13 には Arm 投与量を 1 とし，種々の比率で Lmf を併用した際の ED 値を示す。検討した用量比の範囲内では，ED90 値が最も低値だったのは Arm：Lmf = 1：2 のときであった（Table 2-13，[Table 2.6.3.1-RD-2010-00999]）。

Table 2-12　　Arm，Lmf 及び Arm/Lmf 投与による原虫寄生阻害率

Arm (mg/kg/日)	原虫寄生阻害率（%） Lmf（mg/kg/日） 0.0	0.1875	0.2	0.375	0.5	0.75	1	1.5	2	Lmf ED 値（mg/kg/日） ED50	ED90
0.0	0.0	0.2	0.2	8.9	8.7	15.0	32.5	44.7	91.7	1.269	2.986
0.25	10.0	0.2	48.4	20.2	2.8	24.4	24.6	48.7	99.2	1.238	9.050
0.5	0.2	0.2	13.7	0.2	71.2	13.2	77.4	72.3	99.5	0.730	2.033
1	10.3	5.7	58.3	26.2	24.6	26.0	76.2	97.3	99.9	0.545	2.200
2	48.8	59.6	62.3	82.5	82.5	91.6	98.9	96.8	99.9	0.143	0.614
4	82.1	83.0	94.1	87.8	97.0	92.6	98.9	99.9	100.0	0.028	0.268
Arm ED 値											
ED50	2.101	2.057	0.741	1.255	0.801	0.985	0.383	0.261	NA		
ED90	7.450	4.270	7.400	4.715	3.217	3.823	1.223	0.857	NA		

Source：[Table 2.6.3.1-RD-2010-00999]

NA：該当なし

顕微鏡下で塗抹標本における *P. falciparum* 寄生及び非寄生赤血球を計数し，溶媒投与群及び被験薬投与群の原虫寄生率を算出し，原虫寄生阻害率を以下の式により算出した。

原虫寄生阻害率（%） = 100 × [1 − （被験薬群の原虫寄生率）／（溶媒対照群の原虫寄生率）]

n = 10

Table 2-13　　Arm，Lmf 及び Arm/Lmf（1：0.1875～1：2）投与時における ED 値

	Arm	Lmf	Arm:Lmf 1:0.1875	1:0.375	1:0.75	1:1	1:1.5	1:2
ED50	2.101	1.269	1.963	1.717	2.084	0.656	1.392	1.234
ED90	7.496	2.986	3.437	2.660	3.060	2.483	2.933	1.728

Source：[Table 2.6.3.1-RD-2010-00999]

併用の ED 値は，両剤の総重量で表している。たとえば，1：2 における ED90 値の場合，Arm は 1.728 × 1／(1 +2) = 0.576 mg/kg，Lmf は 1.728 × 2 / (1 + 2) = 1.152 mg/kg，となる。

2.2.2 Arm，Lmf 及び Arm/Lmf による *in vivo* 抗マラリア原虫活性（サルでの検討）

Arm，Lmf 及び Arm/Lmf の抗マラリア原虫活性をマラリア感染サルモデルで評価した。霊長類マラリア原虫である *P. knowlesi* のクロロキン感受性 Nuri 株を感染させた赤血球 5×10^8 個を雌雄アカゲザルの静脈より接種した。原虫寄生率が 3～5%に達した時点で被験薬の投与を開始し，その 12，24 及び 48 時間後（一部の試験群は 24，48 及び 72 時間後）に投与した。投与開始後は血液塗末検査（ギムザ法）を 3 回目の陰性判定となるまでは 12 時間おきに，その後は 15 日目まで 24 時間おき，15 日目以降 105 日目までは 48 時間おきに実施した。被験薬は，Arm 2 mg/kg，Lmf 12 及び 16 mg/kg，Arm/Lmf 2/8 又は 2/12 mg/kg の用量で経口投与した。48 時間後までに 4 回投与した場合，Arm 2 mg/kg 投与した群は単剤及び併用群ともに，約 20 時間で投与開始時の原虫寄生率を 90%低下したが，単剤では完全には消失できず，治癒例もみられなかった。Lmf 12 mg/kg 投与群は Arm 投与群と比べ原虫寄生率の低下が緩徐であり，完全消失には 96.0 時間を要し，1 例ではマラリア原虫の消失 15 日後に再燃が認められた。Lmf 16 mg/kg 投与群では，12 mg/kg 投与群に比べて速やかな原虫寄生率の低下が認められたものの，完全消失には 84.0 時間を要し，3 例中 2 例で再燃が認められた。一方，Arm/Lmf を 48 時間後までに 4 回投与した群では 48.0～56.0 時間でマラリア原虫は完全に消失し，再燃も認められなかった（Table 2-14，[Table 2.6.3.1-RD-2010-01000]）。

Table 2-14　Arm，Lmf 及び Arm/Lmf の抗マラリア原虫活性

被験薬	投与用量（mg/kg）		投与時間	90%低下時間	100%低下時間	治癒	再燃
	Arm	Lmf	（時間）	（時間）	（時間）	（例）	（例）
Arm	2	-	0, 12, 24, 48	20.9 ± 10.1	未達	0	-
Lmf	-	12	0, 12, 24, 48	52.4 ± 18.2	96.0 ± 12.0	2	1
Lmf	-	16	0, 12, 24, 48	23.6 ± 7.4	84.0 ± 12.0	1	2
Arm/Lmf	2	8	0, 12, 24, 48	19.0 ± 1.1	48.0 ± 0.0	3	0
Arm/Lmf	2	8	0, 24, 48, 72	20.0 ± 2.9	72.0 ± 12.0	2	1
Arm/Lmf	2	12	0, 12, 24, 48	20.0 ± 1.9	56.0 ± 13.9	3	0

Source：[Table 2.6.3.1-RD-2010-01000]

被験薬は原虫寄生率が 3～5%に達した時点で投与を開始し（0 時間），その 12，24 及び 48 時間後に経口投与した。Arm/Lmf 2/8 mg/kg 投与群は，0，24，48 及び 72 時間後に経口投与する群も設けた。

90%低下時間：投与開始時の原虫寄生率が 90%低下するまでに要する時間

100%低下時間：マラリア原虫に感染した赤血球が完全に消失するまでに要する時間

n = 3

2.2.3 Arm，Lmf 及び Arm/Lmf に対する *in vivo* 耐性発現検討

Arm，Lmf 及び Arm/Lmf に対するマラリア原虫の耐性発現の可能性を 2%再発法（Peters 1970）と 4 日間連続投与試験を組み合わせた試験により検討した。2%再発法では，被験薬を投与したマウスにマラリア感染赤血球を接種後，原虫寄生率が 2%に達した時点で感染赤血球を同

被験薬を投与した別のマウスに継代し，これを繰り返すことで薬剤への感受性が低下し，原虫寄生率が 2%に達するまでの時間（以下，2%到達時間）が短縮される。この 2%到達時間の短縮が確認された感染赤血球を用いて 4 日間連続投与試験を実施した。

P. berghei NS 株を感染させた赤血球 1×10^7 個を雄性 TFW マウスの静脈より接種した。被験薬は接種 1 時間前に投与し，原虫寄生率が 2%に達した時点で再度被験薬を投与し，その 1 時間後に新たなマウスに継代し，これを繰り返した。血液塗末検査は毎日実施した。被験薬には，溶媒，Arm，Lmf，又は Arm/Lmf（用量比は 1：6）を用いた。2%到達時間の短縮が継続して確認できた時点でのマラリア原虫又はその親株を感染させた赤血球 1×10^7 個を雄性 TFW マウスの静脈より接種し，同様の被験薬を種々の用量で 1 日 1 回，4 日間連続で投与し（4 日間連続投与試験），最終投与翌日の血液を用いて原虫寄生率を決定し，ED50 値を算出した。その結果，Arm に対しては 29 継代目までに 2%到達時間が短縮されたが，親株と 29 継代目を用いた 4 日間連続投与試験における ED50 値はそれぞれ 3.24 及び 2.01 mg/kg であり，耐性は確認できなかった。Arm/Lmf に対しては，2%再発法における 2%到達時間の短縮は一過性には観察されるものの，23 継代目まで継続せず，親株と 18 継代目を用いた 4 日間連続投与試験における ED50 値も両株間で大きな差はなく，耐性は認められなかった。Lmf に対しては 7 継代目までに 2%到達時間が著明に短縮された。親株と耐性株（7 あるいは 18 継代目）を用いた 4 日間連続投与試験において，親株と 7 継代目の ED50 値はそれぞれ 0.05 及び 0.2 mg/kg，親株と 18 継代目の ED50 値はそれぞれ 0.01 及び 0.90 mg/kg であり，親株と比べ耐性株（7 あるいは 18 継代目）の感受性はそれぞれ 1/4 及び 1/90 に低下した（Table 2-15）。さらに，この Lmf 耐性株（18 継代目）とその親株の Arm/Lmf（用量比は 1：6）に対する感受性を評価するために 4 日間連続投与試験を行うと，親株に対する ED50 値は 0.003/0.02 mg/kg であるのに対し，Lmf 耐性株（18 継代目）に対する ED50 値は 0.002/0.01 mg/kg と Arm/Lmf に対する感受性は維持されていた（[Table 2.6.3.1-RD-2010-01004]）。

Table 2-15　Arm，Lmf 及び Arm/Lmf の反復投与及び反復継代後のマラリア原虫株に対する ED50 値

	被験薬	親株の ED50 値（mg/kg/日）	継代後の ED50 値（mg/kg/日）
単剤	Lmf	0.05	0.2（7 継代目）
	Lmf	0.01	0.90（18 継代目）
	Arm	3.24	2.01（29 継代目）
併用	Lmf	0.06	0.02（18 継代目）
	Arm	0.009	0.004

Source：[Table 2.6.3.1-RD-2010-01004]

2%再発法により 2%到達時間が短縮されたマラリア原虫又はその親株を TFW マウスに接種し，4 日間連続投与試験により得た Arm，Lmf 及び Arm/Lmf の ED50 値を示す。

Arm/Lmf は 1：6 の用量比で投与した。

また，これとは別に *P. berghei* K173 N 株を感染させた赤血球 1×10^7 個/0.2 mL BMM を雄性 KM マウスに腹腔内投与し，マラリア感染マウスを作製した。感染 3，4 及び 5 日後に，Arm，Lmf あるいは Arm/Lmf（2：0.75）を 1 日 1 回，経口投与した（10 例/群）。感染 7 日後にマウスから採血し，ギムザ法により最も原虫寄生率が高かったマウスのマラリア感染赤血球を次のマウス 10 例へ継代し，これを反復することで各薬剤への耐性を誘導した。5 継代ごとに 4 日連続投与試験を行い，ED90 値を算出した。その結果，20 継代後の Arm，Lmf 及び Arm/Lmf 群の ED90 値は，初回継代時と比べそれぞれ 6 倍強，200 倍以上及び 2.9 倍に上昇した（[Table 2.6.3.1-RD-2010-00983]）。

2.3 作用機序

Arm 及び Lmf の正確な作用機序は明らかにされていない。現在までに得られている Arm 及び Lmf の抗マラリア原虫作用に関連する薬理学的作用の知見を以下に示す。

2.3.1 Arm の作用機序

マラリア原虫は，赤血球に寄生し，食胞においてヘモグロビンを消化することで繁殖するが，ヘモグロビンの消化産物としてヘムが生成される。一方，Arm は経口投与後，DHA に変換されるが，Arm や DHA はその構造内にエンドペルオキシド架橋を有しており，ヘム鉄と反応してエンドペルオキシド架橋が開裂し，炭素中心ラジカルとなる。このフリーラジカルが赤血球内のマラリア原虫を傷害して死を誘発すると考えられている（Meshnick et al. 1996, Butler et al. 1998）。種々の artemisinin 誘導体のエンドペルオキシド架橋を還元することにより抗マラリア原虫活性が著しく低下，あるいは消失することから，エンドペルオキシド架橋が活性の中心であると考えられる（Avery et al. 1993）。

また，小胞体内カルシウム濃度の調節に関与する SERCA の阻害作用も報告されている。SERCA のオルソログである *PfATP6* を発現させたアフリカツメガエルの卵母細胞を用いた検討において，artemisinin 及び DHA は PfATP6 に対し同レベルの親和性を示した（Ki 値：150 nM）。また，PfATP6 の活性をキニーネ（10 μM）及びクロロキン（1 μM）は阻害しなかったが，artemisinin は 500 nM で約 80%，1 μM で完全に阻害した（Eckstein-Ludwig et al. 2003）。

Arm はマラリア原虫のミトコンドリア機能にも影響すると考えられている。げっ歯類マラリア原虫である *P. berghei* より精製したミトコンドリアを終濃度 100 nM の artemisinin でインキュベート後，ミトコンドリア膜電位プローブであるローダミン 123 を添加してミトコンドリアの膜電位に対する artemisinin の直接的な影響を検討した。その結果，ローダミン 123 の取り込み量は，100 nM の artemisinin によって有意に減少しており，ミトコンドリア膜電位の脱分極が示されている。Artemisinin によるこの作用は活性酸素種捕捉剤の添加により消失し，構造内にエンドペルオキシド架橋を有さない deoxy-artemisinin にはこの作用はみられないことから，artemisinin のエンドペルオキシド架橋から生成される炭素中心ラジカルにより，マラリア原虫においてミトコンドリア膜電位の脱分極が誘導されることが示唆されている（Wang et al. 2010）。また，酵母

Saccharamyces cervisiae（以下，*S. cervisiae*）は，培地中の炭素源を非発酵性にするとその増殖にミトコンドリアの活動が必須となることから，培地中炭素源をグルコースではなくグリセロールとし，artemisinin を添加すると，artemisinin は *S. cervisiae* の増殖を阻害した（IC50 値：約 10 nM）。このとき，artemisinin は酵母ミトコンドリアの電子伝達系酵素により活性化され，フリーラジカルを産生し，ミトコンドリア膜電位の脱分極を誘発して機能を抑制することが示唆されている（Li et al. 2005）。

2.3.2 Lmf の作用機序

Lmf の正確な作用機序は明らかにされていないが，マラリア原虫の食胞におけるヘムの重合に対する阻害作用が主な作用機序として考えられている。2.3.1 項に記載したとおり，マラリア原虫によるヘモグロビンの消化過程においてヘムが生じるが，ヘムは重合体であるヘモゾインへと変換される。Lmf はこの重合を阻害することでマラリア原虫にとって有毒なヘムを蓄積し，抗マラリア原虫活性を発揮すると考えられている（Eastman and Fidock 2009）。クロロキン及び Lmf と構造的に類似するキニーネは，ヘムと結合してヘモゾインへの重合を阻害することが知られており（McChesney and Fitch 1984），Lmf も同様の作用機序を有すると考えられている。

3 副次的薬理試験

3.1 *In vitro* 薬理試験

3.1.1 Arm 及び Lmf の神経伝達物質受容体に対する *in vitro* での結合親和性

Arm 及び Lmf の各種神経伝達物質受容体に対する結合親和性を評価した。各種神経伝達物質の標的受容体，放射性同位体を含有するリガンド及び Arm 及び Lmf を用いて結合アッセイを実施した。Arm 及び Lmf の終濃度は 10 µM とした。その結果，Arm は，アドレナリン α1，セロトニン 3，ヒスタミン H1，アデノシン 1 及び N-メチル-D-アスパラギン酸受容体に対して，それぞれ，11，17，25，14 及び 37%の阻害を示した。また，Lmf は，セロトニン 3，オピオイド µ 及びカイニン酸受容体に対して，それぞれ，20，38 及び 29%の阻害を示した。Arm 及び Lmf は，その他の 12 種類の神経伝達物質受容体に対しては結合しなかった（[Table 2.6.3.1-RD-2010-00985]）。

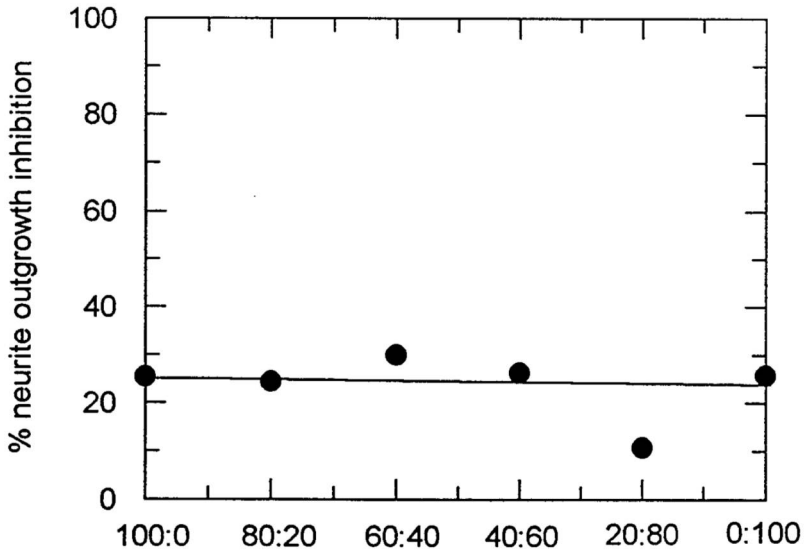
3.1.2 Arm 又は DHA と Lmf の併用による神経細胞への影響

Arm 及び／又は arteether をイヌ及びラットに筋肉内投与することで，用量依存的な運動失調や痙縮が報告されている（Brewer et al. 1994）。そこで，本試験では，マウス神経芽細胞腫 NB2a 細胞の神経突起伸長阻害を神経毒性の指標として，Lmf と併用することで，Arm 又は DHA の神経毒性作用が相乗的に増強されないか検討した。NB2a 細胞を，無血清下，ジブチリルサイクリック AMP（Bt_2cAMP）で処理すると神経細胞の形質が誘導され，神経突起が伸長することが知られている。NB2a 細胞をマイクロプレートに播種し，無血清下，500 µM の Bt_2cAMP 及び種々の濃度の被験薬とともに 24 時間培養後，4%パラホルムアルデヒドで細胞を固定し，クマシーブル

一で染色した。顕微鏡下，無作為に抽出した 50 個の細胞の神経突起数を計測し，平均値を算出した。得られた血清添加群，血清非添加・Bt_2cAMP 添加・被験薬非添加群及び各被験薬群の平均値より神経突起伸長阻害率を算出した。被験薬は，Arm（最高濃度：100 μM）及び Lmf（最高濃度：2 μM），又は DHA（最高濃度：208 nM）及び Lmf（最高濃度 160 nM）の組み合わせで 0：100，20：80，40：60，60：40，80：20 及び 100：0，又は 0：100，20：80，30：70，50：50，70：30，90：10 及び 100：0 の濃度比で併用した。各薬剤の最高濃度は IC20 値から IC75 値の間で設定した。

Figure 3-1 及び 3-2 に Lmf 及び DHA，Figure 3-3 に Lmf 及び Arm の併用での神経突起伸長阻害率を示す。いずれの試験においても，Lmf との併用による Arm 又は DHA の神経毒性の増強を示唆する結果は得られなかった（Figure 3-1，Figure 3-2，Figure 3-3，[Table 2.6.3.1-RD-2010-01003]）。

Figure 3-1　　Lmf 及び DHA の併用による神経突起伸長阻害率（1 回目）

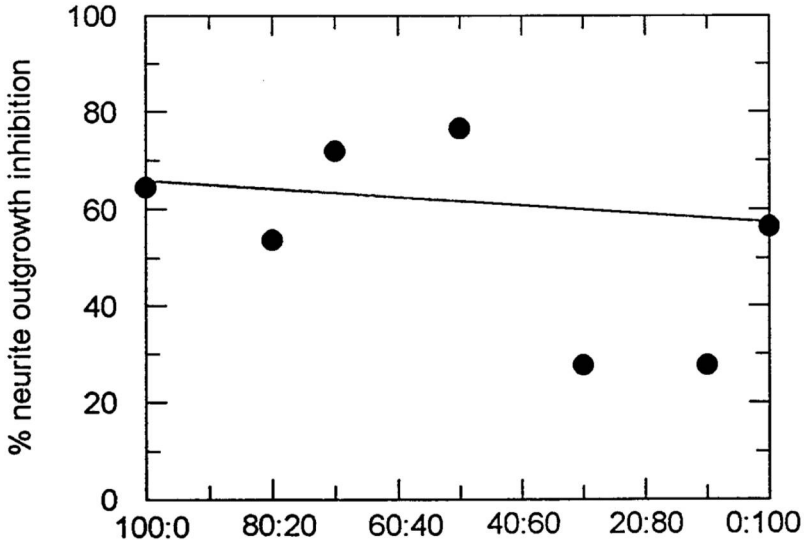


Source：Table 2.6.3.1-RD-2010-01003

横軸は Lmf：DHA の濃度比を示す。

Lmf 及び DHA の最高濃度は，それぞれ 160 及び 208 nM

Figure 3-2　　Lmf 及び DHA の併用による神経突起伸長阻害率（2 回目）

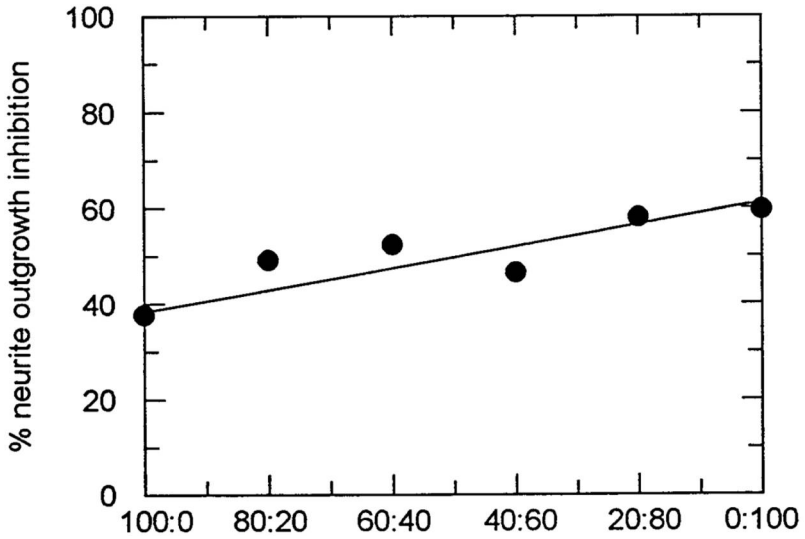


Source：Table 2.6.3.1-RD-2010-01003

横軸は Lmf：DHA の濃度比を示す。

Lmf 及び DHA の最高濃度は，それぞれ 160 及び 208 nM

Figure 3-3　　Lmf 及び Arm の併用による神経突起伸長阻害率



Source：Table 2.6.3.1-RD-2010-01003

横軸は Lmf：Arm の濃度比を示す。

Lmf 及び DHA の最高濃度は，それぞれ 2 及び 100 μM

3.2　　*In vivo* 薬理試験

実施していない。

4 安全性薬理試験

Arm/Lmf の安全性薬理試験として，Arm/Lmf，Arm，DHA，Lmf 及び Desbutyl-Lmf の *in vitro* 電気生理学的試験（hERG 電流，活動電位持続時間），並びにラットを用いた心血管系及び腎臓に関する試験を実施した。なお，中枢神経系及び呼吸系に関する独立した試験は実施していないが，Arm/Lmf の一般毒性試験において呼吸系及び中枢神経系の異常を示唆する一般状態の変化は認められなかったこと，Arm の神経毒性に関する探索的試験において神経系に関する詳細な検討を実施していることから，安全性評価は可能と判断した。

主要な安全性薬理試験は ICH ガイドライン S7A 及び S7B に従い，GLP に準拠して実施した。安全性試験一覧をTable 4-1に示す。

Table 4-1 安全性薬理試験一覧

試験の種類	投与経路	試験系	濃度・用量	試験番号
hERG 電流	*In vitro*	HEK293 細胞	Arm: 10, 31.3 µM	0870568
	In vitro	HEK293 細胞	Arm: 10, 30, 100 µM	0970455
	In vitro	HEK293 細胞	DHA: 30, 112 µM	0870654
	In vitro	HEK293 細胞	DHA: 100, 300 µM	0970456
	In vitro	HEK293 細胞	Lmf: 0.1, 1, 3, 10 µg/mL Desbutyl-Lmf: 0.1, 1, 3, 10 µg/mL Halofantrine: 0.001, 0.01, 0.03, 0.1, 1 µg/mL Chloroquine: 0.005, 0.05, 0.5, 5, 15 µg/mL Mefloquine: 0.05, 0.5, 1, 5 µg/mL	0120007
活動電位 持続時間	*In vitro*	モルモット 摘出乳頭筋	Arm/Lmf: 15.25, 30.5, 305 µg/mL Arm: 0.25, 0.5, 5 µg/mL DHA: 0.25, 0.5, 5 µg/mL Lmf: 15, 30, 300 µg/mL	992004
摘出心房 (拍動数, 収縮力)	*In vitro*	モルモット 摘出心房	Arm/Lmf: 21 µM Arm: 3 µM Lmf: 18 µM	626332
心血管系・ 腎機能	経口	ラット/ Wistar	Arm/Lmf: 3000 mg/kg Arm: 3000 mg/kg Lmf: 3000 mg/kg	626332

Source: Table 2.6.3.4-Study 0120007，Table 2.6.3.4-Study 0870568，Table 2.6.3.4-Study 0870654，Table 2.6.3.4-Study 0970455，Table 2.6.3.4-Study 0970456，Table 2.6.3.4-Study 992004，Table 2.6.3.4-Study 626332

4.1 Arm の hERG 電流に及ぼす作用に関する予備試験

本試験 [Table 2.6.3.4-0870568] は，Arm の hERG 電流に及ぼす作用を評価することを目的として GLP 非適用で実施した。Arm の hERG 電流に及ぼす作用を，hERG 過剰発現させた HEK293 細胞を用いてホールセルパッチクランプ法により評価した。Arm は DMSO に溶解後，細胞外液中最終濃度を 10 及び 31.3 µM に調製した。陰性対照には潅流液を使用し，陽性対照には E-4031（1 µM）を供試した。

試験の結果，いずれの濃度においても Arm の hERG 電流への影響は認められなかったため，IC50 を算出することはできなかった。E-4031 では hERG 電流の阻害が認められた。

4.2 Arm の hERG 電流に及ぼす作用に関する試験

本試験 [Table 2.6.3.4-0970455] は，Arm の hERG 電流に及ぼす作用を評価することを目的として GLP 適用で実施した。Arm の hERG 電流に及ぼす作用を，hERG 過剰発現させた HEK293 細胞を用いてホールセルパッチクランプ法により評価した。Arm は DMSO に溶解後，細胞外液中最終濃度を 10，30 及び 100 µM に調製した。陰性対照には潅流液を使用し，陽性対照には E-4031（0.5 µM）及び terfenadine（60 nM）を供試した。

試験の結果，Arm による hERG 電流の阻害は，10 µM で 4.8 ±0.4%，30 µM で 13.7 ± 0.3%，100 µM で 36.2 ± 0.5%であり，IC50 は 100 µM 超と推定された。

4.3 DHA の hERG 電流に及ぼす作用に関する予備試験

本試験 [Table 2.6.3.4-0870654] は，DHA の hERG 電流に及ぼす作用を評価することを目的として GLP 非適用で実施した。DHA の hERG 電流に及ぼす作用を，hERG 過剰発現した HEK293 細胞を用いてホールセルパッチクランプ法により評価した。DHA は DMSO に溶解後，細胞外液中最終濃度を 30 及び 112 µM に調製した。陰性対照には潅流液を使用し，陽性対照には E-4031（1 µM）を供試した。

試験の結果，いずれの濃度においても DHA の hERG 電流への影響は認められなかったため，IC50 を算出することはできなかった。E-4031 では hERG 電流の阻害が認められた。

4.4 DHA の hERG 電流に及ぼす作用に関する試験

本試験 [Table 2.6.3.4-0970456] は，DHA の hERG 電流に及ぼす作用を評価することを目的として GLP 適用で実施した。DHA の hERG 電流に及ぼす作用を，hERG 過剰発現した HEK293 細胞を用いてホールセルパッチクランプ法により評価した。DHA は DMSO に溶解後，細胞外液中最終濃度を 100 及び 300 µM に調製した。陰性対照には潅流液を使用し，陽性対照には E-4031（0.5 µM）及び terfenadine（60 nM）を供試した。

試験の結果，Arm による hERG 電流の阻害は，100 µM で 10.6 ± 1.0%，300 µM で 27.9 ± 0.4%であり，IC50 は 300 µM 超と推定された。

4.5 Lmf の hERG 電流に及ぼす作用に関する試験

本試験 [Table 2.6.3.4-0120007] は，Lmf の hERG 電流に及ぼす作用を評価することを目的として GLP 適用で実施した。Lmf 及び Desbutyl-Lmf の hERG 電流に及ぼす作用を，hERG 過剰発現した HEK293 細胞を用いてホールセルパッチクランプ法により評価し，他の抗マラリア薬（Halofantrine，chloroquine 及び mefloquine）の作用と比較した。Lmf 及び Desbutyl-Lmf は DMSO に溶解後，細胞外液中最終濃度を 0.1，1，3 及び 10 µg/mL にそれぞれ調製した。陰性対照には潅流液を使用した。

試験の結果，Lmf は 3 µg/mL 以上の濃度で hERG 電流を阻害し，IC25 値は約 1.2 µg/mL，IC50 値は約 4.3 µg/mL であった。最高濃度（10 µg/mL）での最大阻害率は約 65%であったため，IC75 値は算出できなかった。Desbutyl-Lmf も 1 µg/mL 以上の濃度で hERG 電流を阻害し，IC25 値は 0.4 µg/mL，IC50 値は 2.6 µg/mL であった。最高濃度（10 µg/mL）での最大阻害率は約 60%であったため，IC75 値は算出できなかった。

Halofantrine，chloroquine 及び mefloquine でも hERG 電流の阻害がみられ，IC50 値はそれぞれ 0.019，0.8 及び 1.0 µg/mL であった。IC50 値に基づき hERG 電流阻害作用を比較すると，halofantrine > chloroquine > mefloquine > Desbutyl-Lmf > Lmf の順であった。

Table 4-2　　抗マラリア薬の hERG 阻害作用の比較

Agent	IC50 [0120007]	IC50 (µM) [a]	治療用量における血漿中濃度 (µM) [a]	IC50/曝露量比 [a]
Halofantrine	19 ng/mL	0.04	0.57	0.07
Chloroquine	0.8 µg/mL	2.50	0.41	6.1
Mefloquine	1.0 µg/mL	2.64	0.05	53
Lmf	4.3 µg/mL	8.13	0.17	48
Desbutyl-Lmf	2.6 µg/mL	5.49	ND	ND

Source: Table 2.6.3.4-0120007，a: Traebert et al. 2004

ND: 該当なし

4.6　　モルモット摘出乳頭筋の活動電位に及ぼす作用に関する試験

本試験 [Table 2.6.3.4-992004] は，Arm/Lmf のモルモット摘出心室乳頭筋に及ぼす薬理学的作用を評価することを目的として GLP 適用で実施した。雄モルモット心臓右心室から摘出した乳頭筋標本を，35～37ºC の生理食塩液で灌流し，微小電極法により活動電位を測定した。適用濃度は Arm/Lmf では 15.25，30.5 及び 305 µg/mL，Arm では 0.25，0.5 及び 5 µg/mL，DHA では 0.25，0.5 及び 5 µg/mL，並びに Lmf では 15，30 及び 300 µg/mL とした。なお，Lmf の最高濃度では析出が観察された。活動電位パラメータとして，30，60 及び 90%再分極活動電位持続時間（APD30，APD60 及び APD90），活動電位最大立ち上がり速度，活動電位振幅並びに拡張期膜電位を測定した。

試験の結果，Arm/Lmf，DHA 及び Lmf では最高濃度においても活動電位パラメータへの影響は認められなかった。Arm では活動電位最大立ち上がり速度，活動電位振幅並びに拡張期膜電位への影響はみられなかったが，Arm の 5 µg/mL 濃度で溶媒対照と比較して APD の軽度の短縮が認められた。

4.7 モルモット摘出心房に及ぼす作用に関する試験

本試験 [Table 2.6.3.4-626332] は，Arm/Lmf のモルモット摘出心臓に及ぼす作用を評価することを目的として GLP 適用で実施した。添加後の最終濃度が Arm/Lmf 21 μM，Arm 3 μM 及び Lmf 18 μM となるように DMF を用いて調製し，拍動数及び収縮力に及ぼす作用を検討した。

試験の結果，いずれの被験物質においてもモルモット摘出心房の拍動数及び収縮力への影響は認められなかった。

4.8 ラットを用いた心血管系及び腎臓に関する試験

本試験 [Table 2.6.3.4-626332] は，Arm/Lmf のラットの心血管系及び腎機能に及ぼす作用を評価することを目的として GLP 適用で実施した。心血管系への作用に関する試験では，1 群雄 4 例のカテーテル埋植 Wistar 系ラットに，10% Tween 80 加 0.5% Klucel HF 溶液に懸濁した Arm/Lmf，Arm 及び Lmf をそれぞれ 3000 mg/kg の用量で単回経口投与し，投与 8 時間後まで平均動脈血圧，心拍数及び心電図を無麻酔下で測定した。腎機能への作用に関する試験では，1 群雌 6 例の Wistar 系ラットに，10% Tween 80 加 0.5% Klucel HF 溶液に懸濁した Arm/Lmf，Arm 及び Lmf をそれぞれ 3000 mg/kg の用量で単回経口投与した後，代謝ケージにて投与後 0～2 時間及び 2～8 時間の尿を採取し，尿量，並びに尿中ナトリウム，カリウム及びクロライド濃度を測定した。

ラットの心血管系への作用に関する試験では，いずれの投薬群においても平均動脈血圧，心拍数及び心電図への影響は認められなかった。ラットの腎機能への作用に関する試験において，Arm/Lmf 及び Lmf の 3000 mg/kg 群では尿量及び尿中電解質への影響はみられなかったが，Arm の 3000 mg/kg 群では，投与後 2～8 時間の尿量，並びにナトリウム，カリウム及びクロライド排泄量の軽度の増加が認められた。

5 薬力学的薬物相互作用試験

実施していない。

6 考察及び結論

リアメット配合錠は Arm 及び Lmf を 1：6 の配合比で含有しており，マラリア，特に熱帯熱マラリアの治療を目的とした強力な経口抗マラリア薬である。

タンザニア，中国及びタイは，*P. falciparum* への感染頻度が高く，また，クロロキン等の標準的な抗マラリア薬に対する耐性の出現が確認されている地域である。この 3 ヵ国で得られた複数の *P. falciparum* 新鮮分離株を用いて，Arm 及び Lmf に対する感受性を評価することで，リアメット配合剤の有効性を評価した。なお，実験条件によっては Arm や DHA の失活が認められたが，artemisinin の活性は安定しており，予備試験では *P. falciparum* の Arm と artemisinin に対する感受性は相関したことから，Arm ではなく artemisinin で検討した。また，2 種類の *P. falciparum* 実験室適応株に対する Lmf 立体異性体の抗マラリア原虫活性比較試験では，いずれの *P. falciparum* に

対しても活性に差異は認められなかった（2.1.2.1 項）。同様に，*P. falciparum* タンザニア新鮮分離株に対する Lmf 立体異性体及びラセミ体の抗マラリア原虫活性比較試験でも活性に差異は認められなかった（2.1.2.2 項）ことから，他の試験では Lmf はラセミ体を使用した。

Arm は経口投与後，活性代謝物である DHA に変換されることから，Arm 及び DHA の抗マラリア原虫活性について，公表論文を用いて比較した。Arm 及び DHA の IC50 値は，Koleala らの検討ではそれぞれ 5.7 及び 5.2 nM，Pillai らの検討ではそれぞれ 10.3 及び 3.62 nM であった（2.1.3.1 項）。また，Nkhoma らの報告では，それぞれ 10.4 及び 5.8 nM であり（Nkhoma et al. 2009），DHA の抗マラリア原虫活性は Arm と比べ同等かやや高いことが示唆された。Lmf も経口投与後に活性代謝物である Desbutyl-Lmf に変換される。3 種類の *P. falciparum* 実験室適応株に対する Lmf 及び Desbutyl-Lmf の抗マラリア原虫活性比較試験における EC 値は，いずれに対しても Lmf と比較して Desbutyl-Lmf のほうが低値であり（2.1.3.2 項），Desbutyl-Lmf のほうがやや抗マラリア原虫活性が高いと考えられる。

In vivo ではマラリア感染マウス及びサルモデルを用いて Arm，Lmf 及び Arm/Lmf による抗マラリア原虫活性及び耐性発現の可能性を検討した。マラリア感染マウスモデルにおける原虫寄生阻害率は，Arm 及び Lmf 投与によりそれぞれ最大で 82.1%及び 91.7%であったのに対し，Arm/Lmf では 95%以上の阻害が複数用量で認められ，抗マラリア原虫活性は Arm/Lmf のほうが高いことが示された（2.2.1 項）。このことは *in vitro* の検討においても示されている（2.1.4 項）。マラリア感染サルモデルでは，Arm 2 mg/kg 投与群では投与開始 20.9 時間後に原虫寄生率は 90%低下したが，完全消失には至らなかった。また，Lmf 12 mg/kg 投与群では原虫寄生率の 90 及び 100%低下にそれぞれ 52.4 及び 96.0 時間を要し，3 例中 1 例で再燃が認められた。一方，Arm/Lmf 2/8 及び 2/12 mg/kg 投与群では投与開始約 20 時間後に原虫寄生率は 90%低下し，48.0～56.0 時間で完全に消失した。また，再燃も認められなかったことから，単剤による治療と比べ併用のほうがマラリア原虫をより速やかに減少・消失させ，また再燃もきたしにくいことが示唆された（2.2.2 項）。Arm，Lmf 及び Arm/Lmf に対するマラリア原虫の耐性発現の可能性を，マウスを用いた 2 つの試験により検討した。*P. berghei* NS 株を用いて 2%再発法と 4 日間連続投与試験を組み合わせた試験では，Arm 及び Arm/Lmf を投与しても 4 日間連続投与試験における ED50 値の上昇はみられず，耐性は認められなかった。Lmf の ED50 値は 4～90 倍上昇し，比較的容易に耐性が誘導されたが，この Lmf 耐性株又は親株感染マウスに Arm/Lmf を投与するとこれら感染マウスに対する Arm/Lmf の ED50 値は近似しており，Arm/Lmf に対する感受性は維持されていた。また，*P. berghei* K173 N 株を用いた耐性誘導試験において，20 継代後の Arm，Lmf 及び Arm/Lmf 群の ED90 値は，親株と比べそれぞれ 6 倍強，200 倍以上及び 2.9 倍に上昇した。すなわち，感受性低下が最も緩徐だったのは Arm/Lmf であった（2.2.3 項）。これは，速やかにマラリア原虫を減少させる Arm と長時間かけてマラリア原虫を完全に消失させる Lmf を組み合わせたこと（2.2.2 項）に加え，Arm 及び Lmf がそれぞれ異なる作用機序を有する（2.3 項）ことに起因すると考えられる。Arm 及び Lmf への耐性獲得機序に関する報告では，リアメット配合錠の 4 回投与レジメ

ン後に再燃した *P. falciparum* 感染マラリア患者から分離した *P. falciparum* では，哺乳類における P 糖蛋白のオルソログである *Pfmdr1* のコピー数が増加しており，*in vitro* における Lmf の感受性低下との関連性がみられている（Price et al. 2006）。*PfATP6* の A623N 及び S769N 変異，及びコピー数の増加が Arm に対する感受性の低下に関与することが報告されている（Pillai et al. 2012）。最近になって，*K13* 遺伝子（*PfKelch13* 遺伝子）のプロペラドメイン内に C580Y，R539T 又は Y493H 変異を有する *P. falciparum* は，*in vitro* における Arm によるマラリア原虫消失時間が遅延し，中でも C580Y 変異株は最も遅延することが見出された（Ariey et al. 2014, Ashley et al. 2014）。PfKelch13 は *P. falciparum* のホスファチジルイノシトール-3-キナーゼ（PfPI3K）と結合して PfPI3K のユビキチン化を誘導しその分解を促進することが知られているが，*PfKelch13* の C580Y 又は R539T 変異により PfPI3K との結合性が低下し，ユビキチン化による PfPI3K の分解が抑制された結果，ホスファチジルイノシトール 3-リン酸（PIP3）の産生が亢進することが報告された。また，DHA は PfPI3K に結合してそのキナーゼ活性を阻害し，PI3P の産生を強力に阻害すること，*P. falciparum* に PIP3 を導入することで Arm に対する感受性が低下することが報告された（Mbengue et al. 2015）。すなわち，*PfKelch13* の変異と PIP3 を介して Arm 感受性が低下することが示唆されている。以上のように，Arm 及び Lmf に対する複数の異なる耐性獲得機序が報告されているが，*P. falciparum* がリアメット配合錠に対し耐性を獲得するには，これらの変異やコピー数の増加といった複数の機序が同時に発生する必要があることから（Krishna et al. 2006），有効性の増強に加え，耐性獲得の抑制に関しても Arm と Lmf の併用は有益であると考えられる。

副次的薬理試験では，Arm 及び Lmf の神経伝達物質受容体に対する結合親和性を検討したが，終濃度 10 µM において Arm は 5 種類，Lmf は 3 種類の神経伝達物質受容体に対して弱い親和性を示したに過ぎなかった（3.1.1 項）。また，Arm 又は DHA と Lmf の併用によるマウス神経芽細胞腫 NB2a 細胞の神経突起伸長への影響を検討したが，いずれにおいても神経毒性の増強を示唆する結果は得られなかった（3.1.2 項）。

安全性薬理試験では，Lmf 及び Desbutyl-Lmf の hERG 電流の阻害作用がみられ，IC50 値はそれぞれ 8.13 µM 及び 5.49 µM であった。Arm 及び DHA の阻害作用は軽度であり IC50 値はいずれも >100 µM であった。ラットを用いた心血管系に関する試験では心電図に異常はみられなかったが，Arm のイヌを用いた神経毒性に関する探索的試験では，経口投与の 150 mg/kg/日以上の群，筋肉内投与の 40 mg/kg/日以上の群の一部の個体で QTc 間隔の延長が認められた。イヌにおける Arm の曝露量（Cmax）をヒトの曝露量と比較すると，経口投与 600 mg/kg/日群では 1.4～2.2 倍，筋肉内投与 80 mg/kg/日群では 7.9～12.3 倍の差が認められた [2.4-Table 3-2]。これらのことから，本剤の臨床使用における QTc 間隔延長リスクを否定することはできないと考える。

以上のことから，リアメット配合錠が含有する Arm 及び Lmf は併用することでその抗マラリア原虫活性が増強し，また，より速やかに *P. falciparum* を減少・除去させることから，ヒトにおける急性熱帯熱マラリアに伴う症状を速やかに寛解し，完治に導くと期待される。また，併用す

ることで耐性株の発現を抑制することから，再燃を予防する上で両成分を併用することには高い意義があると考えられる。

7 参考文献

[Ariey F, Witkowski B, Amaratunga C, et al. (2014)] A molecular marker of artemisinin resistant *Plasmodium falciparum* malaria. Nature; 505:50-55.

[Ashley EA, Dhorda M, Fairhurst RM, et al. (2014)] Spread of artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* malaria. N Engl J Med; 371:411-23.

[Avery MA, Gao F, Chong WKM, et al. (1993)] Structure-activity relationships of the antimalarial agent artemisinin. 1. Synthesis and comparative molecular field analysis of C-9 analogs of artemisinin and 10-deoxoartemisinin. J Med Chem; 36:4264-75.

[Brewer TG, Grate SJ, Peggins JO, et al. (1994)] Fatal neurotoxicity of arteether and artemether. Am J Trop Med Hyg; 51(3):251-9.

[Butler AR, Gilbert BC, Hulme P, et al. (1998)] EPR evidence for the involvement of free radicals in the iron-catalysed decomposition of Qinghaosu (Artemisinin) and some derivatives; Antimalarial action of some polycyclic endoperoxides. Free Rad Res; 28:471-6.

[Eastman RT and Fidock DA (2009)] Artemisinin-based combination therapies: a vital tool in efforts to eliminate malaria. Nat Rev Microbiol; 7:864-74.

[Eckstein-Ludwig U, Webb RJ, van Goethem IDA, et al. (2003)] Artemisinins target the SERCA of Plasmodium falciparum. Nature; 424:957-61.

[Koleala T, Karl S, Laman M, et al. (2015)] Temporal changes in *Plasmodium falciparum* anti-malarial drug sensitivity *in vitro* and resistance-associated genetic mutations in isolates from Papua New Guinea. Malar J; 14:37.

[Krishna S, Woodrow CJ, Staines HM, et al. (2006)] Re-evaluation of how artemisinins work in light of emerging evidence of *in vitro* resistance. Trends Mol Med; 12:200-5.

[Li W, Mo W, Shen D, et al. (2005)] Yeast model uncovers dual roles of mitochondria in the action of artemisinin. PLoS Genet; 1(3):0329-34.

[Mbengue A, Bhattacharjee S, Pandharkar T, et al. (2015)] A molecular mechanism of artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* malaria. Nature; 520:683-7.

[McChesney EW and Fitch CD (1984)] 4-Aminoquinolines. In: Peters W, Richards WHG, (eds). Handbook of Experimental Pharmacology. Antimalarial drugs II.;Berlin Heidelberg New York Tokyo:Springer-Verlag, p. 3-61.

[Meshnick SR, Taylor TE, Kamchonwongpaisan S (1996)] Artemisinin and the antimalarial endoperoxides: from herbal remedy to targeted chemotherapy. Microbiol Rev; 60(2):301-15.

[Nkhoma S, Nair S, Mukaka M, et al. (2009)] Parasites bearing a single copy of the multi-drug resistance gene (*pfmdr-1*) with wild-type SNPs predominate amongst *Plasmodium falciparum* isolates from Malawi. Acta Trop; 111(1):78–81.

[Peters W (1970)] The chemotherapy of rodent malaria, X. Dynamics of drug resistance, part 2: Acquisition and loss of chloroquine resistance in *Plasmodium berghei* observed by continuous bioassay. Ann Trop Med Parasitol; 64(1):25-40.

[Pillai DR, Lau R, Khairnar K, et al. (2012)] Artemether resistance *in vitro* is linked to mutations in PfATP6 that also interact with mutations in PfMDR1 in travellers returning with *Plasmodium falciparum* infections. Malar J; 11:131.

[Price RN, Uhlemann AC, van Nugt M, et al. (2006)] Molecular and pharmalogical determinants of the therapeutic response to artemether-lumefantrine in multidrug-resistant Plasmodium falciparum malaria. Clin Inf Dis; 42(11):1570-7.

[Traebert M, Dumotier B, Meister L, et al. (2004] Inhibition of hERG K+ currents by antimalarial drugs in stably transfected HEK293 cells. Eur J Pharmacol; 484(1):41-8.

[Vinetz JM, Clain J, Bounkeua V, et al. (2013)] 第 49 章 マラリアの化学療法 グッドマン・ギルマン薬理書（下）薬物治療の基礎と臨床; 第 12 版 東京:廣川書店 p1773-818.

[Wang J, Huang L, Li J, et al. (2010)] Artemisinin directly targets malarial mitochondria through its specific mitochondrial activation. PLoS One; 5(3):e9582.

[木村幹夫 (2002)] マラリアにおける診断と治療の現況. 感染症誌; 76(8):585-93.

2.6.3 薬理試験概要表

目　次

目　次 2
略号一覧 3
2.6.3.1　薬理試験一覧表 4
2.6.3.2　薬効を裏付ける試験 7
2.6.3.3　副次的薬理試験 7
2.6.3.4　安全性薬理試験 8

略号一覧

略号	省略していない表現（英）	省略していない表現（日）
DHA	dihydroartemisinin	-

2.6.3.1 薬理試験一覧表

Type of study	Test system or protocol	Method of administration	Testing facility	Report / Study number	Location in CTD
Primary pharmacodynamics					
Antimalarial activity against *P. falciparum in vitro*					
Correlation between the antimalarial activities of artemether, artemisinin and DHA against *P. falciparum*	Fresh natural isolates from Thailand; counting Giemsa-stained blood films	*In vitro*	[redacted] (Austria)	[RD-2010-01001]	4.2.1.1-1 参考資料
Antimalarial activity of artemisinin and lumefantrine against *P. falciparum*, longitudinal study	Fresh natural isolates from Tanzania; counting Giemsa-stained blood films	*In vitro*	[redacted] (Tanzania)	[RD-2010-00990]	4.2.1.1-2 参考資料
Antimalarial activity of artemisinin and lumefantrine against *P. falciparum*, longitudinal study	Fresh natural isolates from Tanzania; counting Giemsa-stained blood films	*In vitro*	[redacted] (Tanzania)	[RD-2010-00991]	4.2.1.1-3 参考資料
Antimalarial activity of artemisinin and lumefantrine against *P. falciparum*	Fresh natural isolates from China; counting Giemsa-stained blood films	*In vitro*	[redacted] (China)	[RD-2010-00987]	4.2.1.1-4 参考資料
Antimalarial activity of artemisinin and lumefantrine against *P. falciparum*, longitudinal study	Fresh natural isolates from Thailand; counting Giemsa-stained blood films	*In vitro*	[redacted] (Thailand)	[RD-2010-00992]	4.2.1.1-5 参考資料
Antimalarial activity of artemether and lumefantrine against *P. falciparum*, follow-up study	Fresh natural isolates from Thailand; counting Giemsa-stained blood films	*In vitro*	[redacted] (Thailand)	[RD-2010-00993]	4.2.1.1-6 参考資料
Antimalarial activity of + and − lumefantrine against *P. falciparum*	T-996 and LS-21 strains (isolates originating in Thailand and India, respectively); counting Giemsa-stained blood films	*In vitro*	[redacted] (Sweden)	[RD-2010-00996]	4.2.1.1-7 参考資料

Type of study	Test system or protocol	Method of administration	Testing facility	Report / Study number	Location in CTD
Antimalarial activity of + and − lumefantrine and racemate against *P. falciparum*	Fresh natural isolates from Tanzania; counting Giemsa-stained blood films	*In vitro*	[redacted] (Tanzania)	[RD-2010-00997]	4.2.1.1-8 参考資料
Antimalarial activity of lumefantrine and desbutyl-lumefantrine against *P. falciparum*	F-32, FCR-3 and K-1 strains (isolates originating in Tanzania, Gambia and Thailand, respectively); counting Giemsa-stained blood films	*In vitro*	[redacted] (Sweden)	[RD-2010-00986]	4.2.1.1-9 参考資料
Antimalarial activity of artemether and lumefantrine alone and in combination against *P. falciparum*	T-996 and LS-21 strains (isolates originating in Thailand and India, respectively); counting Giemsa-stained blood films	*In vitro*	[redacted] (Sweden)	[RD-2010-00995]	4.2.1.1-10 参考資料
Induction of resistance to artemether and lumefantrine alone and in combination against *P. falciparum*	K1 strains (isolates originating in Thailand); counting Giemsa-stained blood films	*In vitro*	[redacted] (UK)	[RD-2010-01004]	4.2.1.1-11 参考資料
In vivo pharmacology					
Antimalarial activity of artemether and lumefantrine alone and in combination against *P. berghei* infection in mice	Swiss albino KM mice (18-22 g body weight) injected with *P. berghei*; counting Giemsa-stained blood films	Oral	[redacted] (China)	[RD-2010-00999]	4.2.1.1-12 参考資料
Antimalarial activity of artemether and lumefantrine alone and in combination against *P. knowlesi* infection in rhesus monkeys	Young female and male rhesus monkeys (2-3 kg body weight) infected with *P. knowlesi*; counting Giemsa-stained blood films	Oral	[redacted] (China)	[RD-2010-01000]	4.2.1.1-13 参考資料
Induction of resistance to artemether and lumefantrine alone and in combination *in vivo* using *P. berghei* infection in mice	Male TFW mice inoculated with *P. berghei*; 2% relapse technique for resistance induction and 4-day test	Oral	[redacted] (UK)	[RD-2010-01004]	4.2.1.1-11 参考資料
Induction of resistance to artemether and lumefantrine alone and in combination *in vivo* using *P. berghei* infection in mice	Male hybrid KM mice (18-22 g body weight) infected with *P. berghei*; 2% relapse technique for resistance induction and 4-day test	Oral	[redacted] (China)	[RD-2010-00983]	4.2.1.1-14 参考資料
Mechanism of action	Not applicable				

Type of study	Test system or protocol	Method of administration	Testing facility	Report / Study number	Location in CTD
Secondary pharmacodynamics					
In vitro pharmacology					
Interactions of artemether and lumefantrine at neurotransmitter receptors	Receptor binding assays using radiolabeled ligands selective for the corresponding receptor types	*In vitro*	Novartis	[RD-2010-00985]	4.2.1.2-1 参考資料
Assessment of neurotoxic potential of lumefantrine and artemether or lumefantrine and DHA	Inhibition of neurite outgrowth in the mouse neuroblastoma NB2a cell line	*In vitro*	[redacted] (UK)	[RD-2010-01003]	4.2.1.2-2 参考資料
In vivo pharmacology	Not applicable				
Safety pharmacology	See section 2.6.3.4				
Pharmacodynamic drug interactions	Not applicable				

薬効を裏付ける試験及び副次的薬理試験はすべて参考資料とする。

2.6.3.2　薬効を裏付ける試験

2.6.3.1 に記載

2.6.3.3　副次的薬理試験

2.6.3.1 に記載

2.6.3.4 安全性薬理試験

Organ systems evaluated	Species/ strain	Method of admin.	Concentrations or Doses (mg/kg) [a]	Gender and no. per group	Significant findings	Study / Report number	Location in CTD
In vitro							
hERG currents	Human culture / HEK293 cells	*In vitro*	Artemether 10, 31.3 µM	4 cells per dose	Artemether did not inhibit hERG channel activity at 10 and 31.3 µM	[0870568]	4.2.1.3-1
hERG currents [b]	Human culture / HEK293 cells	*In vitro*	Artemether 10, 30, 100 µM	3 cells per dose	Inhibition of hERG current by 4.8% at 10 µM, 13.7% at 30 µM, and 36.2% at 100 µM; IC50 > 100 µM	[0970455]	4.2.1.3-2
hERG currents	Human culture / HEK293 cells	*In vitro*	Dihydroartemisinin 30 and 112 µM	4 cells per dose	Dihydroartemisinin did not decrease significantly hERG cannel activity at 30 and 112 µM.	[0870654]	4.2.1.3-3
hERG currents [b]	Human culture / HEK293 cells	*In vitro*	Dihydroartemisinin 100, 300 µM	3 cells per dose	Inhibition of hERG current by 10.6% at 100 µM, and 27.9% at 300 µM; IC50 > 300 µM	[0970456]	4.2.1.3-4

Organ systems evaluated	Species/ strain	Method of admin.	Concentrations or Doses (mg/kg) [a]	Gender and no. per group	Significant findings	Study / Report number	Location in CTD
hERG currents [b]	Human culture / HEK293 cells	*In vitro*	Lumefantrine 0.1, 1, 3, 10 µg/mL Desbutyl-lumefantrine 0.1, 1, 3, 10 µg/mL Halofantrine 0.001, 0.01, 0.03, 0.1, 1 µg/mL Mefloquine 0.05, 0.5, 1, 5 µg/mL Chloroquine 0.005, 0.05, 0.5, 5, 15 µg/mL DMSO 1% (control)	2 to 6 cells per dose	Lumefantrine inhibited hERG tail current, with significant inhibition at concentrations ≥3 µg/mL ($p< 0.01$). IC25 = 1.2 µg/mL, IC50 = 4.3 µg/mL. IC75 could not be estimated as the maximum inhibition was approximately 65% at the highest test concentration. Desbutyl-lumefantrine inhibited hERG tail current, with significant inhibition at concentrations ≥1 µg/mL ($p< 0.01$). IC25 = 0.4 µg/mL, IC50 = 2.6 µg/mL. IC75 could not be estimated as the maximum inhibition was approximately 60% at the highest test concentration. Halofantrine inhibited hERG tail current, with significant inhibition at concentrations ≥0.03 µg/mL ($p < 0.01$). IC25 = 6.9 ng/mL, IC50 = 19 ng/mL. IC75 =59 ng/mL. Mefloquine inhibited hERG tail current, with significant inhibition at concentrations ≥0.5 µg/mL ($p < 0.01$). IC25 = 0.4 µg/mL, IC50 = 1.0 µg/mL. IC75 =2.8 µg/mL. Chloroquine inhibited hERG tail current, with significant inhibition at concentrations ≥0.5 µg/mL ($p < 0.01$). IC25 = 0.3 µg/mL, IC50 = 0.8 µg/mL. IC75 =2.6 µg/mL.	[0120007]	4.2.1.3-5

Organ systems evaluated	Species/ strain	Method of admin.	Concentrations or Doses (mg/kg) [a]	Gender and no. per group	Significant findings	Study / Report number	Location in CTD
Cardiac action potential parameters in guinea pig isolated papillary muscle [b]	Right ventricular papillary muscles isolated from male Dunkin-Hartley Guinea pig	*In vitro*	Co-artemether 15.25, 30.5, 305 µg/mL Artemether 250, 500, 5000 ng/mL Lumefantrine 15, 30, 300 µg/mL Sch-3045 (DHA) 250, 500, 5000 ng/mL	M: 4 muscles per group	Co-artemether has no effect except a small (~10%) reduction in 30.5 µg/mL APD60 and 90 values. No differences were observed at the higher concentration. Artemether had no effect except a small difference in APD values at 5000 ng/mL, this 10% difference was not statistically significant. Lumefantrine showed no effect, however precipitation occurred at the highest test concentration. Dihydroartemisinin had no effect on any measured parameter.	[992004]	4.2.1.3-6
In vivo & In vitro							
Cardio-vascular and renal [b]	Rat/Han Wistar	Oral (gavage)	Co-artemether 3000 mg/kg Artemether 3000 mg/kg Lumefantrine (benflumetol) 3000 mg/kg	M: 4 per group for CV effects F: 6 per group for renal effects	Mean arterial blood pressure, heart rate, and ECG showed no effect within 8 h postdose for any test compound. Artemether slightly increased urine volume and sodium, potassium and chloride excretion between 2 and 8 h postdose. Co-artemether and lumefantrine had no significant effects on renal function.	[626332]	4.2.1.3-7
	Left and right atrium isolated from GOHI Albino Guinea pig	*In vitro*	Co-artemether 21 µM Artemether 3 µM Lumefantrine (benflumetol) 18 µM	M: 4 paired atria per group	None of the three test articles were found to affect the force of the contraction or the heart rate of isolated guinea-pig atria at the concentrations applied.		

M = male; F = female; HEK293 cells = human embryonic kidney cell; IC25/50/75 = inhibitory concentration 25%/50%/75%; APD30/60/90 = action potential duration at 30%/60%/90% repolarization

a = single dose; b = GLP compliant