ゾフルーザ錠 10mg，同 20mg

第 2 部 (モジュール 2) : CTD の概要 (サマリー)

2.4 非臨床試験の概括評価

塩野義製薬株式会社

目次

略号及び用語定義一覧表 4
2.4 非臨床試験の概括評価 7
2.4.1 非臨床試験計画概略 7
2.4.2 薬理試験 8
2.4.2.1 効力を裏付ける試験 8
2.4.2.1.1 キャップ依存性エンドヌクレアーゼに対する *in vitro* 阻害効果 8
2.4.2.1.2 季節性インフルエンザウイルスに対する *in vitro* 増殖抑制効果 9
2.4.2.1.3 *In vitro* における S-033447 耐性季節性インフルエンザウイルスの分離とその特性評価 10
2.4.2.1.4 季節性以外のインフルエンザウイルスに対する *in vitro* 増殖抑制効果 11
2.4.2.1.5 季節性インフルエンザウイルスに対する *in vivo* 増殖抑制効果 12
2.4.2.1.6 季節性インフルエンザウイルスに対する *in vivo* 治療効果 13
2.4.2.1.7 免疫抑制マウスモデルにおける *in vivo* 治療効果 15
2.4.2.1.8 季節性以外のインフルエンザウイルスに対する *in vivo* 治療効果 15
2.4.2.2 副次的薬理試験 16
2.4.2.3 安全性薬理試験 17
2.4.2.3.1 中枢神経系に対する作用 17
2.4.2.3.2 心血管系に対する作用 17
2.4.2.3.3 呼吸系に対する作用 18
2.4.3 薬物動態試験 18
2.4.3.1 吸収 18
2.4.3.1.1 単回投与 18
2.4.3.1.2 反復投与 20
2.4.3.2 分布 22
2.4.3.3 代謝 23
2.4.3.3.1 *In vitro* 試験 23
2.4.3.3.2 *In vivo* 代謝試験 24
2.4.3.3.3 責任代謝酵素の同定 25
2.4.3.3.4 推定代謝経路 25
2.4.3.4 排泄 26
2.4.3.5 薬物動態学的相互作用 27
2.4.3.6 その他の薬物動態試験 28
2.4.4 毒性試験 28
2.4.4.1 単回投与毒性試験 28
2.4.4.2 反復投与毒性試験 29
2.4.4.3 遺伝毒性試験 30
2.4.4.4 がん原性試験 30

2.4.4.5 生殖発生毒性試験 30
2.4.4.6 局所刺激性試験 32
2.4.4.7 その他の毒性試験 32
2.4.5 総括及び結論 33
2.4.5.1 薬理試験 33
2.4.5.1.1 発見の経緯と作用機序 33
2.4.5.1.2 *In vitro* 活性 34
2.4.5.1.3 *In vivo* 活性 35
2.4.5.1.4 NA 阻害薬耐性を示すインフルエンザウイルスに対する効果 36
2.4.5.1.5 臨床で有効性が期待できる血漿中濃度 36
2.4.5.1.6 ハイリスク患者に対する治療効果 37
2.4.5.1.7 治療開始が遅れた患者や重篤な症状を示す患者に対する治療効果 37
2.4.5.1.8 季節性以外のインフルエンザウイルスに対する効果 38
2.4.5.1.9 S-033447 に対する感受性低下の機序 38
2.4.5.1.10 安全性薬理試験 39
2.4.5.2 薬物動態試験 40
2.4.5.2.1 S-033188 の体内動態について 40
2.4.5.2.2 S-033188 の食事の影響について 42
2.4.5.2.3 薬物代謝酵素を介した相互作用について 42
2.4.5.2.4 トランスポーターを介した相互作用について 44
2.4.5.2.5 幼若ラットにおける S-033188 体内動態の日齢変動について 46
2.4.5.3 毒性試験 47
2.4.5.3.1 S-033188 の毒性評価について 47
2.4.5.3.2 肝・胆道系への影響について 50
2.4.5.3.3 過量投与時の急性有害事象発生リスクについて 51
2.4.5.3.4 生殖発生毒性試験 51
2.4.5.3.5 小児への投与について 52
2.4.5.3.6 皮膚光毒性試験 53
2.4.5.3.7 結論 53
2.4.6 参考文献一覧 53

略号及び用語定義一覧表

略号	英語	日本語
AADAC	arylacetamide deacetylase	アリルアセタミドデアセチラーゼ
ALP	alkaline phosphatase	アルカリホスファターゼ
ALT	alanine aminotransferase	アラニンアミノトランスフェラーゼ
$APD_{30\,(90)}$	action potential duration at 30% (90%) repolarization	30% (90%) 再分極時の活動電位持続時間
$APD_{30\text{-}90}$	a difference between APD_{90} and APD_{30}	90%再分極時と 30%再分極時の活動電位持続時間の差
APTT	activated partial thromboplastin time	活性化部分トロンボプラスチン時間
AST	aspartate aminotransferase	アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ
$AUC_{0\text{-}inf}$	area under the plasma concentration-time curve from time 0 to infinity	時間0から無限大時間までの血漿中濃度－時間曲線下面積
$AUC_{0\text{-}24hr}$	area under the plasma concentration-time curve from time 0 to 24 hours post-dose	時間0から24時間までの血漿中濃度-時間曲線下面積
BA	bioavailability	バイオアベイラビリティ
BCRP	breast cancer resistance protein	
BID	twice daily	1日2回
BLQ	below the lower limit of quantification	定量下限未満
BSEP	bile salt export pump	胆汁酸排出トランスポーター
CC_{50}	50% cytotoxicity concentration	生細胞数を50%低下させる濃度
CEN	cap-dependent endonuclease	キャップ依存性エンドヌクレアーゼ
CL_{tot}	total clearance	全身クリアランス
C_{max}	maximum plasma concentration	最高血漿中濃度
cRNA	complementary RNA	相補的RNA
C_{τ}	plasma concentration at the end of dosing interval after the first dose	初回投与時の投与間隔時間後における血漿中濃度
CYP	cytochrome P450	チトクローム P450
D.Bil	direct bilirubin	直接ビリルビン
$EC_{50\,(90)}$	50% (90%) effective concentration	50 (90) %有効濃度
FBS	fetal bovine serum	ウシ胎児血清
FOB	functional observation battery	機能観察総合評価
GGT	gamma-glutamyl transferase	γ-グルタミルトランスフェラーゼ
GLDH	glutamate dehydrogenase	グルタミン酸脱水素酵素

GLP	Good Laboratory Practice	
hERG	human ether-a-go-go related gene	ether-a-go-go 関連遺伝子
HPLC	high-performance liquid chromatography	高速液体クロマトグラフィー
IC_{50}	50% inhibitory concentration	50%阻害濃度
LAP	leucyl aminopeptidase	ロイシンアミノペプチターゼ
MATE	multidrug and toxin extrusion	
NA	neuraminidase	ノイラミニダーゼ
NA/H274Y	histidine-to-tyrosine substitution at amino acid position 274 in neuraminidase	NA の 274 番目のアミノ酸のヒスチジンからチロシンへの置換
OAT	organic anion transporter	有機アニオントランスポーター
OATP	organic anion transporting polypeptide	有機アニオントランスポーターポリペプチド
OCT	organic cation transporter	有機カチオントランスポーター
PA	polymerase acidic protein	ポリメラーゼ酸性タンパク質
PA/I38T	isoleucine-to-threonine substitution at amino acid position 38 in polymerase acidic protein	PA の 38 番目のアミノ酸のイソロイシンからスレオニンへの置換
P_{app}	permeability coefficient	みかけの膜透過係数
PB	polymerase basic protein	ポリメラーゼ塩基性タンパク質
P-gp	P-glycoprotein	P-糖タンパク質
PK	pharmacokinetic(s)	薬物動態
PT	prothrombin time	プロトロンビン時間
QD	once daily	1 日 1 回
QWBA	quantitative whole-body. autoradiography	定量的全身オートラジオグラフィ
RdRp	RNA-dependent RNA polymerase	RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ
RNP	ribonucleoprotein	リボ核タンパク質
S9	supernatant at 9000×g	9000 *g* 上清
S9 mix	metabolic activation system	代謝活性化系
SI	selectivity index	ウイルス増殖に起因した細胞変性の抑制効果に対する細胞傷害作用の比
$t_{1/2,z}$	terminal elimination half-life	終末相消失半減期
T3/T4	triiodothyronine/thyroxine	甲状腺ホルモン（トリヨードサイロニン/サイロキシン）
TBA	total bile acid	総胆汁酸
T.Bil	total bilirubin	総ビリルビン
$TCID_{50}$	50% tissue culture infectious dose	50%組織培養感染量
T.Cho	total cholesterol	総コレステロール濃度

TK	toxicokinetics	トキシコキネティクス
T_{max}	time to maximum concentration	最高濃度到達時間
UGT	uridine diphosphate glucuronosyltransferase	UDP-グルクロン酸転移酵素
Vd_{ss}	volume of distribution at steady state	定常状態における分布容積
vRNA	virus genome RNA	ウイルスゲノム RNA
WHO	world health organization	世界保健機関

2.4 非臨床試験の概括評価

2.4.1 非臨床試験計画概略

インフルエンザウイルスにはA型，B型及びC型があり，A型はさらに亜型に分類される．ヒトに対して冬季に流行するインフルエンザウイルスはA型H1N1亜型，A型H3N2亜型及びB型であり，これらは季節性インフルエンザウイルスと呼ばれる．季節性インフルエンザウイルスの粒子内では，3つのタンパク質サブユニット［ポリメラーゼ酸性タンパク質（PA），ポリメラーゼ塩基性タンパク質（PB）1及びPB2］からなるRNAポリメラーゼがウイルスRNA（vRNA）の末端に結合し，リボ核タンパク質（RNP）複合体を形成している（図 2.4.1-1）[1]．インフルエンザウイルスの宿主細胞への感染によりRNP複合体は宿主細胞の核内へ移行し，ウイルス遺伝子の転写及び複製を行う．転写反応は，まず，PB2が宿主細胞由来mRNA前駆体のキャップ構造を認識する．引き続いてPAが有するキャップ依存性エンドヌクレアーゼ［cap-dependent endonuclease（CEN）］活性によって，このキャップ構造から10数塩基下流の塩基鎖が切断される．このキャップ構造を含むRNA断片をプライマーとして，PB1が有するRNA依存性RNAポリメラーゼ（RdRp）活性によりvRNAを鋳型としたウイルスmRNAが合成される．こうして転写されたウイルスmRNAがタンパク質に翻訳されることで，子孫ウイルスの複製に必要なタンパク質が産生される．一方，ゲノム複製反応では，RdRp活性により，vRNAから完全長相補鎖の相補的RNA（cRNA）が合成され，このcRNAを鋳型に子孫vRNAが産生される．このゲノム複製反応は，転写反応のようにプライマーを必要とせず，先に産生されたウイルスタンパク質を利用しながら進行する［1］．こうして，宿主細胞内で産生された子孫ウイルス粒子は，ノイラミニダーゼ（NA）によって宿主細胞表面から放出される．既存薬であるオセルタミビルなどのNA阻害剤はNA活性を阻害し［2］，ファビピラビルはRdRp活性を阻害することでインフルエンザウイルスの増殖を抑制することが知られている［3］．

S-033188は，インフルエンザウイルスの増殖を抑制する化合物である．本化合物はプロドラッグであり，代謝（加水分解）により生成した活性体（S-033447）がインフルエンザウイルス特有の酵素であるCENに作用し，インフルエンザウイルス遺伝子の転写反応を阻害することで，インフルエンザウイルスの増殖を抑制する．

効力を裏付ける試験は，20[redacted]年[redacted]月から20[redacted]年[redacted]月まで実施した．薬効薬理試験では，世界中の研究機関で標準的に使用されており株化培養細胞やマウスなどの実験動物において効率よく増殖し，病原性を示すことが知られているインフルエンザウイルスの実験室株及びヒト患者から分離された臨床分離株を使用した．S-033188は，体内で速やかにS-033447に加水分解されるため，*in vitro*試験ではS-033447を使用し，標的酵素に対する阻害効果やインフルエンザウイルスの増殖に対する抑制効果を評価した．*In vivo*試験ではS-033188をモデル動物に経口投与することにより，動物内で増殖するウイルスの力価を低下させる作用，致死率改善効果，生存期間延長効果，体重減少抑制効果又は体温上昇の抑制効果を評価した．

副次的薬理試験は，20[redacted]年[redacted]月から20[redacted]年[redacted]月まで実施した．S-033447のインフルエンザウイルス増殖抑制効果を示す濃度と細胞毒性を示す濃度との乖離，異なるヒト組織に由来する株化細胞への細胞傷害作用，ミトコンドリアへの選択的な障害誘発能並びに各種受容体，イオンチャネル及びトランスポーターに対する阻害作用について検討した．

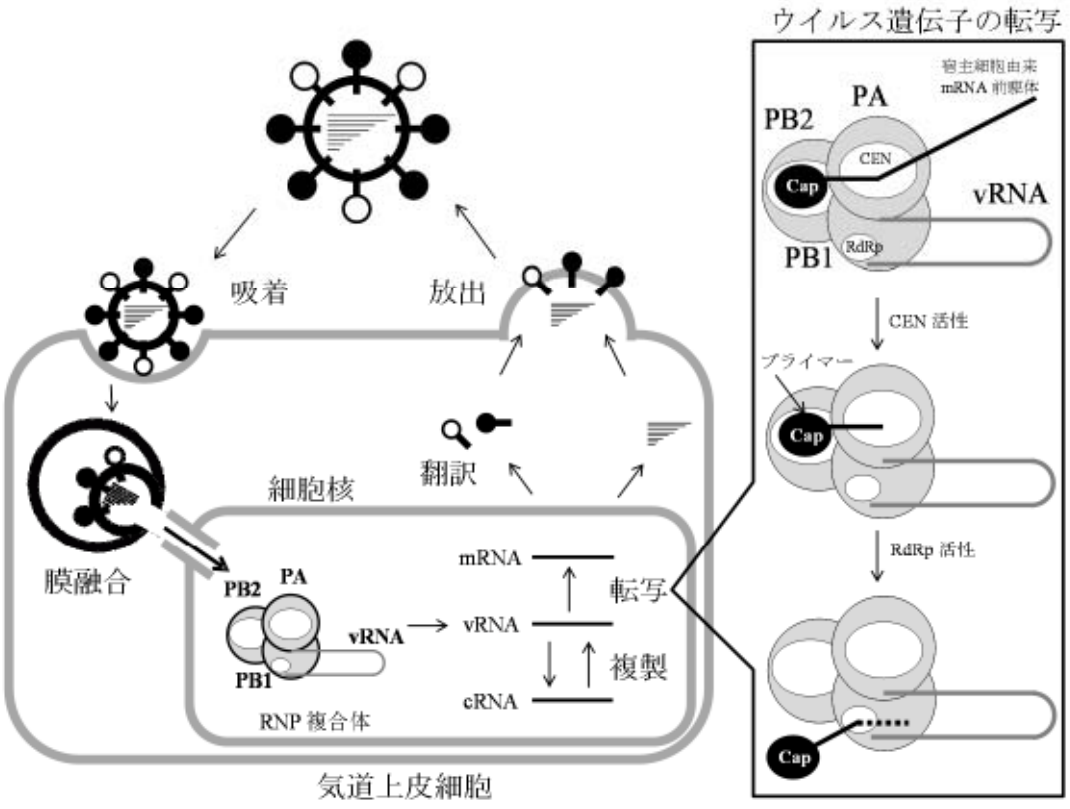
安全性薬理試験としては，20[redacted]年[redacted]月から20[redacted]年[redacted]月までに，コアバッテリー試験として中枢神経系，呼吸系並びに心血管系に及ぼす影響を検討した．

薬物動態試験としては，20[redacted]年[redacted]月から20[redacted]年[redacted]月までに，マウス，ラット及びサルを用いて，分析法・吸収・分布・代謝・排泄並びに薬物動態学的薬物相互作用を検討する試験を実施した．また，吸収に影響を及ぼす食事の要因についても検討した．

毒性試験としては，20[redacted]年[redacted]月から20[redacted]年[redacted]月までに，反復投与毒性試験，遺伝毒性試験，生殖発生毒性試験 (幼若ラットを用いた反復経口投与毒性試験を含む) 及び皮膚光毒性試験を実施した．

安全性薬理試験，妊娠ラットにおける組織分布試験及び主要な毒性試験は，Good Laboratory Practice (GLP) 適用下で実施した．

図 2.4.1-1　インフルエンザウイルスの増殖様式と遺伝子の転写反応



(参考文献 1 に記載の図を改変して使用)

2.4.2 薬理試験

2.4.2.1 効力を裏付ける試験

In vivo 試験におけるオセルタミビルリン酸塩の投与量はオセルタミビル活性体としての量で示した．

2.4.2.1.1 キャップ依存性エンドヌクレアーゼに対する *in vitro* 阻害効果

4 株の A 型及び 3 株の B 型インフルエンザウイルスの CEN 活性に対する S-033447 の阻害効

果を評価した結果，S-033447 の 50%阻害濃度 (IC_{50}) は，A 型で 1.4～3.1 nmol/L，B 型で 4.5～8.9 nmol/L であった (2.6.2.2.1.1 項参照)．S-033447 は A 型及び B 型インフルエンザウイルスの CEN 活性を阻害することが示された．

インフルエンザウイルス遺伝子の転写反応への関与を明らかにするため，組換え RNA ポリメラーゼ複合体が有する CEN 活性，RdRp 活性，及び CEN と RdRp が順次反応する CEN/RdRp 活性をそれぞれ測定する試験系において，S-033447 と S-033188 の IC_{50} を算出した．S-033447 の CEN 活性及び CEN/RdRp 活性に対する IC_{50} は，それぞれ 2.5 nmol/L 及び 1.6 nmol/L であったのに対し，RdRp 活性に対する IC_{50} は 40 nmol/L よりも高い値であったことから，S-033447 は，CEN 活性を選択的に阻害することによりインフルエンザウイルス遺伝子の転写反応を阻害することが示唆された (2.6.2.2.1.2 項参照)．一方，S-033188 の CEN 活性及び CEN/RdRp 活性に対する IC_{50} は，それぞれ 530 及び 340 nmol/L であり，S-033447 に比べて約 200 倍高い値を示したことから，S-033188 は，それ自体は CEN 阻害効果を有さず，S-033447 に加水分解されることによって CEN 阻害効果を発揮すると考えられた．

S-033447 のインフルエンザウイルス遺伝子の転写反応阻害効果が，インフルエンザウイルス感染細胞においても確認できるか否かを A 型インフルエンザウイルス株 (A/WSN/33) を感染させた MDCK 細胞を用いて検討した．感染 6 時間後の感染細胞内で合成されるウイルスの mRNA の量を 1/10 に抑制するために必要な S-033447 の濃度 (EC_{90}) は 5.27 nmol/L であり，S-033447 はインフルエンザウイルス感染細胞においても，インフルエンザウイルス遺伝子の転写反応を阻害することが確認された (2.6.2.2.1.3 項参照)．

2.4.2.1.2 季節性インフルエンザウイルスに対する *in vitro* 増殖抑制効果

A 型又は B 型インフルエンザウイルスを感染させた MDCK 細胞 (イヌ腎臓由来株化細胞) の培養上清に放出される子孫ウイルスの力価 ($TCID_{50}$) を指標にした試験系で S-033447 のウイルス増殖抑制効果を評価した．5 株の A 型及び 3 株の B 型インフルエンザウイルス実験室株を MDCK 細胞に感染させ，90%有効濃度 (EC_{90}) として，翌日の培養上清中に放出されたウイルス力価 ($TCID_{50}$) を 1/10 に抑制するために必要な化合物の濃度を算出し，S-033447 とオセルタミビル活性体，ザナミビル水和物，ラニナミビル，ファビピラビルを比較した．S-033447 は，いずれのウイルス株に対しても，対照薬に比べて低い EC_{90} を示しており (S-033447：A 型，0.46～0.98 nmol/L; B 型，2.21～3.40 nmol/L．対照薬：A 型，9.03～約 4810 nmol/L; B 型，20.88～約 3730 nmol/L)，実験室株に対して対照薬よりも強力なウイルス増殖抑制効果を発揮することが示唆された (2.6.2.2.1.4 項参照)．また，2006 年から 2013 年の 8 年間に日本国内で臨床分離された 5 株の A 型及び 2 株の B 型インフルエンザウイルス株についても EC_{90} を算出した結果，実験室株と同様に S-033447 がファビピラビルに比べ強力なウイルス増殖抑制効果を有していることが示された (S-033447：A 型，0.63～0.95 nmol/L; B 型，6.10～6.48 nmol/L．ファビピラビル：A 型，約 1900～4180 nmol/L; B 型，約 1740～2590 nmol/L) (2.6.2.2.1.5 項参照)．

ウイルス増殖抑制効果を，ウイルスの薬剤感受性試験で汎用されているプラーク形成数を指標にした試験系でも評価した．6 株の A 型及び B 型インフルエンザウイルス実験室株を MDCK 細胞に感染させ，50%有効濃度 (EC_{50}) として，3 日間培養により形成されたプラーク数を 50%

抑制するために必要な化合物の濃度を算出し，S-033447 とファビピラビルを比較した．S-033447 は，いずれのウイルス株に対しても，ファビピラビルに比べて低い EC_{50} を示した (S-033447：A 型，0.35～0.76 nmol/L; B 型，4.33～4.85 nmol/L．ファビピラビル：A 型，約 5060～20200 nmol/L; B 型，約 15800～21100 nmol/L) (2.6.2.2.1.6 項参照)．また，2006 年から 2014 年の間に日本国内で臨床分離された 33 株の A 型及び B 型インフルエンザウイルス株についても EC_{50} を算出し，実験室株と同様に S-033447 がファビピラビルに比べ強力なウイルス増殖抑制効果を有していることが示された (S-033447：A 型，0.20～1.55 nmol/L; B 型，3.33～11.26 nmol/L．ファビピラビル：A 型，約 5210～20100 nmol/L; B 型，約 2380～9120 nmol/L) (2.6.2.2.1.7 項参照)．さらに，2004 年以降に世界保健機関 (WHO) が推奨した 12 種類の A 型及び B 型インフルエンザウイルスワクチン株についても EC_{50} を算出し，S-033188 がファビピラビルに比べ強力なウイルス増殖抑制効果を有していることを確認した (S-033447：A 型，0.74～1.87 nmol/L; B 型，9.24～13.00 nmol/L．ファビピラビル：A 型，約 10400～12900 nmol/L; B 型，約 8820～13900 nmol/L) (2.6.2.2.1.8 項参照)．

オセルタミビルなどの NA 阻害薬に対する薬剤感受性が顕著に低下した NA/H274Y (NA タンパク質の 274 番目のアミノ酸がヒスチジンからチロシンに置換) を有する A 型 H1N1 亜型ウイルス [実験室株 A/WSN/33-NA/H274Y (2.6.2.2.1.4 及び 2.6.2.2.1.6 項参照) 及び臨床分離株 A/Osaka/180/2009，A/Nagasaki/07N020/2008，A/Kyoto/10K124/2011 及び A/Nagasaki/13N059/2014 (2.6.2.2.1.5 及び 2.6.2.2.1.7 項参照)] に対する S-033447 のウイルス放出抑制効果又はプラーク形成阻害効果を評価した．その結果，S-033447 は NA/H274Y を有するウイルス株に対して，対照となる野生型ウイルス株とほぼ同等のウイルス増殖抑制効果を示した (2.6.2.2.1.9 項参照)．

S-033447 と既存 NA 阻害薬 (オセルタミビル活性体，ザナミビル水和物，ラニナミビル又はペラミビル水和物) の併用効果を，ウイルス増殖に起因した細胞変性効果を指標に検討した．MDCK 細胞における A 型インフルエンザウイルス株の細胞変性効果に対する 50%有効濃度 (EC_{50}) から算出した combination index を用いて評価した．その結果，S-033447 は NA 阻害薬と併用することで相乗的なウイルス増殖抑制効果を発揮することが示された (2.6.2.2.1.10 項参照)．

2.4.2.1.3 *In vitro* における S-033447 耐性季節性インフルエンザウイルスの分離とその特性評価

S-033447 に対する A 型 H1N1 亜型のインフルエンザウイルスの感受性低下に寄与する PA のアミノ酸置換を確認するため，A 型 H1N1 亜型ウイルスを MDBK 細胞 (ウシ腎臓由来株化細胞) に感染させ，継代ごとに S-033447 の濃度を上げながら培養を繰り返すことにより，薬剤感受性が 22.5～41.4 倍低下したウイルスを分離した．分離された全てのウイルスで PA タンパク質の 38 番目のアミノ酸にイソロイシンからスレオニンへの置換 (PA/I38T) が認められた (2.6.2.2.2.1 項参照)．リバースジェネティクス法により作出した PA/I38T を有する組換えウイルスは，耐性ウイルス分離試験で分離された PA/I38T を有するウイルスと同様な S-033447 に対する感受性低下を示したことから，PA/I38T は，A 型インフルエンザウイルスの S-033447 に対する感受性を低下させる責任変異であると考えている (2.6.2.2.2.3 項参照)．一方で，PA/I38T は，野生型と比較してウイルス増殖性の低下を誘導したことから，臨床においては PA/I38T による感受性低下株は生じにくいと考えている (2.6.2.2.2.2 項参照)．

上述の薬剤耐性化評価においては，インフルエンザウイルスの薬剤感受性変化及び PA 遺伝子変異の評価に必要なインフルエンザウイルス量を確保するために，薬剤非存在下でウイルスを増幅し，各種評価に使用した．しかしながら，このウイルス増幅操作により，試料中のウイルス増殖性が低下した変異体の割合が低下し，その結果として，変異体の薬剤感受性変化及び PA 遺伝子変異を検出することが困難になることが推測される．そこで，試料中に含まれるインフルエンザウイルスを増幅せずにサンガー法により PA 遺伝子解析を実施することで，変異体の見落としが無いか確認した (2.6.2.2.2.1 項参照)．その結果，4 つの検体でアミノ酸置換が認められ，そのうち 1 つの検体は PA の 38 番目のアミノ酸がイソロイシンとスレオニンの混在 (PA/I38I/T) として検出されたが，それ以外のアミノ酸置換体は全て PA/I38T であり，新たなアミノ酸置換体は検出されなかった．

A 型 H3N2 亜型インフルエンザウイルスについても同様の方法で，MDCK 細胞に感染させて継代培養を繰り返した．試料中に含まれるインフルエンザウイルスを増幅せずにサンガー法により PA 遺伝子解析したところ，PA/I38I/T，362 番目のアミノ酸がリジンとアルギニンの混在 (PA/K362K/R) 及び 199 番目のアミノ酸がグルタミン酸からグリシンへの置換 (PA/E199G) を有する株がそれぞれ検出された (2.6.2.2.2.4 項参照)．これらの耐性ウイルス分離試験で分離されたウイルスの S-033447 に対する薬剤感受性は，野生株に対して PA/I38I/T は 34.9 倍，PA/K362K/R は 1.0～1.1 倍，PA/E199G は 3.2 倍の低下を示した．薬剤感受性変化が大きかった PA/I38T について，PA/I38T を有する組み換えウイルスをリバースジェネティクス法により作出し，感受性を評価したところ，耐性ウイルス分離試験で分離された PA/I38T を有するウイルスと同様な S-033447 に対する感受性低下を示したことから，PA/I38T は，A 型インフルエンザウイルスの S-033447 に対する感受性を低下させる責任変異であると考えている．

B 型インフルエンザウイルスについても同様の方法で，MDCK 細胞に感染させて継代培養を繰り返し，試料中に含まれるインフルエンザウイルスを増幅せずにサンガー法により PA 遺伝子を解析した．しかし，B 型インフルエンザウイルスの感受性低下に寄与するアミノ酸置換体は検出されなかった (2.6.2.2.2.5 項参照)．

2.4.2.1.4 季節性以外のインフルエンザウイルスに対する *in vitro* 増殖抑制効果

ヒトから分離された H5N1 亜型の高病原性鳥インフルエンザウイルスである A/Hong Kong/483/97 株 [4]，及びリバースジェネティクス法により作出した NA/H274Y を有する組換えウイルス (A/Hong Kong/483/97-NA/H274Y 株) を MDCK 細胞に感染させ，EC_{90} として，翌日の培養上清中に放出されたウイルス力価 ($TCID_{50}$) を 1/10 に抑制するために必要な化合物の濃度を算出し，S-033447 とオセルタミビル活性体を比較した．

A/Hong Kong/483/97 株の放出に対する S-033447 の EC_{90} は 1.64 nmol/L であり，オセルタミビル活性体の EC_{90} (11.16 nmol/L) よりも低い値を示した．NA 阻害薬耐性を示す A/Hong Kong/483/97-NA/H274Y 株の放出に対する S-033447 の EC_{90} は 3.16 nmol/L であり，その野生型インフルエンザウイルス株である A/Hong Kong/483/97 株の放出に対する EC_{90} とほぼ同等であった (2.6.2.2.3.1 項参照)．以上の結果から，S-033447 は，高病原性鳥インフルエンザウイルスに対してオセルタミビル活性体よりも強力なウイルス増殖抑制効果を発揮し，NA 阻害薬耐性を示

す高病原性鳥インフルエンザウイルスに対して野生型ウイルス株と同等の抑制効果を有すると結論した.

ヒトから分離されたA型H7N9亜型の鳥インフルエンザウイルスであるA/Anhui/1/2013株 [5], 及びリバースジェネティクス法により作出した NA/R292K を有する組換えウイルス (A/Anhui/1/2013-NA/R292K 株) を感染させた MDCK 細胞を用いて，EC_{90} を算出し，S-033447 とオセルタミビル活性体を比較した. A/Anhui/1/2013 株の放出に対する S-033447 の EC_{90} は 0.80 nmol/L であり，オセルタミビル活性体の EC_{90} (15.41 nmol/L) よりも低い値を示した．NA 阻害薬耐性を示す A/Anhui/1/2013-NA/R292K 株の放出に対する S-033447 の EC_{90} は 1.12 nmol/L であり，その野生型インフルエンザウイルス株である A/Anhui/1/2013 株の放出に対する EC_{90} とほぼ同等であった (2.6.2.2.3.2 項参照). 以上の結果から，S-033447 は，A 型 H7N9 亜型の鳥インフルエンザウイルスに対してオセルタミビル活性体よりも強力なウイルス増殖抑制効果を発揮し，また，NA 阻害薬耐性を示す A 型 H7N9 亜型の鳥インフルエンザウイルスに対して野生型ウイルス株と同等の抑制効果を有すると結論した.

動物 (ブタ，ニワトリ，アヒル) から分離された様々な亜型 (H1N2, H5N2, H5N6, H9N2) の A 型インフルエンザウイルスを感染させた MDCK 細胞を用いて，EC_{90} を算出し，S-033447 とファビピラビルのウイルス増殖抑制効果を比較した．S-033447 の EC_{90} は 0.73～1.20 nmol/L であり，季節性 A 型インフルエンザウイルス株に対して算出された EC_{90} (2.6.2.2.1.4, 2.6.2.2.1.5 項) とほぼ同等の値を示し，ファビピラビルよりも低い値を示した (2.6.2.2.3.3 項参照). 以上の結果から，S-033447 は様々な亜型の動物由来 A 型インフルエンザウイルス株に対して，季節性 A 型インフルエンザウイルス株と同等のウイルス増殖抑制効果を発揮すると考えている.

2.4.2.1.5 季節性インフルエンザウイルスに対する *in vivo* 増殖抑制効果

A 型及び B 型インフルエンザウイルスを接種したマウスモデルにおいて，接種から 5 日後に S-033188 あるいは対照薬を 1 日 2 回 (BID) あるいは 1 日 1 回 (QD) 1 日投与し，投与開始から 24 時間後の肺内ウイルス力価を測定した．S-033188 は，用量依存的に肺内ウイルス力価を低下させ，A 型 H1N1 亜型及び H3N2 亜型に対して S-033188 の 3 mg/kg/日 (1.5 mg/kg BID) 投与群は，オセルタミビルリン酸塩の臨床用量相当 [10 mg/kg/日 (5 mg/kg BID)] [6] 及びその 10 倍量 [100 mg/kg/日 (50 mg/kg BID)] 投与群に比べて肺内ウイルス力価が有意に低下した (2.6.2.2.4.2 及び 2.6.2.2.4.3 項参照). さらに，S-033188 の用量を 15 mg/kg BID 以上にすることで，肺内ウイルス力価はオセルタミビルリン酸塩の 5 mg/kg BID 投与群のほぼ 1/100 (2 $\log_{10}TCID_{50}$/mL の差) にまで低下した.

また，A 型 H1N1 亜型インフルエンザウイルスに対して S-033188 の 5 mg/kg BID 投与群の肺内ウイルス力価は，ラニナミビルオクタン酸エステルの臨床用量相当 [1 mg/kg/日 (1 mg/kg QD)] 又はその 3 倍量 [3 mg/kg/日 (3 mg/kg QD)] を 1 日経鼻投与した群，ザナミビル水和物の 20 mg/kg/日 (10 mg/kg BID) を 1 日経鼻投与した群並びにファビピラビルの 100 mg/kg/日 (50 mg/kg BID) 又はその 3 倍量 [300 mg/kg/日 (150 mg/kg BID)] を 1 日経口投与した群に比べ，有意に低下した.

同様に，B 型インフルエンザウイルスを接種したマウスモデルを用いた検討においても，

S-033188 の 5 mg/kg BID 投与群は，オセルタミビルリン酸塩の 5 及び 50 mg/kg BID 投与群に比べて肺内ウイルス力価が有意に低下した (2.6.2.2.4.3 項参照)．さらに，S-033188 の用量を 15 mg/kg BID 以上にすることで，肺内ウイルス力価はオセルタミビルリン酸塩の 5 及び 50 mg/kg BID 投与群のほぼ 1/10 (1 $\log_{10}TCID_{50}$/mL の差) にまで低下した．

さらに，NA 阻害薬耐性変異である NA/H274Y を有するインフルエンザウイルス接種したマウスモデルにおいて，接種から 5 日後に S-033188 あるいはオセルタミビルリン酸塩を BID 1 日経口投与し，投与開始から 24 時間後の肺内ウイルス力価を測定したところ，野生型である A/WSN/33 株を感染させた先の試験成績 (2.6.2.2.2.2 項参照) とほぼ同等の肺内ウイルス力価の低下作用を示したことから (2.6.2.2.4.4 項参照)，S-033188 のウイルス増殖抑制効果は，NA 阻害薬に対する耐性化の影響を受けないと考えている．

マウス感染モデルにおいて，S-033188 を投与した翌日以降の経時的な肺内ウイルス力価の推移を確認するため，A 型インフルエンザウイルスを接種した 5 日後に S-033188 を BID 1 日又は 3 日間，あるいはオセルタミビルリン酸塩を BID 3 日間反復経口投与し，投与開始から 3 日間の肺内ウイルス力価を測定した．S-033188 投与群は，0.5 mg/kg 及び 5mg/kg 投与群において，オセルタミビルリン酸塩投与群よりも肺内ウイルス力価が有意に低下した (2.6.2.2.4.5 項参照)．投与開始から 48 時間後にウイルス定量下限以下となったマウスの例数は，媒体対照群やオセルタミビルリン酸塩投与群と比べ，S-033188 の 0.5 及び 5 mg/kg BID 1 日投与群の方が多かった．以上の結果から，S-033188 は A 型インフルエンザウイルスの感染に対して，オセルタミビルリン酸塩よりも強力なウイルス増殖抑制効果を発揮し，体内のウイルスをより早期に消失させる効果があると考えている．

マウス感染モデルにおける肺内ウイルス増殖抑制効果と血漿中 S-033447 濃度を用いてマウスモデルの薬物動態/薬力学解析を行った．解析するにあたり，S-033188 を経口投与した翌日の肺内ウイルス力価が，臨床用量相当のオセルタミビルリン酸塩投与時の 1/10 になることを非臨床の薬効目標とした．S-033447 の初回投与時の投与間隔時間後における血漿中濃度 (C_τ) が投与翌日の肺内ウイルス力価と最も相関する PK パラメータであった (2.6.2.2.4.6 項参照)．非臨床における検討から，上記薬効目標を満たす S-033447 の C_τ は 6.85 ng/mL であった．ヒト血清が S-033447 のウイルス増殖抑制効果に及ぼす影響について検討するため，A 型 H1N1 亜型インフルエンザウイルス株を感染させた MDCK 細胞を 0%，12.5%，25%及び 50%のヒト血清を含む培地で培養し，EC_{90} として，ウイルス接種から 6 時間後に細胞内で合成されるウイルス mRNA の量を 1/10 に抑制するために必要な化合物の濃度を算出した．ヒト血清存在下における S-033447 の EC_{90} は，ヒト血清濃度に依存して変動しなかった (2.6.2.2.4.7 項参照)．ヒトで S-033447 の C_τ を 6.85ng/mL 以上にする用法・用量において，オセルタミビルリン酸塩よりも優れたウイルス増殖抑制効果が得られると考えられる．

2.4.2.1.6 季節性インフルエンザウイルスに対する *in vivo* 治療効果

S-033188 の *in vivo* ウイルス増殖抑制効果が，治療効果に反映されるかどうか検討するため，A 型 (H1N1) 及び B 型インフルエンザウイルスを接種することで致死を誘導するマウス感染モデルにおいて，接種直後に S-033188 を BID 1 日あるいはオセルタミビルリン酸塩を BID 5 日間

反復経口投与し，ウイルス接種から 14～21 日間のマウスの生存率を比較した．その結果，高力価の A 型及び B 型ウイルスを接種した場合，S-033188 の 5 mg/kg BID 投与群では，オセルタミビルリン酸塩の 5 mg/kg BID 投与群よりも致死率が改善し，生存期間が有意に延長した (2.6.2.2.4.8 及び 2.6.2.2.4.9 項参照).

A 型 H1N1 亜型インフルエンザウイルスを接種することで致死を誘導するマウスモデルにおいて，感染から投与開始までの時間が経過した場合の治療効果をみるために，接種後 24～96 時間経過してから S-033188 を BID 5 日間の反復経口投与し，ウイルス接種から 28 日間のマウスの生存率を測定した．S-033188 の 1.5 及び 15 mg/kg BID 投与群は，接種 24～72 時間後投与まで 100%の生存率を示し，接種 96 時間後投与でも用量依存的に 50%～70%の生存率を示した．一方，オセルタミビルリン酸塩の 5 mg/kg BID 投与群は，接種 48 時間後投与から生存率が低下し始め，接種 72～96 時間後投与では 10%となった．接種 72～96 時間後投与において，S-033188 の 1.5 及び 15 mg/kg BID 投与群は，オセルタミビルリン酸塩の 5 mg/kg BID 投与群よりも致死率が改善し，生存期間が有意に延長した．S-033188 BID 投与群ではインフルエンザウイルス増殖に伴う体重減少が用量依存的に抑制された (2.6.2.2.4.10 項参照).

同試験において観察された致死率改善効果及び有意な生存期間延長効果が S-033188 のウイルス増殖抑制効果に起因していることを確認するため，致死量の A 型 H1N1 亜型インフルエンザウイルスを接種後 72 時間経過してから S-033188 あるいはオセルタミビルリン酸塩を BID 5 日間反復経口投与し，投与開始後のマウスの肺内ウイルス力価を比較した．S-033188 の 1.5 及び 15 mg/kg BID 投与群は，投与開始から 1 及び 3 日後に用量依存的な肺内ウイルス力価の低下を示し，オセルタミビルリン酸塩 BID 投与群に比べてその低下作用が有意に高かった (2.6.2.2.4.10 項参照). 以上の結果から，本マウス感染モデルにおいて，接種 72 時間後投与 (遅延投与) に確認された S-033188 の致死率改善効果及び有意な生存期間延長効果は，S-033188 のウイルス増殖抑制効果に起因すると結論した.

治療開始が遅れたインフルエンザウイルス感染患者や重篤な症状を示すインフルエンザウイルス感染患者に対する S-033188 とオセルタミビルリン酸との併用投与による致死率改善効果及び有意な生存期間延長効果を検討するため，マウスに致死量の A 型 H1N1 亜型インフルエンザウイルスを接種後 96 時間経過してから，S-033188 単独，オセルタミビルリン酸塩単独，又は両方を併用で BID 5 日間反復経口投与し，接種から 28 日間の生存率と投与期間中の体重変化率を評価した．S-033188 の 0.5 mg/kg BID とオセルタミビルリン酸塩の 10 または 50 mg/kg BID を併用投与した群の生存率はそれぞれ 70%及び 90%であり，S-033188 及びオセルタミビルリン酸塩の単独投与と比較して致死率改善効果が認められた．併用投与した時の生存期間は，オセルタミビルリン酸塩単独投与した時の生存期間と比較して有意に延長した (2.6.2.2.4.11 項参照). また，S-033188 の 1.5 mg/kg BID とオセルタミビルリン酸塩の 10 又は 50 mg/kg BID を併用投与した群の生存率はいずれも 100%であったことから，S-033188 及びオセルタミビルリン酸塩の単独投与と比較して致死率改善効果が認められ，併用投与した時の生存期間は，オセルタミビルリン酸塩を単独投与した時の生存期間と比較して有意に延長した．さらに，インフルエンザウイルス増殖に起因する体重減少においても，S-033188 とオセルタミビルリン酸塩を併用投与することにより抑制効果が認められた．以上の結果から，治療開始が遅れたインフルエンザウイ

ルス感染症患者や重篤な症状を示すインフルエンザウイルス感染症患者に対して，S-033188 とオセルタミビルリン酸塩と併用することでより優れた治療効果を発揮し得ると考えている．

A 型 H1N1 亜型ウイルスを接種したフェレット感染モデルにおいて，感染から 24 時間後に S-033188 を BID 1 日経口投与し，投与開始から 2 日間の体温変化量と鼻腔洗浄液内ウイルス力価の推移を測定した．S-033188 の 10 及び 30 mg/kg BID 投与群の投与開始から 2 日間の鼻腔洗浄液内ウイルス力価は，オセルタミビルリン酸塩 5 mg/kg BID 投与群に比べて有意に低く，感染 2 日後において，いずれの用量でもウイルス力価は定量下限以下となった．S-033188 の 10 及び 30 mg/kg BID 投与群の投与開始から 2 日間の体温変化量は，オセルタミビルリン酸塩 5 mg/kg BID投与群のそれらに比べて有意に小さく，体温上昇が抑制された (2.6.2.2.4.12項参照)．以上の結果から，S-033188 は A 型インフルエンザウイルスの感染に対して，オセルタミビルリン酸塩よりも強力なウイルス増殖抑制効果を発揮することで，優れた治療効果を示すと考えている．

2.4.2.1.7 免疫抑制マウスモデルにおける *in vivo* 治療効果

がんや糖尿病などの慢性疾患患者は免疫機能が低下しており，インフルエンザを発症した場合に重症化しやすいことが知られている [7]．そこで，免疫抑制状態を誘導しウイルス感染期間を延長させたマウスモデルで S-033188 の有効性を検討した．シクロホスファミド投与により免疫抑制状態を誘導したマウスに A 型 H1N1 亜型ウイルスを接種し，接種 5 日後から S-033188 あるいはオセルタミビルリン酸塩を BID 5 日間反復経口投与し，投与開始から 5 日間の肺内ウイルス力価と体重減少率を経時的に測定した．S-033188 の 1.5～50 mg/kg BID 投与群では，投与開始から 24 時間後に用量依存的な肺内ウイルス力価の低下がみられた後，肺内ウイルス力価は投与量に応じて速やかに定量下限値に達した．S-033188 の 1.5～50 mg/kg BID 投与群は，オセルタミビルリン酸塩の 5 及び 50 mg/kg BID 投与群に比べて肺内ウイルス力価が有意に低下し，体重減少率が有意に小さかった．以上のことから，S-033188 は免疫機能が低下したハイリスクグループに対して，オセルタミビルリン酸塩よりも強力なウイルス増殖抑制効果を発揮し，体内のウイルスをより早期に消失させる効果があると考えている (2.6.2.2.4.13 項参照)．

本試験において，S-033188 の 1.5～50 mg/kg BID 投与開始から 1，3 及び 5 日後の肺試料中に含まれるインフルエンザウイルスの PA 遺伝子を，ウイルスを増幅せずにサンガー法により解析したが，アミノ酸置換は認められなかった．以上の結果から，臨床において血漿中 S-033447 濃度 (C_T: 6.85 ng/mL) が維持されている条件下では，本薬による治療中に感受性低下ウイルスは，生じにくいと考えている (2.6.2.2.4.13 項参照)．

2.4.2.1.8 季節性以外のインフルエンザウイルスに対する *in vivo* 治療効果

高病原性鳥インフルエンザウイルス (A/H5N1) を接種することで致死を誘導するマウスモデルにおいて，接種直後に S-033188 を BID 1 日あるいは 5 日間，又はオセルタミビルリン酸塩を BID 5 日間反復経口投与し，投与開始から 5 日間の肺内ウイルス力価の推移及び 14 日間のマウスの生存率を測定した．その結果，S-033188 の 5 及び 50 mg/kg BID 1 日あるいは 5 日間投与群の生存率は，接種 14 日後においていずれも 100%であり，オセルタミビルリン酸塩の 5 mg/kg BID

5 日間投与群と比べて致死率改善効果が認められ，生存期間が有意に延長していた (2.6.2.2.5.1 項参照)．また，肺内ウイルス力価は，S-033188 の 5 及び 50 mg/kg BID 1 日あるいは BID 5 日間投与群で，オセルタミビルリン酸塩の 5 mg/kg BID 5 日間投与群に比べて有意に低下した．以上の結果から，S-033188 は高病原性鳥インフルエンザウイルスの感染に対し，オセルタミビルリン酸塩よりも強力なウイルス増殖抑制効果を発揮することで，優れた治療効果を示すと考えている．

また，鳥インフルエンザウイルス (A/H7N9) を接種することで致死を誘導するマウス感染モデルにおいて，接種直後に S-033188 を BID 1 日あるいは 5 日間，又はオセルタミビルリン酸塩を BID 5 日間反復経口投与し，接種から 28 日間の生存率と投与開始から 1，3 及び 5 日後のマウスの肺内ウイルス力価を測定した．その結果，5 及び 50 mg/kg BID の用量の S-033188 を 1 日あるいは 5 日間投与した群は，接種 28 日後においていずれも 100%の生存率を示し，媒体対照群や 5 mg/kg BID の用量のオセルタミビルリン酸塩を 5 日間投与した群に比べて致死率の改善効果が認められ，生存期間が有意に延長した (2.6.2.2.5.2 項参照)．5 及び 50 mg/kg BID の用量の S-033188 を 1 日あるいは 5 日間投与した群における投与開始から 1, 3 及び 5 日後の肺内ウイルス力価は，媒体対照群や 5 mg/kg BID の用量のオセルタミビルリン酸塩を 5 日間投与した群のそれに比べて有意に低下した．以上の結果から，S-033188 は，A/H7N9 亜型を有する鳥インフルエンザウイルスの感染に対し，オセルタミビルリン酸塩よりも強力なウイルス増殖抑制効果を発揮し，優れた治療効果を示すと考えている．

2.4.2.2 副次的薬理試験

S-033188 と S-033447 の CEN 阻害効果及びウイルス増殖阻害効果の選択性を確認するため，以下の試験を実施した．

S-033447 を含む培地中で MDBK，MDCK，RPMI2650 あるいは A549 細胞を 3 日間培養し，生細胞数を 50%低下させる S-033447 の濃度を CC_{50} として算出したところ，S-033447 の CC_{50} は 17.30～47.52 μmol/L であり，S-033447 のウイルス増殖抑制効果 [(放出抑制効果 (EC_{90}) やプラーク形成抑制効果 (EC_{50})] を示す濃度 (おおむね<10 nmol/L) と細胞傷害作用を示す濃度には十分な乖離がみられた (2.6.2.3.1.1 項参照)．

S-033447 の細胞傷害作用とウイルス増殖に起因した細胞変性に対する抑制効果を同じ試験条件下で評価し，それぞれの作用を示す濃度の乖離を評価した．A 型あるいは B 型インフルエンザウイルス (それぞれ 2 株) を MDCK 細胞に感染させ，S-033447 又は対照薬のリバビリン存在下で 6 日間培養した後，EC_{50} として，ウイルス増殖による死滅細胞数を 50%に抑制する有効濃度を算出した．また，S-033447 又はリバビリンを含む培地中で MDCK 細胞を 6 日間培養し，CC_{50} を算出した後，EC_{50} に対する CC_{50} の比 SI (selectivity index) を用いて，ウイルス増殖に起因した細胞変性の抑制効果を示す濃度と細胞傷害作用を示す濃度の乖離を評価した．S-033447 の A 型及び B 型インフルエンザウイルスに対する SI は 500 倍以上であり，リバビリンよりも高い SI を示した (2.6.2.3.1.2 項参照)．以上の結果から，S-033447 はウイルス増殖抑制効果を示す濃度と細胞傷害作用を示す濃度の間には十分な乖離があると結論した．

異なるヒト組織に由来する 9 種の増殖期の株化細胞に対して，生細胞数を 50%低下させる化

合物の濃度を IC_{50} として算出したところ，S-033447 の IC_{50} は 2.2～50 μmol/L であり，5 種の非増殖期のヒト組織由来株化細胞に対して，S-033447 の IC_{50} はいずれも 3.0 μmol/L を超える濃度～100 μmol/L を超える濃度であった．いずれの条件においても，S-033447 のウイルス放出抑制効果，プラーク形成抑制効果又はウイルス増殖に起因した細胞変性への抑制効果を示す濃度 (おおむね ＜10 nmol/L) との間に十分な乖離がみられた (2.6.2.3.1.3 項参照).

グルコースをガラクトースに置き換えた培地で培養された細胞は，ミトコンドリア選択的な障害が起きると ATP 産生量が著しく低下する性質を利用して [8], S-033188 及び S-033447 のミトコンドリアへの選択的な障害誘発能の有無を評価した．グルコースあるいはガラクトース含有培地で培養した後の細胞中 ATP 含量を測定し，陰性対照群に対して 50%抑制する濃度 (IC_{50}) を算出した．ヒト HepG2 細胞に対する S-033188 及び S-033447 の曝露時間の影響を評価するため，24 時間 [ウシ胎児血清 (FBS) 存在下及び非存在下] 又は 6 日間 (FBS 存在下) の培養期間で行ったが，いずれの条件においても，S-033188 及び S-033447 曝露下のグルコース含有培地及びガラクトース含有培地間の IC_{50} が同程度であったことから，S-033188 及び S-033447 はヒト HepG2 細胞のミトコンドリアの機能に対して選択的な影響を及ぼさないことが明らかとなった (2.6.2.3.1.4 項参照).

計 66 種類の受容体，イオンチャネル及びトランスポーターに対する S-033447 の結合阻害能を検討したところ，10 μmol/L (4.83 μg/mL) の濃度で 50%以上の結合阻害活性を示すものはなかった．この結果から，S-033447 により，各種受容体，イオンチャネル，トランスポーター及び酵素を介する副作用が出現するリスクは低いと結論した (2.6.2.3.1.5 項参照).

2.4.2.3 安全性薬理試験

2.4.2.3.1 中枢神経系に対する作用

ラットに S-033188 を 200，600 又は 2000 mg/kg の用量で単回経口投与し，投与前並びに投与 1，2，4，6，8 及び 24 時間後の各時点における一般症状及び神経行動学的機能について，機能観察総合評価 (FOB) 法を用いて検討した．600 mg/kg 以上の用量で一過性かつ軽度の体温低値を，2000 mg/kg の用量で軽度の尿量減少を示したが，200 mg/kg の用量では S-033188 投与による影響が認められなかったため，S-033188 は 200 mg/kg の用量までラットの一般症状及び神経行動学的機能に影響を及ぼさないと判断した (2.6.2.4.1.1 項参照).

2.4.2.3.2 心血管系に対する作用

S-033188 を 0.1，0.3 又は 1 μmol/L (それぞれ 0.0572，0.171 又は 0.572 μg/mL) の濃度で，あるいは S-033447 を 0.082，0.25 又は 0.83 μmol/L (それぞれ 0.040，0.12 又は 0.40 μg/mL) の濃度でモルモットの心臓から摘出した右心室乳頭筋標本に適用した．1 Hz の電気刺激を与えたときの静止膜電位，活動電位振幅，脱分極最大立ち上がり速度並びに 30%及び 90%再分極時の活動電位持続時間 (APD_{30} 及び APD_{90}) を測定し，APD_{90} と APD_{30} の差 (APD_{30-90}) を算出した．S-033188 及び S-033447 は，いずれの濃度においても，いずれのパラメータにも影響を及ぼさなかった (2.6.2.4.2.1 項参照).

S-033188 を 1，3 又は 10 μmol/L (それぞれ 0.572，1.71 又は 5.72 μg/mL) の濃度で，あるいは

S-033447 を 0.56，2.06 又は 8.44 μmol/L (それぞれ 0.30，1.00 又は 4.08 μg/mL) の濃度でヒト ether-a-go-go 関連遺伝子 (hERG) チャネルを発現させたチャイニーズハムスターの卵巣細胞に適用し，whole-cell パッチクランプ法を用いて遅延整流カリウム電流 (hERG 電流) を測定した．S-033188 及び S-033447 の IC_{50} は，> 10 μmol/L 及び 15.11 μmol/L (7.31 μg/mL) と推定された (2.6.2.4.2.2 項参照)．

サルに S-033188 を 200 又は 400 mg/kg の用量で，7 日間の投与間隔で漸増的に経口投与し，テレメトリー法を用いて心血管系に及ぼす影響を検討した．S-033188 は，いずれの用量においても，投与前並びに投与 2，4，6，8，10 及び 24 時間後の各時点における血圧，心拍数及び心電図 [PR 間隔，QRS 間隔，QT 間隔及び補正 QT 間隔 (QTc)] に対して影響はなく，400 mg/kg までの単回経口投与で心血管系に影響を及ぼさないと判断した (2.6.2.4.2.3 項参照)．

2.4.2.3.3 呼吸系に対する作用

ラットに，S-033188 を 200，600 又は 2000 mg/kg の用量で単回経口投与し，whole-body plethysmograph 法により呼吸系に及ぼす影響を検討した．S-033188 は，いずれの用量においても，投与前，並びに投与 1，2，4，6，8 及び 24 時間後の各時点における呼吸数，1 回換気量及び分時換気量に影響はなく，2000 mg/kg の用量まで呼吸機能に影響を及ぼさないと判断した (2.6.2.4.3.1 項参照)．

2.4.3 薬物動態試験

2.4.3.1 吸収

S-033188 は，体内で速やかに S-033447 に加水分解されるため，フェレットを除く動物種において血漿中に検出されないか，検出されても，ごく一部の個体で定量下限 (0.500 ng/mL) 付近で散発的に検出される程度であった．本項では，これに該当する場合，S-033188 の血漿中濃度について記載していない．

2.4.3.1.1 単回投与

非絶食のラットに 1 mg/kg の用量の [^{14}C]-S-033188 を単回経口投与したときの血液及び血漿中放射能濃度並びに血漿中 S-033188 及び S-033447 濃度を測定し，薬物動態 (PK) パラメータを求めた．血漿中放射能の約 90%が S-033447 として存在した．血液及び血漿中放射能濃度は，投与後の吸収過程 [最高濃度到達時間 (T_{max})，最高血漿中濃度 (C_{max})] 及びその後の消失過程 [終末相消失半減期 ($t_{1/2,z}$)] を含めて同様に推移し，投与後 24 時間の血液及び血漿中放射能濃度は，4 例中 1 例の血液 (1.68 ng eq./mL) を除いて，定量下限未満 (BLQ) にまで減少したことから，血球中に残存する S-033188 関連化合物はないと判断した (2.6.4.3.1.1 項参照)．

非絶食のラットに 0.254 mg/kg (S-033188 0.3 mg/kg 相当) 又は 0.846 mg/kg (S-033188 1 mg/kg 相当) の用量の S-033447 を単回静脈内投与したときの血漿中 S-033447 濃度を測定し，PK パラメータを求めた．S-033447 の時間 0 から 24 時間までの血漿中濃度-時間曲線下面積 ($AUC_{0\text{-}24hr}$) 及び無限大時間までの血漿中濃度－時間曲線下面積 ($AUC_{0\text{-}inf}$) は用量に比例して増大し，各用量における $t_{1/2,z}$，全身クリアランス (CL_{tot}) 及び定常状態分布容積 (Vd_{ss}) はほぼ一定の値を示したことから，S-033447 を静脈内投与した後の体内動態は，0.846 mg/kg まで線形であった

(2.6.4.3.1.2 項参照).

非絶食のラットに 0.3，1，3 又は 10 mg/kg の用量の S-033188 を単回経口投与したときの血漿中 S-033188 及び S-033447 濃度を測定し，PK パラメータを求めた．S-033447 の C_{max}，$AUC_{0\text{-}24hr}$ 及び $AUC_{0\text{-}inf}$ は用量にほぼ比例して増大し，体内動態は線形であった (2.6.4.3.1.3 項参照)．S-033447 の $AUC_{0\text{-}24hr}$ と S-033447 を 0.254 mg/kg で静脈内投与後の $AUC_{0\text{-}24hr}$ の比で算出されるバイオアベイラビリティ (BA) は 9.77%～14.7%であった．

絶食又は非絶食のラットに 1 mg/kg の用量の S-033188 を単回経口投与したときの血漿中 S-033188 及び S-033447 濃度を測定し，PK パラメータを求めた．非絶食下で S-033188 を単回経口投与した後の S-033447 の C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24hr}$ は，絶食下での値と比べて，それぞれ約 0.50 倍及び 0.82 倍と食餌による血漿中曝露の減少 (食餌の影響) が認められた (2.6.4.3.1.4 項参照).

非絶食のラットに 1 mg/kg の用量の S-033188 又は 0.846 mg/kg (S-033188 1 mg/kg 相当) の用量の S-033447 を単回経口投与したときの血漿中 S-033188 及び S-033447 濃度を測定し，PK パラメータを求めた．その結果，S-033188 投与時の S-033447 の C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24hr}$ が S-033447 投与時の値の 20.5 倍及び 15.3 倍となり，S-033447 のプロドラッグ化により，S-033447 の血漿中曝露が増大した (2.6.4.3.1.5 項参照).

10，20 及び 30 日齢の幼若ラットに対して非絶食下で S-033188 を 3，10 又は 30 mg/kg の用量で単回経口投与したときの血漿中 S-033188 及び S-033447 濃度を測定し，PK パラメータを求めた．10 日齢における S-033447 の C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}inf}$ は，いずれの投与量においても 20 及び 30 日齢に比べて著しく大きく，C_{max} は 20 日齢と比べて 3～5 倍，30 日齢と比べて 6～8 倍の値を示した (2.6.4.3.2.1 項参照)．また，$AUC_{0\text{-}inf}$ は 20 日齢と比べて 7～8 倍，30 日齢と比べて 16～24 倍の値を示した．さらに，10 日齢のラットでは，$t_{1/2,z}$ の延長が認められ，20 及び 30 日齢のラットと比べて 2～3 倍の値を示した．10 日齢のラットにおいてのみ，血漿中に S-033188 が検出されたが，血漿中 S-033447 濃度と比べて著しく小さい値 (C_{max} で約 0.75%未満，$AUC_{0\text{-}24hr}$ で約 0.04%未満) であった．さらに，10，20 及び 30 日齢の幼若ラットに非絶食下で 0.254 mg/kg (S-033188 0.3 mg/kg 相当) の用量の S-033447 を単回静脈内投与したときの血漿中 S-033447 濃度を測定し，PK パラメータを求めた．10 日齢のラットの $t_{1/2,z}$ は，20 及び 30 日齢と比べて 2～3 倍の値であり，Vd_{ss} は 20 及び 30 日齢と比べて 0.36～0.53 倍であった．また，S-033188 を単回経口投与後の血漿中 S-033447 の $AUC_{0\text{-}inf}$ との比で表される BA は，10 日齢のラットで高く，20 及び 30 日齢と比べて約 2 倍の値を示した (2.6.4.3.2.2 項参照)．以上の結果から，前述した 10 日齢における経口投与後の $AUC_{0\text{-}inf}$ の増大は 20 及び 30 日齢に比べて S-033447 の消失速度の低下，分布容積の減少及び S-033188 の経口吸収性が上昇したことに起因すると考えている．

非絶食のサルに 3 mg/kg の用量の [^{14}C]-S-033188 を単回経口投与したときの血液及び血漿中放射能濃度並びに血漿中 S-033188 及び S-033447 濃度を測定し，PK パラメータを求めた．血漿中放射能の約 80%が S-033447 として存在した．血液及び血漿中放射能濃度は，投与後約 4 時間で C_{max} に達し，投与後の吸収過程及びその後の消失過程を含めて同様に推移したことから，血球中に特異的に残存する S-033188 関連化合物はないと判断した (2.6.4.3.3.1 項参照).

非絶食のサルに 0.254 mg/kg (S-033188 0.3 mg/kg 相当) 又は 0.846 mg/kg (S-033188 1 mg/kg 相当) の用量の S-033447 を単回静脈内投与したときの血漿中 S-033447 濃度を測定し，PK パラメー

タを求めた. S-033447 の $AUC_{0\text{-}24hr}$ 及び $AUC_{0\text{-}inf}$ は用量に比例して増大し, 各用量における $t_{1/2,z}$, CL_{tot} 及び Vd_{ss} はほぼ一定の値を示したことから，S-033447 を静脈内投与した後の体内動態は，0.846 mg/kg まで線形であった (2.6.4.3.3.2 項参照).

非絶食のサルに 0.3，1 又は 3 mg/kg の用量の S-033188 を単回経口投与したときの血漿中 S-033188 及び S-033447 濃度を測定し，PK パラメータを求めた．S-033447 の C_{max}，$AUC_{0\text{-}24hr}$ 及び $AUC_{0\text{-}inf}$ は用量にほぼ比例して増大し，3 mg/kg まで体内動態は線形であった (2.6.4.3.3.3 項参照)．S-033447 の $AUC_{0\text{-}24hr}$ と S-033447 を 0.254 mg/kg で静脈内投与後の $AUC_{0\text{-}24hr}$ の比で算出される BA は 10.4%～11.5%であった.

絶食 (投与後 10 時間に給餌) 又は非絶食のサルに 1 mg/kg の用量の S-033188 を単回経口投与したときの血漿中 S-033188 及び S-033447 濃度を測定し，PK パラメータを求めた．非絶食下で S-033188 を単回経口投与した後の S-033447 の C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24hr}$ は，絶食下のサルにおける値と比較して，それぞれ 0.18 倍及び 0.21 倍となり，顕著な食餌の影響が認められた (2.6.4.3.3.4 項参照).

絶食 (投与後 8 時間に給餌) の雄性サルに 1 mg/kg の用量の S-033188 を単独又は各種金属イオン [マグネシウム及びアルミニウムの混合物, カルシウム, 鉄又は第 1 相臨床試験 (2.7.1.2.1.1 項参照) で用いた高脂肪食中に含まれる金属イオン量を模した混合物] とともに単回経口投与したときの血漿中 S-033447 濃度を測定し，PK パラメータを求めた．各種金属イオンとともに単回経口投与した後の血漿中 S-033447 の C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}inf}$ は，単独投与における値と比較してそれぞれ 0.48～0.63 倍及び 0.49～0.63 倍となり，金属イオンによる S-033447 の血漿中濃度の減少が認められ，その減少の割合は検討した全ての条件でおおむね同等であった (2.6.4.3.3.5 項参照).

非絶食のインフルエンザウイルス感染モデルマウスに 0.5，1.5，5，15 又は 50 mg/kg の用量の S-033188 を単回経口投与した後 12 時間までの血漿中 S-033188 及び S-033447 濃度を測定し，PK パラメータを求めた．S-033447 の C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}inf}$ は，S-033188 の 0.5～15 mg/kg の範囲で用量にほぼ比例して増大し，体内動態は線形であったが，50 mg/kg では用量比以下の値を示した (2.6.4.3.4.1 項参照).

絶食のフェレットに 10 又は 30 mg/kg の用量の S-033188 を単回経口投与した後の血漿中 S-033447 及び S-033188 濃度を測定し，PK パラメータを求めた．S-033447 の C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}inf}$ は用量比以上に増加した (2.6.4.3.4.2 項参照). また, 血漿中に, S-033447 に相当する量の S-033188 が検出された.

2.4.3.1.2 反復投与

ラット 2 週間反復経口投与毒性試験において，ラットに 20，200 又は 2000 mg/kg/日の用量の S-033188 を 1 日 1 回，2 週間反復経口投与して，投与 1，7 及び 14 日目の血漿中 S-033188 及び S-033447 濃度を測定し，PK パラメータを求めた．S-033447 の C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24hr}$ は，用量の増加に伴い，用量比以下で増大した (2.6.4.3.5.1 項参照)．これら PK パラメータに明らかな雌雄差は認められなかった．投与 7 及び 14 日目の S-033447 の C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24hr}$ は，投与 1 日目のそれらに比べて，1/2～1/3 程度に減少した．C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24hr}$ が減少した要因としては，S-033447 のグルクロン酸抱合や酸化的代謝 (2.6.4.5.2.1 項参照) に関与する UGT 酵素及び CYP 酵素活性

が，2000 mg/kg/日で 2 週間反復経口投与後のラットの肝臓から調整した肝臓のミクロソーム中で上昇していることから (2.6.4.5.2.3 項参照)，S-033447 の代謝に関与する酵素が反復投与により誘導され，S-033447 の代謝が亢進したためと推測している．

ラット 4 週間反復経口投与毒性試験において，ラットに同じ用量の S-033188 を 1 ヵ月間反復経口投与したが，同様の結果が得られた (2.6.4.3.5.2 項参照)．

ラット胚・胎児に関する試験において，非絶食の妊娠ラットに 20，200，又は 1000 mg/kg の用量の S-033188 を胚・胎児の着床から硬口蓋閉鎖までの期間 (妊娠 6 日から妊娠 17 日：12 日間) 反復経口投与して，妊娠 6 日及び妊娠 17 日の血漿中 S-033188 及び S-033447 濃度を測定し，PK パラメータを求めた．妊娠 6 日の 20～1000 mg/kg/日投与群間並びに妊娠 17 日の 20 及び 200 mg/kg/日投与群間の C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24hr}$ は，用量の増加に伴い，用量比以下で増大した (2.6.4.3.5.3 項参照)．妊娠 17 日の 1000 mg/kg/日投与群の C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24hr}$ は，200 mg/kg/日群とほぼ等しかった．1000 mg/kg/日投与群の妊娠 17 日の曝露量は，妊娠 6 日の 1/2 程度に減少したが，20 及び 200 mg/kg/日投与群では，反復投与による影響は認められなかった．1000 mg/kg/日投与群で C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24hr}$ が減少した要因としては，ラット 2 週間反復経口投与毒性試験で前述したように，肝臓における薬物代謝酵素の誘導による S-033447 の代謝亢進であると推察している．

幼若ラット反復経口投与毒性試験において，10 日齢の非絶食の幼若ラットに 20，200 又は 1000 mg/kg の用量の S-033188 を 10～49 日齢の 40 日間反復経口投与して，10，30 及び 49 日齢の血漿中 S-033188 及び S-033447 濃度を測定し，PK パラメータを求めた．10 日齢 (投与 1 日目) における S-033188 の C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24hr}$ は，用量の増加に伴い，用量比以上に増大したが，血漿中 S-033447 の曝露に比べて著しく小さい値であった (2.6.4.3.5.4 項参照)．30 及び 49 日齢 (それぞれ投与 21 及び 40 日目) の血漿中 S-033188 濃度は，ほとんどの測定時点で BLQ (< 0.00500 μg/mL) であった．S-033447 の C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24hr}$ は用量の増加とともに増大したが，その程度は用量比より小さかった．これら PK パラメータに明らかな雌雄差は認められなかった．10 日齢における S-033447 の C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24hr}$ は 30 及び 49 日齢に比べて著しく大きい値であった．反復投与後の S-033447 の C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24hr}$ の著しい減少は，前述した幼若ラットの単回経口投与の結果で 10 日齢の C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24hr}$ が 30 日齢に比べて著しく大きかったことから，ラットの発育に伴う S-033447 の経口吸収性，消失能及び分布容積の変化が原因であると考えられる．

ウサギ胚・胎児発生に関する試験において，非絶食の妊娠ウサギに 30，100 又は 1000 mg/kg/日の用量の S-033188 を胚・胎児の着床から硬口蓋閉鎖までの期間 (妊娠 7 日から妊娠 19 日：約 13 日間) 反復経口投与して，妊娠 7 日及び 19 日の血漿中 S-033188 及び S-033447 濃度を測定し，PK パラメータを求めた．妊娠 7 及び 19 日の S-033447 の C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24hr}$ は，用量の増加に伴い，用量比以下で増大した (2.6.4.3.6.1 項参照)．妊娠 19 日の曝露は妊娠 7 日に比べて同程度又は減少傾向を示した．

非絶食のサルに，サル 2 週間反復経口投与毒性試験では，20，60 又は 200 mg/kg/日の用量の S-033188 を，サル 2 週間反復経口投与毒性試験 (追加) では，3 又は 10 mg/kg/日の用量の S-033188 を 2 週間反復経口投与して，投与 1，7 及び 14 日目の血漿中 S-033188 及び S-033447

濃度を測定し，PK パラメータを求めた．S-033447 の C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24hr}$ は，ほぼ用量の増加に伴い，用量比以下で増大した (2.6.4.3.7.1 項参照)．これらの PK パラメータに明らかな雌雄差は認められなかった．投与 7 及び 14 日目の C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24hr}$ は投与 1 日目の C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24hr}$ に比べ，3 及び 10 mg/kg/日の用量では，おおむね 1～1.5 倍程度に，また 20～200 mg/kg/日の用量では，おおむね 1.5～2 倍程度に増大したが，いずれの用量でも投与 14 日目の C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24hr}$ は投与 7 日目と同程度であった．反復投与後の C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24hr}$ の増加は，反復投与による曝露の積み重なりが影響しており，投与 7 から 14 日目に定常状態に達したと結論した．

サル 4 週間反復経口投与毒性試験において，非絶食のサルに，1，10 又は 100 mg/kg/日の用量の S-033188 を 4 週間反復経口投与して，投与 1, 14 及び 28 日目の血漿中 S-033188 及び S-033447 濃度を測定し，PK パラメータを求めた．S-033447 の C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24hr}$ は，用量の増加に伴い，用量比以下で増大した．これらの PK パラメータに明らかな雌雄差は認められなかった．投与 14 及び 28 日目では，投与 1 日目と同程度または増加傾向を示したが，投与 28 日目では投与 14 日目と同程度の曝露であったことから，反復投与期間の延長による C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24hr}$ の変動は認められなかった．また，4 週間反復経口投与した際の血漿中 S-033447 の C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24hr}$ と用量との関係性は，前述したサル 2 週間反復経口投与した際のそれと類似していることから，再現性が認められた．(2.6.4.3.7.2 項参照).

2.4.3.2 分布

絶食下のラット，サル及びヒトの血清を用いて，[^{14}C]-S-033447 (濃度：50～1000 ng/mL) の *in vitro* タンパク結合率を検討した結果，それぞれ 91.9%～92.1%, 85.0%～89.5%及び 92.9%～93.9% であった (2.6.4.4.1.1 項参照)．また，ヒト血清における [^{14}C]-S-033447 の主結合タンパクはアルブミンであることが明らかとなった．

絶食下のラット，サル及びヒトの新鮮血液を用いて，[^{14}C]-S-033447 (濃度：50～1000 ng/mL) の *in vitro* 血球移行率を検討した結果，それぞれ 57.1%～59.6%，50.4%～52.9%及び 48.5%～54.4% であった (2.6.4.4.1.2 項参照).

非絶食の有色ラットに 1 mg/kg の用量の [^{14}C]-S-033188 を単回経口投与したときの放射能の組織 (メラニン含有組織を含む) 分布を，定量的全身オートラジオグラフィ (QWBA) により検討した．移行性は，ほとんどの組織において良好で，多くの組織中放射能は投与後 1 又は 2 時間で最高濃度に到達した (2.6.4.4.2.1 項参照)．その放射能濃度は，小腸粘膜で最も高く (3350 ng eq./g)，続いて肝臓 (879 ng eq./g)，胃粘膜 (197 ng eq./g)，腎臓皮質 (144 ng eq./g) の順であった．大脳，小脳及び脊髄などの中枢系組織中放射能濃度は測定したいずれの時点でも BLQ (< 8.51 ng eq./g) であった．各組織中の放射能濃度は時間の経過とともに減少し，投与後 24 時間で大部分の組織が BLQ まで減少した．骨中及び肝臓中放射能濃度の消失半減期が長かったが，いずれの組織中放射能濃度も投与後 336 時間には BLQ まで減少したことから，残留性はないと考えられる．メラニン含有組織への放射能の残留性は低いことが示された．

妊娠 18 日のラットに，1 mg/kg の用量の [^{14}C]-S-033188 を単回経口投与したときの放射能の組織分布を QWBA により検討した．多くの組織中放射能濃度は投与後 2 又は 8 時間に最高濃度に到達した (2.6.4.4.2.2 項参照)．しかし，肝臓の放射能濃度は，投与後 1 時間で最高濃度に達し

た．肝臓を含む大部分の組織では，投与後 8 時間以降の消失は速やかで，投与後 24 時間までに BLQ 又は定量下限付近まで減少した．一方，骨の放射能濃度は評価最終時点である投与後 48 時間に最高濃度に達したが，前述したように，有色ラット単回経口投与後の組織分布の結果では，投与後 336 時間までに骨中放射能濃度は BLQ まで減少することが確認されており，妊娠ラットにおいても同様に減少するものと考えられる．胎児の組織中に放射能が検出されたが，その濃度は，血液，骨，皮膚を除き母動物に比べて約 50%以下の値であったことから，S-033188 由来の放射能は胎盤を通過し胎児に分布するが，胎児の各組織への移行性は母動物と比べて低い傾向にあると考えられる．胎児の骨では投与後 48 時間に最高濃度に達するが (327 ng eq./g)，母動物同様，その後減少して行くものと考えられる．また，骨を除く全組織では，投与後 24 時間に BLQ まで減少したことから，胎児の各組織における放射能の残留性は低いと考えている．

2.4.3.3 代謝

2.4.3.3.1 *In vitro* 試験

各種動物に S-033188 を単回経口投与した際，血漿中に S-033188 はほとんど検出されず，加水分解産物の S-033447 が検出された．そこで，ヒト血清に [^{14}C]-S-033188 を 10 µmol/L，あるいは肝臓ホモジネート 9000 g 上清 (S9) 及び小腸 S9 には 100 µmol/L の濃度で添加し，1 時間反応した後の [^{14}C]-S-033447 の生成率を算出した．その結果，S-033188 は，いずれの系においても速やかに加水分解されたことから，ヒト，ラット及びサルに S-033188 を単回経口投与後の血漿中に S-033188 が検出されなかったのは，小腸，門脈血及び肝臓を通過したときに速やかに加水分解されたためであることが示唆された (2.6.4.5.1.1 項参照).

凍結ヒト肝細胞に 5 又は 50 µmol/L の濃度の [^{14}C]-S-033188 又は [^{14}C]-S-033447 を添加し，37°C で 4 時間反応させたときの代謝物を検索した結果，主代謝物として S-033447 が放射能検出器を接続した高速液体クロマトグラフィー (Radio-HPLC) 測定試料の総ピーク面積の約 85%～89%認められ，その他の代謝物として S-033447 グルクロナイド，S-033447 ピロール体のグルクロナイド (推定) 及び S-033447 スルホキシド体 (2 種) が検出された (2.6.4.5.1.2 項参照)．また，50 µmol/L で反応させたときのみ S-033447 ピロール体，S-033447 二酸化体 (推定) 及び S-033447 ケトン体 (推定) も検出された．

ヒト肝 CYP 分子種 (CYP1A2, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 及び CYP3A4) に対する阻害能を評価するため，0.1～100 µmol/L の濃度の S-033188 又は S-033447 をヒト肝ミクロソームに添加して，濃度及び時間依存的な阻害作用について検討した．S-033188 は，CYP2B6, CYP2C8 及び CYP3A4 を濃度依存的に阻害し，その 50%阻害濃度 (IC_{50}) は CYP2B6 では 46.0 µmol/L，CYP2C8 では 63.2 µmol/L，CYP3A4 では 50.2 µmol/L (基質：テストステロン) 及び 23.2 µmol/L (基質：ミダゾラム) であった (2.6.4.5.1.3 項参照)．その他の分子種に対する IC_{50} は ＞100 µmol/L であった．また，いずれの CYP 分子種に対しても時間依存的阻害を示さなかった．S-033447 は CYP2B6 及び CYP3A4 を濃度依存的に阻害し，その IC_{50} は CYP2B6 では 29.3 µmol/L 及び CYP3A4 では 43.2 µmol/L (基質：ミダゾラム) であった．その他の分子種及び CYP3A4 (基質：テストステロン) に対する IC_{50} は ＞100 µmol/L であった．また，いずれの CYP 分子種に対しても時間依存的阻害を示さなかった．

ヒト肝 CYP 分子種 (CYP1A2，CYP2B6 及び CYP3A4) に対する誘導能を評価するため，0.1～3 μmol/L の濃度の S-033188 又は 0.1～30 μmol/L の濃度の S-033447 を凍結ヒト肝細胞 (3 ロット) の培養液中に添加して，72 時間曝露した後の CYP1A2，CYP2B6 及び CYP3A4 の mRNA 発現量並びに酵素活性を測定した．S-033188 は，各 CYP 分子種の mRNA 発現量及び酵素活性に対して誘導作用示さなかった (2.6.4.5.1.4 項参照)．一方，S-033447 は，濃度依存的に各 CYP 分子種の mRNA 発現量を媒体対照群の 2 倍前後に上昇させたものの (CYP1A2: 1.48～2.51 倍，CYP2B6: 0.901～2.22 倍, CYP3A4: 1.62～2.53 倍), これらの誘導作用は陽性対照である 50 μmol/L オメプラゾール (CYP1A2)，1000 μmol/L フェノバルビタール (CYP2B6) 及び 10 μmol/L リファンピシン (CYP3A4) の誘導作用の 20%未満であった．また，S-033447 を 30 μmol/L まで曝露した細胞の酵素活性は，媒体対照を処理した細胞の活性と比べ 2 倍未満であった．以上のことから，ヒトでの CYP 誘導を介した薬物相互作用の可能性は低いことが示唆された．

ヒト UGT 分子種 (UGT1A1, UGT1A3, UGT1A4, UGT1A6, UGT1A9, UGT2B7 及び UGT2B15) に対する阻害能を評価するため，0.1～100 μmol/L の濃度の S-033188 又は 0.03～30 μmol/L の濃度の S-033447 をヒト肝ミクロソームに添加して，UGT 分子種の酵素活性を測定した．S-033188 は，UGT2B15 を濃度依存的に阻害し，その IC_{50} は 94 μmol/L であった (2.6.4.5.1.5 項参照)．また, UGT1A1, UGT1A3, UGT1A4, UGT1A6, UGT1A9 及び UGT2B7 に対する IC_{50} は ＞100 μmol/L であった．一方，S-033447 は，全ての UGT 分子種に対して IC_{50} は ＞30 μmol/L であった．以上のことから，ヒトにおける UGT 阻害能を介した薬物相互作用の可能性は低いことが示唆された．

2.4.3.3.2 *In vivo* 代謝試験

非絶食のラットに 5 mg/kg の用量の [^{14}C]-S-033188 を単回経口投与し，血漿，尿，胆汁及び糞中代謝物を検討した．血漿中放射能は主に S-033447 として存在し (HPLC 測定試料の総ピーク面積の約 80%～90%)，その他の代謝物として，S-033447 グルクロナイド及び S-033447 スルホキシド体 (1 種) が検出された (2.6.4.5.2.1 項参照)．尿中には S-033447，S-033447 グルクロナイド及び S-033447 スルホキシド体 (2 種) が検出されたが，いずれも極めて低い排泄率であった．胆汁中には S-033447 の他，主な代謝物として S-033447 グルクロナイド，S-033447 スルホキシド体 (2 種) 及び S-033447 ピロール体のグルクロナイド (推定) が検出された．糞中の放射能の大部分は S-033447 であり，その他，S-033447 ピロール体及び S-033447 スルホキシド体 (2 種) が検出された．

非絶食のサルに 3 mg/kg の用量の [^{14}C]-S-033188 を単回経口投与した後の，血漿，尿，胆汁及び糞中代謝物を検討した．血漿中放射能は主に S-033447 として存在し (HPLC 測定試料の総ピーク面積の約 60%～80%)，その他の代謝物として S-033447 グルクロナイド及び S-033447 スルホキシド体 (2 種) が検出された (2.6.4.5.2.2 項参照)．尿中には S-033188 及び S-033447 に加えて主な代謝物として，S-033447 グルクロナイド及び S-033447 スルホキシド体 (2 種) が検出された．胆汁中には S-033447 の他，主な代謝物として S-033447 グルクロナイド及び S-033447 スルホキシド体 (2 種)，S-033447 ピロール体のグルクロナイド (推定) が検出された．糞中の大部分は S-033447 であり，その他，S-033188，S-033447 ピロール体，S-033447 スルホキシド体 (2 種) 及び S-033447 酸化体 (2 種，推定) が検出された．これらの代謝物は，2 種の S-033447

酸化体を除いて前述したラット代謝物検索においても認められた.

ラット 2 週間反復経口投与毒性試験において (2.6.6.3.1 項参照), S-033188 を 2000 mg/kg の用量で 2 週間反復経口投与したラットの肝臓から肝ミクロソームを調製し，CYP 含量，CYP (CYP1A，2B，2C 及び 3A) 活性及び UGT 活性 [基質 : *p*-ニトロフェノール，トリヨードサイロニン (T3) 及びサイロキシン (T4)] を測定した．CYP 含量は，媒体対照群と比べて，S-033188 投与群の雄では 1.8 倍，雌では 1.6 倍であった (2.6.4.5.2.3 項参照). CYP1A 活性は雌雄ともに変動は認められず，CYP2C 活性 (雄のみ) はわずかな低下を示すものの大きな変動はないことから，CYP1A 及び CYP2C の誘導はないと判断した．一方，CYP2B 活性は雄で 3.3 倍，雌で 4.6 倍であり，CYP3A 活性は雄で 3.3 倍，雌で 31 倍であり，CYP2B 及び CYP3A の誘導が認められた．*p*-ニトロフェノールグルクロン酸抱合活性は媒体対照群と比べて，S-033188 投与群の雄で 1.1 倍，雌で 1.4 倍であったが，T3 グルクロン酸抱合活性は雄で 2.3 倍，雌で 2.4 倍であり，T4 グルクロン酸抱合活性は雄で 4.4 倍，雌で 5.5 倍であり，UGT の誘導も認められた.

2.4.3.3.3 責任代謝酵素の同定

S-033188 から S-033447 への変換に関与する加水分解酵素を明らかにするために，ヒト肝 S9 及び小腸 S9 における [^{14}C]-S-033188 の加水分解反応に対する各種エステラーゼ阻害剤の影響を検討した．その結果から，S-033188 の加水分解反応にはアリルアセタミドデアセチラーゼ (AADAC) が主に関与していると結論した (2.6.4.5.3.1 項参照).

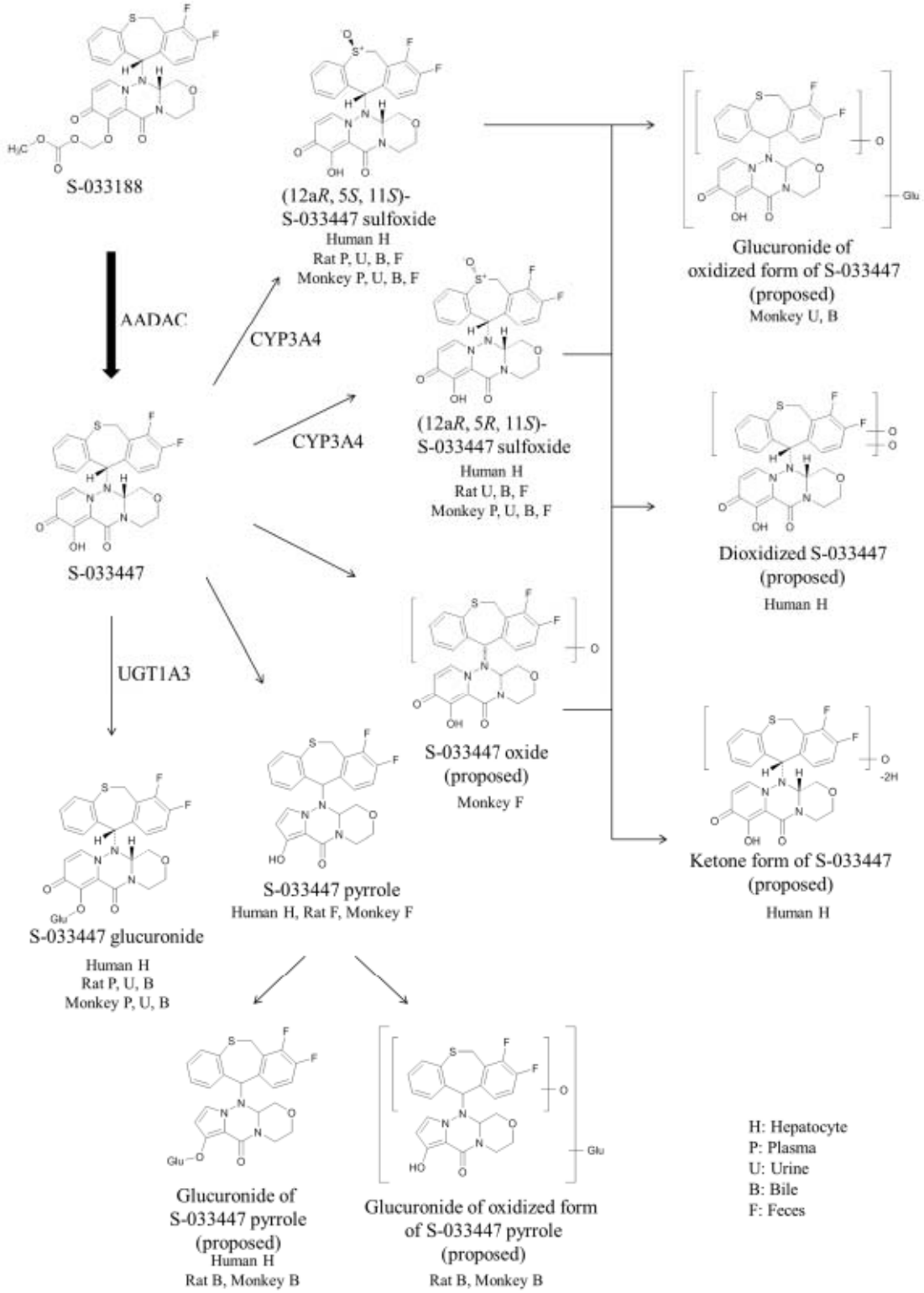
S-033447 のグルクロン酸抱合反応に関与する責任代謝酵素を検討するため，各組換えヒト UGT 分子種 (UGT1A1，UGT1A3，UGT1A4，UGT1A6，UGT1A9，UGT2B7 及び UGT2B15) と [^{14}C]-S-033447 を反応させたときの S-033447 グルクロナイドの生成量を検討した結果，UGT1A3 が主に関与していると結論した (2.6.4.5.3.2 項参照).

S-033447 スルホキシド体の生成に関与する責任代謝酵素を検討するため，組換えヒト CYP 分子種 (CYP1A2, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 及び CYP3A4) と[^{14}C]-S-033447 を反応させたときの S-033447 スルホキシド体の生成量と，ヒト肝ミクロソームと[^{14}C]-S-033447 の反応系に各 CYP 分子種に対する阻害剤を共存させたときの阻害率を検討した結果，CYP3A4 が主に関与していると結論した (2.6.4.5.3.3 項参照).

2.4.3.3.4 推定代謝経路

ヒト *in vitro* 代謝物，ラット，及びサル *in vivo* 代謝物の検索結果から推定した S-033188 の主な代謝経路を図 2.4.3-1 に示す.

図 2.4.3-1　S-033188 の推定代謝経路



2.4.3.4 排泄

非絶食のラットに 1 mg/kg の用量の [^{14}C]-S-033188 を単回経口投与したときの，尿及び糞中排泄を検討した結果，投与後 168 時間までの尿及び糞中への放射能排泄率は，それぞれ投与量

の 0.4%及び 96.6%であった (2.6.4.6.1.1 項参照). したがって，ラットにおける [^{14}C]-S-033188 の主排泄経路は糞中であることが明らかとなった．胆管カニュレーションを施した非絶食のラットに 1 mg/kg の用量の [^{14}C]-S-033188 を単回経口投与した後の尿，糞及び胆汁中排泄を検討した結果，投与後 48 時間までの尿，糞及び胆汁中への放射能の排泄率は，それぞれ投与量の 0.6%，55.7%及び 18.5%であった．これら結果から，ラットに吸収された [^{14}C]-S-033188 の主排泄経路は胆汁を介した糞中排泄であると結論した．

胆管カニュレーションを施したラットを用い，ドナーラットの胆汁がレシピエントラットの十二指腸管腔内に流入するように連結後，ドナーラットに 1 mg/kg の用量の [^{14}C]-S-033188 を，単回経口投与した後の放射能の腸肝循環について検討した．投与した放射能の 1.4%がドナーラットの胆汁を介してレシピエントラットに再吸収され，腸肝循環率はレシピエントラットに移行した放射能 (投与した放射能の 21.2%) の 4.2% (投与した放射能の 0.9%) であった (2.6.4.6.1.2 項参照). これらの結果から，S-033188 の体内動態に及ぼす腸肝循環の影響が認められるが，腸肝循環率はドナーラットに投与した放射能に対して 0.9%であり，その影響は小さいと考えている．

非絶食の授乳ラットに，1 mg/kg の用量の [^{14}C]-S-033188 を単回経口投与したときの放射能の乳汁移行性を検討した．授乳ラットの血漿中及び乳汁中放射能は，投与後 1 時間に C_{max} に到達し，投与後 24 時間には検出下限未満まで減少した (2.6.4.6.1.3 項参照). 乳汁中放射能は，投与後 2 時間以降から減少し，投与後 4 及び 8 時間における血漿中放射能濃度に対する乳汁中放射能濃度の比は約 7 と一定で，血漿中放射能濃度と同じ速度で減少した．投与後 24 時間には検出下限未満まで減少した．以上の結果から，S-033188 及びその代謝物は乳汁中に移行するが，その後血漿中濃度と同様に消失し，乳汁中に残留しないと考えている．

非絶食のサルに 3 mg/kg の用量の [^{14}C]-S-033188 を単回経口投与したときの，尿及び糞中排泄を検討した結果，投与後 168 時間までの尿及び糞中への放射能排泄率は，それぞれ投与量の 1.0%及び 94.4%であった (2.6.4.6.2.1 項参照). したがって，サルにおける [^{14}C]-S-033188 の主排泄経路は糞中であることが明らかとなった．胆管カニュレーションを施した非絶食のサルに，[^{14}C]-S-033188 を 3 mg/kg の用量で単回経口投与した後の尿，糞及び胆汁中排泄を検討した結果，投与後 72 時間までの尿，糞及び胆汁中への放射能の排泄率は，それぞれ投与量の 1.2%，89.5%及び 8.5%であった．投与放射能の総回収率 (消化管内容物及びケージ洗浄分を含む) は 99.6%であった．これらの結果から，サルに吸収された [^{14}C]-S-033188 の主排泄経路は胆汁を介した糞中排泄であると結論した．

2.4.3.5 薬物動態学的相互作用

S-033188 及び S-033447 が P-gp 及び breast cancer resistance protein (BCRP) に対する基質であるか否かを検討するために，P-gp 及び BCRP を発現する Caco-2 細胞 (ヒト結腸直腸腺癌由来株化細胞) を用いて評価した．[^{14}C]-S-033188 又は[^{14}C]-S-033447 の細胞の頂側膜側 (管腔側) から基底膜側 (血管側) へのみかけの膜透過係数 (P_{app}) に対する基底膜側から頂側膜側への P_{app} の比率 (P_{app} ratio) は，4.4～6.3 であった (2.6.4.7.1 項参照). 一方，P-gp 阻害剤のベラパミル存在下では [^{14}C]-S-033188 及び [^{14}C]-S-033447 の P_{app} ratio は顕著に減少したが，BCRP 阻害剤の Ko143

存在下では減少しなかった．したがって，S-033188 及び S-033447 は P-gp の基質であるが BCRP の基質でないと判断した．

S-033447 が OATP1B1 及び OATP1B3 の基質であるか否かを検討するために，OATP1B1 又は OATP1B3 発現 HEK293 細胞（ヒト胎児腎臓株化細胞）及び親細胞における [^{14}C]-S-033447 の細胞内取り込み量を比較し評価した．OATP1B1 又は OATP1B3 発現細胞への取り込み量は親細胞と差はみられなかった（2.6.4.7.1 項参照）．したがって，S-033447 は OATP1B1 及び OATP1B3 の基質でないと判断した．

S-033188 の P-gp 及び BCRP を介した典型的基質輸送に対する阻害作用の有無を Caco-2 細胞を用いて評価した．S-033188 の P-gp に対する IC_{50} は 8.75 μmol/L であったが，S-033188 は BCRP に対して評価した最高濃度（78.1 μmol/L）においても 50%以上の阻害作用を示さなかった（2.6.4.7.2 項参照）．S-033447 の P-gp，BCRP，OATP1B1，OATP1B3，有機アニオントランスポーター（OAT）1，OAT3，有機カチオントランスポーター（OCT）1，OCT2，multidrug and toxin extrusions (MATE) 1 及び MATE2-K を介した典型的基質輸送に対する阻害作用の有無を Caco-2 細胞もしくは各トランスポーター発現 HEK293 細胞を用いて評価した．S-033447 の BCRP，OATP1B1，OCT1，MATE1 及び MATE2-K に対する IC_{50} はそれぞれ 7.10 μmol/L，6.81 μmol/L，6.52 μmol/L，11.2 μmol/L 及び 1.91 μmol/L であった．一方，S-033447 は，P-gp，OATP1B3，OCT2，OAT1 及び OAT3 に対して評価した最高濃度（P-gp: 20.9 μmol/L，OATP1B3，OCT2，OAT1 及び OAT3: 20.4 μmol/L）においても 50%以上の阻害作用を示さなかった．

S-033447 の胆汁酸排出トランスポーター（BSEP）を介した典型的基質輸送に対する阻害作用を BSEP 発現 Sf9 細胞（昆虫細胞）から調製した細胞膜ベシクルを用いて評価した．BSEP の基質の輸送に対する S-033447 の阻害作用を評価した結果，いずれの濃度においても BSEP 活性は阻害されなかった（2.6.4.7.3 項参照）．

ヒト血清における[^{14}C]-S-033447 の主結合タンパクであるアルブミン（2.6.4.4.1.1 項参照）における S-033447 の結合部位を各結合部位にそれぞれ特異的に結合するワルファリン（部位 I），ジアゼパム（部位 II）及びジゴキシン（部位 III）を用いて検討したが，各薬物又は S-033447 のタンパク結合率が変化しなかったことから，明らかにならなかった（2.6.4.7.4 項参照）．

2.4.3.6 その他の薬物動態試験

S-033188 及び S-033447 の *in vitro* 溶解性及び膜透過性を評価した結果，S-033188 は低溶解性・高膜透過性，S-033447 は低溶解性・中膜透過性の化合物に分類されると判断した（2.6.4.8 項参照）．

2.4.4 毒性試験

2.4.4.1 単回投与毒性試験

S-033188 について急性毒性を評価するための独立した単回投与毒性試験を実施していない．ラット及びサル 2 週間反復経口投与毒性試験並びにサル心血管系に関する安全性薬理試験における S-033188 の高用量投与時の成績を基に，S-033188 の急性毒性を考察した．

ラット 2 週間反復経口投与毒性試験（投与量：20，200 及び 2000 mg/kg/日）及びサル 2 週間

反復経口投与毒性試験 (投与量：20，60 及び 200 mg/kg/日) において，死亡例及び切迫殺例は発生せず，初回投与時に急性毒性の発生を示唆する一般状態変化は認められなかった (2.6.6.3.1 及び 2.6.6.3.3 項参照)．雄性サルを用いた心血管系試験 (投与量：200 及び 400 mg/kg 単回経口投与) において，200 mg/kg 以上を単回経口投与した際の一般状態変化として，軟便・下痢又は嘔気・嘔吐が観察されたが (2.6.2.4.2.3 項参照)，死亡例及び切迫殺例は発生しなかった．以上のことから，単回投与における概略の致死量は各試験の最高用量 (ラット，2000 mg/kg；サル，400 mg/kg) を超えると判断した．

2.4.4.2 反復投与毒性試験

ラット 2 週間反復経口投与毒性試験 [各群雌雄各 10 例．投与量：0 (対照群)，20，200 及び 2000 mg/kg/日] では，死亡例及び切迫殺例は発生しなかった (2.6.6.3.1 項参照)．200 mg/kg/日以上の投与群にプロトロンビン時間 (PT) 及び活性化部分トロンボプラスチン時間 (APTT) の延長がみられたが，食餌中に含まれるビタミン K_1 不足を原因とするラットで起こりやすい変化であると考えられる．20 mg/kg/日以上の投与群で肝重量の増加及び肝細胞肥大，甲状腺濾胞上皮細胞の過形成，甲状腺のコロイド減少又は下垂体の好塩基性細胞の肥大が認められたが，これらの変化は肝臓の CYP 含量の増加を伴う CYP2B，CYP3A 及び UGT 活性の上昇と関連して起こったラットに特異的な甲状腺ホルモン (T3/T4) のクリアランスの増加に伴う代償性の変化であると考えられる．各種検査において S-033188 投与に起因する変化が認められたが，いずれも程度が軽度であり病理組織学的検査において関連組織に変性や壊死などが認められないこと，さらに，ヒトへの外挿性に乏しいことから，いずれも毒性学的意義のない変化と考えられ，本試験条件下での無毒性量は，雌雄ともに 2000 mg/kg/日と判断した．

ラット 4 週間反復経口投与毒性試験 [各群雌雄各 10 例．投与量: 0 (対照群)，20，200 及び 2000 mg/kg/日] では，死亡例及び切迫殺例は発生しなかった (2.6.6.3.2 項参照)．2 週間反復経口投与毒性試験で認められた変化と類似の変化が認められたが，投与期間を延長したことによる変化の程度の増悪及び頻度の増加は認められなかった．したがって，ラット 2 週間反復経口投与毒性試験と同様に，いずれも毒性学的意義のない変化と考え，本試験条件下での無毒性量は，雌雄ともに 2000 mg/kg/日と判断した．

サル 2 週間反復経口投与毒性試験 [各群雌雄各 3 例．投与量：0 (対照群)，20，60 及び 200 mg/kg/日] では，死亡例及び切迫殺例は発生しなかった (2.6.6.3.3 項参照)．S-033188 投与各群でアラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT)，グルタミン酸脱水素酵素 (GLDH)，ロイシンアミノペプチターゼ (LAP)，γ-グルタミルトランスフェラーゼ (GGT) 活性等の肝・胆道系への影響を示唆する血液化学パラメータの上昇が認められた．病理組織学的検査において肝臓及び胆のうに S-033188 投与に起因する変化は認められなかったものの，上記の血液化学パラメータ値の上昇を示した個体の発生頻度が高く，また程度が大きかったことから，無毒性量は雌雄ともに 20 mg/kg/日未満と判断した．

上述の試験で無毒性量が認められなかったことから，より低用量で追加のサル 2 週間反復経口投与毒性試験 [各群雌雄各 3 例．投与量：0 (対照群)，3 及び 10 mg/kg/日] を実施した．死亡例及び切迫殺例は発生しなかった．血液化学的検査において，10 mg/kg 投与群で雌雄全例に変

化は認められなかった (2.6.6.3.4 項参照). 3 mg/kg/日投与群の 6 例 (雌雄各 3 例) 中雌 1 例にのみ肝・胆道系への影響を示唆する血液化学パラメータ値の上昇が認められたが，用量依存性がなく，1 例のみの変化であることから，毒性学的意義は乏しいと判断した．前述のサル 2 週間反復経口投与毒性試験の結果と合わせて，無毒性量は雌雄ともに 10 mg/kg/日と判断した．

サル 4 週間反復経口投与毒性試験 [各群雌雄各 3 例．投与量：0 (対照群)，1，10 及び 100 mg/kg/日] では，死亡例及び切迫殺例は発生しなかった (2.6.6.3.5 項参照)．血液化学的検査において，100 mg/kg 投与群でアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST), ALT, GLDH, LAP 又は GGT 活性の上昇がみられた．これらの変化は休薬 1 週目から回復傾向を示し，4 週間の休薬期間終了時には回復した．無毒性量は雌雄ともに 10 mg/kg/日と判断した．肝・胆道系への影響を詳細に検討するため，サル 4 週間反復経口投与毒性試験の肝臓試料を用いて，電子顕微鏡検査を実施した．その結果，いずれの投与群においても肝細胞の微細構造に異常所見は認められなかった．

2.4.4.3 遺伝毒性試験

S-033188 及び S-033447 の復帰突然変異誘発性を評価するため，ネズミチフス菌 (TA98, TA100, TA1535 及び TA1537) 並びに大腸菌 (WP2*uvrA*) の 5 菌株を用い，代謝活性化系 (S9 mix) の非存在及び存在下の条件でプレート法により試験を実施したところ，S-033188 及び S-033447 による復帰突然変異は誘発されなかったため，陰性と判断した (2.6.6.4.1 及び 2.6.6.4.2 項参照).

S-033188 及び S-033447 の染色体異常誘発性を評価するため，ヒトリンパ芽球由来 TK6 培養細胞を用いて，サイトカラシン B 法による *in vitro* 小核試験を，S9 mix 非存在及び存在下での 3 時間処理 (処理後 24 時間再培養) 及び 24 時間連続処理条件で実施したところ，S-033188 及び S-033447 による小核細胞の出現は誘発されなかったため，陰性と判断した (2.6.6.4.3 及び 2.6.6.4.4 項参照).

S-033188 の *in vivo* における染色体異常誘発性を評価するため，ラットを用いて小核試験 [各群雄 5 例．投与量：0 (対照群)，500，1000 及び 2000 mg/kg/日．1 日 1 回 2 日間経口投与] を実施した．多染性赤血球中の小核を有する細胞の出現頻度及び全赤血球中の多染性赤血球比は，陰性対照群と有意差がなく，骨髄細胞の増殖抑制は認められなかったことから陰性と判断した (2.6.6.4.5 項参照).

2.4.4.4 がん原性試験

S-033188 は臨床での使用が 1 回投与であること，S-033188 及び S-033447 の遺伝毒性試験の結果が全て陰性であったこと並びに特定組織への蓄積性及び残留性が認められなかったことから，S-033188 及び S-033447 ががん原性を有する可能性は極めて低いと考え，がん原性試験は実施しなかった．

2.4.4.5 生殖発生毒性試験

ラット受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験 [各群雌雄各 20 例．投与量： 0 (対照群)，20，200 及び 1000 mg/kg/日] では，死亡例及び切迫殺例は発生しなかった (2.6.6.6.1 項参

照). 雌雄親動物のいずれの検査項目にも毒性変化は認められず，胚発生に関する検査項目についても S-033188 投与に起因する変化は認められなかった．無毒性量は，雌雄親動物並びに初期胚に関して，いずれも 1000 mg/kg/日と判断した．

ラット胚及び胎児発生に関する試験 [各群 20 例．投与量：0 (対照群)，20，200 及び 1000 mg/kg/日] では，死亡例及び切迫殺例は発生しなかった (2.6.6.6.2 項参照)．200 mg/kg/日以上の投与群で母動物の摂餌量の減少を伴う体重増加抑制が認められたが，これらの変化は軽度で投与初期のみに認められた変化であることから毒性ではないと判断した．胚・胎児の生存性及び子宮内発育並びに外表，内臓，及び骨格の形態において，S-033188 投与に起因する変化は認められなかった．無毒性量は，母動物並びに胚・胎児に関して，いずれも 1000 mg/kg/日と判断した．

ウサギ胚・胎児発生に関する試験 [各群 18 から 20 例．投与量： 0 (対照群)，30，100 及び 1000 mg/kg/日] では，死亡例及び切迫殺例は発生しなかった (2.6.6.6.3 項参照)．1000 mg/kg/日投与群の 2 例に流産が認められた．1000 mg/kg/日投与群で，母動物への投与初期に摂餌量の減少を伴う体重増加抑制が認められた．胚・胎児には，催奇形性は認められなかったが，1000 mg/kg/日投与群で頸部過剰肋骨発現率の増加が認められた．無毒性量は，母動物並びに胚・胎児に関して，いずれも 100 mg/kg/日と判断した．

ラットの出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験 [各群 20 から 22 例．投与量：0 (対照群)，20，200 及び 1000 mg/kg/日] では，F0 母動物に S-033188 投与に起因する変化は認められなかった．一方，16～20 日齢の一部の F1 動物において前眼房出血を起因とする一般症状及び病理所見が認められた．しかし，その発生頻度は低く (200 mg/kg/日投与群の 1.1%，1000 mg/kg/日投与群の 2.4%)，眼科的検査において所見が認められた F1 児以外の児に出血を示唆する変化は一切認められなかったこと，さらに，F1 動物への S-033188 及び S-033447 の曝露がより高いと予想される幼若ラットにおける反復経口投与毒性試験において (後述)，眼球の出血及び異常所見は認められなかったことから，S-033188 投与に起因する変化ではないと判断した．母動物並びに次世代の発生に関する無毒性量はいずれも 1000 mg/kg/日と判断した．

幼若ラット反復経口投与毒性試験 [各群雌雄各 12 例．投与開始：10 日齢，投与量：20，200 及び 1000 mg/kg/日，投与期間：40 日間] では，死亡例及び切迫殺例は発生しなかった (2.6.6.6.5 項参照)．1000 mg/kg/日投与群の雌雄で 11 及び 12 日齢 (投与 2 及び 3 日目) のみに腹部膨満が認められたが，一過性の変化であり剖検時に腹部に異常は認められなかったことから毒性ではないと判断した．50 日齢 (最終投与日翌日) の血液学的検査において，200 mg/kg/日以上の群の雌雄に S-033188 投与に起因する変化として血小板数 (PLT) の増加又は APTT の延長が認められた．これらの変化は軽度であること，並びに一般状態及び病理組織学的検査に関連変化がないことから毒性ではないと判断した．病理組織学的検査において 200 mg/kg/日以上の群の雌雄において甲状腺濾胞上皮細胞の肥大がみられたが，軽微な変化であり，ラット反復経口投与毒性試験で述べたように，これらの変化は肝臓の CYP 含量の増加を伴う CYP2B，CYP3A 及び UGT 活性の上昇と関連して起こったラットに特異的な代償性の変化であると考え，毒性ではないと判断した．無毒性量は 1000 mg/kg/日と判断した．

2.4.4.6 局所刺激性試験

該当する試験なし.

2.4.4.7 その他の毒性試験

ラット 2 週間反復経口投与毒性試験において認められた PT 及び APTT の延長は，S-033188 投与により何らかの原因でビタミン K が不足したことによると考えられるが，当該試験は高圧蒸気滅菌によりビタミン K 含量が減少した食餌の摂取，かつ剖検前絶食によりビタミン K の摂取量が低下した条件で実施していることから，通常よりも PT 及び APTT の延長の程度が大きくなったと推測された．そこで，ビタミン K_1 併用投与並びに剖検前の給餌の有無による PT 及び APTT の延長に対する影響を調べた．S-033188 とビタミン K_1 の併用投与群 (以後，S-033188 経口投与量/ビタミン K_1 皮下投与量で表記する) として，0/0 mg/kg/日群，2000/0 mg/kg/日群及び 2000/0.3 mg/kg/日群を設定し，剖検前の絶食による影響を調べるために，0/0 mg/kg/日群及び 2000/0 mg/kg/日群には剖検前絶食群及び剖検前非絶食群を設定した (各群雄 5 例)．対照群には媒体を同様に投与した．死亡例及び切迫殺例は発生しなかった (2.6.6.8.1 項参照)．その結果，剖検前の摂餌により PT 及び APTT の延長は軽減され，ビタミン K_1 の併用投与時により，PT 及び APTT の延長は回復した．したがって，S-033188 投与による PT 及び APTT の延長はビタミン K 不足に起因しており，ビタミン K 摂取量が減少した条件下でより顕著になる変化であることが確認された.

ヘアレスマウス皮膚光毒性試験では，S-033188 をヘアレスマウスに 0 (対照群) 又は 1000 mg/kg の用量で単回経口投与し，皮膚光毒性評価を実施した．また，S-033188 を全身曝露したときの皮膚光毒性を評価するため，0 (対照群)，10，30 又は 100 mg/kg の用量を単回腹腔内投与した．S-033188 投与群 (各群 15 例) については 10 例の UV 照射群と 5 例の非照射群を，対照群 (各群 15 例) には 5 例の UV 照射群と 5 例の非照射群を設定した．死亡例及び切迫殺例は発生しなかった (2.6.6.8.2 項参照)．全ての S-033188 投与群において，S-033188 投与による光毒性は認められなかった.

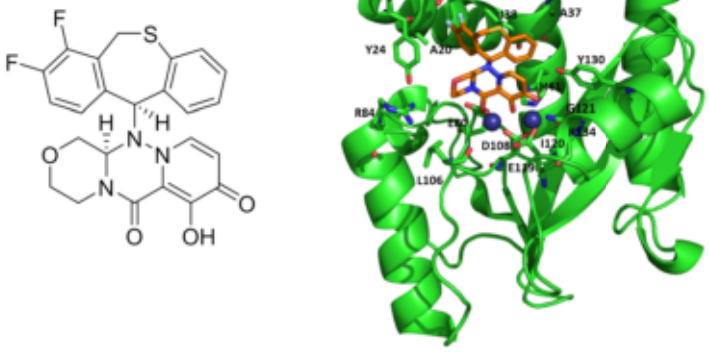
2.4.5 総括及び結論

2.4.5.1 薬理試験

2.4.5.1.1 発見の経緯と作用機序

S-033447 の標的酵素である CEN は，“cap-snatching” と呼ばれるインフルエンザウイルスに特徴的なウイルス遺伝子の転写反応機構 (図 2.6.2.2-1) に必須の酵素である．ヒトは遺伝子の転写反応機構がインフルエンザウイルスのそれと異なっており，また CEN がコードされている PA に相同する遺伝子を有していないことから，CEN はインフルエンザウイルスに選択的に作用する抗ウイルス薬の標的として長年研究されてきた．S-033447 は，塩野義製薬によって見出された，CEN 活性を阻害する新しい化合物である．インフルエンザウイルス由来の組換え RNA ポリメラーゼ複合体及びインフルエンザウイルス感染細胞を用いた検討から，S-033447 がインフルエンザウイルスの CEN 活性を選択的に阻害することにより，ウイルス遺伝子の転写反応を阻害することを明らかにした (2.6.2.2.1.2 項)．これまでに得られた検討結果から，S-033447 のインフルエンザウイルスに対する増殖抑制の作用機序は，ウイルス遺伝子の転写反応阻害によりウイルス粒子を構成するウイルスのタンパク質や vRNA の産生が抑制され，それらの結果として子孫ウイルスの産生が抑制されることであると考えられる．S-033188 は，S-033447 の環状構造に化学修飾を加えることでプロドラッグ化した化合物であり，2.6.2.2.1.2 項で示したように，S-033188 そのものは CEN 阻害効果を有さず，生体内でエステラーゼによる加水分解を受けて S-033447 に変換されることで CEN 阻害効果を発揮している．S-033447 と PA とのドッキングモデル (図 2.4.5.1-1) から，A20，M21，Y24，E26，K34，A37，I38，H41，E80，R84，L106，D108，E119，I120，G121，Y130 及び K134 (A 型 H1N1pdm の配列を基準に記載) の 17 個のアミノ酸残基が S-033447 と相互作用する可能性が高いと考えられる [9]．S-033447 が有するフェノール性水酸基及び隣接するカルボニル基は CEN の活性中心において補酵素として機能するメタルイオンを介して，H41，E80，D108 及び E119 と相互作用すると考えられ，S-033447 の疎水性 3 環構造は CEN の疎水性ポケットを形成する A20，M21，Y24，A37 及び I38 と相互作用すると考えられる．S-033447 は，主にこれらの相互作用により基質となる宿主細胞由来の mRNA 前駆体と競合することによって，CEN 阻害効果を示すと考えている．

図 2.4.5.1-1　　S-033447 の化学構造及び PA の N 末端ドメインと結合したドッキングモデル



National Center for Biotechnology Information データベース [9] によれば，これら 17 個のアミノ酸残基は，A 型 H1N1 亜型と A 型 H3N2 亜型の間で共通である (表 2.4.5.1-1)．また，A 型と B 型の間においては，これらのアミノ酸残基のうち，20，24，34，37 及び 120 番目の 5 つのアミノ酸残基には違いが認められるものの，残りのアミノ酸残基は共通である．さらに，同データベースから，これらのアミノ酸残基に対する変異体の頻度は，A 型 H3N2 亜型の N 末端から 20 番目のアミノ酸のスレオニンの 1.3%が最大であるが，おおむね 1%を下回っていることから，これらのアミノ酸残基に対する変異体が自然界に存在する頻度は低いと考えられる．以上の結果から，S-033447 は，A 型 H1N1 亜型，A 型 H3N2 亜型及び B 型インフルエンザウイルスのいずれに対しても作用し得ると考えられる．

表 2.4.5.1-1　　PA の N 末端ドメインの 17 アミノ酸残基のインフルエンザウイルスの型間又は亜型間における保存性

PA の N 末端ドメインのアミノ酸番号[a]	A 型 H1N1 亜型 (n = 6569)		A 型 H3N2 亜型 (n = 5319)		B 型 (n = 1997)	
	アミノ酸	置換アミノ酸と検出頻度[b]	アミノ酸	置換アミノ酸と検出頻度[b]	アミノ酸	置換アミノ酸と検出頻度[b]
20	A	T: 0.80	A	T: 1.30	T	A: 0.05
21	M	–	M	–	M	–
24	Y	H: 0.11	Y	H: 0.06	F	–
26	E	–	E	–	E	–
34	K	R: 0.03	K	R: 0.02	M	V: 0.31
37	A	S: 0.03	A	–	N	–
38	I	V: 0.06	I	M: 0.04	I	–
41	H	–	H	–	H	–
80	E	T: 0.02	E	–	E	D: 0.05
84	R	G: 0.05	R	K: 0.04	R	–
106	L	I: 0.03	L	–	L	–
108	D	–	D	N: 0.02	D	–
119	E	–	E	–	E	–
120	I	V: 0.03	I	V: 0.04	V	I: 0.10
121	G	–	G	–	G	–
130	Y	–	Y	–	Y	–
134	K	E: 0.03	K	T: 0.02	K	–

– No substitutions

a A 型 H1N1pdm の配列を基準

b 最も頻度の高いアミノ酸置換体とその検出頻度 (数値は%を表す)

(参考文献 9 記載の表を改変して使用)

2.4.5.1.2 *In vitro* 活性

S-033447 は，A 型及び B 型インフルエンザウイルスの CEN 活性に対して阻害効果を示し，その IC_{50} はそれぞれ 1.4～3.1 nmol/L 及び 4.5～8.9 nmol/L であった (2.6.2.2.1.1 項)．また，ウイルスを感染させた MDCK 細胞の培養細胞上清中への子孫ウイルスの放出に対する抑制効果を評価した試験では，S-033447 は，A 型及び B 型インフルエンザウイルス実験室株に対して，オセルタミビル活性体などの NA 阻害薬やファビピラビルなどの既存薬よりも強力なウイルス増殖抑制効果 (EC_{90}：それぞれ 0.46～0.98 nmol/L 及び 2.21～3.40 nmol/L) が示されている

(2.6.2.2.1.4 項). また，2006 年から 2013 年の間に日本国内で分離された A 型及び B 型インフルエンザウイルス臨床株に対しても，ウイルス増殖抑制効果 (EC_{90}：それぞれ 0.63～0.95 nmol/L 及び 6.10～6.48 nmol/L) を示した (2.6.2.2.1.5 項). さらに，MDCK 細胞におけるプラーク形成に対する抑制効果を検討した試験では，S-033447 は，A 型及び B 型インフルエンザウイルス実験室株に対して，ウイルス放出に対する抑制効果と同程度のウイルス増殖抑制効果 (EC_{50}：それぞれ 0.35～0.76 nmol/L 及び 4.33～4.85 nmol/L) が示された (2.6.2.2.1.6 項). その作用は，2006 年から 2014 年の間に日本国内で分離された A 型及び B 型インフルエンザウイルス臨床株 (EC_{50}：それぞれ 0.20～1.55 nmol/L 及び 3.33～11.26 nmol/L) (2.6.2.2.1.7 項) や，2004 年以降に WHO がワクチン株として推奨した A 型及び B 型インフルエンザウイルス株 (EC_{50}：それぞれ 0.74～1.87 nmol/L 及び 9.24～13.00 nmol/L) に対しても認められたことから (2.6.2.2.1.8 項)，S-033447 のウイルス増殖抑制効果は，インフルエンザウイルス株の分離された年代や地域によらず発揮されると考えられる．S-033447 の CEN 阻害効果及びウイルス増殖抑制効果は，A 型 H1N1 亜型及び A 型 H3N2 亜型に対しては同等であったが，B 型に対する効果と比べて，より強かった．

表 2.4.5.1-1 で示したように，S-033447 と相互作用すると考えられる活性中心のアミノ酸残基は A 型と B 型で共通であった．一方，S-033447 と相互作用すると考えられる A 型と B 型の疎水性ポケットのアミノ酸残基は 5 個のアミノ酸残基うち 3 個が異なっていた．これらのアミノ酸残基のうち，A 型の A20 及び A37 は非極性アミノ酸であるのに対して，B 型の T20 及び N37 は極性アミノ酸であるため，B 型の疎水性ポケットは A 型と比べて極性が高く，S-033447 の疎水性 3 環構造は，疎水性が高い A 型の方が B 型よりも強固な疎水性相互作用を形成すると考えられる．これらのことから，S-033447 は，A 型及び B 型インフルエンザウイルスの両方の PA に対して相互作用するものの，B 型の PA よりも A 型の PA に対して強い相互作用を示すと考えてられる．また，これらの相互作用により，S-033447 は，その相互作用の強さを反映した CEN 阻害効果を示すことで，ウイルス放出抑制効果及びプラーク形成抑制効果を示すと考えている．S-033447 の細胞傷害作用を，4 種類の培養細胞を用いた試験系及び 9 種類のヒト組織由来株化細胞を用いた試験系で検討した結果，細胞傷害作用を示す濃度 (CC_{50} 又は IC_{50}) は > 2 μmol/L であり，*in vitro* 試験で観察されたウイルス放出抑制効果，プラーク形成抑制効果又はウイルス増殖に起因した細胞変性への抑制効果を示す濃度 (おおむね < 10 nmol/L) との間に十分な乖離がみられた．以上のことから，S-033447 は，今回 *in vitro* 試験に用いたヒト各種組織由来株化細胞に対して選択的な細胞傷害作用を示さないことが明らかとなった．

2.4.5.1.3 *In vivo* 活性

非臨床では，非致死量のインフルエンザウイルスを接種した 5 日後に投与を開始するモデルを使用し，マウス肺内ウイルス力価を指標に，抗ウイルス効果を示す用量を検討した．また，重篤なインフルエンザウイルス感染症患者においては死に至る場合もあることから，致死量のインフルエンザウイルスを接種したモデルを使用し，致死率を改善し，生存期間の延長が認められる用量を検証した．さらに，インフルエンザウイルス感染フェレットモデルを用い，インフルエンザウイルス感染に起因する体温上昇の抑制効果が認められるかを検証した．

A 型及び B 型インフルエンザウイルス実験室株又は臨床分離株の非致死量を接種した 5 日後に投与を開始するマウスモデルにおいては，S-033188 の 1～100 mg/kg (0.5～50 mg/kg BID) を 1 日経口投与することにより，投与開始から 24 時間後のマウス肺内ウイルス力価を用量依存的に低下させることが示された (2.6.2.2.4.2 項～2.6.2.2.4.5 項)．さらに，S-033188 を 30 mg/kg (15 mg/kg BID) で 1 日経口投与した群は，オセルタミビルリン酸塩を臨床用量相当 [10 mg/kg (5 mg/kg BID)] で 1 日経口投与した群に比して，肺内ウイルス力価が約 1/10 以下に低下した．

A 型及び B 型インフルエンザウイルス実験室株の致死量を接種し，直後に S-033188 の投与を開始するマウスモデルにおいては，10 mg/kg (5 mg/kg BID) の 1 日経口投与により，マウスは全例生存し，オセルタミビルリン酸塩を臨床用量相当で 5 日間反復経口投与したときよりも致死率が改善し，生存期間が有意に延長した (2.6.2.2.4.8 項，2.6.2.2.4.9 項)．

A 型インフルエンザウイルス臨床分離株の非致死量を接種したフェレットモデルにおいて，S-033188 を 10 mg/kg BID の 1 日経口投与 (血漿中 S-033447 の曝露がマウスモデルにおける 5～15 mg/kg BID での 1 日経口投与時の曝露に相当) では，オセルタミビルリン酸塩を臨床用量相当で 2 日間反復経口投与したときを上回る鼻腔洗浄液内ウイルス力価の低下作用及び体温上昇抑制効果が認められた (2.6.2.2.4.12 項)．

これらの結果から，S-0331888 は，感染ウイルスの型や亜型を問わず，S-033447 の *in vitro* 活性に応じた肺内ウイルス力価の低下作用を示すと考えている．さらに，S-033188 は，オセルタミビルリン酸塩投与を上回る肺内ウイルス力価の低下作用を示す用量で，インフルエンザウイルス感染に起因する致死率の改善効果及び体温上昇の抑制効果を示すと考えている．

2.4.5.1.4 NA 阻害薬耐性を示すインフルエンザウイルスに対する効果

NA/H274Y のアミノ酸変異により NA 阻害薬に対して耐性となる A 型 H1N1 亜型のインフルエンザウイルスは，2008～2009 年のシーズンに日本全国で流行した．2009 年以降に主流となった A 型 H1N1 亜型のインフルエンザウイルスパンデミック株においても，NA/H274Y の検出例が確認されている [10]．NA 阻害薬とは異なる作用機序を有する S-033447 は，NA/H274Y 変異を有する A 型 H1N1 亜型のインフルエンザウイルスに対して，その野生株と同等の *in vitro* ウイルス増殖抑制効果を発揮した (2.6.2.2.1.9 項)．また，S-033447 は同変異ウイルスを感染させたマウスモデルにおいても，その野生株と同等のウイルス増殖抑制効果を発揮した (2.6.2.2.4.4 項)．以上の結果から，S-033447 のウイルス増殖抑制効果は，NA 阻害薬耐性を示す変異の影響を受けないと考えられる．

2.4.5.1.5 臨床で有効性が期待できる血漿中濃度

マウス感染モデルにおいて，S-033188 はオセルタミビルリン酸塩を上回るウイルス力価の低下作用と，それに伴う致死率の改善効果や生存期間の有意な延長，体温上昇の抑制効果を示した．感染モデルマウスにおける血漿中 S-033447 濃度を用いた PK/PD 解析から，S-033447 の C_τ が投与開始から 24 時間後の肺内ウイルス力価と最も相関する PK パラメータであった．マウス感染モデルにおいて肺内ウイルス力価をオセルタミビルリン酸塩よりも約 1/10 に低下させることができる S-033188 の用量は 15 mg/kg BID 経口投与であり，この用法用量における C_τ は 6.85

ng/mL であった．申請用法用量である 40 mg をヒトに投与した際の C_{24hr} (57.1 ng/mL) は，マウス感染モデルにおける C_T (6.85 ng/mL) を充分に上回っていた．以上の結果より，ヒトにおいても，マウス感染モデル同様，季節性 A 型及び B 型インフルエンザウイルスに対して既存薬よりも強力なウイルス増殖抑制効果が期待される．また，申請用法用量 40 mg [申請用法用量は，「体重 80 kg 未満の成人には 40 mg/日，また体重 80 kg 以上の成人には 80 mg/日」であるが，母集団薬物動態パラメータを用いて C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}inf}$ をベイジアン法により推定した結果，C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}inf}$ は体重 40～80 kg と 80 kg 以上の患者間で類似していたため，本項では 40 mg/日のデータを用いて考察する (2.7.2.3.3.1 項参照)．] で期待される C_{24hr} (57.1 ng/mL) は，ウイルス放出に対する抑制効果で観察された季節性インフルエンザウイルスに対する S-033447 の EC_{90} 値 [0.46～6.48 nmol/L (0.92～12.96 ng/mL)] を充分に上回っており，S-033447 のウイルス増殖抑制効果は，インフルエンザウイルス株の分離された年代や地域によらず発揮されると推測される．

2.4.5.1.6 ハイリスク患者に対する治療効果

がんや糖尿病などの疾患で認められるような免疫機能が低下している患者がインフルエンザウイルスに感染した場合，重症化し易く，死に至ることもあるため，ハイリスクグループとみなされている [7]．また，免疫機能の低下に伴い，インフルエンザウイルスの感染期間が延長することが知られている [11]．そこで，ハイリスクグループを模した動物モデルとして，免疫抑制剤により免疫抑制状態を惹起し，感染期間を延長させた A 型インフルエンザウイルス感染マウスモデルを用いて S-033188 の効果を検討した．

インフルエンザウイルスを接種した 5 日後に S-033188 を 1.5～50 mg/kg BID で 5 日間反復経口投与した群は，投与開始から 1 日後に用量依存的な肺内ウイルス力価の低下を示した後，肺内ウイルス力価は速やかに定量下限値 (1.5 $\log_{10}$ $TCID_{50}$/mL) に達し，オセルタミビルリン酸塩を臨床用量相当で 5 日間反復経口投与した群を上回る肺内ウイルス力価の低下作用が認められた (2.6.2.2.4.13 項)．また，免疫抑制状態の A 型インフルエンザウイルス感染マウスモデルにおいて，S-033188 を 15 mg/kg BID で投与した群は，免疫抑制を惹起していない A 型インフルエンザウイルス感染マウスモデル (2.6.2.2.4.10 項) と同様に，投与開始から 1 日後に媒体対照群よりも肺内ウイルス力価を約 1/1000 に低下させたことから，S-033188 投与による投与翌日の肺内ウイルスの増殖抑制効果は，宿主動物の免疫状態により影響を受けることなく発揮されると考えられる．

以上の結果は，S-033188 が，ハイリスク因子の有無に依らず，オセルタミビルリン酸塩よりも強力なウイルス増殖抑制効果により，体内のウイルスをより早期に消失させる効果があることを示唆している．

2.4.5.1.7 治療開始が遅れた患者や重篤な症状を示す患者に対する治療効果

発症から 48 時間以上を経過したインフルエンザウイルス感染患者や，重篤な症状を示すインフルエンザウイルス感染患者に対して，有効な治療法はないことから，マウスモデルにおいて治療開始時期を遅らせた場合の S-033188 の治療効果及びオセルタミビルリン酸塩を併用することによる効果を検討した．A 型インフルエンザウイルス実験室株を致死量で接種したマウスモ

デルにおいて，S-033188 を 15 mg/kg BID で 5 日間反復経口投与した群は，感染から 72 及び 96 時間経過後に投与を開始してもそれぞれ 100%及び 70%の生存率を示した．これに対し，オセルタミビルリン酸塩を臨床用量相当で 5 日間反復経口投与した群の生存率はいずれも 10%であり，S-033188 投与群ではオセルタミビルリン酸塩投与群よりも優れた致死率改善効果が認められた (2.6.2.2.4.10 項)．このモデルでは，S-033188 投与群においては，ウイルス増殖に起因する体重減少の抑制効果や肺内ウイルス力価の低下作用も，オセルタミビルリン酸塩投与群より優れていた．さらに，S-033188 とオセルタミビルリン酸塩を併用投与するモデルにおいて，それぞれの単剤投与よりも優れた致死率改善効果や体重減少抑制効果が示されている (2.6.2.2.4.11 項)．以上の結果から，発症から 48 時間以上を経過したインフルエンザウイルス感染患者や，重篤な症状を示すインフルエンザウイルス感染患者においては，S-033188 単剤投与でもオセルタミビルリン酸塩より優れた治療効果を発揮し，さらにオセルタミビルリン酸塩と併用投与することでより高い治療効果が得られる可能性があると考えている．

2.4.5.1.8 季節性以外のインフルエンザウイルスに対する効果

近年，鳥インフルエンザウイルスのヒトへの感染が報告され，A 型 H5N1 亜型の高病原性鳥インフルエンザウイルスや 2016～2017 年シーズンに報告された中国における A 型 H7N9 亜型の鳥インフルエンザウイルスでは死亡例も報告されている [12]．これらの死亡例から，A 型 H5N1 亜型において NA/H274Y，A 型 H7N9 亜型において NA/R292K といった NA 阻害薬耐性を示すアミノ酸置換が検出されており，これらの NA 阻害薬耐性ウイルスがパンデミックの要因となることが懸念されている．これらの経緯を考慮して，鳥やブタ由来のインフルエンザウイルスに対する S-033188 の有効性について評価した．

ヒトから分離された A 型 H5N1 亜型の高病原性鳥インフルエンザウイルスの A/Hong Kong/483/97 株，ヒトから分離された A 型 H7N9 亜型の鳥インフルエンザウイルスの A/Anhui/1/2013 株及び鳥やブタから分離された様々な亜型の A 型インフルエンザウイルスに対する EC_{90} は 0.73～1.64 nmol/L であり (2.6.2.2.3.1 項～2.6.2.2.3.3 項)，季節性 A 型インフルエンザウイルスに対する EC_{90} [0.46～0.98 nmol/L (2.6.2.2.1.4 項，2.6.2.2.1.5 項)] と同等であった．また，NA/H274Y を有する A 型 H5N1 亜型や NA/R292K を有する A 型 H7N9 亜型の鳥インフルエンザウイルスに対しても，S-033447 は，それぞれの野生株と同等のウイルス増殖抑制効果を *in vitro* の実験において示した (2.6.2.2.3.1 項，2.6.2.2.3.2 項)．さらに，A/Hong Kong/483/97 株及び A/Anhui/1/2013 株を感染させた直後に投与を開始するマウスモデルにおいて，S-033188 を 5 mg/kg BID で 1 日経口投与した実験では，マウスは全例生存し，オセルタミビルリン酸塩を臨床用量相当で 5 日間反復経口投与した群を上回る生存期間の延長や肺内ウイルス力価の低下作用が認められた (2.6.2.2.5.1 項，2.6.2.2.5.2 項)．以上の結果から，S-033188 は，鳥やブタ由来の様々な亜型の A 型インフルエンザウイルス株に対して，季節性 A 型インフルエンザウイルス株と同様にオセルタミビルリン酸塩よりも優れた治療効果を示すと考えている．

2.4.5.1.9 S-033447 に対する感受性低下の機序

A 型 H1N1 亜型のインフルエンザウイルスを用いた耐性ウイルス分離試験において，PA/I38T

のアミノ酸置換が認められたが，これは疎水性アミノ酸であるイソロイシンが親水性アミノ酸であるスレオニンに置換されたものである (2.6.2.2.2.1 項). リバースジェネティクス法を用いて，PA/I38T が A 型 H1N1 亜型のインフルエンザウイルスの S-033447 に対する感受性や増殖性に与える影響を検討したところ，30～40 倍程度の感受性低下 (2.6.2.2.2.3 項) とともに，ウイルス増殖性の低下も誘導することが示された (2.6.2.2.2.2 項). S-033447 と PA の N 末端領域とのドッキングモデル (図 2.4.5.1-1) から，PA/I38 は CEN の疎水性ポケットに位置し，S-033447 の疎水性 3 環構造と相互作用すると考えられる．イソロイシンが疎水性アミノ酸であるのに対して，スレオニンは親水性アミノ酸であることから，PA/I38T の CEN の疎水性ポケットは野生型に比べて S-033447 の疎水性 3 環構造との相互作用が減弱し，その相互作用の強さを反映して CEN 阻害効果が減弱したものと考えられる．また，PA/I38T は野生型よりもウイルス増殖性の低下を示したことから，臨床においては PA/I38T による感受性低下株は生じにくいと考えられる．さらに，PA/I38T を有するインフルエンザウイルスは増殖性が低下することから，病原性や伝播性が低下すると考えられ，症状が重篤化する可能性や，流行する可能性は低いと考えられる．PA/I38T は A 型 H3N2 亜型のインフルエンザウイルスを用いた耐性ウイルス分離試験でも検出されたが (2.6.2.2.2.4 項), B 型インフルエンザウイルスを用いた耐性ウイルス分離試験ではこのようなアミノ酸置換体は検出されなかった (2.6.2.2.2.5 項). 2.7.2.4 項に記載したように，リバースジェネティクス法により作出した組換えウイルスを用いたプラーク形成数を指標に薬剤感受性を検討した試験では，PA/I38T を A/WSN/33 (H1N1) 株，A/Victoria/3/75 (H3N2) 株及び B/Maryland/1/59 株に導入すると，それぞれ S-033447 に対して 27.24，56.59 及び 5.76 倍の薬剤感受性の低下を示したため，PA/I38T は A 型のみならず B 型インフルエンザウイルスにおいても薬剤感受性低下に関与するアミノ酸置換であると考えられる．

2.4.5.1.10 安全性薬理試験

安全性薬理のコアバッテリー試験として，中枢神経系，呼吸系及び心血管系に対する S-033188 及び S-033447 の影響を検討した．

ラットの FOB 法を用いた中枢神経系に対する試験では，S-033188 は 200 mg/kg までの単回経口投与によって一般症状及び神経行動学的機能に影響を及ぼさず，600 mg/kg 以上の用量で一過性かつ軽度の体温低値，2000 mg/kg の用量で軽度の尿量減少を示した．また，ラットの WBP 法を用いた呼吸系に対する試験では，S-033188 は 2000 mg/kg までの単回経口投与は，呼吸数，1 回換気量及び分時換気量に影響を及ぼさなかった．ラットの中枢神経系及び呼吸系試験において S-033188 及び S-033447 の血漿中濃度測定は実施しなかったが，ラット 2 週間反復経口投与毒性試験 (投与量：20，200 及び 2000 mg/kg/日) での 200 及び 2000 mg/kg/日投与群の雄における投与 1 日目の S-033447 の C_{max} はそれぞれ 0.621 及び 0.713 µg/mL であった (2.6.6.3.1 項参照). これらのことから，申請用法用量 [申請用法用量は，「体重 80 kg 未満の成人には 40 mg/日，また体重 80 kg 以上の成人には 80 mg/日」であるが，母集団薬物動態パラメータを用いて C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}inf}$ をベイジアン法により推定した結果，C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}inf}$ は体重 40～80 kg と 80 kg 以上の患者間で類似していたため，本項では 40 mg/日のデータを用いて考察する (2.7.2.3.3.1 項参照).] における S-033447 の C_{max} (0.123 µg/mL) (2.7.2.2.1.1 項参照) とラット中枢神経系試験

及び呼吸系試験の無影響量 (それぞれ 200 及び 2000 mg/kg) における S-033447 の C_{max} との比較から，それぞれ約 5 倍及び約 6 倍の安全域があると推定した．

サルのテレメトリー法を用いた心血管系に対する試験では，S-033188 は 200 及び 400 mg/kg の経口投与 (単回漸増投与) で，血圧，心拍数及び心電図に影響を及ぼさなかった． 本試験における無影響量 (400 mg/kg) 投与時の S-033447 の C_{max} は 1.64 µg/mL であったことから，申請用法用量における S-033447 の C_{max} (2.7.2.2.1.1 項参照) に比して約 13 倍の安全域があると推定した．また，サル 2 週間及び 4 週間反復経口投与毒性試験においても心電図に影響はなく，心臓の組織障害を示唆する所見は認められなかった (2.6.6.3.3 項及び 2.6.6.3.5 項参照)．*In vitro* 心血管系試験では，S-033188 及び S-033447 はそれぞれ 1 µmol/L (0.572 µg/mL) 及び 0.83 µmol/L (0.40 µg/mL) まで，モルモット乳頭筋標本の静止膜電位，活動電位振幅，脱分極最大立ち上がり速度，APD_{30}，APD_{90} 及び $APD_{30\text{-}90}$ に影響を及ぼさなかった．また，S-033188 及び S-033447 の hERG チャネル発現細胞における hERG 電流に対する IC_{50} は，それぞれ 10 µmol/L (5.72 µg/mL) を超える値及び 15.11 µmol/L (7.31 µg/mL) と推定された．申請用法用量における S-033447 の C_{max} は 0.123 µg/mL (2.7.2.2.1.1 項参照) であり，ヒト血清タンパク結合率 (92.9%) (2.6.4.4.1.1 項参照) を考慮すると，ヒト血漿中における S-033447 のフリー体濃度は 8.7 ng/mL と推定される．この濃度に対して，心筋活動電位試験における S-033447 の無影響量 (評価に用いた最高濃度) の 0.40 µg/mL 及び hERG 試験の推定の IC_{50} (7.31 µg/mL) は，それぞれ 46 倍及び 840 倍に相当した．また，申請用法用量における血漿中 S-033188 濃度はほとんどのヒトにおいて BLQ (< 0.1 ng/mL) (2.7.2.2.1.1 項参照) であり，心筋活動電位試験における S-033188 無影響量の 0.572 µg/mL 及び hERG 試験の推定の IC_{50} (5.72 µg/mL を超える値) を考慮すると，ヒトで S-033188 が影響を及ぼす可能性は極めて低いと考えられる．以上のように，*in vitro* 心血管系試験及びサルの心血管系試験の結果から S-033188 及び S-033447 がヒト心血管系に影響を及ぼすリスクは極めて低いと考えられる．

上記の安全性薬理試験の成績から，*in vitro* 心血管系試験では 46 倍以上，*in vivo* 試験では 5 倍以上の安全域があることが示された．また，いずれの試験においても，生命維持機能に関して重篤な所見は認められなかった．したがって，S-033188 投与によりヒトにおける中枢神経系，呼吸系及び心血管系について，生命維持機能に影響を及ぼすリスクは低いと考えられる．

2.4.5.2 薬物動態試験

2.4.5.2.1 S-033188 の体内動態について

S-033188 を非絶食下のラット及びサルに 1 mg/kg の用量で単回経口投与したとき (2.6.4.3.1.3 項及び 2.6.4.3.3.3 項参照)，血漿中 S-033447 の T_{max} はそれぞれ 1.25 及び 5.33 時間であり，サル血漿中濃度はラットの血漿中濃度と比べ緩やかな増加を示した．絶食下のラット及びサルにおける S-033447 の BA はそれぞれ 11.9%及び 50.6%であるが，非絶食下での BA はそれぞれ 9.77%及び 11.1%であり，ラット及びサルにおいて食事の影響が認められ，特にサルにおいて顕著であった (2.6.4.3.3.4 項参照)．なお，S-033188 をラット及びサルに経口投与した後の血漿中 S-033188 濃度はほとんどの時点で BLQ であった．血漿中に S-033188 がほとんど検出されない理由として，S-033188 のほとんどが小腸，門脈血及び肝臓を通過する過程で S-033447 に加水分

解されたためと考えられる．この加水分解反応に関わる責任代謝酵素は AADAC であることが示された (2.6.4.5.3.1 項参照).

[^{14}C]-S-033188 を有色ラットに単回経口投与後の組織分布試験において (2.6.4.4.2.1 項参照), 放射能はラット組織に幅広く分布した．また，骨及び肝臓を除く組織における放射能濃度は投与後 24 時間で BLQ まで減少し，骨及び肝臓中放射能濃度も 336 時間には BLQ まで減少した．ラットに S-033188 を経口投与した後の血漿中に S-033188 は認められないことから，各組織には S-033447 及びその代謝物が分布するが，これらは組織には残留しないと判断した．妊娠ラットにおいて胎児の組織中に放射能が検出されたことから (2.6.4.4.2.2 項参照), S-033447 及びその代謝物が胎盤を通過し，胎児に移行することが示されたが，血液，骨，皮膚を除いてその放射能濃度は母動物の同一組織に比べて半分以下の値を示し，さらに骨を除く全組織は投与後 24 時間に BLQ まで減少したことから，残留性は低いと考えている．

[^{14}C]-S-033188 を用いたラット及びサルでの代謝物検索において (2.6.4.5.2.1 項及び 2.6.4.5.2.2 項参照), S-033188 は S-033447 に加水分解され，さらに，S-033447 スルホキシド体，S-033447 グルクロナイド及び S-033447 ピロール体に代謝されることが示された．ヒトマスバランス試験において，血漿では S-033447 グルクロナイド及び S-033447 スルホキシド体の一つ [(12aR, 5R, 11S)-S-033447 スルホキシド体] が認められ，その曝露はそれぞれ血漿中総曝露に相当する血漿中放射能の 16.4%及び 1.5%であった (2.7.2.2.1.2 項)．血漿中 S-033447 グルクロナイドは，血漿中放射能の 10%を超えていたことから,「医薬品の臨床試験及び製造販売承認申請のための非臨床安全性試験の実施についてのガイダンス」 [13] の基準に従って，S-033447 グルクロナイドの安全性について考慮する必要があると考えられた. しかし, S-033447 グルクロナイドは S-033447 の水酸基が抱合された *O*-グルクロナイドであり，「医薬品の臨床試験及び製造販売承認申請のための非臨床安全性試験の実施についてのガイダンスに関する質疑応答集(Q&A)」 [14] に「多くのグルクロナイドは，アシルグルクロナイド等の化学的転移を起こす例を除いて，懸念がない」と記述されている通り，毒性の懸念が低い代謝物であると考えられる．サルの代謝物検索において，血漿中 S-033447 グルクロナイドは血漿中放射能の 2.5%～18.8%認められ，S-033447 は血漿中放射能の 60.9%～83.0%認められたことから，S-033447 グルクロナイドは S-033447 に対して 3.0%～30.9%存在すると算出された．S-033188 のサルにおける 2 週間反復経口投与毒性試験の最大用量 (200 mg/kg) における $AUC_{0\text{-}24hr}$ (22.4～37.2 μg·hr/mL) (2.6.4.3.7.1 項参照) とサル血漿中におけるグルクロナイドの存在比率 (S-033447 比率の 3.0%～30.9%) の 3.0%を用いると, S-033447 グルクロナイドは, 少なくともサル血漿中に 672 ng·hr/mL 存在すると算出された．したがって，ヒトマスバランス試験において [^{14}C]-S-033188 を 40 mg の用量で経口投与後の血漿中放射能の $AUC_{0\text{-}inf}$ (3830 ng· hr/mL) とヒト血漿中におけるグルクロナイドの存在比率 (放射能比率の 16.4%) から算出される S-033447 グルクロナイドの血漿中曝露 (627 ng· hr/mL) はサルにおける曝露量と同等であるため，S-033447 グルクロナイドの安全性は評価できていると考えられる．また，ヒトマスバランス試験における S-033447 スルホキシド体の血漿中曝露は放射能曝露の 1.5%であり，ラット及びサル血漿中における 2 種の S-033447 スルホキシド体の曝露の和 (6.5%～9.2%及び 14.5%～16.1%) と比べて低かった．この結果から，ヒトでは，ラット及びサルとは異なり，S-033447 の代謝にグルクロン酸抱合反応が大きく関与し，酸化反応の寄与は

小さいと考えている．このグルクロン酸抱合反応及び酸化反応に関わる責任代謝酵素を確認した結果，それぞれ UGT1A3 及び CYP3A4 が関与していることが明らかとなった (2.6.4.5.3.2 項及び 2.6.4.5.3.3 項参照).

[^{14}C]-S-033188 をラット及びサルに単回経口投与したときの放射能の主排泄経路は，胆汁を介した糞中排泄であった (2.6.4.6.1.1 項及び 2.6.4.6.2.1 項参照). [^{14}C]-S-033188 を授乳ラットに単回経口投与した後の放射能は，乳汁中にも排泄されたが，血漿中放射能と同様の推移で消失した (2.6.4.6.1.3 項参照). 投与した放射能に対する腸肝循環率はラットで 0.9%であり，ラットにおいて S-033447 の腸肝循環がその体内動態に与える影響は小さいことが示唆された (2.6.4.6.1.2 項参照). 腸肝循環は胆汁に排泄された S-033447 グルクロナイドが消化管で加水分解を受け，S-033447 となって再吸収されることで起こると考えられるため，S-033447 グルクロナイドの生成の割合が大きいヒトにおいては，腸肝循環が S-033447 の体内動態に与える影響はラットに比べて大きくなる可能性が示唆された.

2.4.5.2.2 S-033188 の食事の影響について

ラット及びサルにおいて S-033447 の血漿中濃度に食餌の影響が認められた．また，第 1 相臨床試験で高脂肪食を摂取したヒトに 40 mg の用量の S-033188 懸濁剤を単回経口投与したときの S-033447 の C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}inf}$ は，絶食下の値に比べてそれぞれ 0.33 倍及び 0.59 倍であり，ヒトにおいても食事の影響があることが示された (2.7.1.2.1.1 項参照).

S-033188 が加水分解を受けることにより生成される S-033447 の構造中には水酸基及びケトン基が隣接する部位があり，この部位が金属イオンとキレートを形成すると考えられる．そのため，ヒトで認められた食事の影響は，消化管腔内で加水分解を受け変換された S-033447 が，高脂肪食中に含まれる金属イオン (カルシウム：975 mg，マグネシウム：67 mg，鉄：3.2 mg) とキレートを形成し，S-033447 の膜透過性又は溶解度が低下することによって生じていると考えた．このことを検証するため，S-033188 を絶食下のサルに各種金属イオン (マグネシウム及びアルミニウムの混合物，カルシウム，鉄並びに第 1 相臨床試験で用いた高脂肪食中の金属イオン含量を模した混合物) とともに経口投与したときの血漿中 S-033447 濃度を評価した．その結果，各種金属イオンと併用投与時の S-033447 の C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}inf}$ は S-033188 単独投与時の値に比べてそれぞれ 0.48～0.63 倍及び 0.49～0.63 倍であった (2.6.4.3.3.5 項参照). また，第 1 相臨床試験で用いた高脂肪食中の金属イオン含量を再現した混合物と併用投与したときの S-033447 の C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}inf}$ は単独投与時と比べてそれぞれ 0.54 倍及び 0.62 倍であり，臨床における食事の影響 (それぞれ 0.33 倍及び 0.59 倍) と同程度であったことから，臨床で認められた食事の影響には食事中の金属イオンが大きく関与していると推察している.

2.4.5.2.3 薬物代謝酵素を介した相互作用について

ヒト肝ミクロソームを用いた *in vitro* 試験において，S-033188 及び S-033447 による，CYP1A2，CYP2B6，CYP2C8，CYP2C9，CYP2C19，CYP2D6 及び CYP3A4 並びに UGT1A1，UGT1A3，UGT1A4，UGT1A6，UGT1A9，UGT2B7 及び UGT2B15 の濃度依存的な阻害能を検討した．S-033188 は CYP2B6, CYP2C8 及び CYP3A4 (ミダゾラム及びテストステロン) 並びに UGT2B15

に対する阻害能を有し，それぞれの IC_{50} は 46.0，63.2，23.2 及び 50.2 並びに 94 μmol/L であった．また，S-033447 は CYP2B6 及び CYP3A4 (ミダゾラム) に対する阻害能を有し，それぞれの IC_{50} は 29.3 及び 43.2 μmol/L であった．なお，上記以外の分子種に対する S-033188 及び S-033447 の阻害は認められず，時間依存的な阻害については上記いずれの CYP 分子種についても認められなかった (2.6.4.5.1.3 項参照)．S-033188 及び S-033447 が阻害能を示した代謝酵素について，静的薬物速度論モデルを用いて申請用法用量 (40 mg/日) で S-033188 を経口投与後における基質薬の AUC 変動率 (AUCR) を算出したところ，1.00～1.15 であり，「医薬品開発と適正な情報提供のための薬物相互作用ガイドライン (最終案)」[15] の判断基準 (AUCR < 1.25) に従って，申請用法用量において S-033188 及び S-033447 は各代謝酵素の阻害剤となる可能性は低いと考えられた．しかしながら CYP3A4 の基質となる薬物は市場に多く存在し，S-033188 と併用する可能性が高いため，CYP3A4 については *in vivo* での相互作用リスクを臨床で確認するのが望ましいと判断し，CYP3A4 の基質であるミダゾラムとの臨床薬物相互作用試験を実施した (2.7.2.2.4.1 項参照)．その結果，S-033188 の併用投与によってミダゾラムの C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}inf}$ に有意な変動がないことが確認された．

ヒト肝細胞を用いた *in vitro* 試験において S-033188 及び S-033447 による CYP1A2，CYP2B6 及び CYP3A4 の誘導能を検討した結果，S-033188 による酵素誘導は認められなかった (2.6.4.5.1.4 項参照)．一方，S-033447 による各分子種の mRNA に対する誘導能が認められたことから，媒体対照群に対して 2 倍以上の酵素誘導を示した分子種について E_{max} 及び EC_{50} を算出した．さらに，「医薬品開発と適正な情報提供のための薬物相互作用ガイドライン (最終案)」[15] にあるカットオフ基準としての R 値を算出した結果，0.92～0.99 であり，臨床薬物相互作用試験を不要と判断する基準値である 0.9 よりも大きかったことから，S-033188 及び S-033447 が誘導剤として作用する可能性は低いと考えられた．以上の結果より，S-033188 及び S-033447 が各薬物代謝酵素の基質となる併用薬の体内動態に影響する可能性は低いと考えている．

ヒトマスバランス試験の血漿を用いた代謝物検索の結果，S-033447，S-033447 グルクロナイド及び (12aR, 5R, 11S)-S-033447 スルホキシド体が主に検出され，総 AUC に対する割合はそれぞれ，82.2%，16.4%及び 1.5%であった (2.7.2.2.1.2 項参照)．S-033447 グルクロナイドの生成又は (12aR, 5R, 11S)-S-033447 スルホキシド体の生成に関与する責任代謝酵素について検討した結果，それぞれ UGT1A3 又は CYP3A4 が関与することが示された (2.6.4.5.3.2 項及び 2.6.4.5.3.3 項参照)．(12aR, 5R, 11S)-S-033447 スルホキシド体のヒト血漿中濃度に占める割合は小さいことから，CYP3A4 阻害剤が S-033447 のヒト血漿中濃度に与える影響は小さいものと考えられる．一方，S-033447 グルクロナイドは S-033447 の主代謝物であり，S-033447 の消失全体の 25%以上を占める可能性があるため，S-033188 及び S-033447 の代謝に及ぼす UGT1A3 阻害剤の影響を検討する臨床薬物相互作用試験を実施した (2.7.2.2.4.4 項参照)．非選択的 UGT 阻害剤であるプロベネシドとの併用による S-033447 の C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}inf}$ は単独投与時に比べてそれぞれ 0.79 倍及び 0.75 倍であり，プロベネシドによる UGT 阻害に起因した S-033447 の血漿中濃度の増加は認められないことから，UGT 阻害剤の併用による S-033447 の血漿中濃度の増加は起こらないと判断した (2.7.2.2.4.4 項参照)．

2.4.5.2.4 トランスポーターを介した相互作用について

S-033188 はヒト血漿中にほとんど認められず，薬物の肝臓 (OATP1B1 及び OATP1B3) 及び腎臓 (OAT1，OAT3，OCT2，MATE1 及び MATE2-K) への移行に関わるトランスポーターの阻害により S-033188 の体内動態は変動しないと考えられるため，薬物の消化管吸収に影響を及ぼすトランスポーターである P-gp 及び BCRP の基質評価を実施した．また，S-033447 については，ヒトマスバランス試験において腎臓を介した尿中への排泄量は 3.28%と微量であり，薬物の腎臓への移行に関わるトランスポーターの阻害により S-033447 の体内動態は変動しないと考えられるため，P-gp 及び BCRP 並びに薬物の肝臓への移行に関わるトランスポーターの基質評価を実施した．

In vitro トランスポーター基質評価の結果，S-033188 は P-gp の基質であるが，BCRP の基質ではなかった．また，S-033447 は P-gp の基質であるが，BCRP，OATP1B1 及び OATP1B3 の基質ではなかった (2.6.4.7.1 項参照)．S-033188 及び S-033447 はともに P-gp の基質であったため，P-gp の阻害剤であるイトラコナゾールが S-033188 及び S-033447 の体内動態に及ぼす影響を検討する臨床薬物相互作用試験 (2.7.2.2.4.2 項参照) を実施した．その結果，イトラコナゾール併用時の血漿中 S-033188 濃度は大部分の健常成人において BLQ (< 0.100 ng/mL) であり，単独投与時と変わらなかった．S-033447 の C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}inf}$ は，単独投与時に比べてそれぞれ 1.3 倍及び 1.2 倍であり，変動は小さかった (2.7.2.2.4.2 項参照)．以上のことから，S-033188 及び S-033447 の体内動態が P-gp の阻害剤となる併用薬によって変動する可能性は低いと判断した．

S-033188 及び S-033447 の各トランスポーターを介した典型的基質輸送に対する阻害結果を表 2.4.5.2-1 に示す．なお，臨床試験において S-033188 は血漿中でほとんど認められず，S-033188 による薬物の肝臓及び腎臓への移行に関わるトランスポーターの阻害作用は臨床上問題にならないと考えられるため，*in vitro* 評価は不要であると判断した．

In vitro トランスポーター阻害評価，並びに「医薬品開発と適正な情報提供のための薬物相互作用ガイドライン (最終案)」 [15] に基づき薬物相互作用の可能性を判断した結果，S-033188 は消化管の P-gp を，S-033447 は消化管の P-gp 又は BCRP を阻害することにより薬物相互作用が惹起される可能性が考えられた (2.6.4.7.2 項参照)．そこで，S-033188 併用投与が P-gp の基質であるジゴキシンあるいは BCRP の基質であるロスバスタチンの体内動態に及ぼす影響を検討する臨床薬物相互作用試験を実施した (2.7.2.2.4.5 項参照)．その結果，S-033188 を申請用法用量 (80 mg/日) で併用投与時のジゴキシンの C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}inf}$ は単独投与時に比べてそれぞれ 1.0 倍及び 0.86 倍の値を示し，S-033188 併用投与によるジゴキシンの体内動態はほとんど変動しなかった (2.7.2.2.4.5 項参照)．また，ロスバスタチンの C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}inf}$ は単独投与時に比べてそれぞれ 0.82 倍及び 0.83 倍の値を示し，S-033188 併用投与によりロスバスタチンの体内動態はほとんど変動しなかった．以上の結果より，S-033188 及び S-033447 が臨床において P-gp 及び BCRP の基質となる併用薬の体内動態に影響する可能性は低いと考えている．

S-033447 の OATP1B1，OCT1，MATE1 及び MATE2-K に対する阻害作用が認められるが，表 2.4.5.2-1 に示す通り，医薬品開発と適正な情報提供のための薬物相互作用ガイドライン (最終案)」[15] にあるカットオフ基準値を満たすことから，これらのトランスポーターの基質となる併用薬の体内動態に影響する可能性は低いと考えている．

表 2.4.5.2-1　　S-033188 及び S-033447 による各トランスポーター阻害作用のまとめ

Transporter	IC_{50} (μmol/L)	MHLW Guideline			Clinical DDI Study (substrate)
		Equation *	Cutoff Value	DDI potential	
S-033188					
P-gp	8.75	$[I]_2/IC_{50}$: 32.0	≥10	Yes	Performed (digoxin)
BCRP	> 78.1	$[I]_2/IC_{50}$: <3.58	≥10	No	Performed (rosuvastatin)
S-033447					
P-gp	> 20.9	$[I]_1/IC_{50}$: <0.0122	≥0.1	No	Performed (digoxin)
		$[I]_2/IC_{50}$: <13.4	≥10	Yes	
BCRP	7.10	$[I]_1/IC_{50}$: 0.0358	≥0.1	No	Performed (rosuvastatin)
		$[I]_2/IC_{50}$: 39.4	≥10	Yes	
OATP1B1	6.81	$1 + ([I]_{u,inlet,max}/IC_{50})$: 1.01	≥1.25	No	–
OATP1B3	> 20.4	$1 + ([I]_{u,inlet,max}/IC_{50})$: <1.003		No	–
OAT1	> 20.4	$1+(C_{max,u}/IC_{50})$: <1.001	≥1.25	No	–
OAT3	> 20.4	$1+(C_{max,u}/IC_{50})$: <1.001		No	–
OCT2	> 20.4	$1+(C_{max,u}/IC_{50})$: <1.001		No	–
MATE1	11.2	$1+(C_{max,u}/IC_{50})$: 1.00		No	–
MATE2K	1.91	$1+(C_{max,u}/IC_{50})$: 1.01		No	–
OCT1	6.52	No criterion	–	–	–
BSEP	> 78.0	No criterion	–	–	–

* 計算式に用いた S-033188 及び S-033447 の薬物動態パラメータを下記に示す.

Parameter	Value	Unit	Comment/Source
Molecular Weight (S-033188)	571.55	-	Free form of S-033188
Molecular Weight (S-033447)	483.49	-	Free form of S-033447
Dose	40	mg	Proposed clinical dose
Molar dose	70.0	μmol	40 mg as S-033188/571.55 × 1000
$[I]_1$ ($C_{max,plasma}$)	0.254	μmol/L	123 ng/mL as S-033447 at 40 mg in Ph1 SAD study (1510T0811) (Section 2.7.2.2.1.1)
$[I]_2$	280	μmol/L	Molar dose/250 mL × 1000
R_b	1.22	-	In vitro concentration ratios of blood to plasma of [^{14}C]-S-033447 in human at 50 ng/mL (Section 2.6.4.4.1.2)
$f_{u,p}$	0.071	-	In vitro serum protein binding ratios of [^{14}C]-S-033447 in human at 50 ng/mL (Section 2.6.4.4.1.1)
$f_{u,b}$	0.0582	-	$f_{u,p} / R_b$
$C_{max,u}$	0.0180	μmol/L	$f_{u,p} \times C_{max,plasma}$
k_a	0.0203	min^{-1}	Estimated based on the data in BA/FE study, 1.22 hr^{-1}[16]
$F_a \cdot F_g$	1	-	Worst-case [15]
Q_h	1617	mL/min	97 L/hr [15]
$[I]_{u,inlet,max}$	0.0692	μmol/L	$f_{u,b} \times (C_{max,plasma} \times R_b + F_a \cdot F_g \times k_a \times$ Molar dose$/Q_h \times 1000)$

Abbreviations: $[I]_1$, maxinmum total plasma concentration ($C_{max,plasma}$); $[I]_2$, molar dose/250 mL; R_b, the ratio of concentration in blood to plasma; $f_{u,p}$, the unbound fraction in plasma; $f_{u,b}$, the unbound fraction in blood; $C_{max,u}$, maxinmum unbound plasma concentration; k_a, the first order absorption rate constant; F_a, the fraction absorbed after oral administration; F_g, the fraction available after intestinal metabolism; Q_h, the total hepatic blood flow; $[I]_{u,inlet,max}$, the unbound hepatic inlet concentration.

2.4.5.2.5 幼若ラットにおける S-033188 体内動態の日齢変動について

10，20 及び 30 日齢の非絶食の雄性 Sprague-Dawley 系ラットに S-033188 を単回経口投与したとき，10 日齢のラットの血漿中 S-033447 の C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}inf}$ は 20 及び 30 日齢の値に比べて著しく大きく，BA の増大が認められた (2.6.4.3.2.1 項及び 2.6.4.3.2.2 項参照)．また，S-033447 を単回静脈内投与したとき，10 日齢のラット血漿中 S-033447 の $AUC_{0\text{-}inf}$ は 20 及び 30 日齢の値に比べて大きく，$t_{1/2,z}$ の延長及び Vd_{ss} の減少が認められた (2.6.4.3.2.2 項参照)．以上の結果は，S-033188 投与後の S-033447 曝露にラットの日齢変動があることを示しており，その要因として経口吸収性，消失能及び分布容積の変動が関与していると考えられる．また，成獣ラットにおいて S-033447 は主に肝代謝によって体内から消失するため，消失の変動については肝代謝能の変動に起因することが推察された．

まず，経口吸収性の日齢変動に関して，腸管還流法を用いた各種脂肪酸の膜透過性評価の結果が報告されており[17]，18 及び 25 日齢のラットに比べ，消化管が未成熟な 9 日齢のラットでは脂肪酸の膜透過性が高いことが示されている．このことから，同様のメカニズムが 10 日齢のラットにおける S-033188 の経口吸収性に影響し，C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}inf}$ を増加させた要因の一つであると推察している．また，消失過程に関与していると考えられる代謝能の日齢変動については，ラット肝臓における UGT 酵素活性及び CYP 酵素活性は若日齢ほど低いという報告がある[18, 19]．ラットにおいて S-033447 の消失には S-033447 グルクロナイド及び S-033447 スルホキシド体への代謝が関与し，それらの代謝には UGT 酵素や CYP 酵素が寄与していると考えてい

る．したがって，10 日齢のラットで認められた $t_{1/2,z}$ の延長は S-033447 の代謝に関与する UGT 酵素活性及び CYP 酵素活性が若日齢ほど低いことに起因していると推察している．さらに，分布に関しては，各臓器重量の体重に対する比を 35～200 日齢のラットに対して測定した結果，若日齢の低体重のラットほど体重に対する各臓器重量の割合が大きくなると報告されている [20]．したがって，10 日齢のラットにおいて，体重に対する血液量が 20 及び 30 日齢のラットに比べて少ないと推察されるため，体重あたりの用量で投与したときの血漿中濃度は 10 日齢で高くなり，Vd_{ss} の減少に繋がったと考えている．以上の様なラットで認められた吸収，代謝及び分布に関する現象がヒトにおいても生じる可能性について以下に考察した．

哺乳類の生誕時における消化管の成熟度は妊娠期間に依存するという報告があり，ヒトはラットに比べてより成熟して生まれるため，ヒト新生児の消化管はラットのそれに比べてより成熟していると考えられている [21]．また，ヒトにおいて S-033447 の消失に関与する代謝酵素である UGT 酵素は生後 2～30 ヵ月で，CYP3A4 酵素は生後 12 ヵ月で成人と同程度の活性を示すとの報告がある [22, 23]．このことから，生後 30 ヵ月以降の小児では S-033447 の代謝に関わる酵素活性はおおむね成人と同程度であり，消化管での吸収過程及び代謝による消失過程が成人と比較して大きく異なるとは考えにくい．一方，生後 30 ヵ月以下の小児において，代謝酵素の未成熟により血漿中濃度の増加する可能性がある．分布に関しては若年齢の小児であるほど，体重に占める体液及び脂肪の量が多く，体重あたりの用量で投与したときの血漿中濃度は小児の方が減少しやすいとの報告がある [22]．以上のことから，代謝酵素活性が未成熟である生後 30 ヵ月未満の小児を除けば，小児において血漿中濃度が成人に比べて顕著に増加する可能性は低いものと考えている．

実際に，12 歳未満の小児を対象とした第 3 相試験 (2.7.2.2.2.3 項参照) において，体重に応じて S-033188 を体重 5 kg 以上 10 kg 未満，10 kg 以上 20 kg 未満，20 kg 以上 40 kg 未満及び 40 kg 以上の小児に，それぞれ 5 mg，10 mg，20 mg，40 mg の用量 (0.5～1 mg/kg) で経口投与した後の S-033447 の血漿中濃度は，第 3 相試験 (2.7.2.2.2.2 項参照) において青少年及び成人に体重 40 kg 以上 80 kg 未満の患者には 40 mg，80 kg 以上の患者には 80 mg の用量で経口投与したときの値と類似していた (2.7.2.3.4.3 項参照)．以上のように，幼若ラットにおいて日齢による血漿中濃度の変動が認められたが，その現象はラット特有の現象であると考えられ，代謝酵素が未成熟である生後 30 ヵ月未満の小児を含めてヒトで S-033447 の血漿中濃度が年齢により顕著に変動する可能性は低いと考えている．

2.4.5.3 毒性試験

2.4.5.3.1 S-033188 の毒性評価について

S-033188 の安全性評価のために実施した毒性試験は (表 2.6.6.1-1 参照)，「医薬品の臨床試験及び製造販売承認申請のための非臨床安全性試験の実施についてのガイダンス」[13] に基づき，医薬品の製造販売承認申請に際して提出すべき安全性試験を網羅しており，かつ，S-033188 の申請用法である単回投与に必要な反復投与毒性試験の投与期間を充足していると判断した．また，*in vivo* 毒性試験の最高用量は，最大耐量又は各種毒性試験法ガイドラインに定められた限界量を設定しており，全ての試験において無毒性量を確認できた．なお，ラットでは反復投与

による S-033447 の血漿中曝露量 (C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24hr}$) の低下が認められたが，技術的限界量である 2000 mg/kg/日を最高用量に設定することにより，申請用法用量における S-033447 の血漿中曝露量の約 2～3 倍を達成できた．また，ラットに比べて高い S-033447 の血漿中曝露量を獲得できたサル (サルに 200 mg/kg/日の反復投与後の S-033447 の血漿中曝露量はヒトでの申請用法用量におけるそれの約 17～22 倍) において S-033447 の高曝露下における毒性を検出できた．以上のことから，S-033188 の製造販売承認申請のために必要な非臨床における安全性評価が適切に実施されたと判断した．

ラット及びサル反復経口投与毒性試験並びに生殖発生毒性試験で認められた主な毒性所見及び無毒性量を表 2.4.5.3-1 及び表 2.4.5.3-3 に示す．また，各毒性試験における S-033447 の血漿中曝露量 (C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24hr}$) 並びに申請用法用量における S-033447 の血漿中曝露量との比を表 2.4.5.3-2 に示す．S-033188 の申請用法用量は，「体重 80 kg 未満の成人には 40 mg/日，また体重 80 kg 以上の成人には 80 mg/日」であるが，母集団薬物動態パラメータを用いて C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}inf}$ をベイジアン法により推定した結果，C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}inf}$ は体重 40～80 kg と 80 kg 以上の患者間で類似していた (2.7.2.3.3.1 項参照)．そこで，以下の考察における曝露比の算出には，第 1 相単回投与試験で，ヒトに 40 mg/日の用量で投与したときの S-033447 の C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24hr}$ [それぞれ 0.123 μg/mL 及び 1.71 μg·hr/mL (2.7.2.2.1.1 項参照)] を用いた．

S-033188 の安全性評価で認められた毒性所見のうち，ヒトの安全性に影響を及ぼす懸念がある最も重要な変化は，サル反復投与毒性試験で認められた肝・胆道系への影響を示唆する血漿中 AST，ALT，GLDH，LAP 及び GGT 活性等の上昇であった．生殖発生毒性評価において，S-033188 は催奇形性を示さなかったが，ウサギにおいて，母体毒性認められる用量で胎児の骨格変異発現率の増加が認められた．遺伝毒性，皮膚光毒性は示さず，幼若ラットにおける毒性は認められなかった．

表 2.4.5.3-1　ラット及びサルの反復投与毒性試験における主な毒性所見

動物種	投与期間	投与経路	投与量 [a] (mg/kg/日)	主な毒性所見
ラット	2 週間	経口	20，200，<u>2000</u>	毒性変化はなし
	4 週間	経口	20，200，<u>2000</u>	毒性変化はなし
サル	2 週間	経口	20，60，200	200 mg/kg/日：嘔吐，ALP 活性の上昇，T.Bil，D.Bil，T.Cho 及びトリグリセリド値及びリン脂質の増加 ≥ 60 mg/kg/日：AST 活性の顕著な上昇，TBA 値の増加 ≥ 20 mg/kg/日：ALT，GLDH，LAP 又は GGT 活性の顕著な上昇
	2 週間	経口	3，<u>10</u>	毒性変化はなし
	4 週間	経口	1，<u>10</u>，100	100 mg/kg/日：AST，ALT，GLDH，LAP 又は GGT 活性の顕著な上昇

略号：ALP，アラニンアミノトランスフェラーゼ；D.Bil，直接ビリルビン；TBA，総胆汁酸．

a　下線は無毒性量を示す．

表 2.4.5.3-2　S-033188 の反復経口投与による S-033447 の血漿中曝露量及び臨床との曝露比

動物種 (投与期間)	投与量 (mg/kg/day)	性別	C_{max} (μg/mL)		$AUC_{0\text{-}24hr}$ (μg·hr/mL)		曝露比	
			投与開始日	投与最終日	投与開始日	投与最終日	C_{max} [a]	$AUC_{0\text{-}24hr}$ [b]
ラット (2 週間)	20	雄	0.254	0.162	1.40	0.872	1.3	0.5
		雌	0.156	0.144	1.03	0.853	1.2	0.5
	200	雄	0.621	0.243	5.68	2.00	2.0	1.2
		雌	0.744	0.291	6.48	3.40	2.4	2.0
	2000 (無毒性量)	雄	0.713	0.274	7.99	3.34	2.2	2.0
		雌	1.19	0.497	15.2	5.47	4.0	3.2
ラット (4 週間)	20	雄	0.240	0.124	1.34	0.817	1.0	0.5
		雌	0.189	0.123	0.990	0.722	1.0	0.4
	200	雄	0.713	0.198	5.90	1.66	1.6	1.0
		雌	0.730	0.204	6.18	1.72	1.7	1.0
	2000 (無毒性量)	雄	1.03	0.275	11.1	3.40	2.2	2.0
		雌	1.24	0.460	17.3	4.76	3.7	2.8
サル (2 週間 [追加])	3	雄	0.102	0.129	1.28	1.56	1.0	0.9
		雌	0.113	0.148	1.43	1.89	1.2	1.1
	10 (無毒性量)	雄	0.199	0.314	3.24	4.53	2.6	2.6
		雌	0.220	0.368	3.31	4.28	3.0	2.5
サル (2 週間)	20	雄	0.440	0.559	6.73	9.46	4.5	5.5
		雌	0.444	0.563	6.57	7.79	4.6	4.6
	60	雄	0.659	1.37	10.4	19.8	11.1	11.6
		雌	0.484	0.736	8.00	10.5	6.0	6.1
	200	雄	0.820	1.29	13.4	22.4	10.5	13.1
		雌	1.34	2.12	21.4	37.2	17.2	21.8
サル (4 週間)	1	雄	0.0507	0.0515	0.555	0.527	0.4	0.3
		雌	0.0523	0.0527	0.589	0.456	0.4	0.3
	10 (無毒性量)	雄	0.236	0.242	3.43	3.05	2.0	1.8
		雌	0.189	0.229	2.66	3.14	1.9	1.8
	100	雄	0.496	0.714	8.96	11.6	5.8	6.8
		雌	0.449	0.642	7.68	9.06	5.2	5.3
妊娠ラット	20	雌	0.214	0.324	1.26	1.88	2.6	1.1
	200	雌	0.739	0.622	6.49	6.18	5.1	3.6
	1000	雌	1.25	0.621	15.3	7.17	5.0	4.2
妊娠ウサギ	30	雌	0.586	0.485	6.29	4.60	3.9	2.7
	100	雌	1.24	0.883	14.4	9.26	7.2	5.4
	1000	雌	1.83	1.35	35.6	20.9	11.0	12.2
幼若ラット	20	雄	2.14	0.109	26.1	0.667	0.9	0.4
		雌	2.29	0.104	27.8	0.554	0.8	0.3
	200	雄	7.02	0.295	87.1	2.57	2.4	1.5
		雌	7.09	0.382	103	2.76	3.1	1.6
	1000	雄	8.24	0.248	133	2.95	2.0	1.7
		雌	9.69	0.282	147	3.05	2.3	1.8
ヒト	40 mg/日	男女	0.123		1.71		−	−

a　申請用法用量 (40 mg/日) における C_{max} (0.123 μg/mL) (2.7.2.2.1.1 項参照) に対する各毒性試験における投与最終日の C_{max} の比.

b　申請用法用量 (40 mg/日) における $AUC_{0\text{-}24hr}$ (1.71 μg·hr/mL) (2.7.2.2.1.1 項参照) に対する各毒性試験における投与最終日の $AUC_{0\text{-}24hr}$ の比.

表 2.4.5.3-3　生殖発生毒性試験における主な毒性所見及び無毒性量

動物種	試験種	投与経路	投与量 (mg/kg/日)	主な毒性所見と無毒性量
ラット	受胎能及び着床までの初期胚発生	経口	20，200，1000	毒性変化はなし 無毒性量 雌雄親動物の毒性：1000 mg/kg/日 初期胚発生毒性：1000 mg/kg/日
	胚・胎児発生	経口	20，200，1000	毒性変化はなし 無毒性量 母動物の毒性：1000 mg/kg/日 胚・胎児発生毒性：1000 mg/kg/日
	出生前及び出生後の発生並びに母体の機能	経口	20，200，1000	毒性変化はなし 無毒性量 母動物の毒性：1000 mg/kg/日 F1 動物の毒性：1000 mg/kg/日
ウサギ	胚・胎児発生	経口	30，100，1000	母動物 1000 mg/kg/日：流産，摂餌量減少，体重増加抑制 胚・胎児 1000 mg/kg/日：頚部短小過剰肋骨発現率の高値 無毒性量 母動物の毒性：100 mg/kg/日 胚・胎児発生毒性：100 mg/kg/日

2.4.5.3.2 肝・胆道系への影響について

サル2週間及び4週間反復経口投与毒性試験では，20 mg/kg/日以上の投与により血漿中 ALT，AST，GGT，GLDH 及び LAP 活性の顕著な上昇が，200 mg/kg/日を 2 週間反復経口投与時の一部の個体に ALP，TBA，D.Bil，T.Bil，T.Cho 及び TG の増加が認められ，肝・胆道系の障害が示唆された．投与期間の延長 (2 週間から 4 週間) によって，これら血液化学パラメータ値の変動幅が大きくなることはなく，変動が見られた項目は休薬により良好な回復性を示した．上述した所見はいずれも 20 mg/kg/日以上の用量をサルに反復経口投与した際に認められており，10 mg/kg/日以下の用量では認められなかったことから，サル 4 週間反復経口投与毒性試験における無毒性量は 10 mg/kg/日と判断した．表 2.4.5.3-2 に示すように，10 mg/kg/日における S-033447 の血漿中曝露量 (C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24hr}$) は，申請用法用量 (40 mg/日) における S-033447 の血漿中曝露量のそれぞれ 1.9 倍及び 1.8 倍であった．サル 2 週間及び 4 週間反復経口投与毒性試験において，肝・胆道系の器官及び組織に病理組織学的な変化は認められなかった．そこで，サル 4 週間反復投与毒性試験の肝臓試料を用いた電顕検査により肝・胆道系への影響を精査したところ，肝細胞の微細構造に異常所見は認められなかった．サルのみにおいて上述した変化が認められた原因は不明であるが，ラット，サル及びヒトにおいて種特異的な代謝物は検出されていないことから，肝機能に影響を及ぼすような代謝物が生成した可能性は低いと考えられる (2.6.4.5.2.1 項，2.6.4.5.2.2 項及び 2.7.2.2.1.2 項参照)．サルにおける 2 週間及び 4 週間反復投与毒性試験において，動物は休薬後 1 週間から良好な回復傾向を示したこと，肝・胆道系への影響を示唆する血液化学パラメータ値の上昇は認められたものの，肝・胆道系の器官及び組織に病理組織学的な変化は認められず，肝細胞の微細構造に異常所見は認められなかったことか

ら，仮にヒトにおいて何らかの原因で肝・胆道系への影響が誘発されたとしても，短期間で回復する可能性が高いことが予想される．国内で実施した第 2 相臨床試験並びに国内及び海外で実施した第 3 相臨床試験では，S-033188 投与群とプラセボ投与群の間で肝機能障害関連有害事象の発現率に差が認められなかった (2.7.4.2.1.7 項参照)．以上の結果から，S-033188 投与によりヒトにおいて肝・胆道系に障害を及ぼすリスクは低いと考えている．

2.4.5.3.3 過量投与時の急性有害事象発生リスクについて

ラットでは 2000 mg/kg/日までの反復経口投与で急性毒性症状を示唆する一般状態変化は認められなかった．サルの心血管系への影響に関する試験及びサル反復投与毒性試験では 200 mg/kg 以上の単回又は反復経口投与で軟便・下痢又は嘔吐が観察されたが，400 mg/kg までの単回経口投与でも死亡及び切迫殺は発生しなかった．S-033188 をラットに 2000 mg/kg の用量で経口投与した際の S-033447 の C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24hr}$ は，それぞれ 0.713 µg/mL 及び 7.99 µg·hr/mL であった (表 2.4.5.3-2)．また，サルの心血管系への影響に関する試験で 400 mg/kg の用量で単回経口投与した際の C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24hr}$ は，それぞれ 1.64 µg/mL 及び 26.2 µg·hr/mL であり (評価資料 4.2.1.3-06)，ヒトにおける申請用法用量との曝露比は，ラットでそれぞれ 5.8 倍及び 4.7 倍，サルでそれぞれ 13.3 倍及び 15.3 倍であった．サルへの単回経口投与で認められた所見は軽度であり，影響が認められた用量における曝露はヒトにおける申請用法用量での S-033188 の血漿中曝露のばらつきを考慮しても約 13 倍以上の乖離があることから，ヒトにおいて誤って過量投与された場合でも，S-033188 投与に起因する重篤な急性有害事象が起きるリスクは低いと考えられる．軟便・下痢又は嘔吐等の消化器症状は，消化器に対する異物反応や刺激性によって発生することがあり，その場合，血漿中 S-033447 濃度に依存する変化ではなく，被験物質の投与量に依存する反応であると考えられる．申請用法用量における体重当たりの投与量は 0.8 mg/kg (ヒトの体重を 50 kg で換算) であるのに対し，サルにおいて消化器症状が認められたのは 200 mg/kg 以上の投与量であり，200 倍以上の十分な乖離が認められた．以上のことから，サルにおいて認められた消化器症状が投与量に依存した変化であったとしても，ヒトにおいて消化器症状が発現する可能性は低いと考えられる．

2.4.5.3.4 生殖発生毒性試験

ラット受胎能及び初期胚発生に関する試験において，雌雄の受胎能及び初期胚並びに胚・胎児に S-033188 投与による毒性は認められず，無毒性量は 1000 mg/kg/日と判断した．受胎能及び初期胚発生に関する試験における血漿中曝露量は測定していないが，胚・胎児発生に関する試験の 1000 mg/kg/日における S-033447 の血漿中曝露量 (C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24hr}$) は，申請用法用量 (40 mg/日) における S-033447 の血漿中曝露量のそれぞれ 5.0 倍及び 4.2 倍であった (表 2.4.5.3-2)．加えて，ラット 2 週間及び 4 週間反復経口投与毒性試験における雌雄生殖器の病理組織学的検査において異常所見は認められておらず，S-033188 及び S-033447 の遺伝毒性も陰性であった．したがって，S-033188 の投与により受胎能に悪影響を及ぼす可能性は低いと判断した．

ラット胚・胎児発生に関する試験において催奇形性は認められなかった．ウサギ胚・胎児発

生に関する試験では，1000 mg/kg/日で頚部過剰肋骨発現率の高値が認められたが，この所見は隣接する頚椎骨の成長過程で吸収される軽微な変化で，ヒトにおいても胎児期に自然発症で認められ，成長とともに吸収され発現頻度が低下することが報告されていることから [24]，児の生命維持や成長に影響を及ぼさない軽微な変化であると判断した．ウサギ胚・胎児発生に関する試験の 100 mg/kg/日における S-033447 の血漿中曝露量 (C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24hr}$) は，申請用法用量 (40 mg/日) における S-033447 の血漿中曝露量のそれぞれ 7.2 倍及び 5.4 倍であった (表 2.4.5.3-2)．以上のように，ラット及びウサギの胚・胎児発生への影響を評価する試験では，S-033188 は催奇形性を示さず，無毒性量における曝露はヒトにおける申請用法用量での S-033447 の血漿中曝露を超える安全域が確認された (4 倍以上)．

ラット出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験において，母動物並びに次世代の発生に S-033188 投与による毒性は認められず，無毒性量は 1000 mg/kg/日と判断した．出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験における血漿中曝露量は測定していないが，上述したようにラット胚・胎児発生に関する試験の 1000 mg/kg/日における S-033447 の C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24hr}$ は，申請用法用量 (40 mg/日) における S-033447 の血漿中曝露量のそれぞれ 5.0 倍及び 4.2 倍であり (表 2.4.5.3-2)，ヒトにおける申請用法用量での S-033447 の血漿中曝露量を超える条件での安全性が確認された．

以上のことから，S-033188 は申請用法用量で生殖発生毒性を示す可能性は低いと考えられるが，ヒトにおいて妊娠中の投与に関する安全性は確立しておらず，ラットにおいて胎盤通過が認められていることから (2.6.4.4.2.2 項参照)，妊婦又は妊娠している可能性のある婦人には治療上の有益性が危険を上回ると判断される場合にのみ投与するべきと考える．また，ラットにおいて乳汁中への移行が報告されているため (2.6.4.6.1.3 項参照)，授乳婦に投与する場合には授乳を避けるべきと考える．

2.4.5.3.5 小児への投与について

幼若ラットを用いた 40 日間反復経口投与毒性試験では，S-033188 投与による毒性は認められず，無毒性量は 1000 mg/kg/日と判断した．ラット 2 週間及び 4 週間反復経口投与毒性試験並びに幼若ラットを用いた 40 日間反復経口投与毒性試験において S-033188 投与による毒性は認められておらず，毒性試験の対象動物が幼若になることによる新たな毒性は認められなかった．ヒト成人に対する申請用法用量 (体重 80 kg 未満の成人には 40 mg/日，又は体重 80 kg 以上の成人には 80 mg/日) とヒト小児に対する申請用法用量 (5 kg 以上 10 kg 未満の小児には 5 mg/日，10 kg 以上 20 kg 未満の小児には 10 mg/日，20 kg 以上 40 kg 未満の小児には 20 mg/日，又は 40 kg 以上の小児には 40 mg/日) は体重あたりの投与量が成人及び小児いずれも 0.5～1.0 mg/kg の範囲内であった (2.7.3.4.2 項参照)．また，国内で実施したヒト成人における第 2 相臨床試験並びに国内及び海外で実施した第 3 相臨床試験では，S-033188 投与による重篤な副作用は発現しなかった (2.7.4.2.1.4 項参照)．以上のように，ヒト小児への体重あたりの投与量はヒト成人と同等であること，ヒト成人における重篤な副作用の発現は認められていないこと，並びに成獣ラット及び幼若ラットいずれにおいても毒性は認められなかったことから，ヒト小児において重篤な副作用発現のリスクは低いと考えられる．なお，国内で実施したヒト小児における第 3 相臨

床試験では，S-033188 投与による重篤な副作用は発現しなかった (2.7.4.2.1.4 項参照).

2.4.5.3.6 皮膚光毒性試験

ヘアレスマウスを用いた皮膚光毒性試験において S-033188 投与による光毒性は認められなかった．1000 mg/kg の単回経口投与における UV 照射開始時の血漿中 S-033447 の曝露量は 1.29 μg/mL で，申請用法用量 (40 mg/日) における血漿中曝露量の 10.5 倍であり十分な安全域が確認された．したがって，S-033188 の活性体である S-033447 に光毒性のリスクはないと考えられる．また，100 mg/kg の単回腹腔内投与における UV 照射時の血漿中 S-033188 の曝露量は 0.250 μg/mL であった．S-033188 は活性体である S-033447 に速やかに代謝されるが，仮に体内に微量に残留したとしても十分な安全域が見込まれることから，光毒性リスクはないと考えられる．

2.4.5.3.7 結論

以上のように，ヒトで注意すべき S-033188 の安全性リスクとして肝・胆道系障害が考えられたが，形態学的変化を伴わないこと，休薬により速やかに回復することから，ヒト申請用法用量である 1 回投与ではこれら変化が発生するリスクは極めて低いと結論した．

2.4.6 参考文献一覧

1. Palese P, Shaw ML. Orthomyxoviridae: The viruses and their replication. In: Knipe DM, Howley PM. Fields Virology. 5th ed. Philadelphia: Wolters Kluwer Lippincott Williams & Wilkins 2007; 1647-74.
2. Larisa VG, Laurent K, Frederick GH. Influenza virus neuraminidase inhibitors. Lancet 2000; 355 (9206): 827–35.
3. Sangawa H, Komeno T, Nishikawa H, et al. Mechanism of Action of T-705 Ribosyl Triphosphate against Influenza Virus RNA Polymerase. Antimicrobial Agents Chemother 2013; 57 (11): 5202–8.
4. Claas EC, Osterhaus AD, van BR, et al. Human influenza A H5N1 virus related to a highly pathogenic avian influenza virus. Lancet 1998, 351: 472-77.
5. Gao R, Cao B, Hu Y, et al. Human Infection with a Novel Avian-Origin Influenza A (H7N9) Virus. N Engl J Med 2013, 368: 1888-97.
6. Weixing L, Escarpe PA, Eugene J. et al. Identification of GS 4104 as an Orally Bioavailable Prodrug of the Influenza Virus Neuraminidase Inhibitor GS 4071. Antimicrob Agents Chemother 1998, 42: 647-53.
7. Whitley RJ, Monto AS. Prevention and treatment of influenza in high-risk groups: children, pregnant women, immunocompromised hosts, and nursing home residents. J Infect Dis 2006; 194: S133-8.
8. Marroquin LD, Hynes J, Dykens JA, et al. Circumventing the crabtree effect: replacing media glucose with galactose increases susceptibility of HepG2 cells to mitochondrial toxicants. Toxicol Sci 2007; 97 (2): 539-47.
9. Hattori K, Kurihara N, Rokushima M. et al. In-Silico Analyses of Amino Acid Residues Involved in S-033188/S-033447 Binding to N-Terminal Domain of PA Subunit of Influenza Virus Polymerase.

ASM microbe 2017; Poster number 378.

10. Okomo-Adhiambo M., Sleeman K, Lysen C, et al. Neuraminidase inhibitor susceptibility surveillance of influenza viruses circulating worldwide during the 2011 Southern Hemisphere season. Influenza Other Respir Viruses 2013, 7: 645–58.
11. Lee N, Chan PK, Hui DS. Viral loads and duration of viral shedding in adult patients hospitalized with influenza. J Infect Dis 2009; 200: 492-500.
12. Xiling Wang, Hui Jiang, Peng Wu. Epidemiology of avian influenza A H7N9 virus in human beings across five epidemics in mainland China, 2013–17: an epidemiological study of laboratory-confirmed case series. Lancet Infect Dis 2017, S1473-3099 (17) 30323-7
13. 厚生労働省医薬食品局審査管理課．医薬品の臨床試験及び製造販売承認申請のための非臨床安全性試験の実施についてのガイダンス．平成 22 年 2 月 19 日．
14. 厚生労働省医薬食品局審査管理課.「医薬品の臨床試験及び製造販売承認申請のための非臨床安全性試験の実施についてのガイダンス」に関する質疑応答集 (Q&A) について．平成 24 年 8 月 16 日．
15. 厚生労働省医薬食品局審査管理課．医薬品開発と適正な情報提供のための薬物相互作用ガイドライン (最終案)．平成 26 年 7 月 8 日．
16. Ishibashi T. Model-Based Pharmacokinetic Analysis of S-033188/S-033447. Shionogi Co., Ltd.; 2016.
17. Meddings JB, Theisen S. Development of rat jejunum: lipid permeability, physical properties, and chemical composition. Am J Physiol 1989; 256 (5 Pt 1): G931-40.
18. Asaoka Y, Sakai H, Sasaki J, et al. Changes in the Gene Expression and Enzyme Activity of Hepatic Cytochrome P450 in Juvenile Sprague-Dawley Rats. J Vet Med Sci 2010; 72 (4): 471-9.
19. Watkins JB, Klaassen CD. Development of UDP-Glucuronosyltransferase Activity Toward Digitoxigenin-monodigitoxoside in Neonatal Rats. Drug Metab Dispos 1985; 13 (2): 186-91
20. 田所 作太郎，栗原 嘉雄他．ラットの体重と臓器重量について．北関東医学 1962; 12: 250-65
21. Walthall K., Cappon GD. Postnatal development of the gastrointestinal system: a species comparison. Birth Defects Research (Part B) 2005; 74: 132-56
22. Alcorn J, McNamara PJ. Pharmacokinetics in the newborn. Advanced Drug Delivery Reviews 2003; 55: 667-86
23. Gladtke E. The importance of pharmacokinetics for paediatrics. Eur J Pediatr 1979; 131: 85-91
24. Chernoff N, Rogers JM. Supernumerary ribs in developmental toxicity bioassays and in human populations: incidence and biological significance. J Toxicol Environ Health B Crit Rev 2004; 7 (6): 437-49.