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)

2.6 非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.1 緒言

塩野義製薬株式会社

目次

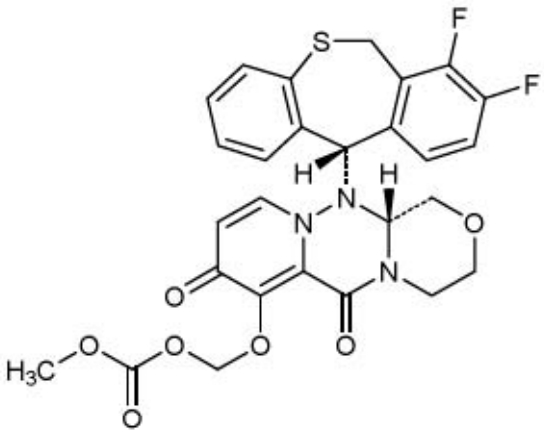
2.6.1 緒言 3
2.6.1.1 医薬品の構造及び薬理学的特性 3
2.6.1.2 申請した臨床適応，用量及び投与期間 4

2.6.1 緒言

2.6.1.1 医薬品の構造及び薬理学的特性

S-033188 は，塩野義製薬株式会社で創製された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キャップ依存性エンドヌクレアーゼ（cap-dependent endonuclease）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と考えられる．

1. 医薬品の構造



S-033188

2. 薬理学的特性

実施した非臨床薬効薬理試験結果から本薬の薬理学的特性は以下のように考えられる．

- *in vitro* の評価結果から，S-033447 は，A 型及び B 型の季節性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（オセルタミビルカルボン酸）などのノイラミニダーゼ阻害薬やファビピラビルよりも強力なウイルス増殖抑制効果を発揮すると考えられる．
- 非致死量の季節性インフルエンザウイルスをマウスに接種し，肺内ウイルス力価の低下作用を検討した *in vivo* の評価結果から，S-033188 は，インフルエンザウイルス感染患者に対して，ノイラミニダーゼ阻害薬やファビピラビルよりも強力なウイルス増殖抑制効果を発揮することで，速やかに体内のウイルス力価を低下させると考えられる．
- 致死量の季節性 A 型及び B 型インフルエンザウイルスをマウスに接種し，致死率改善効果を検討した *in vivo* の評価結果から，S-033188 は，インフルエンザウイルス感染患者に対して，オセルタミビルリン酸塩よりも高い有効性を発揮すると考えられる．
- 致死量の季節性 A 型インフルエンザウイルスをマウスに接種し，遅延投与による致死率改善効果を検討した *in vivo* の評価結果から，S-033188 は，治療開始が遅れた患者や重篤な症状を示す患者に対して，オセルタミビルよりも高い有効性を発揮すると考えられる．さらに，S-033188 とオセルタミビルリン酸塩との併用投与による効果を検討した *in vivo* の評価結果から，S-033188 は，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，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すると考えられる．

- 非致死量の季節性A型インフルエンザウイルスを，免疫抑制状態を誘導したマウスに接種し，肺内ウイルス力価の低下作用を検討した *in vivo* の評価結果から，S-033188は，免疫能低下が見られるハイリスク患者に対して，オセルタミビルリン酸塩よりも高い有効性を発揮すると考えられる．
- A型H5N1亜型の高病原性鳥インフルエンザウイルスやA型H7N9亜型の鳥インフルエンザウイルスを用いた *in vitro* 及び *in vivo* の評価結果及び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する *in vitro* の評価結果から，S-033188は，鳥や豚由来のA型インフルエンザウイルスが感染した患者に対して，季節性A型インフルエンザウイルスと同等の有効性を発揮する治療薬になると考えられる．
- ノイラミニダーゼ阻害薬耐性変異を有する季節性インフルエンザウイルス及び鳥インフルエンザウイルスを用いた *in vitro* あるいは *in vivo* の評価結果から，S-033188は，ノイラミニダーゼ阻害薬耐性変異を有するインフルエンザウイルスに対しても高い有効性を発揮すると考えられる．

2.6.1.2 申請した臨床適応，用量及び投与期間

(1) 効能又は効果

A型又はB型インフルエンザウイルス感染症

(2) 用法及び用量

① 成人，12歳以上の小児

通常，S-033188として40 mgを単回経口投与する．ただし，体重80 kg以上の患者にはS-033188として80 mgを単回経口投与する．

② 12歳未満の小児

通常，S-033188として以下の用量を単回経口投与する．

体重	用量
40 kg以上	40 mg
20 kg以上40 kg未満	20 mg
10 kg以上20 kg未満	10 mg
5 kg以上10 kg未満	5 mg

なお，機構における審査の過程において，インフルエンザウイルス感染症の患者におけるS-033188の用法・用量 (案) を以下のとおり変更した．

① 通常，成人及び 12 歳以上の小児には，20 mg 錠 2 錠 (S-033188 として 40 mg) を単回経口投与する．ただし，体重 80 kg 以上の患者には 20 mg 錠 4 錠 (S-033188 として 80 mg) を単回経口投与する．

② 通常，12 歳未満の小児には，以下の用量を単回経口投与する．

体重	用量
40 kg 以上	20 mg 2 錠 (S-033188 として 40 mg)
20 kg 以上 40 kg 未満	20 mg 1 錠 (S-033188 として 20 mg)
10 kg 以上 20 kg 未満	10 mg 1 錠 (S-033188 として 10 mg)

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)

2.6 非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.2 薬理試験の概要文

塩野義製薬株式会社

目次

略号及び用語定義一覧表 5
2.6.2 薬理試験の概要文 7
2.6.2.1 まとめ 7
2.6.2.2 効力を裏付ける試験 12
2.6.2.2.1 *In vitro* における季節性インフルエンザウイルスに対する作用 13
2.6.2.2.1.1 A型及び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 13
2.6.2.2.1.2 A型インフルエンザウイルス遺伝子の *in vitro* 転写反応に対するS-033188及びS-033447の阻害効果 14
2.6.2.2.1.3 A型インフルエンザウイルス感染細胞におけるS-033447のウイルス遺伝子転写反応に対する阻害効果 14
2.6.2.2.1.4 A型及びB型インフルエンザウイルス実験室株に対するS-033447のウイルス放出抑制効果 15
2.6.2.2.1.5 A型及びB型インフルエンザウイルス臨床分離株に対するS-033447のウイルス放出抑制効果 16
2.6.2.2.1.6 A型及びB型インフルエンザウイルス実験室株に対するS-033447のプラーク形成抑制効果 17
2.6.2.2.1.7 A型及びB型インフルエンザウイルス臨床分離株に対するS-033447のプラーク形成抑制効果 18
2.6.2.2.1.8 A型及びB型インフルエンザウイルスワクチン株に対するS-033447のプラーク形成抑制効果 20
2.6.2.2.1.9 NA阻害薬耐性を示すA型インフルエンザウイルスに対するS-033447の効果 20
2.6.2.2.1.10 S-033447とNA阻害薬との併用によるA型インフルエンザウイルスが示す細胞変性に対する抑制効果 21
2.6.2.2.2 *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 22
2.6.2.2.2.1 S-033447耐性A型インフルエンザウイルス (H1N1) の分離 22
2.6.2.2.2.2 S-033447耐性A型インフルエンザウイルス (H1N1) の増殖性 24
2.6.2.2.2.3 S-033447耐性遺伝子を導入した組換えウイルスを用いたS-033447に対する感受性試験 25
2.6.2.2.2.4 S-033447耐性A型インフルエンザウイルス (H3N2) の分離 26
2.6.2.2.2.5 S-033447耐性B型インフルエンザウイルスの分離 29
2.6.2.2.3 *In vitro* における季節性以外のインフルエンザウイルスに対する作用 31
2.6.2.2.3.1 高病原性鳥インフルエンザウイルス (A/H5N1) に対するS-033447のウイルス放出抑制効果 31
2.6.2.2.3.2 鳥インフルエンザウイルス (A/H7N9) に対するS-033447のウイルス放出抑

制効果 31
2.6.2.2.3.3 様々な亜型の動物由来インフルエンザウイルスに対するS-033447のウイルス放出抑制効果 32
2.6.2.2.4 *In vivo*における季節性インフルエンザウイルスに対する作用 33
2.6.2.2.4.1 マウス適合インフルエンザウイルスの薬剤感受性 33
2.6.2.2.4.2 A型インフルエンザウイルス感染マウスモデルにおけるS-033188の肺内ウイルス力価低下作用 34
2.6.2.2.4.3 A型H3N2亜型及びB型インフルエンザウイルス感染マウスモデルにおけるS-033188の肺内ウイルス力価低下作用 36
2.6.2.2.4.4 NA阻害薬耐性インフルエンザウイルスに対するS-033188の肺内ウイルス力価低下作用 38
2.6.2.2.4.5 A型インフルエンザウイルス感染マウスモデルにおけるS-033188投与後の経時的な肺内ウイルス力価低下作用 39
2.6.2.2.4.6 PK/PD解析 41
2.6.2.2.4.7 ヒト血清がS-033447のウイルス遺伝子転写反応に対する阻害効果に及ぼす影響 43
2.6.2.2.4.8 A型インフルエンザウイルス感染マウスモデルにおけるS-033188の致死率改善効果 44
2.6.2.2.4.9 B型インフルエンザウイルス感染マウスモデルにおけるS-033188の致死率改善効果 45
2.6.2.2.4.10 A型インフルエンザウイルス感染マウスモデルにおけるS-033188の遅延投与による致死率改善効果と肺内ウイルス力価低下作用 46
2.6.2.2.4.11 A型インフルエンザウイルス感染マウスモデルにおけるNA阻害薬との併用投与による致死率改善効果 49
2.6.2.2.4.12 A型インフルエンザウイルス感染フェレットモデルにおけるS-033188の治療効果 53
2.6.2.2.4.13 A型インフルエンザウイルス感染免疫抑制マウスモデルにおける肺内ウイルス力価低下作用 55
2.6.2.2.5 *In vivo*における季節性以外のインフルエンザウイルスに対する作用 57
2.6.2.2.5.1 高病原性鳥インフルエンザウイルス (A/H5N1) に対するS-033188の治療効果 57
2.6.2.2.5.2 鳥インフルエンザウイルス (A/H7N9) に対する治療効果 59
2.6.2.3 副次的薬理試験 61
2.6.2.3.1 選択性 61
2.6.2.3.1.1 培養細胞に対する細胞傷害作用 61
2.6.2.3.1.2 季節性インフルエンザウイルス感染による細胞変性に対する抑制効果と細胞傷害作用との乖離 61
2.6.2.3.1.3 ヒト各種組織由来株化細胞に対する細胞傷害作用 62

2.6.2.3.1.4 ヒト細胞に対するミトコンドリア毒性 63
2.6.2.3.1.5 各種受容体，イオンチャネル及びトランスポーター結合及び酵素アッセイ 64
2.6.2.4 安全性薬理試験 65
2.6.2.4.1 中枢神経系 65
2.6.2.4.1.1 ラットの中枢神経系に対する作用 65
2.6.2.4.2 心血管系 65
2.6.2.4.2.1 *In vitro* におけるモルモット乳頭筋標本の心筋活動電位に対する作用 65
2.6.2.4.2.2 hERG 導入細胞におけるカリウム電流に対する作用 66
2.6.2.4.2.3 *In vivo* における無麻酔サルの血圧，心拍数及び心電図に対する作用 66
2.6.2.4.3 呼吸系 67
2.6.2.4.3.1 ラットの呼吸機能に対する作用 67
2.6.2.5 薬力学的薬物相互作用試験 67
2.6.2.6 考察及び結論 68
2.6.2.6.1 発見の経緯と作用機序 68
2.6.2.6.2 *In vitro* 活性 69
2.6.2.6.3 *In vivo* 活性 70
2.6.2.6.4 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 71
2.6.2.6.5 臨床で有効性が期待できる血漿中濃度 71
2.6.2.6.6 ハイリスク患者に対する治療効果 72
2.6.2.6.7 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 72
2.6.2.6.8 季節性以外のインフルエンザウイルスに対する効果 73
2.6.2.6.9 S-033447 に対する感受性低下の機序 74
2.6.2.6.10 安全性薬理 74
2.6.2.7 図表 76
2.6.2.8 参考文献 76

略号及び用語定義一覧表

略号	英語	日本語
adjusted COD	coefficient of determination adjusted for degrees of freedom	自由度調整済みの決定係数
$APD_{30\,(90)}$	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
ATP	adenosine triphosphate	アデノシン三リン酸
$AUC_{0\text{-}12\,(24)\,hr}$	area under the plasma concentration-time curve from time 0 to 12 (24) hours post-dose	時間 0 から投与後 12 (24) 時間までの血漿中濃度-時間曲線下面積
$AUC_{0\text{-}inf}$	area under the plasma concentration-time curve extrapolated 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_{all}	area under the plasma concentration-time curve from time 0 to the last sampling time after dosing	時間 0 から最終採血時点までの血漿中濃度－時間曲線下面積
BID	twice daily	1 日 2 回
BLQ	below the lower limit of quantification	定量下限未満
$C_{12\,(24)\,hr}$	plasma concentration at 12 (24) hours post-dose	投与後 12 (24) 時間の血漿中濃度
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
CI	combination Index	併用投与指数
C_{max}	maximum plasma concentration	最高血漿中濃度
COD	coefficient of determination	決定係数
CP	cyclophosphamide	シクロフォスファミド
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
dpi	days post-infection	感染後の日数
E_0	baseline effect	ベースライン薬効
$EC_{50\,(90)}$	50% (90%) effective concentration	50 (90) %有効濃度
E_{max}	maximum effect	最大薬効
FBS	fetal bovine serum	ウシ胎児血清
FC	fold change	
FOB	functional observation battery	機能観察総合評価
GLP	Good Laboratory Practice	
hERG	human ether-a-go-go related gene	ether-a-go-go 関連遺伝子
IC_{50}	50% inhibitory concentration	50%阻害濃度
K362K/R	mixture of no substitution and lysine-to-arginine substitution at amino acid position 362	362 番目のアミノ酸のリジンがアルギニンに置換されたものと置換されていないものの混在
MC	methylcellulose aqueous solution	メチルセルロース水溶液
NA	neuraminidase	ノイラミニダーゼ
N/A	not applicable	
NA/H274Y	histidine-to-tyrosine substitution at amino	NA の 274 番目のアミノ酸のヒスチジン

	acid position 274 in neuraminidase	からチロシンへの置換
NA/R292K	-to-tyrosine substitution at amino acid position 274 in neuraminidase	NA の 292 番目のアミノ酸のアルギニンからリジンへの置換
N.C.	not calculated	
PA	polymerase acidic protein	ポリメラーゼ酸性タンパク質
PA/E199G	glutamic acid-to-glycine substitution at amino acid position 199 in polymerase acidic protein	PA の 199 番目のアミノ酸のグルタミン酸からグリシンへの置換
PA/I38I/T	mixture of no substitution and 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がスレオニンに置換されたものと置換されていないものの混在
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
PA/K362K/R	mixture of no substitution and lysine-to-arginine substitution at amino acid position 362 in polymerase acidic protein	PA の 362 番目のアミノ酸のリジンがアルギニンに置換されたものと置換されていないものの混在
PB	polymerase basic protein	ポリメラーゼ塩基性タンパク質
PK/PD	pharmacokinetics/pharmacodynamics	薬物動態/薬力学
PS	potency shift	
QD	once daily	1 日 1 回
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
S.D.	standard deviation	標準偏差
S.E.	standard error	標準誤差
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
$T_{>2\ (>10,\ >50)}$	time which plasma concentration exceeds 2 (10, 50) ng/mL during 24 hours	2 (10, 50) ng/mL を超える濃度を維持する時間
$TCID_{50}$	50% tissue culture infectious dose	50%組織培養感染量
T_{max}	time to maximum plasma concentration	最高血漿中濃度到達時間
vRNA	virus genome RNA	ウイルスゲノム RNA
WBP	whole-body plethysmograph	呼吸数及び換気量の評価方法

2.6.2 薬理試験の概要文

2.6.2.1 まとめ

効力を裏付ける試験

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キャップ依存性エンドヌクレアーゼ [cap-dependent endonuclease (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と考えられる．S-033188 は，体内で速やかに S-033447 に加水分解されるため，以下の *in vitro* 試験では S-033447 を使用し，標的酵素に対する阻害効果を評価した．また培養細胞にインフルエンザウイルスを感染させた後，ウイルス増殖に伴って培地中に放出されるウイルスの力価，感染細胞に形成されるプラークの数及びウイルス増殖に起因する細胞変性効果を指標として，インフルエンザウイルスの増殖に対する S-033447 の抑制効果を評価した．*in vivo* 試験では S-033188 をインフルエンザウイルス感染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，致死率改善効果又は体温上昇の抑制効果を評価した．

作用メカニズムを検討する試験 (インフルエンザウイルス遺伝子の転写反応を模した酵素反応への阻害試験系及びインフルエンザウイルス感染細胞内で合成されるウイルスの mRNA 量を指標にした試験系) において，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された．A 型及び B 型インフルエンザウイルス実験室株の CEN 活性に対する阻害効果を検討した結果，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．A 型及び B 型インフルエンザウイルス実験室株及び臨床分離株並びにヒトから分離された高病原性鳥インフルエンザウイルス (A/H5N1) やヒトから分離された鳥インフルエンザウイルス (A/H7N9) 及び鳥やブタから分離された様々な亜型のインフルエンザウイルスの増殖に対する抑制効果を，これらのウイルスを感染させた MDCK 細胞 (イヌ腎臓由来株化細胞) から培地中に放出されるウイルスの力価を指標として検討した結果，S-033447 の 90%有効濃度 (EC_{90}) は，A 型で 0.46～0.98 nmol/L，B 型で 2.21～6.48 nmol/L，高病原性鳥インフルエンザウイルス (A/H5N1) で 1.64 nmol/L，鳥インフルエンザウイルス (A/H7N9) で 0.80 nmol/L，動物由来インフルエンザウイルスで 0.73～1.20 nmol/L であり，オセルタミビル活性体などの既存薬よりも強力なウイルス増殖抑制効果を示した．さらに，A 型及び B 型インフルエンザウイルス実験室株及び臨床分離株の増殖に対する抑制効果を，感染細胞に形成されるプラークの数を指標として検討した結果，S-033447 の 50%有効濃度 (EC_{50}) は，A 型で 0.20～1.87 nmol/L，B 型で 3.33～13.00 nmol/L であった．また，ノイラミニダーゼ (NA) 阻害薬に対する耐性変異である NA/H274Y (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) を有するインフルエンザウイルス実験室株及び臨床分離株並びに高病原性鳥インフルエンザウイルス株 (A/H5N1)，同じく NA 阻害薬に対する耐性変異である NA/R292K (NA の 292 番目のアミノ酸のアルギニンからリジンへの置換) を有する鳥インフルエンザウイルス株 (A/H7N9) に対しても，S-033447 は野生型ウイルスと同等の増殖抑制効果を示した．MDCK 細胞における A 型インフルエンザウイルス増殖に起因する細胞変性効果

を指標として，インフルエンザウイルスの増殖に対する S-033447 の抑制効果を評価した結果，S-033447 は単独でウイルス増殖抑制効果を示し，さらに 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示した．

S-033447 に対する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 亜型インフルエンザウイルスを 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継代培養を繰り返したところ，ポリメラーゼ酸性タンパク質 (PA) の N 末端から 38 番目に位置し，CEN 活性中心を形成するアミノ酸の 1 つであるイソロイシンがスレオニンに置換 (PA/I38T) したウイルスが検出された．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得られた PA/I38T を有する分離ウイルスと同様に野生株に比して S-033447 に対する感受性低下を示したことから，PA/I38T は S-033447 に対する感受性低下の責任変異であると考えた．PA/I38T を有するウイルスは，MDBK，MDCK，RPMI2650 (ヒト鼻中隔扁平上皮癌由来株化細胞) 及び A549 細胞 (ヒト肺腺癌由来株化細胞) において野生型ウイルスよりも低い増殖能を示し，ファビピラビルに対して交叉耐性を示さなかった. 同様の方法で, A 型 H3N2 亜型インフルエンザウイルスを MDCK 細胞に感染させて継代培養を繰り返したところ，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)，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．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 倍の感受性低下を示した．同様の方法で，B 型インフルエンザウイルスを MDCK 細胞に感染させて継代培養を繰り返したが，アミノ酸置換体は検出されなかった．

In vivo 試験では，インフルエンザウイルスがマウスで効率よく増殖するよう，繰り返し感染させることでマウスに適合させたウイルス株 (A/Osaka/129/2009, A/Hong Kong/8/68 及び B/Hong Kong/5/72) を使用した．マウスに適合させたウイルス株のプラーク形成に対する S-033447 の EC_{50} は, それぞれの親株の EC_{50} とほぼ同等の値を示したことから, マウス適合の過程で S-033447 に対する薬剤感受性が変化しないことが確認された．A 型及び B 型インフルエンザウイルス並びに NA/H274Y を有する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 を 1 日 2 回 (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結果，5 mg/kg BID 以上の用量を投与した群は, 臨床用量相当のオセルタミビルリン酸塩などの既存薬を投与した群よりも肺内ウイルス力価が有意に低下した．A 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 を BID 1 日経口投与し，投与開始から 3 日間の肺内ウイルス力価を経時的に測定した結果，0.5 及び 5 mg/kg BID 投与群は，臨床用量相当のオセルタミビルリン酸塩の 3 日間反復経口投与群よりも肺内ウイルス力価が有意に低下した．A 型及び 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モデルにおいて，接種直後に S-033188 を BID 1 日経口投与し，ウイルス接種から 14～21 日間のマウスの生存を観察した結果，S-033188 を 5 mg/kg BID 以上の用量で投与した群は，臨床用量相当のオセルタミビルリン酸塩を 5 日間反復経口投与した群よりも致死率が改善し，生存期間が有意に延長した．A 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，接種から 72～96 時間後に S-033188 を BID 5 日間反復経口投与し，ウイルス接種から 28 日間のマウスの生存を観察した結果，S-033188 の 1.5 及び 15 mg/kg BID 投与群は，臨床用量相当のオセルタミビルリン酸塩の 5 日間反復経口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．同モデルにおいて，接種から 72 時間後に S-033188 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継時的に測定した結果，S-033188 の 1.5 及び 15 mg/kg BID 投与群は，臨床用量相当のオセルタミビルリン酸塩の 5 日間反復経口投与群よりも肺内ウイルス力価が有意に低下した．また，同モデルにおいて S-033188 とオセルタミビルリン酸塩の併用効果を検討するため，接種から 96 時間後に S-033188 の 0.5 及び 1.5 mg/kg BID とオセルタミビルリン酸塩の 10 及び 50 mg/kg BID の 5 日間反復経口投与を組合せて併用効果を検討した場合，オセルタミビルリン酸塩の 10 及び 50 mg/kg BID 単独投与に比べ，致死率が改善し，生存期間が有意に延長した．

シクロフォ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 型インフルエンザウイルスを接種し，ウイルス感染期間を延長させたモデルにおいて，接種から 5 日後に S-033188 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を経時的に測定した結果，S-033188 の 1.5，15 及び 50 mg/kg BID 投与群は，臨床用量相当のオセルタミビルリン酸塩の 5 日間反復経口投与群よりも肺内ウイルス力価が有意に低下した．同モデルにおいて，S-033188 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に PA のアミノ酸置換体は検出されなかった．A 型インフルエンザウイルスを接種したフェレットモデルにおいて，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結果，S-033188 の 10 及び 30 mg/kg BID 投与群は，臨床用量相当のオセルタミビルリン酸塩の 2 日間反復経口投与群よりも体温上昇が有意に抑制され，鼻腔洗浄液内ウイルス力価が有意に低下した．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を観察した結果，S-033188 の 5 及び 50 mg/kg BID 投与群は，臨床用量相当のオセルタミビルリン酸塩の 5 日間反復経口投与群よりも肺内ウイルス力価が有意に低下し，致死率が改善し，生存期間が有意に延長した．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モデルにおいて，接種直後に S-033188 を BID 1 日経口投与し，投与開始から 5 日間の肺内ウイルス力価の推移及び 28 日間のマウスの生存を観察した結果，S-033188 の 5 及び 50 mg/kg BID 投与群は，臨床用量相当のオセルタミビルリン酸塩の 5 日間反復経口投与群よりも肺内ウイルス力価が有意に低下し，致死率が改善し，生存期間が有意に延長した．なお，*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す．

マウスモデルにおいて，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-033188 は，体内で速やかに S-033447 に加水分解されるため，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 (PK/PD) 解析を行った結果，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．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

において有効性が期待できる S-033447 の C_τ を設定するために，ヒト血清が S-033447 のウイルス増殖抑制効果に及ぼす影響を，インフルエンザウイルス感染細胞内で合成されるウイルスの mRNA 量を指標にした試験系で検討したところ，ヒト血清は S-033447 のウイルス増殖抑制効果に大きな影響を及ぼさなかった．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．

副次的薬理試験

S-033447 の CEN 阻害活性の特異性を確認する目的で，細胞毒性，ミトコンドリア毒性並びに各種受容体，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との乖離について検討した．

異なる 4 種の培養細胞に対して，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 (放出抑制効果やプラーク形成抑制効果) 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 株の A 型あるいは 2 株の B 型インフルエンザウイルスを MDCK 細胞に感染させ，EC_{50} として，ウイルス増殖による死滅細胞数を 50%に抑制する濃度を算出したところ，S-033447 の EC_{50} は，1.23～5.73 nmol/L であり，CC_{50} との間に 500 倍以上の乖離がみられた．

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～> 100 μmol/L の濃度域であった．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．S-033188 及び S-033447 のミトコンドリアに対する選択的な障害は認められなかった．

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．

安全性薬理試験

S-033188 の中枢神経系，呼吸系及び心血管系に対する作用を評価する目的で，安全性薬理コアバッテリー試験を Good Laboratory Practice (GLP) 適用下で実施した．

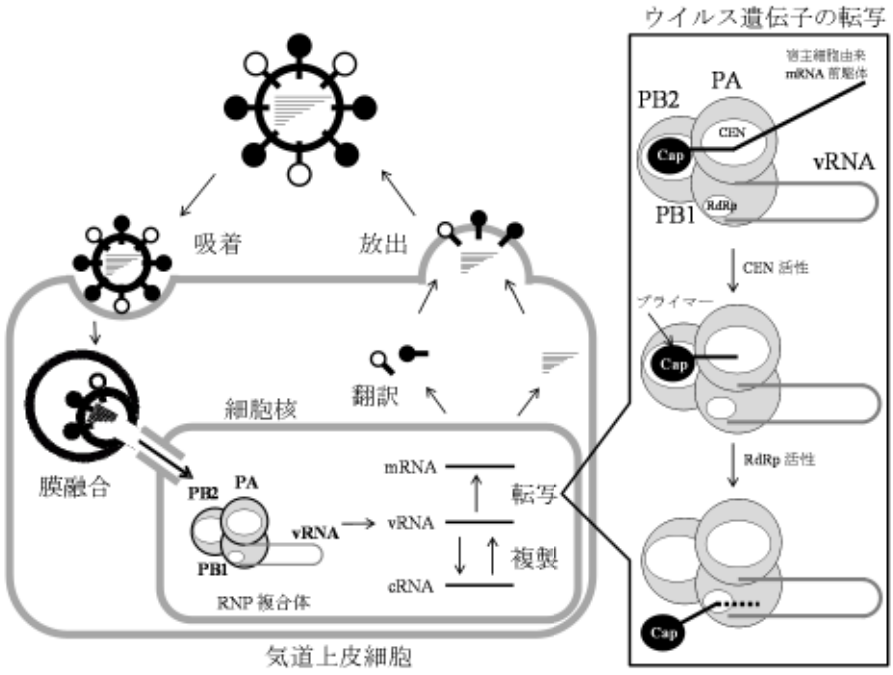
S-033188 は，ラットの中枢神経系及び呼吸系に対して，単回経口投与でそれぞれ 200 及び 2000 mg/kg の用量まで影響を及ぼさなかった．また，S-033188 は，サルの心血管系試験において，単回経口投与で最高用量である 400 mg/kg まで血圧，心拍数及び心電図に影響を及ぼさなかった．モルモット摘出乳頭筋を用いた活動電位試験において，S-033188 及び S-033447 は，それぞれ最高適用濃度である 1 μmol/L (0.572 μg/mL) 及び 0.83 μmol/L (0.40 μg/mL) まで静止膜電位，活動電位振幅，脱分極最大立ち上がり速度並びに 30%及び 90%再分極時の活動電位持続時間 (APD_{30} 及び APD_{90}) 及び APD_{90} と APD_{30} の差 ($APD_{30\text{-}90}$) に影響を及ぼさなかった．また，

hERG チャネル発現細胞を用いた遅延整流カリウム電流に対する S-033188 及び S-033447 の 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．

2.6.2.2 効力を裏付ける試験

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［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［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（図 2.6.2.2-1）．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，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］．

図 2.6.2.2-1　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)

以下の試験では，世界中の研究室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．*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．また，*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抑制効果を評価した．さらに，高病原性鳥インフルエンザウイルスや豚由来の新型インフルエンザウイルスなど，従来の季節性インフルエンザウイルスとは性質の異なるインフルエンザウイルスの感染も問題となっていることから [4], 季節性以外のインフルエンザウイルスに対する S-033188 の有効性についても評価した．

2.6.2.2.1 *In vitro* における季節性インフルエンザウイルスに対する作用

2.6.2.2.1.1 A 型及び 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

評価資料 4.2.1.1-01
概要表 2.6.3.2.1

A 型及び B 型インフルエンザウイルスの CEN 活性に対する S-033447 の阻害効果を評価するため，4 株の A 型及び 3 株の B 型インフルエンザウイルスから RNP 複合体を抽出し，それらが有する CEN 活性を指標とした阻害試験を実施した．

S-033447 の A 型及び B 型インフルエンザウイルスの CEN 活性に対する IC_{50} は，それぞれ 1.4～3.1 nmol/L 及び 4.5～8.9 nmol/L であり，B 型よりも A 型に対する IC_{50} の方が低い値を示した (表 2.6.2.2-1)．一方で，種々のウイルス由来酵素に対して非特異的に阻害することが知られているスラミンナトリウム塩の阻害効果を検討したところ，スラミンナトリウム塩の A 型及び B 型インフルエンザウイルスの CEN 活性に対する IC_{50} は，それぞれ 22000～150000 nmol/L 及び 33000～37000 nmol/L であり，両者の間に明確な差は認められなかった．これらのことから，S-033447 の A 型及び B 型インフルエンザウイルスの CEN 活性に対する阻害効果は，両者の間でわずかな差が認められたものの，どちらの型の CEN 活性に対しても 1 桁 nM レベルの IC_{50} であり，非常に強いことが示唆された．

以上の結果から，S-033447 は A 型及び B 型インフルエンザウイルスの CEN 活性を阻害する化合物であると考えている．

表 2.6.2.2-1　A 型及び B 型インフルエンザウイルス由来 CEN 活性に対する S-033447 とスラミンナトリウム塩の阻害効果

Type/subtype	Strains	IC_{50} (nmol/L)	
		S-033447	Suramin sodium salt
A/H1N1	A/WSN/33	1.4 ± 1.0	22000 ± 2900
A/H1N1	A/PR/8/34	2.7 ± 0.12	70000 ± 4800
A/H3N2	A/Victoria/3/75	2.3 ± 0.47	96000 ± 4800
A/H3N2	A/Hong Kong/8/68	3.1 ± 1.1	150000 ± 17000
B	B/Maryland/1/59	8.9 ± 0.85	37000 ± 6100
B	B/Hong Kong/5/72	5.1 ± 1.1	34000 ± 4100
B	B/Lee/40	4.5 ± 0.51	33000 ± 9600

The mean and standard deviation (S.D.) were calculated from more than 3 independent experiments.

2.6.2.2.1.2 A 型インフルエンザウイルス遺伝子の *in vitro* 転写反応に対する S-033188 及び S-033447 の阻害効果

評価資料 4.2.1.1-02
概要表 2.6.3.2.2

S-033188 と S-033447 の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，A 型インフルエンザウイルス株 (A/WSN/33) 由来の組換え 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 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．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．

以上の結果から，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化合物であると結論した．また 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．

2.6.2.2.1.3 A 型インフルエンザウイルス感染細胞における S-033447 のウイルス遺伝子転写反応に対する阻害効果

評価資料 4.2.1.1-23
概要表 2.6.3.2.28

組換え RNA ポリメラーゼ複合体を用いた試験系にて確認された S-033447 の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検討した．A 型インフルエンザウイルス株 (A/WSN/33) を MDCK 細胞に感染させ，種々の濃度の化合物存在下で培養し，感染 6 時間後の感染細胞内で合成されるウイルスの mRNA の量を測定した．化合物非存在下の条件に比べ，mRNA 量を 1/10 に抑制するために必要な化合物の濃度を EC_{90} として算出し，S-033447 とファビピラビルの転写反応阻害効果を比較した．

S-033447 の EC_{90} は 5.27 nmol/L であり，ファビピラビルの EC_{90} (約 332000 nmol/L) よりも低い値を示した．

以上の結果から，前項の試験で確認された S-033447 の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同様に確認された.

2.6.2.2.1.4 A 型及び B 型インフルエンザウイルス実験室株に対する S-033447 のウイルス放出抑制効果

評価資料 4.2.1.1-03
概要表 2.6.3.2.3

インフルエンザウイルス感染細胞内で CEN 活性が阻害されると，インフルエンザウイルス遺伝子の転写反応阻害により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．そこで，インフルエンザウイルスを感染させた細胞の培養上清に放出される子孫ウイルスの力価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，種々の濃度の化合物存在下で培養し，翌日 (A 型及び B 型ウイルスの培養期間はそれぞれ 24 及び 30 時間) の培養上清中に放出されたウイルス力価 ($TCID_{50}$) を測定した. 化合物非存在下の条件に比べて，力価を 1/10 に抑制するために必要な化合物の濃度を EC_{90} として算出し，S-033447 とオセルタミビル活性体，ザナミビル水和物，ラニナミビル及び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 A 型及び B 型インフルエンザウイルスの放出に対する EC_{90} は，それぞれ 0.46～0.98 nmol/L 及び 2.21～3.40 nmol/L であり，A 型及び B 型インフルエンザウイルスに対するウイルス放出抑制効果に差が認められたが，いずれの対照薬よりも低い値を示した (表 2.6.2.2-2).

以上の結果から，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，ザナミビル水和物，ラニナミビル，ファビピラビルなどの対照薬よりも強力なウイルス増殖抑制効果を有すると結論した.

表 2.6.2.2-2　A 型及び B 型インフルエンザウイルス実験室株に対する S-033447 のウイルス放出抑制効果

		EC_{90} (nmol/L)					
		S-033447		Oseltamivir acid		Zanamivir hydrate	
Type/subtype	Strain	Mean	S.D.	Mean	S.D.	Mean	S.D.
A/H1N1	A/WSN/33	0.79	0.13	161.12	186.18	233.25	157.46
A/H1N1	A/WSN/33-NA/H274Y	0.46	0.14	>400	N.C.	197.64	33.19
A/H1N1	A/PR/8/34	0.79	0.12	180.50	73.86	169.77	54.22
A/H3N2	A/Victoria/3/75	0.98	0.20	64.61	44.97	202.28	162.43
A/H3N2	A/Hong Kong/8/68	0.64	0.30	44.15	25.68	98.12	72.68
B	B/Maryland/1/59	3.08	1.16	245.75	165.74	59.55	26.99
B	B/Hong Kong/5/72	2.21	0.65	537.50	211.21	178.36	66.88
B	B/Lee/40	3.40	1.27	371.77	152.75	249.27	206.39

		EC_{90} (nmol/L)			
		Laninamivir		Favipiravir	
Type/subtype	Strain	Mean	S.D.	Mean	S.D.
A/H1N1	A/WSN/33	17.68	8.63	3778.65	1037.54
A/H1N1	A/WSN/33-NA/H274Y	19.08	9.51	3137.46	859.44
A/H1N1	A/PR/8/34	9.03	7.92	3943.76	1812.06
A/H3N2	A/Victoria/3/75	45.02	35.78	4808.71	1039.81
A/H3N2	A/Hong Kong/8/68	23.16	18.95	2944.21	1136.46
B	B/Maryland/1/59	20.88	4.09	2705.13	547.94
B	B/Hong Kong/5/72	40.53	14.61	1800.32	1043.52
B	B/Lee/40	45.98	14.41	3727.46	478.15

Abbreviation: N.C., not calculated.
The mean and S.D. were calculated from 3 independent experiments.

2.6.2.2.1.5 A 型及び B 型インフルエンザウイルス臨床分離株に対する S-033447 のウイルス放出抑制効果

評価資料 4.2.1.1-04
概要表 2.6.3.2.4

2006 年から 2013 年の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を MDCK 細胞に感染させ，種々の濃度の化合物存在下で培養し，翌日 (A 型及び B 型ウイルスの培養期間はそれぞれ 24 及び 30 時間) の培養上清中に放出されたウイルス力価 ($TCID_{50}$) を測定した．化合物非存在下の条件と比べ，力価を 1/10 に抑制するために必要な化合物の濃度を EC_{90} として算出し，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 A 型及び B 型インフルエンザウイルスの放出に対する EC_{90} は，それぞれ 0.63～0.95 nmol/L 及び 6.10～6.48 nmol/L であり，A 型及び B 型インフルエンザウイルスに対するウイルス放出抑制効果に差が認められたが，ファビピラビルよりも低い値を示した (表 2.6.2.2-3)．

以上の結果から，S-033447 は，今回評価した 2006 から 2013 年の 8 年間に日本で臨床分離された A 型及び B 型インフルエンザウイルス臨床分離株に対して，実験室株と同様にウイルス増殖抑制効果を発揮すると結論した．

表 2.6.2.2-3　A 型及び B 型インフルエンザウイルス臨床分離株に対する S-033447 のウイルス放出抑制効果

		EC_{90} (nmol/L)			
		S-033447		Favipiravir	
Type/subtype	Strain	Mean	S.D.	Mean	S.D.
A/H1N1	A/Kadoma/3/2006	0.88	0.49	3417.76	1810.86
A/H1N1	A/Osaka/129/2009	0.86	0.08	4183.69	6.29
A/H1N1	A/Osaka/180/2009[a]	0.95	0.41	3945.39	1216.98
A/H3N2	A/Hokkaido/12H048/2013	0.63	0.25	3335.60	1102.13
A/H3N2	A/Niigata/12F392/2013	0.87	0.52	1898.14	806.10
B	B/Hokkaido/11H011/2012	6.48	0.97	1735.19	252.28
B	B/Gunma/12G045/2013	6.10	0.33	2585.87	1825.91

The mean and S.D. were calculated from 3 independent experiments.
a H274Y substitution in the neuraminidase.

2.6.2.2.1.6 A 型及び B 型インフルエンザウイルス実験室株に対する S-033447 のプラーク形成抑制効果

評価資料 4.2.1.1-05
概要表 2.6.3.2.5

インフルエンザウイルスを感染させた細胞を，寒天培地で培養すると，放出された子孫ウイルスにより感染細胞の周辺に新たな感染が広がり，これに伴い死滅した細胞によるプラークが生じる．このプラーク形成数を指標に薬剤のウイルス増殖抑制効果を評価する試験法は，ウイルスの薬剤感受性試験法として汎用されているため，この試験法にて S-033447 のウイルス増殖抑制効果を評価した．4 株の A 型及び 2 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，種々の濃度の化合物存在下で培養し，3 日間培養により形成されたプラーク数を測定した．化合物非存在下の条件に比べ，プラーク数を 50%抑制するために必要な化合物の濃度を EC_{50} として算出し，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 A 型及び B 型インフルエンザウイルスのプラーク形成に対する EC_{50} は，それぞれ 0.35～0.76 nmol/L 及び 4.33～4.85 nmol/L であり，A 型及び B 型インフルエンザウイルスに対するプラーク形成抑制効果に差が認められたが，ファビピラビルよりも低い値を示した (表 2.6.2.2-4).

以上の結果から，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ファビピラビルよりも強力なウイルス増殖抑制効果を発揮すると結論した．

表 2.6.2.2-4　A 型及び B 型インフルエンザウイルス実験室株に対する S-033447 のプラーク形成抑制効果

		EC_{50} (nmol/L)			
		S-033447		Favipiravir	
Type/subtype	Strain	Mean	S.D.	Mean	S.D.
A/H1N1	A/WSN/33	0.76	0.36	20237.37	7338.31
A/H1N1	A/WSN/33-NA/H274Y	0.49	0.20	19708.66	4792.24
A/H3N2	A/Victoria/3/75	0.76	0.19	10622.91	3284.25
A/H3N2	A/Hong Kong/8/68	0.35	0.06	5061.25	660.16
B	B/Maryland/1/59	4.85	2.42	21061.74	16213.15
B	B/Hong Kong/5/72	4.33	2.69	15798.81	3888.14

The mean and S.D. were calculated from 3 independent experiments.

2.6.2.2.1.7 A 型及び B 型インフルエンザウイルス臨床分離株に対する S-033447 のプラーク形成抑制効果

評価資料 4.2.1.1-06，4.2.1.1-07
概要表 2.6.3.2.6，2.6.3.2.7

2006 年から 2014 年の間に日本国内で臨床分離された 22 株の A 型及び 11 株の B 型インフルエンザウイルス株を MDCK 細胞に感染させ，種々の濃度の化合物存在下で培養し，3 日間培養により形成されたプラーク数を測定した．化合物非存在下の条件に比べ，プラーク数を 50%抑制するために必要な化合物の濃度を EC_{50} として算出し，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 A 型及び B 型インフルエンザウイルスのプラーク形成に対する EC_{50} は，それぞれ 0.20～1.55 nmol/L 及び 3.33～11.26 nmol/L であり，A 型及び B 型インフルエンザウイルスに対するプラーク形成抑制効果に差が認められたが，ファビピラビルよりも低い値を示した (表 2.6.2.2-5).

以上の結果から，S-033447 は，今回評価した 2006 から 2014 年の 9 年間に日本で臨床分離された A 型及び B 型インフルエンザウイルス臨床分離株に対して，実験室株と同等のウイルス増殖抑制効果を発揮すると結論した．

表 2.6.2.2-5　A 型及び B 型インフルエンザウイルス臨床分離株に対する S-033447 及びファビピラビルのプラーク形成抑制効果

		EC_{50} (nmol/L)			
		S-033447		Favipiravir	
Type/subtype	Strain	Mean	S.D.	Mean	S.D.
(評価資料 4.2.1.1-06)					
A/H1N1	A/Kadoma/3/2006	0.94	0.23	15921.25	4777.96
A/H1N1	A/Osaka/129/2009	0.26	0.03	5997.85	1459.17
A/H1N1	A/Osaka/180/2009 [a]	0.48	0.07	7781.85	514.29
A/H1N1	A/Nagasaki/10N073/2011	0.20	0.10	7107.27	2961.82
A/H1N1	A/Kyoto/10K124/2011[a]	0.35	0.14	7519.05	3467.41
A/H1N1	A/Kyoto/10K118/2011	0.80	0.46	9285.86	1037.96
A/H1N1	A/Hokkaido/13H020/2014	0.99	0.17	5699.56	3484.95
A/H1N1	A/Nagasaki/13N019/2014	0.52	0.15	5213.67	3691.01
A/H1N1	A/Nagasaki/13N059/2014[a]	0.66	0.12	5529.57	3384.77
A/H3N2	A/Hyogo/10K051/2011	0.66	0.34	8578.24	4051.95
A/H3N2	A/Niigata/10F017/2011	0.43	0.05	10898.58	2215.27
A/H3N2	A/Niigata/11F027/2012	0.90	0.35	9997.65	2119.93
A/H3N2	A/Tokyo/11IM003/2012	0.49	0.06	8608.13	1821.01
A/H3N2	A/Hokkaido/12H048/2013	0.56	0.02	20102.12	17491.38
A/H3N2	A/Niigata/12F392/2013	0.68	0.36	10986.95	960.41
A/H3N2	A/Kyoto/13SK042/2014	0.49	0.07	9930.30	780.08
A/H3N2	A/Nagasaki/13N033/2014	0.42	0.06	6246.96	3728.19
B	B/Kyoto/10K131/2011	4.01	1.64	5388.38	383.42
B	B/Hokkaido/11H011/2012	5.28	0.26	7959.90	369.61
B	B/Gunma/12G045/2013	5.04	1.83	6547.81	2294.34
B	B/Gunma/13G004/2014	11.26	1.20	7206.97	1363.49
(評価資料 4.2.1.1-07)					
A/H1N1	A/Hokkaido/07H002/2008	1.55	0.78	12399.34	1668.54
A/H1N1	A/Nagasaki/07N020/2008[a]	0.73	0.38	9792.83	1135.66
A/H3N2	A/Niigata/05F067/2006	0.38	0.14	8474.14	1821.05
A/H3N2	A/Nagasaki/05N007/2006	0.80	0.18	5596.88	1176.08
A/H3N2	A/Kyoto/06K110/2007	0.55	0.22	7399.62	2797.93
B	B/Niigata/06F075/2007	4.72	1.75	9117.34	1354.79
B	B/Gunma/06G040/2007	5.97	0.58	8695.90	1787.95
B	B/Kyoto/08K015/2009	5.04	1.52	5057.36	2106.91
B	B/Kyoto/11K272/2012	4.39	1.26	3839.75	2194.88
B	B/Nagasaki/13N013/2013	4.03	0.84	7860.73	796.11
B	B/Niigata/13F044/2014	3.33	0.59	2376.55	286.16
B	B/Kyoto/13K042/2014	5.96	2.96	8531.80	1620.65

The mean and S.D. were calculated from 3 independent experiments.
a H274Y substitution in the neuraminidase

2.6.2.2.1.8 A型及びB型インフルエンザウイルスワクチン株に対するS-033447のプラーク形成抑制効果

評価資料 5.3.5.4-01
概要表 2.6.3.2.8

2004年以降にWHOがワクチン株として推奨した6株のA型及び6株のB型インフルエンザウイルス株をMDCK細胞に感染させ，種々の濃度の化合物存在下で培養し，3日間培養により形成されたプラーク数を測定した．化合物非存在下の条件と比べ，プラーク数を50%抑制するために必要な化合物の濃度をEC_{50}として算出し，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A型及びB型インフルエンザウイルスワクチン株のプラーク形成に対するEC_{50}は，それぞれ0.74～1.87 nmol/L及び9.24～13.00 nmol/Lであり，A型及びB型インフルエンザウイルスに対するプラーク形成抑制効果に差が認められたが，ファビピラビルよりも低い値を示した (表 2.6.2.2-6).

以上の結果から，S-033447は，WHOが推奨したA型及びB型インフルエンザウイルスワクチン株に対して臨床分離株や実験室株と同等のウイルス増殖抑制効果を発揮すると結論した．

表 2.6.2.2-6　A型及びB型インフルエンザウイルスワクチン株に対するS-033447及びファビピラビルのプラーク形成抑制効果

		EC_{50} (nmol/L)			
		S-033447		Favipiravir	
Type/subtype	Strain	Mean	S.D.	Mean	S.D.
A/H1N1	A/Brisbane/59/2007	1.85	0.20	11806.44	1044.24
A/H1N1	A/California/7/2009	1.18	0.13	12350.37	1742.20
A/ H3N2	A/Victoria/361/2011	1.87	0.06	11431.86	1389.60
A/ H3N2	A/New York/39/2012	0.74	0.28	11021.81	3806.56
A/ H3N2	A/Texas/50/2012	1.00	0.14	12911.87	1518.57
A/ H3N2	A/Switzerland/9715293/2013	1.04	0.57	10369.53	1404.84
B	B/Phuket/3073/2013	9.24	2.93	13919.59	1987.55
B	B/Malaysia/2506/2004	12.26	2.47	13628.90	2105.20
B	B/Brisbane/60/2008	10.61	3.20	9600.00	3731.90
B	B/Wisconsin/1/2010	13.00	1.68	9446.12	2070.56
B	B/Massachusetts/2/2012	9.53	2.49	9402.45	1483.96
B	B/Texas/2/2013	11.91	1.31	8821.58	1066.49

The mean and S.D. were calculated from 3 independent experiments.

2.6.2.2.1.9 NA阻害薬耐性を示すA型インフルエンザウイルスに対するS-033447の効果

評価資料 4.2.1.1-03，4.2.1.1-04，4.2.1.1-05，4.2.1.1-06，4.2.1.1-07
概要表 2.6.3.2.3，2.6.3.2.4，2.6.3.2.5，2.6.3.2.6，2.6.3.2.7

前述した試験では，NA阻害薬耐性A型インフルエンザウイルス株に対するウイルス増殖抑制効果も検討した．NA/H274Yを有するA型H1N1亜型ウイルスは，オセルタミビルなどのNA阻害薬に対する薬剤感受性が，顕著に低下することが報告されている [5]．S-033447は，

NA/H274Y を有する実験室株である A/WSN/33-NA/H274Y と，その野生型ウイルス株である A/WSN/33 に対し，ほぼ同等のウイルス放出抑制効果及びプラーク形成抑制効果を示した (表 2.6.2.2-2, 表 2.6.2.2-4). また S-033447 は, NA/H274Y を有する臨床分離株である A/Osaka/180/2009 と，同シーズンに分離された野生型ウイルス株である A/Osaka/129/2009 に対し，ほぼ同等のウイルス放出抑制効果を示した (表 2.6.2.2-3)．さらに，S-033447 は，NA/H274Y を有する A/Nagasaki/07N020/2008，A/Kyoto/10K124/2011 及び A/Nagasaki/13N059/2014 と，同シーズンにそれぞれ分離された野生型ウイルス株である A/Hokkaido/07H002/2008，A/Kyoto/10K118/2011 及び A/Nagasaki/13N019/2014 に対し，ほぼ同等のプラーク形成抑制効果を示した (表 2.6.2.2-5).

以上の結果から，S-033447 は，NA 阻害薬耐性を示すウイルス株に対して野生型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結論した.

2.6.2.2.1.10 S-033447 と NA 阻害薬との併用による A 型インフルエンザウイルスが示す細胞変性に対する抑制効果

評価資料 4.2.1.1-08
概要表 2.6.3.2.9

ウイルス感染症に対する化学療法では，異なるメカニズムを有する薬剤を併用することでより高い治療効果が得られることが知られており，重篤なインフルエンザウイルス感染症において NA 阻害薬と新規メカニズムを有する薬剤を併用する治療方法の開発が進められている．そこで，ウイルス増殖に起因した細胞変性効果を指標に，S-033447 と NA 阻害薬の併用効果を検討した．A 型インフルエンザウイルス株 (A/PR/8/34) を MDCK 細胞に感染させ，種々の濃度の化合物存在下で 2 日間培養した．化合物非存在下の条件と比べ，ウイルス増殖による死滅細胞数を 50%に抑制する濃度を EC_{50} として算出し，S-033447 と NA 阻害薬を EC_{50} 比に近い割合で混合した条件下で得られる Combination Index (CI) を用いて S-033447 と 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) の併用効果を評価した．CI は, Chou-Talalay method に基づき、併用する 2 剤をそれぞれの EC_{50} の比に近い割合で混合し、2 剤のウイルス増殖抑制効果に対する寄与がおおむね同等となる条件下で得られる阻害効果を基に下記の数式を用いて算出した [6]．併用効果は，CI ≤ 0.8 のときに相乗，0.8＜CI＜1.2 のときに相加，CI ≥ 1.2 のときに拮抗と判定した.

$$CI = (D_{A/A+B})/D_A + (D_{B/A+B})/D_B + (D_{A/A+B} \times D_{B/A+B})/(D_A \times D_B)$$

D_A: the EC_{50} of S-033447

D_B: the EC_{50} of NA inhibitor

$D_{A/A+B}$: the concentration of S-033447 giving 50% inhibition in combination with NA inhibitor at the closest ratio of each EC_{50} value

$D_{B/A+B}$: the concentration of NA inhibitor giving 50% inhibition in combination with S-033447 at the closest ratio of each EC_{50} value

S-033447 と NA 阻害薬を併用した際の CI は 0.49～0.59 であり，いずれの NA 阻害薬と併用した

場合も CI≤0.8 であった (表 2.6.2.2-7).

以上の結果から，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と考える.

表 2.6.2.2-7　S-033447 とオセルタミビル活性体，ザナミビル水和物，ラニナミビル又はペラミビル水和物を併用したときの D_A，D_B，$D_{A/A+B}$，$D_{B/A+B}$ 及び CI

Substance A	Substance B	D_A (nmol/L)	D_B (nmol/L)	$D_{A/A+B}$ (nmol/L)	$D_{B/A+B}$ (nmol/L)	CI	Combination effect
S-033447	oseltamivir acid	4.51	3171.97	1.17	586.94	0.49	synergy
S-033447	zanamivir hydrate	4.49	1565.38	1.22	305.99	0.52	synergy
S-033447	laninamivir	4.52	212.74	1.12	56.02	0.58	synergy
S-033447	peramivir trihydrate	4.41	213.77	1.13	56.66	0.59	synergy

2.6.2.2.2 *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

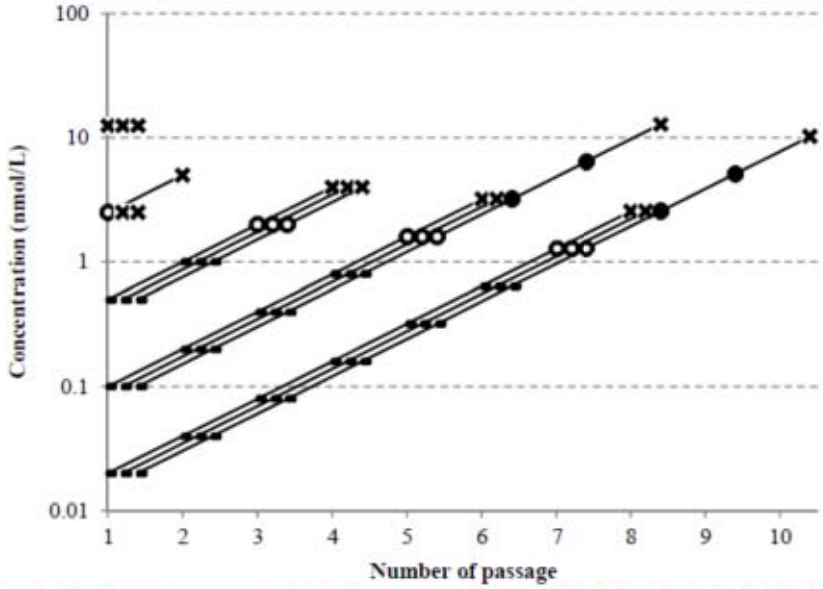
2.6.2.2.2.1 S-033447 耐性 A 型インフルエンザウイルス (H1N1) の分離

評価資料 4.2.1.1-09，4.2.1.1-10
概要表 2.6.3.2.10，2.6.3.2.11

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，耐性ウイルスの分離を試みた．MDBK 細胞に A/WSN/33 (H1N1) 株を感染させ，0.02，0.1，0.5，2.5 及び 12.5 nmol/L の S-033447 (EC_{50} を基準として 1/25，1/5，1，5，25 倍) の 5 点の濃度で，1 濃度あたり 3 試料 (全 15 試料) で培養を開始した．3 日間の培養を 1 継代として，継代毎に薬剤濃度を 2 倍に上げ，0.01 plaque forming unit/cell という一定の感染力価でインフルエンザウイルスを継代培養した．インフルエンザウイルスの薬剤感受性変化及び PA 遺伝子変異は，MDBK 細胞を用いて培養上清中のウイルスを薬剤非存在下で増幅した後，プラーク形成抑制試験及びサンガー法により評価した.

最初の継代で 15 試料のうち 2.5 及び 12.5 nmol/L で培養した 5 試料は培養後のウイルス力価が低く，初回の培養で継代が不能となった (図 2.6.2.2-2)．残りの 10 試料については複数回の継代を実施し，10 代目までに継代が不能となった (最終薬剤濃度 : 12.8 nmol/L 以下)．0.02 nmol/L で培養開始後 8 及び 9 代目の試料及び 0.1 nmol/L で培養開始後 6 及び 7 代目の試料で 22.5～41.4 倍の薬剤感受性の低下が認められ，それら全てのインフルエンザウイルスで PA 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 (表 2.6.2.2-8)．PA の 38 番目のイソロイシンは A 型及び B 型インフルエンザウイルス間で高度に保存されており [7,8]，CEN の活性中心の近傍に位置していることから，PA の 38 番目のアミノ酸置換は S-033447 に対する感受性低下に関連することが示唆された.

図 2.6.2.2-2 A/WSN/33 株感染 MDBK 細胞の継代数と S-033447 の濃度



Open circle shows the passage of the virus susceptible to S-033447. Closed circle shows the passage of the virus with reduced susceptibility to S-033447. Cross shows that the passage was stopped. Dot shows that the measurement of the susceptibility was not conducted.

表 2.6.2.2-8 A/WSN/33 株を用いた S-033447 耐性ウイルス分離試験において分離されたインフルエンザウイルスと PA のアミノ酸置換

Sample ID	Number of passage	Initial concentration (nmol/L)	Last concentration (nmol/L)	EC_{50} (nmol/L)	Fold change[a]	PA amino acid substitution[b]
Parent strain	0	N/A	N/A	0.29[c]	1.0	–
P10-1-1	10	0	0	0.33	1.1	–
P10-2-1	10	0	0	0.28	0.9	–
P10-3-1	10	0	0	0.25	0.8	–
P7-4-1	7	0.02	1.28	0.57	1.9	–
P7-5-1	7	0.02	1.28	0.52	1.8	–
P7-6-1[d]	7	0.02	1.28	0.40	1.4	–
P8-6-1[d]	8	0.02	2.56	6.62	22.5	I38T
P9-6-1	9	0.02	5.12	12.18	41.4	I38T
P5-7-1	5	0.1	1.6	0.27	0.9	–
P5-8-1	5	0.1	1.6	0.39	1.3	–
P5-9-1[d]	5	0.1	1.6	0.30	1.0	–
P6-9-1[d]	6	0.1	3.2	8.81	29.9	I38T
P7-9-1	7	0.1	6.4	11.66	39.6	I38T
P3-10-1	3	0.5	2	0.34	1.2	–
P3-11-1	3	0.5	2	0.30	1.0	–
P3-12-1	3	0.5	2	0.27	0.9	–
P1-13-1	1	2.5	2.5	0.39	1.3	–

Abbreviation: N/A, not applicable.
–: No substitutions.
a The fold change for isolated viruses was calculated as relative EC_{50} to parent virus.
b The amino acid substitutions were identified by the comparison to the sequences of parent virus.
c EC_{50} was calculated from 3 independent experiments.
d The measurement of the susceptibility and sequence analysis of the virus in the previous passage was conducted.

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，増殖性が低下する変異体の場合，このウイルス増幅操作により試料中のウイルスに含まれる変異体の割合が低下し，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．

表 2.6.2.2-8 に記載された 17 検体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 遺伝子解析を実施した結果，試料番号 P8-6 の検体は PA/I38I/T として検出されたものの，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 (表 2.6.2.2-9)．したがって，薬剤非存在下でのウイルス増幅操作により検出されなかった変異体はないと結論した．

表 2.6.2.2-9　A/WSN/33 株を用いた S-033447 耐性ウイルス分離試験において分離されたインフルエンザウイルスを増幅せずにサンガー法で解析した時の PA のアミノ酸置換

Sample ID	PA amino acid substitution[a]
P10-1	–
P10-2	–
P10-3	–
P7-4	–
P7-5	–
P7-6	–
P8-6	I38I/T
P9-6	I38T
P5-7	–
P5-8	–
P5-9	–
P6-9	I38T
P7-9	I38T
P3-10	–
P3-11	–
P3-12	–
P1-13	–

–: No substitutions.
a The amino acid substitutions were identified by the comparison to the sequences of parent virus.

2.6.2.2.2.2 S-033447 耐性 A 型インフルエンザウイルス (H1N1) の増殖性

評価資料 4.2.1.1-11
概要表 2.6.3.2.12

耐性ウイルス分離試験において認められた PA/I38T を有するウイルスが，野生型ウイルスと同等の増殖性を示す場合，臨床においてそのウイルスが生じやすい可能性が考えられる．そこで，PA/I38T を有することによる A/WSN/33 株の増殖性変化を調べるため，2 種類の PA/I38T を有するインフルエンザウイルス (A/WSN/33-P9-6-1 及び A/WSN/33-P7-9-1) 及びリバースジェネ

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 (rgA/WSN/33-PA/I38T) をMDBK, MDCK, RPMI2650及びA549細胞に感染させた．各細胞の培養条件におけるウイルス増殖初期過程の培養上清中のウイルス力価を測定することで, PA/I38Tを有するインフルエンザウイルスの増殖性を野生型インフルエンザウイルスやNA/H274Yを有するインフルエンザウイルスと比較し，評価した．その結果，各細胞の培養条件において，培養上清中のPA/I38Tを有するインフルエンザウイルスの力価は，それらの野生型インフルエンザウイルスやNA/H274Yを有するインフルエンザウイルスのウイルス力価よりも低い値を示した (表 2.6.2.2-10).

以上の結果から，A/WSN/33株のPA/I38Tは，野生型と比較してウイルス増殖性の低下を誘導すると考えている．そのため，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．また，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．

表 2.6.2.2-10　培養細胞におけるウイルス増殖初期過程の培養上清中のウイルス力価

	MDBK cell at 24 hours ($log_{10}TCID_{50}$/mL)		MDCK cell at 24 hours ($log_{10}TCID_{50}$/mL)		RPMI2650 cell at 24 hours ($log_{10}TCID_{50}$/mL)		A549 cell at 36 hours ($log_{10}TCID_{50}$/mL)	
virus	Mean	S.D.	Mean	S.D.	Mean	S.D.	Mean	S.D.
A/WSN/33	4.67	0.33	6.72	0.25	4.48	0.30	2.91	0.37
A/WSN/33 -NA/H274Y	4.22	0.38	6.00	0.00	3.83	0.29	3.50	1.00
A/WSN/33-P9-6-1	3.72	0.35	4.83	0.44	2.85	0.37	1.56	0.10
A/WSN/33-P7-9-1	3.83	0.44	2.56	0.10	2.80	0.64	1.50	0.00
rgA/WSN/33	4.00	0.33	5.06	0.59	4.33	0.17	4.72	0.25
rgA/WSN/33 -PA/I38T	3.28	0.25	3.72	0.25	3.06	0.54	3.59	0.16

The mean and S.D. were calculated from triplicate.

2.6.2.2.2.3 S-033447耐性遺伝子を導入した組換えウイルスを用いたS-033447に対する感受性試験

評価資料 4.2.1.1-12
概要表 2.6.3.2.13

PA/I38Tが，A型インフルエンザウイルスのS-033447に対する感受性に及ぼす影響を検討するため，耐性ウイルス分離試験で分離されたPA/I38Tを有するインフルエンザウイルス (A/WSN/33-P9-6-1) 及び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 (rgA/WSN/33-PA/I38T) をMDCK細胞に感染させ, 種々の濃度の化合物存在下で培養し，翌日の培養上清中に放出されたウイルスの力価を測定した．化合物非存在下の条件に比べ，力価を1/10に抑制するために必要なS-033447及びファビピラビルの濃度をEC_{90}として算出し，それらの野生型インフルエンザウイルスと比較した．S-033447のA/WSN/33-P9-6-1及びrgA/WSN/33-PA/I38Tの放出に対するEC_{90}は，それぞれ29.52及び15.55 nmol/Lであり，野生型

に比べて，それぞれ 35.9 倍及び 33.0 倍の薬剤感受性低下を示した (表 2.6.2.2-11)．一方，ファビピラビルの A/WSN/33-P9-6-1 及び rgA/WSN/33-PA/I38T に対する薬剤感受性は，野生株とほぼ同等であった．

以上の結果から，PA/I38T は，A 型 H1N1 亜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．

表 2.6.2.2-11　PA/I38T を有する A/WSN/33 株に対する S-033447 及びファビピラビルのウイルス放出抑制効果

	EC_{90} (nmol/L)[a]					
	S-033447			Favipiravir		
Strain	Mean	S.D.	Fold Change[b]	Mean	S.D.	Fold Change[b]
A/WSN/33	0.82	0.04	N/A	4540.49	597.51	N/A
A/WSN/33-P9-6-1	29.52	5.79	35.9	2002.75	842.53	0.4
rgA/WSN/33	0.47	0.03	N/A	3752.56	999.69	N/A
rgA/WSN/33-PA/I38T	15.55	0.98	33.0	4232.09	1920.94	1.1

a The mean and S.D. were calculated from 3 independent experiments.
b The fold change was calculated as relative EC_{90} to wild type.

2.6.2.2.2.4 S-033447 耐性 A 型インフルエンザウイルス (H3N2) の分離

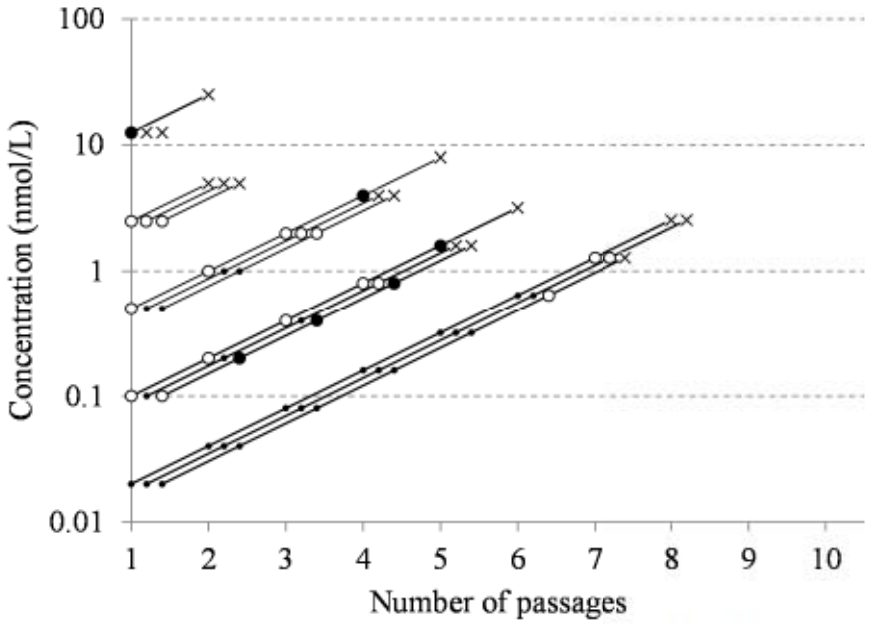
評価資料 4.2.1.1-13
概要表 2.6.3.2.14

S-033447 に対する A 型 H3N2 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，耐性ウイルスの分離を試みた．MDCK 細胞に A/Victoria/3/75 (H3N2) 株を感染させ，0.02, 0.1, 0.5, 2.5 及び 12.5 nmol/L の S-033447 (EC_{50} を基準として 1/25, 1/5，1，5，25 倍) の 5 点の濃度で，1 濃度あたり 3 試料 (全 15 試料) で培養を開始した．3 日間の培養を 1 継代として，継代毎に薬剤濃度を 2 倍に上げ，0.01 plaque forming unit/cell という一定の感染力価でインフルエンザウイルスを継代培養した．試料中に含まれるインフルエンザウイルスの PA 遺伝子解析は，ウイルスを増幅せずにサンガー法により実施した．アミノ酸置換が認められた場合は，該当する試料中に含まれるインフルエンザウイルスの薬剤感受性試験を，ウイルスを増幅せずに実施した．試料中に含まれるインフルエンザウイルスにアミノ酸置換体が混在している場合は，薬剤存在下でウイルスを増幅し，アミノ酸置換体を単離した後に薬剤感受性試験を実施した．なお，本試験における薬剤感受性試験は，プラークを免疫染色法にて検出する試験方法 [9] にて実施した．

最初の継代で 15 試料のうち 12.5 nmol/L で培養した 2 試料は培養後のウイルス力価が低く，初回の培養で継代が不能となった (図 2.6.2.2-3)．残りの 13 試料については複数回の継代を実施し，8 代目までに継代が不能となった (最終薬剤濃度：25 nmol/L 以下)．0.1 nmol/L で培養を開始した 3 試料のうち 2～4 代目及び 5 代目の 2 試料において PA/K362K/R が検出された．同様に，0.5 nmol/L で培養を開始した 3 試料のうち 4 代目の 1 試料において PA/I38I/T が，12.5 nmol/L で培養を開始した 3 試料のうち 1 代目の 1 試料において PA/E199G が，それぞれ検出された (表 2.6.2.2-12)．アミノ酸置換が認められた試料中に含まれるウイルスの S-033447 に対する薬剤感

受性変化を，ウイルスを増幅せずに評価したところ，親株の EC_{50} に比べて PA/K362K/R は 1.0～1.1 倍，PA/I38I/T は 34.9 倍，PA/E199G は 3.2 倍の低下を示した (表 2.6.2.2-13)．PA/K362R 及び PA/E199G を有する分離ウイルスは，PA/I38T を有する分離ウイルスよりも薬剤感受性変化が顕著に小さかったことから，これらのアミノ酸置換が S-033447 に対するウイルスの薬剤感受性に与える影響は小さいと推察した．さらに，アミノ酸置換体が混在している PA/K362K/R 及び PA/I38I/T を含む試料については，10，32 あるいは 100 nmol/L の S-033447 存在下でウイルスを MDCK 細胞で培養することでアミノ酸置換体を有するウイルスの単離を試みたところ，PA/I38T は単離されたが，PA/K362R は単離されなかった．単離された PA/I38T を有する 5 種類のウイルスの薬剤感受性変化を予備的に評価したところ，親株の EC_{50} に比べて 31.8～105.6 倍，単離前のウイルスの EC_{50} に比べて 0.9～3.0 倍の低下であり，PA/I38T を有するウイルスの単離前後では薬剤感受性に大きな変化は認められなかった (表 2.6.2.2-14)．また，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/Victoria/3/75 (H3N2) 株に導入すると，S-033447 に対して 56.59 倍の薬剤感受性の低下を示した．以上の結果から，PA/I38T は，A 型 H3N2 亜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．

図 2.6.2.2-3　A/Victoria/3/75 株感染 MDCK 細胞の継代数と S-033447 の濃度



Open circles, closed circles, crosses, and dots indicate samples analyzed their PA sequence and showed no amino acid changes, samples analyzed their PA sequence and showed amino acid changes, samples discontinued passage, and samples proceeded to the next passage, respectively.

表 2.6.2.2-12　A/Victoria/3/75 株を用いた S-033447 耐性ウイルス分離試験において分離されたインフルエンザウイルスと PA のアミノ酸置換

Sample ID	Number of passage	Initial concentration (nmol/L)	Concentration at collection (nmol/L)	PA amino acid substitution[a]
0 nM-1-P8	8	0	0	−
0 nM-2-P8	8	0	0	−
0 nM-3-P8	8	0	0	−
0.02 nM-1-P7	7	0.02	1.28	−
0.02 nM-2-P7	7	0.02	1.28	−
0.02 nM-3-P6	6	0.02	0.64	−
0.1 nM-1-P1	1	0.1	0.1	−
0.1 nM-1-P2	2	0.1	0.2	−
0.1 nM-1-P3	3	0.1	0.4	−
0.1 nM-1-P4	4	0.1	0.8	−
0.1 nM-1-P5	5	0.1	1.6	K362K/R
0.1 nM-2-P4	4	0.1	0.8	−
0.1 nM-3-P1	1	0.1	0.1	−
0.1 nM-3-P2	2	0.1	0.2	K362K/R
0.1 nM-3-P3	3	0.1	0.4	K362K/R
0.1 nM-3-P4	4	0.1	0.8	K362K/R
0.5 nM-1-P1	1	0.5	0.5	−
0.5 nM-1-P2	2	0.5	1	−
0.5 nM-1-P3	3	0.5	2	−
0.5 nM-1-P4	4	0.5	4	I38I/T
0.5 nM-2-P3	3	0.5	2	−
0.5 nM-3-P3	3	0.5	2	−
2.5 nM-1-P1	1	2.5	2.5	−
2.5 nM-2-P1	1	2.5	2.5	−
2.5 nM-3-P1	1	2.5	2.5	−
12.5 nM-1-P1	1	12.5	12.5	E199G

−: No substitutions.
a The amino acid substitutions were identified by the comparison to the sequences of parent virus.

表 2.6.2.2-13　PA のアミノ酸置換を有する A/Victoria/3/75 株に対する S-033447 の薬剤感受性変化

Sample ID	Amino acid change in PA region[a]	EC_{50} (nmol/L)	Fold change[b]
Parent strain	N/A	5.6	N/A
0.1 nM-1-P5	K362K/R	6.1	1.1
0.1 nM-3-P4	K362K/R	5.5	1.0
0.5 nM-1-P4	I38I/T	195.4	34.9
12.5 nM-1-P1	E199G	17.8	3.2

a The amino acid substitutions were identified by the comparison to the sequences of parent virus.
b The fold change was calculated as relative EC_{50} to parent virus.
Each data was obtained from a single experiment.

表 2.6.2.2-14 単離した PA/I38T を有する A/Victoria/3/75 株に対する S-033447 の薬剤感受性変化

Sample ID	S-033447 concentration for the purification (nmol/L)	Amino acid change in PA region[a]	EC_{50} (nmol/L)	Fold change relative to PA/I38I/T variant[b]	Fold change relative to parent virus[c]
0.5 nM-1-P4 PL19-B04	32	I38T	591.1	3.0	105.6
0.5 nM-1-P4 PL19-C04	10	I38T	584.9	3.0	104.4
0.5 nM-1-P4 PL20-G04	10	I38T	335.9	1.7	60.0
0.5 nM-1-P4 PL21-E03	100	I38T	178.0	0.9	31.8
0.5 nM-1-P4 PL21-G04	10	I38T	525.8	2.7	93.9

a The amino acid substitutions were identified by the comparison to the sequences of parent virus.
b The fold change was calculated as relative EC_{50} to PA/I38I/T variant (0.5 nM-1-P4)
c The fold change was calculated as relative EC_{50} to parent virus.
Each data was obtained from a single experiment.

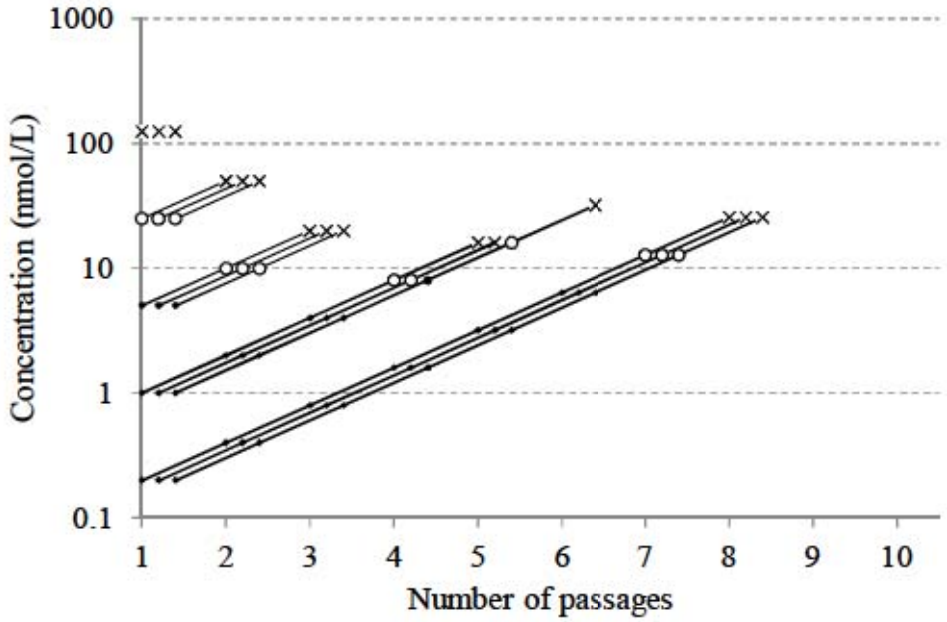
2.6.2.2.2.5 S-033447 耐性 B 型インフルエンザウイルスの分離

評価資料 4.2.1.1-14
概要表 2.6.3.2.15

S-033447 に対する B 型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，耐性ウイルスの分離を試みた．MDCK 細胞に B/Maryland/1/59 株を感染させ，0.2，1，5，25 及び 125 nmol/L の S-033447 (EC_{50} を基準として 1/25，1/5，1，5，25 倍) の 5 点の濃度で，1 濃度あたり 3 試料 (全 15 試料) で培養を開始した．3 日間の培養を 1 継代として，継代毎に薬剤濃度を 2 倍に上げ，0.01 plaque forming unit/cell という一定の感染力価でインフルエンザウイルスを継代培養した．試料中に含まれるインフルエンザウイルスの PA 遺伝子解析は，ウイルスを増幅せずにサンガー法により実施した．

最初の継代で 15 試料のうち 125 nmol/L で培養した 3 試料は培養後のウイルス力価が低く，初回の培養で継代が不能となった (図 2.6.2.2-4)．残りの 12 試料については複数回の継代を実施し，8 代目までに継代が不能となった (最終薬剤濃度：50 nmol/L 以下)．継代が不能となる直前の試料に含まれるウイルスの PA 遺伝子を解析した結果，アミノ酸置換は認められなかった (表 2.6.2.2-15)．以上，本試験において，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について情報を得ることはできなかった．

図 2.6.2.2-4 B/Maryland/1/59 株感染 MDCK 細胞の継代数と S-033447 の濃度



Circles, crosses, and dots indicate samples analyzed their PA sequence, samples discontinued passage, and samples proceeded to the next passage, respectively.

表 2.6.2.2-15 B/Maryland/1/59 株を用いた S-033447 耐性ウイルス分離試験において分離されたインフルエンザウイルスと PA のアミノ酸置換

Sample ID	Number of passage	Initial concentration (nmol/L)	Concentration at collection (nmol/L)	PA amino acid substitution[a]
0 nM-1-P8	8	0	0	−
0 nM-2-P8	8	0	0	−
0 nM-3-P8	8	0	0	−
0.2 nM-1-P7	7	0.2	12.8	−
0.2 nM-2-P7	7	0.2	12.8	−
0.2 nM-3-P7	7	0.2	12.8	−
1 nM-1-P4	4	1	8	−
1 nM-2-P4	4	1	8	−
1 nM-3-P5	5	1	16	−
5 nM-1-P2	2	5	10	−
5 nM-2-P2	2	5	10	−
5 nM-3-P2	2	5	10	−
25 nM-1-P1	1	25	25	−
25 nM-2-P1	1	25	25	−
25 nM-3-P1	1	25	25	−

−: No substitutions.
a The amino acid substitutions were identified by the comparison to the sequences of parent virus.

2.6.2.2.3 *In vitro* における季節性以外のインフルエンザウイルスに対する作用

2.6.2.2.3.1 高病原性鳥インフルエンザウイルス (A/H5N1) に対する S-033447 のウイルス放出抑制効果

評価資料 4.2.1.1-15
概要表 2.6.3.2.16

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である A/Hong Kong/483/97 株 [10] 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，種々の濃度の化合物存在下で培養し，翌日の培養上清中に放出されたウイルス力価 ($TCID_{50}$) を測定した．化合物非存在下の条件と比べ，力価を 1/10 に抑制するために必要な化合物の濃度を EC_{90} として算出し，S-033447 とオセルタミビル活性体のウイルス増殖抑制効果を比較した．

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 (表 2.6.2.2-16)．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．

以上の結果から，S-033447 は，A 型 H5N1 亜型の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，また NA 阻害薬耐性を示す A 型 H5N1 亜型の高病原性鳥インフルエンザウイルスに対しても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．

表 2.6.2.2-16　A 型 H5N1 亜型の高病原性鳥インフルエンザウイルス株に対する S-033447 及びオセルタミビル活性体のウイルス放出抑制効果

	EC_{90} (nmol/L)[a]					
	S-033447			Oseltamivir acid		
Strain	Mean	S.D.	Fold change[b]	Mean	S.D.	Fold change[b]
A/Hong Kong/483/97	1.64	1.59	N/A	11.16	10.20	N/A
A/Hong Kong/483/97 -NA/H274Y	3.16	1.24	1.93	4054.91	1295.66	363.34

a The mean and S.D. were calculated from 3 independent experiments.
b The fold change was calculated as relative EC_{90} to wild type (A/Hong Kong/483/97).

2.6.2.2.3.2 鳥インフルエンザウイルス (A/H7N9) に対する S-033447 のウイルス放出抑制効果

評価資料 4.2.1.1-16
概要表 2.6.3.2.17

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 [11]，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 MDCK 細胞に感染させ，種々の濃度の化合物存在下で培養し，翌日の培養上清中に放出されたウイルス力価 ($TCID_{50}$) を測定した．化合物非存在下の条件に比べ，力価を 1/10 に抑制するために必要な化合物の濃度を EC_{90} として算出し，S-033447 とオセ

ルタミビル活性体のウイルス増殖抑制効果を比較した.

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よりも低い値を示した (表 2.6.2.2-17). 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 株とほぼ同等であった.

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も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.

表 2.6.2.2-17　A 型 H7N9 亜型の鳥インフルエンザウイルス株に対する S-033447 及びオセルタミビル活性体のウイルス放出抑制効果

	EC_{90} (nmol/L)[a]					
	S-033447			Oseltamivir acid		
Strain	Mean	S.D.	Fold change[b]	Mean	S.D.	Fold change[b]
A/Anhui/1/2013	0.80	0.36	N/A	15.41	11.56	N/A
A/Anhui/1/2013-NA/R292K	1.12	0.53	1.39	142389.79	6601.02	9239.94

a The mean and S.D. were calculated from 3 independent experiments.
b The fold change was calculated as a relative value to the wild type (A/Anhui/1/2013).

2.6.2.2.3.3 様々な亜型の動物由来インフルエンザウイルスに対する S-033447 のウイルス放出抑制効果

評価資料 4.2.1.1-17
概要表 2.6.3.2.18

動物 (ブタ，ニワトリ，アヒル) から分離された 5 種類の A 型インフルエンザウイルスを MDCK 細胞に感染させ，種々の濃度の化合物存在下で培養し，翌日の培養上清中に放出されたウイルス力価 ($TCID_{50}$) を測定した．化合物非存在下の条件と比べ，力価を 1/10 に抑制するために必要な化合物の濃度を EC_{90} として算出し，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 項，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 (表 2.6.2.2-18).

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.

表 2.6.2.2-18 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する S-033447 及びファビピラビルのウイルス放出抑制効果

		EC_{90} (nmol/L)[a]			
		S-033447		Favipiravir	
Subtype	Strain	Mean	S.D.	Mean	S.D.
H1N2	A/swine/Chiba/14/2012	1.20	0.51	25276.04	26701.87
H5N2	A/chicken/Taiwan/K703-1/2008	0.96	0.55	21918.27	25522.14
H5N6	A/duck/Vietnam/HU4-879/2015	0.73	0.53	20512.11	20970.33
H9N2	A/chicken/Vietnam/HU1-1050/2014	0.79	0.55	29290.93	28909.28
H9N2	A/duck/Vietnam/HU1-1512/2014	0.96	0.54	12605.88	10328.79

The EC_{90} values of S-033447 and Favipiravir against A/PR/8/34 (control strain) were 0.66 ± 0.39 and 14368.00 ± 11855.71 nmol/L, respectively.
a The mean and S.D. were calculated from 3 independent experiments.

2.6.2.2.4 *In vivo* における季節性インフルエンザウイルスに対する作用

2.6.2.2.4.1 マウス適合インフルエンザウイルスの薬剤感受性

評価資料 4.2.1.1-18
概要表 2.6.3.2.19

以下の *in vivo* の項に記載した試験では，マウスで効率よく増殖するよう，繰り返し感染させることでマウスに適合させたインフルエンザウイルス株を用いた．マウスに適合させる過程で S-033447 に対する薬剤感受性が変化せず，それらの親株の薬剤感受性と同等であることを確認するため，以下の試験を実施した．3 株のマウスに適合させたインフルエンザウイルスを MDCK 細胞に感染させ，種々の濃度の化合物存在下で 3 日間培養して形成されたプラーク数を測定した．化合物非存在下の条件に比べ，プラーク数を 50%抑制するために必要な化合物の濃度を EC_{50} として算出し，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 のマウスに適合させた A/Osaka/129/2009 株，A/Hong Kong/8/68 株及び B/Hong Kong/5/72 株のプラーク形成に対する EC_{50} は，それぞれ 0.75，0.58 及び 8.37 nmol/L であり（表 2.6.2.2-19），それぞれの親株の EC_{50} である 0.26，0.35 及び 4.33 nmol/L（表 2.6.2.2-4，表 2.6.2.2-5）とほぼ同等の値を示した．

以上の結果から，以下の *in vivo* の項で使用したマウス適合インフルエンザウイルス株とそれらの親株の S-033447 に対する薬剤感受性は同等であり，マウス適合の過程で S-033447 に対する薬剤感受性が変化しなかったと結論した．

表 2.6.2.2-19　マウス適合インフルエンザウイルス株に対する S-033447 のプラーク形成抑制効果

		EC_{50} (nmol/L)[a]			
		S-033447		Favipiravir	
Type/subtype	Strain	Mean	S.D.	Mean	S.D.
A/H1N1	A/Osaka/129/2009 (mouse-adapted)	0.75	0.38	9556.84	2875.03
A/H3N2	A/Hong Kong/8/68 (mouse-adapted)	0.58	0.13	12096.49	1842.32
B	B/Hong Kong/5/72 (mouse-adapted)	8.37	4.51	13230.20	1075.35

The EC_{50} values of S-033447 and favipiravir against A/PR/8/34 (control strain) were 1.07 ± 0.09 and 13368.02 ± 1111.12 nmol/L, respectively.
a The mean and S.D. were calculated from 3 independent experiments.

2.6.2.2.4.2 A 型インフルエンザウイルス感染マウスモデルにおける S-033188 の肺内ウイルス力価低下作用

評価資料 4.2.1.1-19
概要表 2.6.3.2.20，2.6.3.2.21，2.6.3.2.22

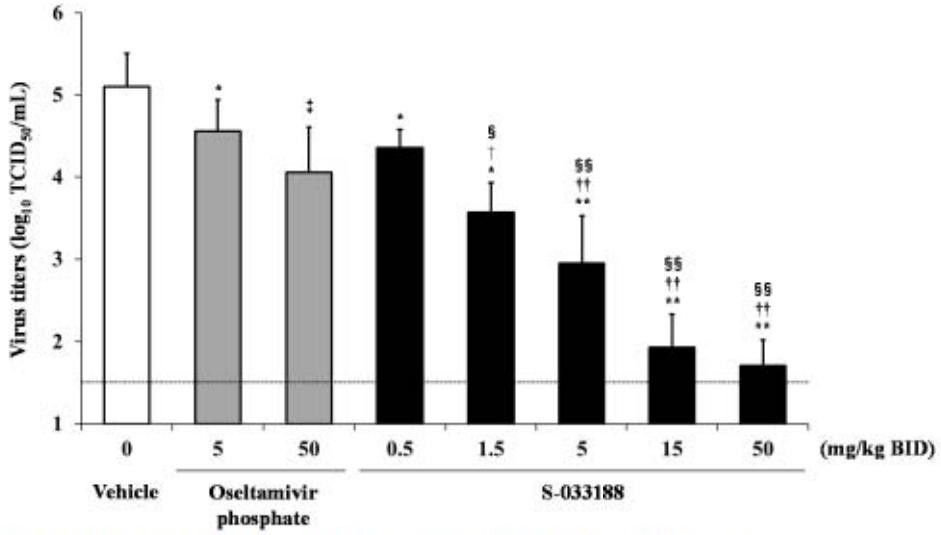
雌性 BALB/c マウスに 2.0 $\log_{10}(1.00 \times 10^2)$ $TCID_{50}$ (非致死量) の A/WSN/33 (H1N1) 株を経鼻接種した 5 日後に，1，3，10，30 及び 100 mg/kg/日 (0.5，1.5，5，15 及び 50 mg/kg BID) の用量の S-033188 を 1 日経口投与し，投与開始から 24 時間後の肺内ウイルス力価を測定した．また，対照薬として，臨床用量相当である 10 mg/kg/日 (5 mg/kg BID) [12] あるいはその 10 倍量である 100 mg/kg/日 (50 mg/kg BID) の用量のオセルタミビルリン酸塩を，1 日経口投与し，同様に肺内ウイルス力価を測定した．

S-033188 の 0.5～50 mg/kg BID 投与群では，用量依存的な肺内ウイルス力価の低下が認められ，1.5 mg/kg BID 以上の用量を投与することにより，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 (図 2.6.2.2-5)．S-033188 の 1.5 mg/kg BID 投与群とオセルタミビルリン酸塩の 5 mg/kg BID 投与群とは 0.99 $\log_{10}TCID_{50}$/mL，媒体対照群とは 1.53 $\log_{10}TCID_{50}$/mL の差があった．さらに，S-033188 を 15 mg/kg BID 以上の用量で投与することで，肺内ウイルス力価を媒体対照群よりも 3 $\log_{10}TCID_{50}$/mL 以上，オセルタミビルリン酸塩の 5 及び 50 mg/kg BID 投与群よりも 2 $\log_{10}TCID_{50}$/mL 以上，低下させた．

さらに，同感染モデルを用いて，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 1 日 1 回 (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 日経口投与した群の投与開始から 24 時間後の肺内ウイルス力価低下作用を，10 mg/kg/日 (5 mg/kg BID) の用量の S-033188，1 日経口投与群と比較した．

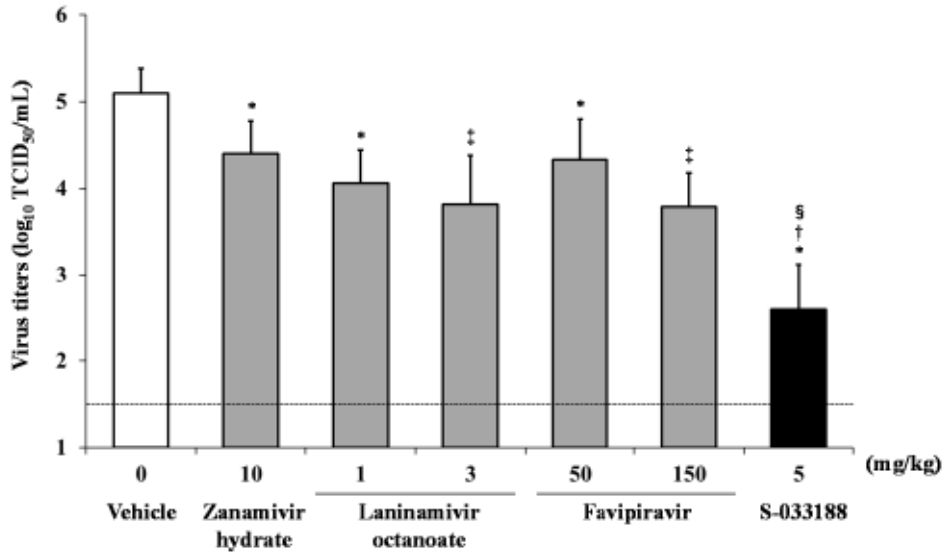
S-033188 の 5 mg/kg BID 投与群の肺内ウイルス力価は，全ての対照薬のいずれの投与群の肺内ウイルス力価と比べて有意に低下した (図 2.6.2.2-5，図 2.6.2.2-6)．

図 2.6.2.2-5　A/WSN/33 株感染マウスにおける S-033188 の肺内ウイルス力価低下作用



Broken line represents the lower limit of quantification (1.5 $\log_{10}$ $TCID_{50}$/mL)
Each bar represents the mean and S.D. of 10 mice.
The following P values were calculated by the one-way analysis of variance followed by pairwise comparisons and the fixed sequence procedure:
* $P < 0.01$ vs vehicle, ** $P < 0.0001$ vs vehicle, † $P < 0.01$ vs oseltamivir phosphate 5 mg/kg, †† $P<0.0001$ vs oseltamivir phosphate 5 mg/kg.
The following P values were calculated by the one-way analysis of variance followed by pairwise comparisons:
‡ $P < 0.0001$ vs vehicle, § $P < 0.05$ vs oseltamivir phosphate 50 mg/kg, §§ $P < 0.0001$ vs oseltamivir phosphate 50 mg/kg.

図 2.6.2.2-6　A/WSN/33 株感染マウスにおける S-033188 と各種対照薬の肺内ウイルス力価低下作用



Broken line represents the lower limit of quantification (1.5 $\log_{10}$ $TCID_{50}$/mL)
Mice were administered as follows: S-033188, orally BID; zanamivir hydrate, intranasally BID; laninamivir octanoate, intranasally QD; favipiravir, orally BID; vehicle, orally BID.
Each bar represents the mean and S.D. of 15 mice.
The following P values were calculated by the one-way analysis of variance followed by pairwise comparisons and the fixed sequence procedure: * $P < 0.0001$ vs vehicle, † $P < 0.0001$ vs zanamivir hydrate 10 mg/kg, laninamivir octanoate 1 mg/kg, favipiravir 50 mg/kg.
The following P values were calculated by the one-way analysis of variance followed by pairwise comparisons:
‡ $P < 0.0001$ vs vehicle, § $P < 0.0001$ vs laninamivir octanoate 3 mg/kg, favipiravir 150 mg/kg.

また，同感染モデルに 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ときの S-033447 の血漿中濃度は，用量の増加に伴い増大した (表 2.6.2.2-20).

表 2.6.2.2-20　A/WSN/33 株感染マウスにおける S-033188 単回経口投与後の S-033447 の PK パラメータ

PK Parameters of S-033447	Dose of S-033188 (mg/kg)				
	0.5	1.5	5	15[b]	50
C_{max} (ng/mL)	5.05	14.3	45.7	175	284
T_{max} (hr)	1.00	1.00	0.500	0.500	2.00
$t_{1/2,z\ (hr)}$[a]	2.24	2.56	2.45	2.26	3.14
$AUC_{0\text{-}inf}$ (ng·hr/mL)	22.7	66.1	252	670	1690
$AUC_{0\text{-}12hr}$ (ng·hr/mL)	22.0	62.6	242	648	1580

Abbreviations: $AUC_{0\text{-}12hr}$, area under the plasma concentration-time curve from time 0 to 12 hours after dosing; $AUC_{0\text{-}inf}$, area under the plasma concentration-time curve extrapolated from time 0 to infinity; C_{max}, maximum plasma concentration; $t_{1/2,z}$, terminal elimination half-life; T_{max}, time to maximum plasma concentration.
a 0.5 mg/kg, $t_{1/2,4\text{-}10hr}$; 1.5 to 50 mg/kg, $t_{1/2,6\text{-}12hr}$.
b Plasma concentration of S-033447 12 hours post-dose (C_{12hr}) of S-033188 at the dose of 15 mg/kg was 6.85 ng/mL.

以上の結果から，S-033188 は，A 型 H1N1 亜型インフルエンザウイルスの感染に対して，臨床用量相当あるいはその 10 倍量のオセルタミビルリン酸塩並びにラニナミビルオクタン酸エステル，ザナミビル水和物及びファビピラビルよりも強力なウイルス増殖抑制効果を発揮すると考えている.

2.6.2.2.4.3 A 型 H3N2 亜型及び B 型インフルエンザウイルス感染マウスモデルにおける S-033188 の肺内ウイルス力価低下作用

評価資料 4.2.1.1-20
概要表 2.6.3.2.23，2.6.3.2.24

2.6.2.2.4.2 項の試験で示した S-033188 の A/WSN/33 (H1N1) 株に対する肺内ウイルス力価の低下作用が，A 型 H3N2 亜型及び B 型インフルエンザウイルスに対しても認められるかを，以下の試験で検討した.

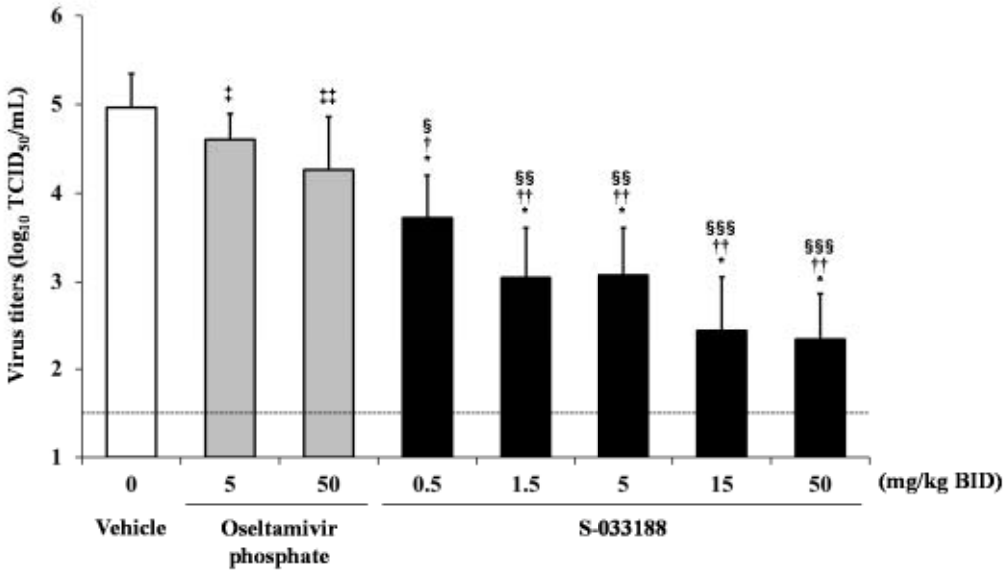
雌性 BALB/c マウスに 2.0 $\log_{10}(1.00 \times 10^2)$ $TCID_{50}$ (非致死量) の A/Hong Kong/8/68 (H3N2) 株あるいは 2.6 $\log_{10}(4.00 \times 10^2)$ $TCID_{50}$ (非致死量) の B/Hong Kong/5/72 株を経鼻接種した 5 日後に，1，3，10，30 又は 100 mg/kg/日 (0.5，1.5，5，15 又は 50 mg/kg BID) の用量の S-033188 を 1 日経口投与し，投与開始から 24 時間後の肺内ウイルス力価を測定した．対照薬として，臨床用量相当である 10 mg/kg/日 (5 mg/kg BID) あるいはその 10 倍量である 100 mg/kg/日 (50 mg/kg BID) の用量のオセルタミビルリン酸塩を 1 日経口投与し，同様に肺内ウイルス力価を測定した.

A/Hong Kong/8/68 株を感染させたモデルにおいて，S-033188 の 0.5～50 mg/kg BID 投与群では，用量依存的な肺内ウイルス力価の低下が認められ，0.5 mg/kg BID 以上の用量を投与することにより，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 (図 2.6.2.2-7)．S-033188 の 1.5 mg/kg BID 投与群の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 投与群よりも 1.55 $\log_{10}TCID_{50}$/mL，媒体対照群よりも 1.92 $\log_{10}TCID_{50}$/mL 低かった.

B/Hong Kong/5/72株を感染させたモデルにおいて，S-033188の0.5～50 mg/kg BID投与群では，用量依存的な肺内ウイルス力価の低下が認められ，5 mg/kg BID以上の用量を投与することにより，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（図 2.6.2.2-8）．S-033188の15 mg/kg BID投与群の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投与群よりも0.97 $log_{10}TCID_{50}$/mL，媒体対照群よりも1.33 $log_{10}TCID_{50}$/mL低かった．

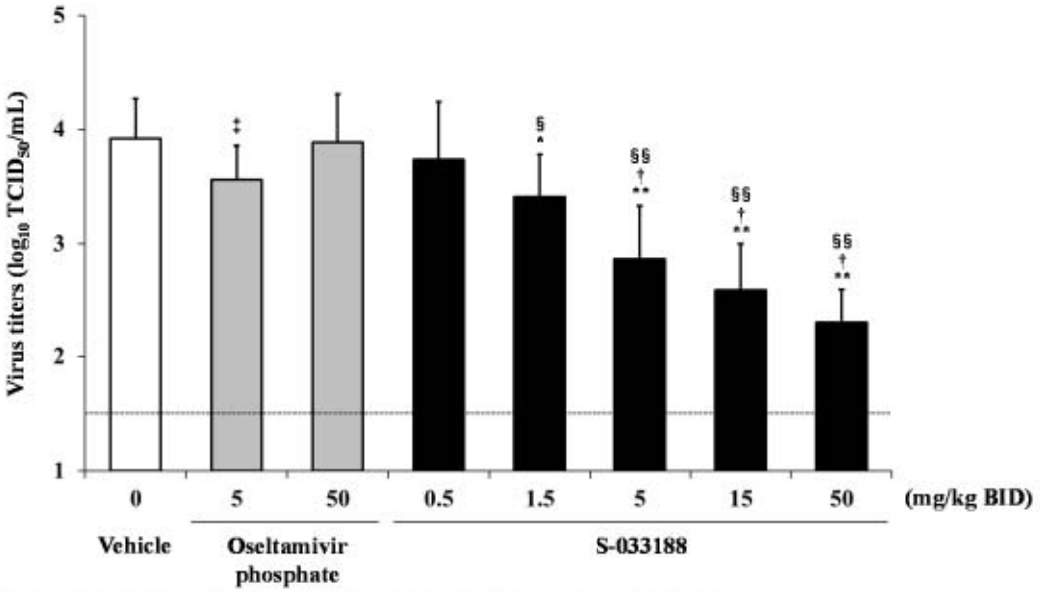
以上の結果から，S-033188は，A型H3N2亜型及びB型インフルエンザウイルスの感染に対して，臨床用量相当あるいはその10倍量のオセルタミビルリン酸塩よりも強力なウイルス増殖抑制効果を発揮すると考えている．

図 2.6.2.2-7　A/Hong Kong/8/68株感染マウスにおけるS-033188の肺内ウイルス力価低下作用



Broken line represents the lower limit of quantification (1.5 log_{10} $TCID_{50}$/mL)
Each bar represents the mean and S.D. of 10 mice.
The following P values were calculated by the one-way analysis of variance followed by pairwise comparisons and the fixed sequence procedure: * $P < 0.0001$ vs vehicle, † $P < 0.0005$ vs oseltamivir phosphate 5 mg/kg, †† $P < 0.0001$ vs oseltamivir phosphate 5 mg/kg.
The following P values were calculated by the one-way analysis of variance followed by pairwise comparisons:
‡ $P < 0.05$ vs vehicle, ‡‡ $P < 0.01$ vs vehicle, § $P < 0.05$ vs oseltamivir phosphate 50 mg/kg, §§ $P < 0.0005$ vs oseltamivir phosphate 50 mg/kg, §§§ $P < 0.0001$ vs oseltamivir phosphate 50 mg/kg.

図 2.6.2.2-8　B/Hong Kong/5/72 株感染マウスにおける S-033188 の肺内ウイルス力価低下作用



Broken line represents the lower limit of quantification (1.5 log $TCID_{50}$/mL)
Each bar represents the mean and S.D. of 15 mice.
The following P values were calculated by the one-way analysis of variance followed by pairwise comparisons and the fixed sequence procedure: * $P < 0.001$ vs vehicle, ** $P < 0.0001$ vs vehicle, † $P < 0.0001$ vs oseltamivir phosphate 5 mg/kg.
The following P values were calculated by the one-way analysis of variance followed by pairwise comparisons:
‡ $P < 0.01$ vs vehicle, § $P < 0.005$ vs oseltamivir phosphate 50 mg/kg, §§ $P < 0.0001$ vs oseltamivir phosphate 50 mg/kg.

2.6.2.2.4.4 NA 阻害薬耐性インフルエンザウイルスに対する S-033188 の肺内ウイルス力価低下作用

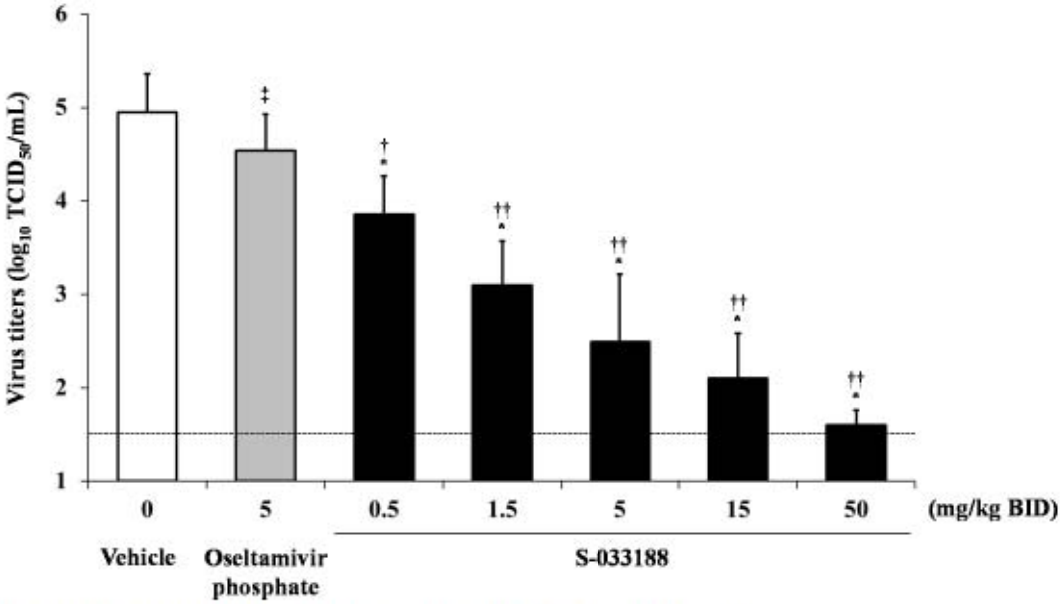
評価資料 4.2.1.1-20
概要表 2.6.3.2.25

雌性 BALB/c マウスに 2.0 log_{10} (1.00×10^2) $TCID_{50}$ (非致死量) の NA/H274Y を有する A/WSN/33-NA/H274Y (H1N1) 株を経鼻接種した 5 日後に，1，3，10，30 又は 100 mg/kg/日 (0.5，1.5，5，15 又は 50 mg/kg BID) の用量の S-033188 を 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．対照薬として，臨床用量相当である 10 mg/kg/日 (5 mg/kg BID) の用量のオセルタミビルリン酸塩を 1 日経口投与した．

S-033188 の 0.5～50 mg/kg BID 投与群では，用量依存的な肺内ウイルス力価の低下が認められ，0.5 mg/kg BID 以上の用量を投与することによりオセルタミビルリン酸塩の 5 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，野生型である A/WSN/33 株を感染させた先の試験成績 (2.6.2.2.4.2 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 (図 2.6.2.2-9)．

以上の結果から，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．

図 2.6.2.2-9　A/WSN/33-NA/H274Y 株感染マウスにおける S-033188 の肺内ウイルス力価低下作用



Broken line represents the lower limit of quantification (1.5 log_{10} $TCID_{50}$/mL)
Each bar represents the mean and S.D. of 10 mice.
The following P values were calculated by the one-way analysis of variance followed by pairwise comparisons and the fixed sequence procedure: * $P < 0.0001$ vs vehicle, † $P < 0.005$ vs oseltamivir phosphate 5 mg/kg, †† $P < 0.0001$ vs oseltamivir phosphate 5 mg/kg.
The following P value was calculated by the one-way analysis of variance followed by pairwise comparisons: ‡ $P < 0.05$ vs vehicle.

2.6.2.2.4.5 A 型インフルエンザウイルス感染マウスモデルにおける S-033188 投与後の経時的な肺内ウイルス力価低下作用

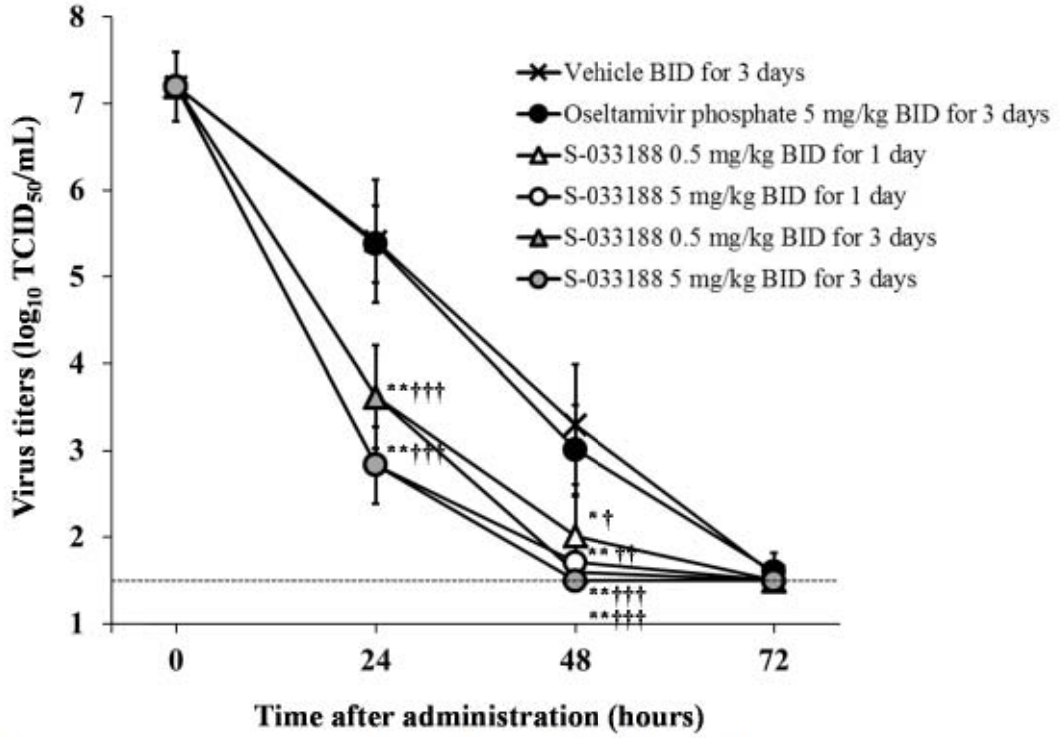
評価資料 4.2.1.1-21
概要表 2.6.3.2.26

マウス感染モデルにおいて，S-033188 を単日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，雌性 BALB/c マウスに 3.6 log_{10} (4.30×10^3) $TCID_{50}$ (非致死量) の A/Osaka/129/2009 株を経鼻接種した 5 日後に，1 又は 10 mg/kg/日 (0.5 又は 5 mg/kg BID) の用量の S-033188 を 1 日あるいは 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経時的に測定した．対照薬として，臨床用量相当である 10 mg/kg/日 (5 mg/kg BID) の用量のオセルタミビルリン酸塩を 3 日間反復経口投与し，同様に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 5 mg/kg のいずれの投与群においても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 (図 2.6.2.2-10)．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 を 0.5 及び 5 mg/kg を BID 1 日経口投与した群の方が多かった (図 2.6.2.2-11)．

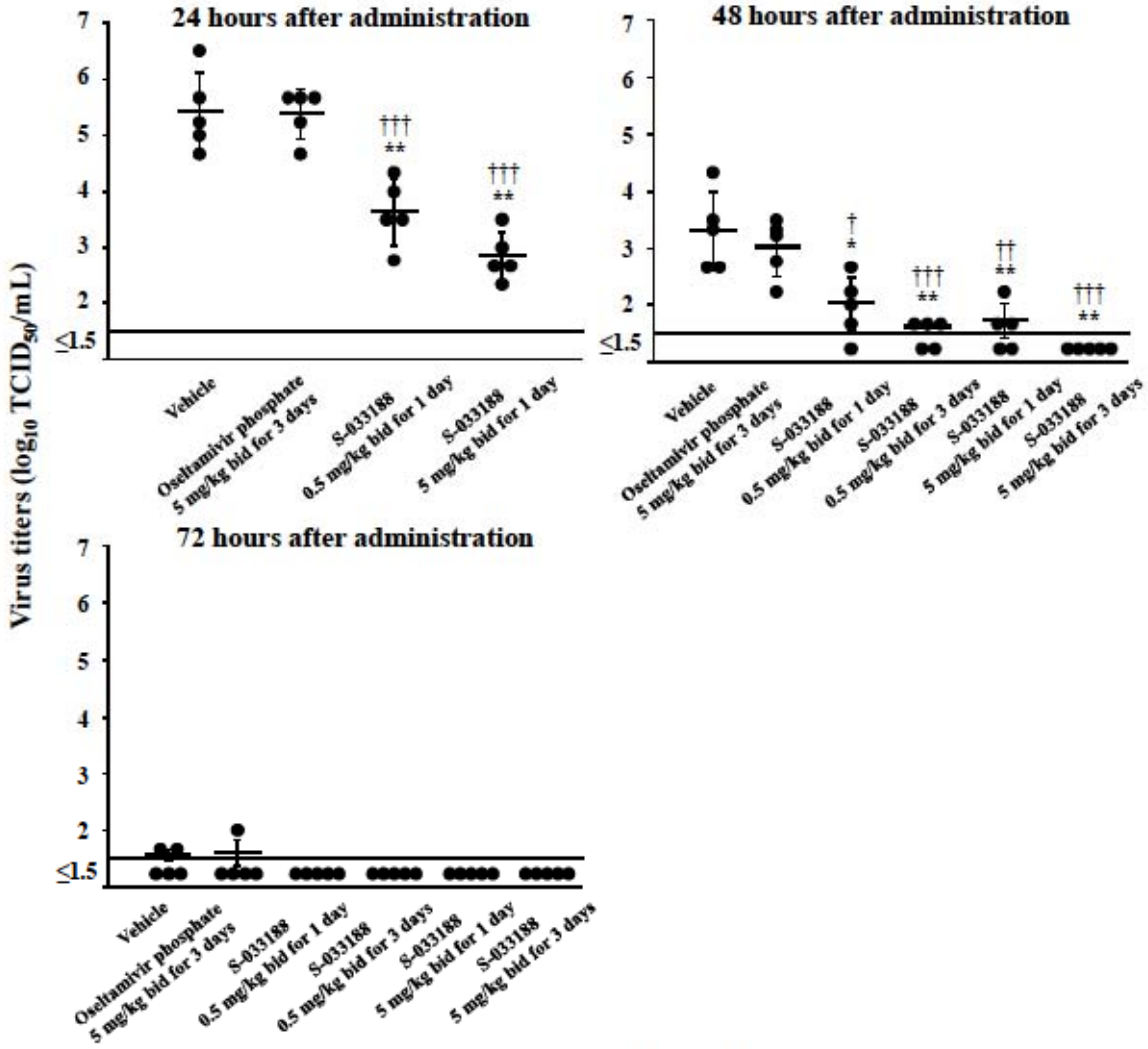
以上の結果から，S-033188 は，A 型インフルエンザウイルスの感染に対して，オセルタミビルリン酸塩よりも強力なウイルス増殖抑制効果を発揮し，体内のウイルスをより早期に消失させる効果があると考えている．

図 2.6.2.2-10 A/Osaka/129/2009 株感染マウスにおける S-033188 の経時的な肺内ウイルス力価低下作用



Broken line represents the lower limit of quantification (1.5 $\log_{10}$ $TCID_{50}$/mL)
Each point represents the mean ± S.D. from 5 mice.
The following P value for the overall time (from 24 to 48 hours) was calculated by the two-way analysis of variance followed by pairwise comparisons and the fixed sequence procedure: $P < 0.0001$ vs vehicle, oseltamivir phosphate 5 mg/kg.
The following P values at 24 and 48 hours were calculated by the two-way analysis of variance followed by pairwise comparisons and the fixed sequence procedure: * $P < 0.001$ vs vehicle, ** $P < 0.0001$ vs vehicle, † $P < 0.01$ vs oseltamivir phosphate 5 mg/kg, †† $P < 0.001$ vs oseltamivir phosphate 5 mg/kg, ††† $P < 0.0001$ vs oseltamivir phosphate 5 mg/kg.

図 2.6.2.2-11　投与開始から 24, 48 及び 72 時間後における A/Osaka/129/2009 株感染マウスの肺内ウイルス力価の個体別推移



Broken line represents the lower limit of quantification (1.5 $\log_{10}$ $TCID_{50}$/mL)
Data represent as the individual virus titers (filled circles) and the mean ± S.D. of 5 mice (horizontal bars).
The following P values were calculated by the two-way analysis of variance followed by pairwise comparisons and the fixed sequence procedure: * $P < 0.001$ vs vehicle, ** $P < 0.0001$ vs vehicle, † $P < 0.01$ vs oseltamivir phosphate 5 mg/kg, †† $P < 0.001$ vs oseltamivir phosphate 5 mg/kg, ††† $P < 0.0001$ vs oseltamivir phosphate 5 mg/kg.

2.6.2.2.4.6 PK/PD 解析

評価資料 4.2.1.1-22
概要表 2.6.3.2.27

マウスに 2.0 $\log_{10}(1.00 \times 10^2)$ $TCID_{50}$ (非致死量) の A/WSN/33 (H1N1) 株を経鼻接種した 5 日後に 0.0625～8 mg/kg の S-033447 を QD, BID あるいは 1 日 4 回で皮下投与した感染モデルにおける，投与開始から 24 時間後の肺内ウイルス力価 (PD パラメータ) に対して，時間 0 から 24 時間までの血漿中濃度-時間曲線下面積 ($AUC_{0\text{-}24hr}$)，C_{max}，投与 24 時間後の血漿中薬物濃度 (C_{24hr})，C_τ，2 ng/mL を超える濃度を維持する時間 ($T_{>2}$)，10 ng/mL を超える濃度を維持する時間 ($T_{>10}$)，及び 50 ng/mL を超える濃度を維持する時間 ($T_{>50}$) の各 PK パラメータを用いた

PK/PD 解析を行った．S-033447 の各 PK パラメータを Sigmoid maximum effect (E_{max}) モデル及び線形モデルに当てはめた結果，最も大きな自由度調整済み決定係数 (adjusted COD) が得られたのは，Sigmoid E_{max} モデルでは C_{24hr} 及び C_τ，線形モデルでは C_τ であり，C_τ が PD パラメータと最も相関する PK パラメータであった (表 2.6.2.2-21，表 2.6.2.2-22).

表 2.6.2.2-21　Sigmoid E_{max} モデルによる S-033447 の PK パラメータ解析結果

PK parameter	Model parameter	Estimate	S.E.	95% confidential interval	P value	COD [adjusted COD]
$AUC_{0\text{-}24hr}$ (ng·hr/mL)	E_0	3.821	0.116	(3.590, 4.052)	< 0.0001	0.415
	E_{max}	1.091	0.170	(0.752, 1.429)	< 0.0001	[0.395]
	EC_{50}	431.596	81.757	(269.068, 594.124)	< 0.0001	
	γ	4.170	2.291	(−0.385, 8.725)	0.0722	
C_{max} (ng/mL)	E_0	3.806	0.208	(3.391, 4.220)	< 0.0001	0.261
	E_{max}	1.022	0.333	(0.360, 1.683)	0.0029	[0.236]
	EC_{50}	42.528	14.034	(14.629, 70.427)	0.0032	
	γ	2.421	1.972	(−1.500, 6.342)	0.2230	
C_{24hr} (ng/mL)	E_0	3.928	0.116	(3.697, 4.159)	< 0.0001	0.595
	E_{max}	1.499	0.206	(1.090, 1.908)	< 0.0001	[0.581]
	EC_{50}	4.767	1.047	(2.687, 6.848)	< 0.0001	
	γ	1.843	0.649	(0.554, 3.133)	0.0056	
C_τ (ng/mL)	E_0	3.958	0.126	(3.707, 4.210)	< 0.0001	0.595
	E_{max}	1.554	0.233	(1.091, 2.016)	< 0.0001	[0.581]
	EC_{50}	4.108	0.961	(2.199, 6.018)	< 0.0001	
	γ	1.697	0.604	(0.498, 2.897)	0.0061	
$T_{>50}$ (hr)	E_0	3.588	0.094	(3.403, 3.774)	< 0.0001	0.309
	E_{max}	1.913	2.859	(−3.770, 7.596)	0.5051	[0.285]
	EC_{50}	16.534	38.174	(−59.353, 92.421)	0.6660	
	γ	1.324	1.438	(−1.534, 4.183)	0.3597	

Abbreviations: S.E., standard error; COD, coefficient of determination; E_0, baseline effect; γ, slope factor.
The EC_{50} was calculated as the value of a PK parameter which produces 50% of the E_{max}.

表 2.6.2.2-22　線形モデルによる S-033447 の PK パラメータ解析結果

PK parameter	Model parameter	Estimate	S.E.	95% confidential interval	P value	COD [adjusted COD]
$AUC_{0\text{-}24hr}$ (ng·hr/mL)	E_0	5.705	0.326	(5.056, 6.354)	< 0.0001	0.399
	β	0.400	0.052	(0.296, 0.504)	< 0.0001	[0.392]
C_{max} (ng/mL)	E_0	4.542	0.248	(4.050, 5.034)	< 0.0001	0.249
	β	0.335	0.062	(0.212, 0.458)	< 0.0001	[0.241]
C_{24hr} (ng/mL)	E_0	3.624	0.066	(3.493, 3.756)	< 0.0001	0.527
	β	0.303	0.031	(0.242, 0.364)	< 0.0001	[0.522]
C_τ (ng/mL)	E_0	3.603	0.064	(3.475, 3.731)	< 0.0001	0.532
	β	0.318	0.032	(0.255, 0.381)	< 0.0001	[0.527]
$T_{>2}$ (hr)	E_0	5.141	0.297	(4.550, 5.732)	< 0.0001	0.324
	β	0.090	0.014	(0.062, 0.117)	< 0.0001	[0.317]
$T_{>10}$ (hr)	E_0	4.095	0.103	(3.890, 4.301)	< 0.0001	0.513
	β	0.060	0.006	(0.048, 0.072)	< 0.0001	[0.508]
$T_{>50}$ (hr)	E_0	3.569	0.083	(3.403, 3.734)	< 0.0001	0.303
	β	0.055	0.009	(0.037, 0.072)	< 0.0001	[0.295]

Abbreviation: β, regression coefficient.

S-033188 の期待される治療効果は，既存薬よりも短期間で強力にウイルス力価を低下させることによる，より速やかな症状改善効果やウイルス検出期間の短縮である．そこで，マウス感染モデルにおいて S-033188 を経口投与した翌日の肺内ウイルス力価を臨床用量相当のオセルタ

ミビルリン酸塩投与群の 1/10 にすることを非臨床モデルでの薬効目標とした．A 型インフルエンザウイルス (A/WSN/33 株) 感染モデルにおいては 3 mg/kg/日 (1.5 mg/kg BID) の用量の S-033188 を 1 日経口投与した群で，10 mg/kg/日 (5 mg/kg BID) の用量のオセルタミビルリン酸塩を 1 日経口投与した群に比して 0.99 $log_{10}TCID_{50}$/mL 低い肺内ウイルス力価を示した (2.6.2.2.4.2 項参照)．同様に B 型インフルエンザウイルス (B/Hong Kong/5/72 株) 感染モデルにおいては，30 mg/kg/日 (15 mg/kg BID) の用量の S-033188 を 1 日経口投与した群で，10 mg/kg/日 (5 mg/kg BID) の用量のオセルタミビルリン酸塩を 1 日経口投与した群に比して 0.97 $log_{10}TCID_{50}$/mL 低い肺内ウイルス力価を示した (2.6.2.2.4.3 項参照)．A 型及び B 型インフルエンザウイルスの S-033447 に対する感受性の差を考慮して，15 mg/kg BID 1 日経口投与を S-033188 の有効薬効用量と考えた．マウス感染モデルの BID 投与において，C_τ は投与後 12 時間の血漿中濃度 (C_{12hr}) に相当し，15 mg/kg BID 投与時の S-033447 の C_{12hr} は 6.85 ng/mL であった (表 2.6.2.2-20)．以上のことから，ヒトでも，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．

2.6.2.2.4.7 ヒト血清が S-033447 のウイルス遺伝子転写反応に対する阻害効果に及ぼす影響

評価資料 4.2.1.1-23
概要表 2.6.3.2.28

一般に薬物は循環血液中に移行したのち，血清中のタンパク質と可逆的に結合するが，薬理効果を発揮するのは血清タンパク質と結合していない遊離型の分子とされている [13]. そこで，ヒト血清が S-033447 のウイルス増殖抑制効果に及ぼす影響を検討した．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，0%，12.5%，25%及び 50%のヒト血清を含む培地と種々の濃度の化合物存在下で培養し，感染 6 時間後に細胞内で合成されるウイルス mRNA の量を測定した．化合物非存在下の条件と比べ，ウイルス mRNA 量を 1/10 に抑制するために必要な化合物の濃度を EC_{90} として測定し，S-033447 とヒト血清に対するタンパク結合率が低いことが知られているファビピラビルを比較した [14].

0%, 12.5%, 25%及び 50%のヒト血清存在下における S-033447 の EC_{90} は，それぞれ 5.27, 6.59, 6.98 及び 10.8 nmol/L であり，ファビピラビルと同様に，EC_{90} のヒト血清濃度に依存した変動は認められなかった (表 2.6.2.2-23).

以上の結果から，ヒト血清は S-033447 のウイルス増殖抑制効果に大きな影響を及ぼさない，と結論した．

表 2.6.2.2-23　ヒト血清存在下における S-033447 及びファビピラビルのウイルス mRNA 合成阻害効果

Human Serum Concentration (%)	S-033447				Favipiravir			
	EC_{90} (nmol/L)[a]		PS (fold)[a,b]		EC_{90} (nmol/L)[a]		PS (fold)[a,b]	
	Mean	S.D.	Mean	S.D.	Mean	S.D.	Mean	S.D.
0	5.27	2.43	N/A		332209.91	55553.44	N/A	
12.5	6.59	1.22	1.65	1.31	162725.18	31085.47	0.50	0.13
25	6.98	1.01	1.65	1.05	254384.73	110051.44	0.76	0.30
50	10.84	3.74	2.86	2.68	305690.41	136403.40	0.91	0.37

a The mean and S.D. were calculated from 3 independent experiments.
b The potency shift (PS) was calculated as a relative value to 0% human serum.

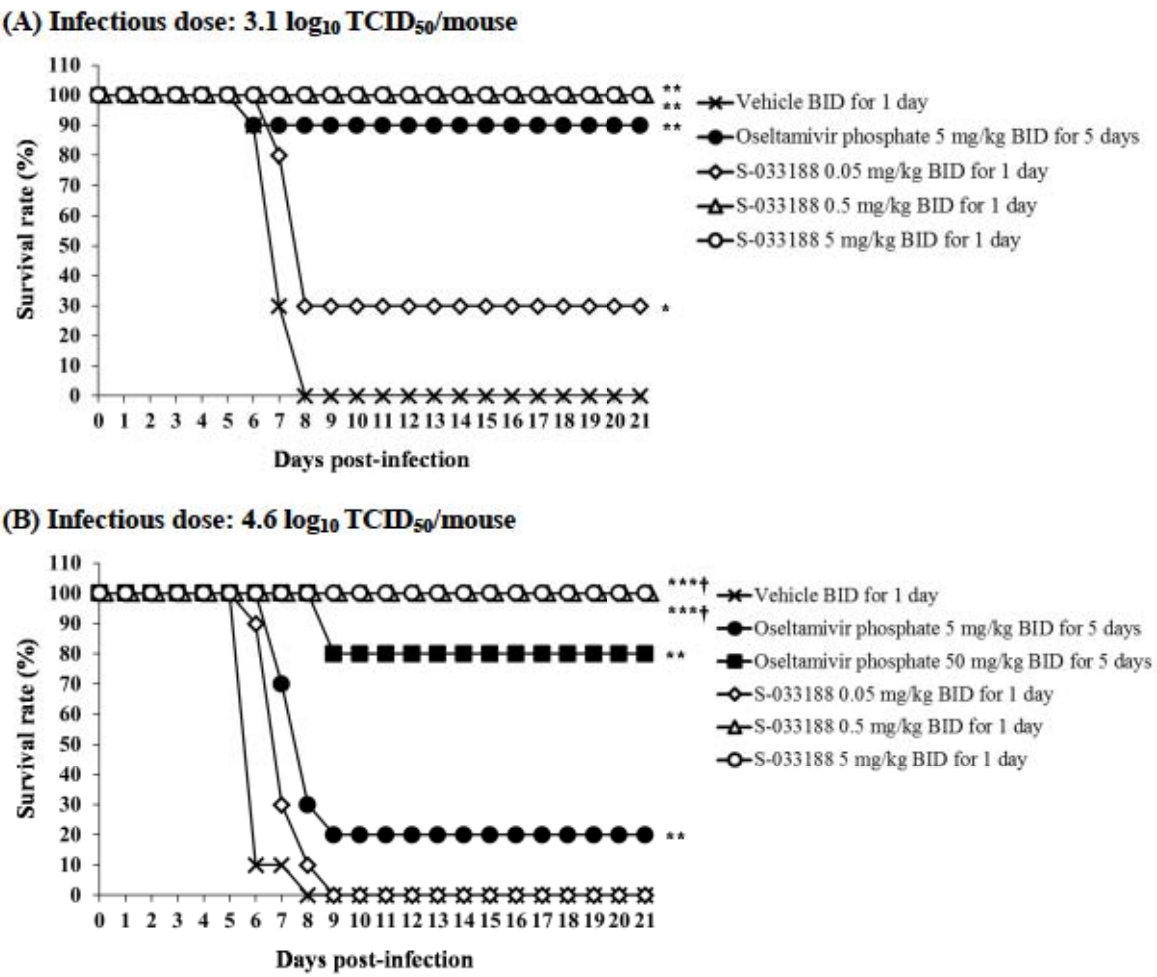
2.6.2.2.4.8 A 型インフルエンザウイルス感染マウスモデルにおける S-033188 の致死率改善効果

評価資料 4.2.1.1-24
概要表 2.6.3.2.29

前項 (2.6.2.2.4.2 項，2.6.2.2.4.3 項，2.6.2.2.4.4 項，2.6.2.2.4.5 項，2.6.2.2.4.6 項) のマウス非致死モデルで示された S-033188 の薬理作用が，マウス致死モデルでも認められるかを，以下の項で検討した．雌性 BALB/c マウスに 3.1 $\log_{10}(1.38 \times 10^3)$ $TCID_{50}$ あるいは 4.6 $\log_{10}(4.42 \times 10^4)$ $TCID_{50}$ (いずれも致死量) の A/PR/8/34 株を経鼻接種した直後に，0.1，1 又は 10 mg/kg/日 (0.05，0.5 又は 5 mg/kg BID) の用量の S-033188 を 1 日経口投与し，接種から 21 日間の生存率をもとめ，対照薬と比較した．対照薬として，臨床用量に相当する 10 mg/kg/日 (5 mg/kg BID) あるいはその 10 倍量である 100 mg/kg/日 (50 mg/kg BID) の用量のオセルタミビルリン酸塩を 5 日間反復経口投与した．その結果，3.1 $\log_{10}TCID_{50}$ 接種時，S-033188 の 0.5 及び 5 mg/kg BID 投与群とオセルタミビルリン酸塩の 5 mg/kg BID 投与群の接種 21 日後における生存率は，それぞれ 100%，100%及び 90%であった (図 2.6.2.2-12)．一方で，4.6 $\log_{10}TCID_{50}$ 接種時，S-033188 の 0.5 及び 5 mg/kg BID 投与群は，接種 21 日後においていずれも 100%の生存率を示したが，オセルタミビルリン酸塩の 5 及び 50 mg/kg BID 投与群の接種 21 日後における生存率は，それぞれ 20%，80%であった．S-033188 の 0.5 及び 5 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．

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優れた治療効果を発揮すると考えている．

図 2.6.2.2-12　A/PR/8/34 株 (3.1 $log_{10}TCID_{50}$ 又は 4.6 $log_{10}TCID_{50}$/mouse) 感染マウスにおける S-033188 の致死率改善効果



The following P values were calculated by the log-rank test and the fixed-sequence procedure: * $P < 0.05$, ** $P < 0.001$, *** $P < 0.0001$ vs vehicle, † $P < 0.0005$ vs oseltamivir phosphate 5 mg/kg.

2.6.2.2.4.9 B 型インフルエンザウイルス感染マウスモデルにおける S-033188 の致死率改善効果

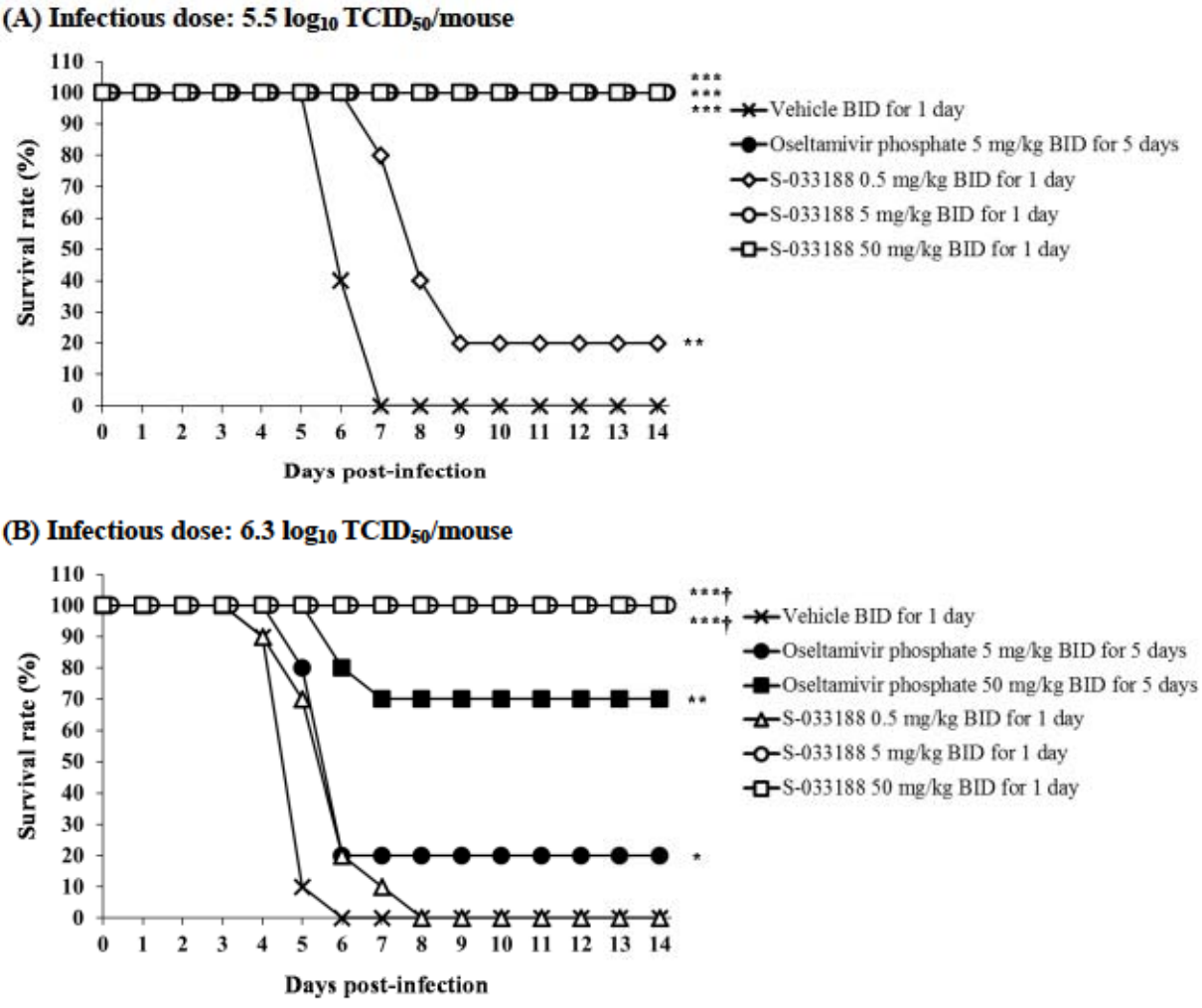
評価資料 4.2.1.1-25
概要表 2.6.3.2.30

雌性 BALB/c マウスに 5.5 log_{10} (3.30×10^5) $TCID_{50}$ あるいは 6.3 log_{10} (1.98×10^6) $TCID_{50}$ (いずれも致死量) の B/Hong Kong/5/72 株を経鼻接種した直後に，1，10 又は 100 mg/kg/日 (0.5，5 又は 50 mg/kg BID) の用量の S-033188 を 1 日経口投与し，接種から 14 日間の生存率をもとめ，対照薬と比較した．対照薬として，臨床用量相当である 10 mg/kg/日 (5 mg/kg BID) あるいはその 10 倍量である 100 mg/kg/日 (50 mg/kg BID) の用量のオセルタミビルリン酸塩を 5 日間反復経口投与した．その結果，5.5 $log_{10}TCID_{50}$ 接種時，S-033188 の 5 及び 50 mg/kg BID 投与群とオセルタミビルリン酸塩の 5 mg/kg BID 投与群の接種 14 日後における生存率は，いずれも 100%であった (図 2.6.2.2-13)．一方で，6.3 $log_{10}TCID_{50}$ 接種時，S-033188 の 5 及び 50 mg/kg BID 投与群は，接種 14 日後において 100%の生存率を示したが，オセルタミビルリン酸塩の 5 及び 50 mg/kg BID

投与群の接種 14 日後における生存率はそれぞれ 20%及び 70%であった．S-033188 の 5 及び 50 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．

以上の結果から，S-033188 は，B 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優れた治療効果を発揮すると考えている．

図 2.6.2.2-13　B/Hong Kong/5/72 株 (5.5 $\log_{10}$TCID$_{50}$ 又は 6.3 $\log_{10}$TCID$_{50}$/mouse) 感染マウスにおける S-033188 の致死率改善効果



The following P values were calculated by the log-rank test and the fixed-sequence procedure: * $P < 0.05$, ** $P < 0.001$, *** $P < 0.0001$ vs vehicle, † $P < 0.0005$ vs oseltamivir phosphate 5 mg/kg.

2.6.2.2.4.10 A 型インフルエンザウイルス感染マウスモデルにおける S-033188 の遅延投与による致死率改善効果と肺内ウイルス力価低下作用

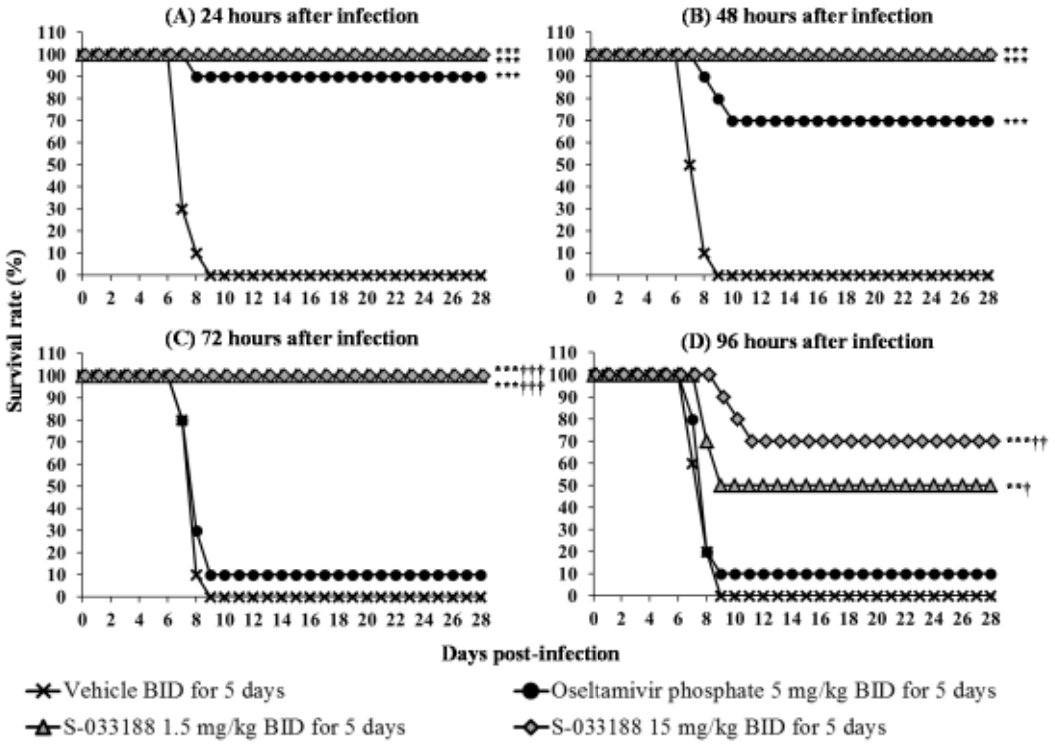
評価資料 4.2.1.1-26，4.2.1.1-27
概要表 2.6.3.2.31，2.6.3.2.32，2.6.3.2.33

雌性 BALB/c マウスに 3.1 $\log_{10}$ (1.38×10^3) TCID$_{50}$ (致死量) の A/PR/8/34 株を経鼻接種した 24，48，72 又は 96 時間後に，3 又は 30 mg/kg/日 (1.5 又は 15 mg/kg BID) の用量の S-033188 を 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もとめ，それらの推移を対照薬と比較した．また，経鼻接種から 72 時間後に投与を開始した場合の肺内ウイルス力価の推移を測定した．対照薬として，臨床用量に相当する 10 mg/kg/日 (5 mg/kg BID) の用量のオセルタミビルリン酸塩を 5 日間反復経口投与した．その結果，接種 24 及び 48 時間後投与において，S-033188 の 1.5 及び 15 mg/kg BID 投与群並びにオセルタミビルリン酸塩 BID 投与群では，媒体投与群に比べて致死率が改善し，接種 24 時間後投与の生存率は，それぞれ 100%，100%及び 90%，接種 48 時間後投与の生存率はそれぞれ 100%，100%及び 70%であった (図 2.6.2.2-14)．一方，接種 72 及び 96 時間後投与において，オセルタミビルリン酸塩 BID 投与群は，媒体投与群に比べて致死率の改善を示さず，生存率はいずれも 10%であった．これに対し，S-033188 の 1.5 及び 15 mg/kg BID 投与群は，媒体投与群及びオセルタミビルリン酸塩 BID 投与群に比べて致死率が改善し，接種 72 時間後投与における生存率はいずれも 100%，接種 96 時間後投与における生存率はそれぞれ 50%及び 70%であり，生存期間が有意に延長した (図 2.6.2.2-14)．S-033188 BID 投与群ではインフルエンザウイルス増殖に起因する体重減少を用量依存的に抑制した (図 2.6.2.2-15)

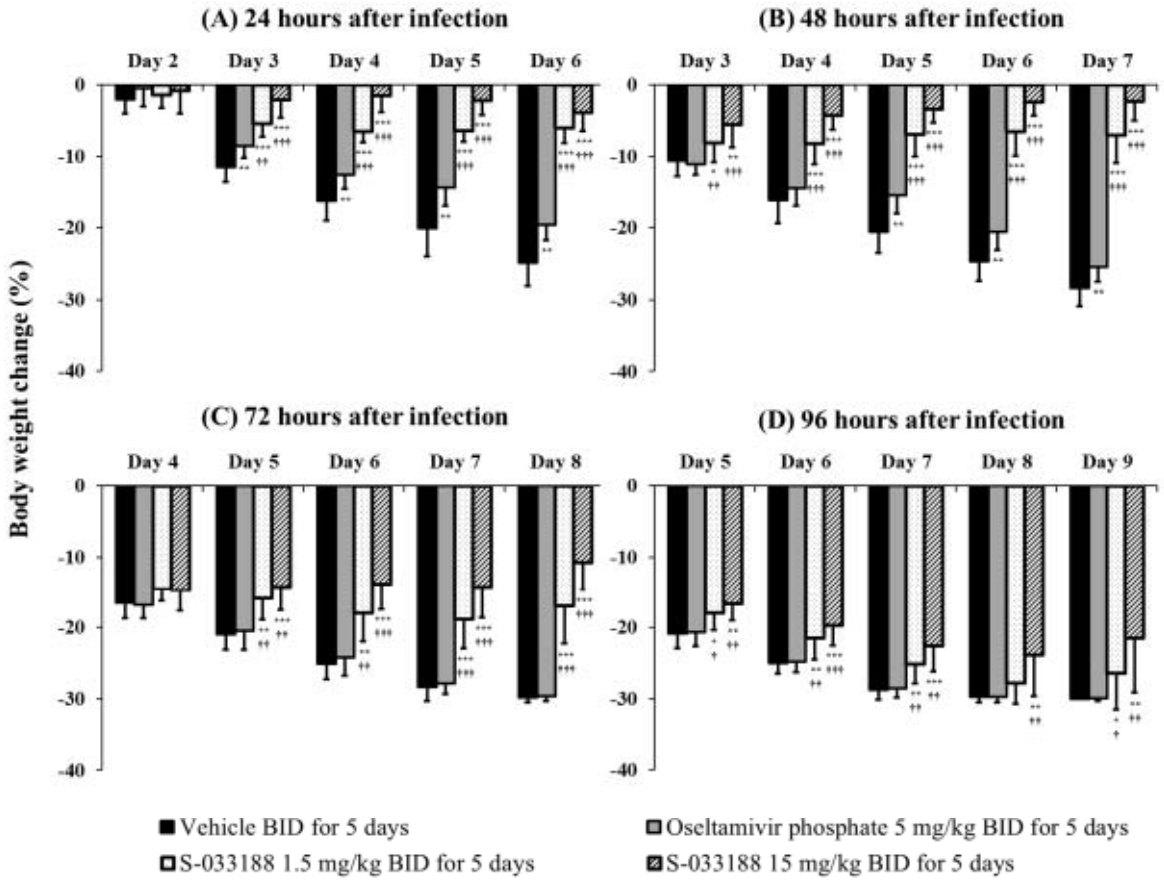
以上の結果から，S-033188 は，治療開始が遅れたインフルエンザウイルス感染患者や重篤な症状を示すインフルエンザウイルス感染患者に対して，オセルタミビルリン酸塩よりも優れた治療効果を発揮すると考えている．

図 2.6.2.2-14　A/PR/8/34 株感染マウスにおける遅延投与による S-033188 の致死率改善効果



The following P values were calculated by log-rank test and the fixed-sequence procedure: ** $P < 0.01$, *** $P < 0.0001$ vs vehicle, $^{\dagger}P < 0.05$, $^{\dagger\dagger}P < 0.01$, $^{\dagger\dagger\dagger}P < 0.0001$ vs oseltamivir phosphate 5 mg/kg.

図 2.6.2.2-15　A/PR/8/34 株感染マウスにおける遅延投与による S-033188 の体重減少抑制効果



Data represent as relative value, with body weight of each mouse in the morning on the day of infection being 100%, and the percentages of body weight of died mice were regarded as 70%.
Each bar represents the mean body weight change ± S.D. of 10 mice.
The following P values were calculated by student's t-test and the fixed sequence procedure: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.0001$ vs vehicle, † $P < 0.05$, †† $P < 0.01$, ††† $P < 0.0001$ vs oseltamivir phosphate 5 mg/kg.

観察された致死率改善効果が 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，同モデルにおいて肺内ウイルス力価を測定した．

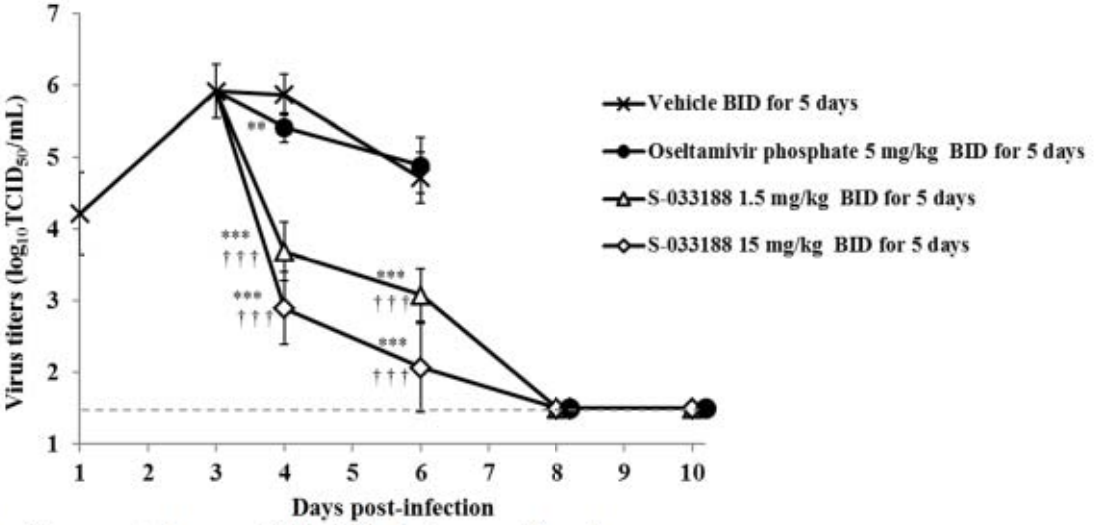
雌性 BALB/c マウスに 3.1 $\log_{10}$ (1.38×10^3) $TCID_{50}$ (致死量) の A/PR/8/34 株を経鼻接種し，72 時間後に 3 又は 30 mg/kg/日 (1.5 又は 15 mg/kg BID) の用量の S-033188 を 5 日間反復経口投与した．投与開始後のマウスの肺内ウイルス力価を継時的に測定し，対照薬と比較した．対照薬として，臨床用量に相当する 10 mg/kg/日 (5 mg/kg BID) の用量のオセルタミビルリン酸塩を 5 日間反復経口投与した．

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 投与群に比べて肺内ウイルス力価が有意に低下した (

図 2.6.2.2-16).

以上の結果から，A/PR/8/34 株感染マウスにおける接種 72 時間後投与 (遅延投与) において確認された S-033188 の致死率改善効果は，S-033188 のウイルス増殖抑制効果に起因すると結論した．

図 2.6.2.2-16　A/PR/8/34 株感染マウスにおける S-033188 の経時的な肺内ウイルス力価低下作用



Each point represents the mean ± S.D. of 6 to 8 mice except for n=1.
Broken line represents the lower limit of quantification (1.50 log10 TCID50/mL)
The following P values were calculated by the one-way analysis of variance followed by pairwise comparison and the fixed sequence procedure: ** $P < 0.01$, *** $P < 0.0001$ vs vehicle, ††† $P < 0.0001$ vs oseltamivir phosphate 5 mg/kg.

2.6.2.2.4.11 A 型インフルエンザウイルス感染マウスモデルにおける NA 阻害薬との併用投与による致死率改善効果

評価資料 4.2.1.1-28
概要表 2.6.3.2.34，2.6.3.2.35

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おいて，臨床用量の 2 倍量あるいはそれ以上のオセルタミビルリン酸塩と新規メカニズムを有する薬剤を併用する治療方法の開発が進められている．そこで，臨床用量の 2 及び 10 倍量のオセルタミビルリン酸塩と S-033188 を併用することによる効果を検討した．雌性 BALB/c マウスに 2.9 $\log_{10}$ (8.00×10^2) $TCID_{50}$ (致死量) の A/PR/8/34 株を経鼻接種し，96 時間後に 1，3，30 又は 100 mg/kg/日 (0.5，1.5，15 又は 50 mg/kg BID) の用量の S-033188 の 5 日間反復経口投与と，臨床用量の 2 倍量に相当する 20 mg/kg/日 (10 mg/kg BID) 又は 10 倍量に相当する 100 mg/kg/日 (50 mg/kg BID) の用量のオセルタミビルリン酸塩の 5 日間反復経口投与を併用し，接種から 28 日間の生存率と投与期間中の体重変化率をもとめ，それらの推移を S-033188 及びオセルタミビルリン酸塩の単独投与群と比較した．

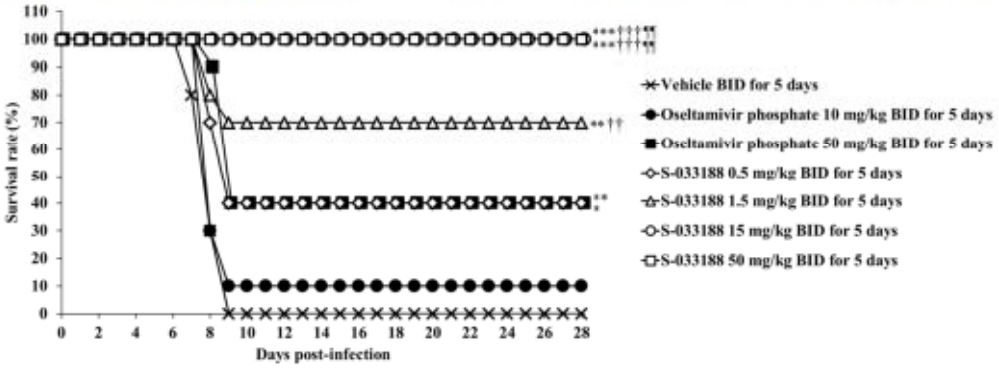
S-033188 の 15 mg/kg BID 以上の用量の単独投与群の生存率は 100%であったことから，これらの投与群においてはオセルタミビルリン酸塩との併用効果は評価不能と判断した (図 2.6.2.2-17)．一方，S-033188 の 0.5 及び 1.5 mg/kg BID 単独投与群の生存率はそれぞれ 40%及び 70%, オセルタミビルリン酸塩の 10 及び 50 mg/kg BID 単独投与群の生存率はそれぞれ 10%及び 40%であったため，これらの用量を組合せて併用効果を検討した．S-033188 の 0.5 mg/kg BID とオセルタミビルリン酸塩の 10 又は 50 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．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 (図 2.6.2.2-17)．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 (図 2.6.2.2-18)．

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．

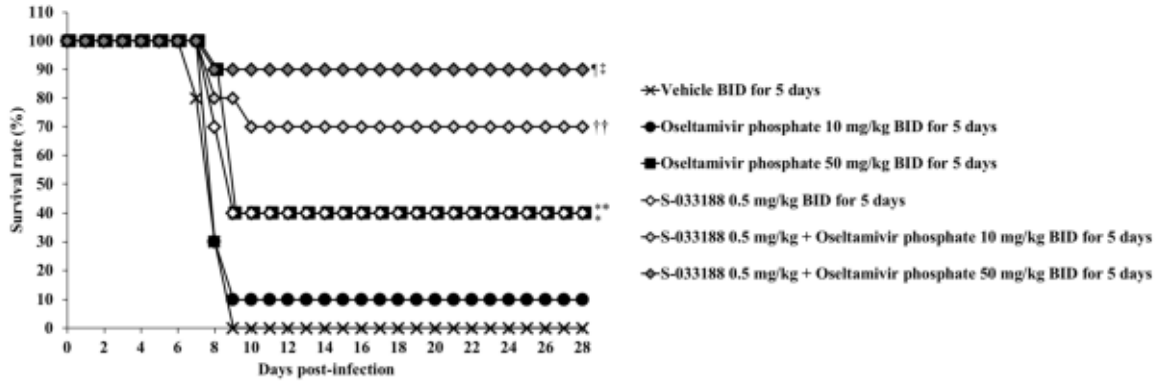
図 2.6.2.2-17　A/PR/8/34 株感染マウスにおける S-033188 とオセルタミビルリン酸塩の併用投与による致死率改善効果

(A) Effect of delayed treatment with S-033188 or oseltamivir phosphate alone



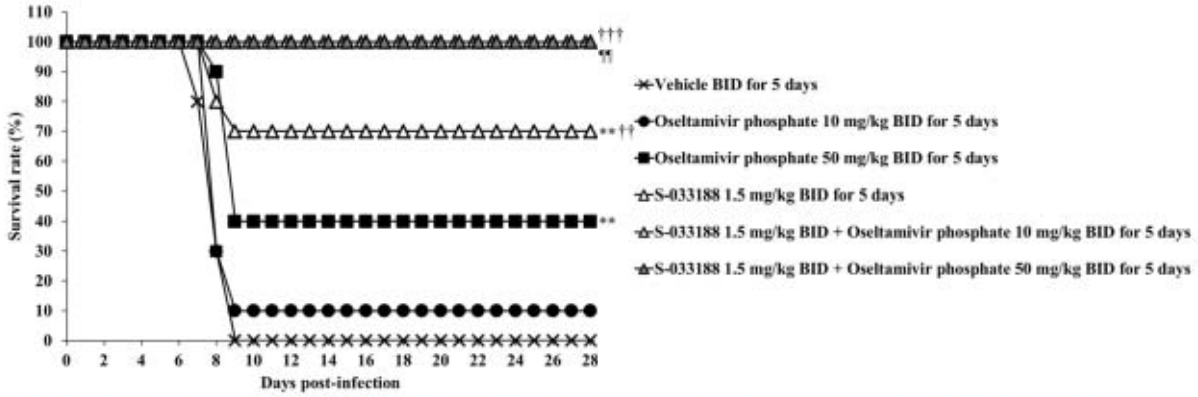
The following P values were calculated by log-rank test and the fixed-sequence procedure: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.0001$ vs vehicle, †† $P < 0.01$, ††† $P < 0.0001$ vs oseltamivir phosphate 10 mg/kg, ¶¶ $P < 0.01$ vs oseltamivir phosphate 50 mg/kg.

(B) Effect of delayed treatment with 0.5 mg/kg of S-033188 in combination with oseltamivir phosphate



The following P values were calculated by log-rank test and the fixed-sequence procedure: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs vehicle, †† $P < 0.01$ vs oseltamivir phosphate 10 mg/kg, ¶ $P < 0.05$ vs oseltamivir phosphate 50 mg/kg, ‡ $P < 0.05$ vs S-033188 0.5 mg/kg.

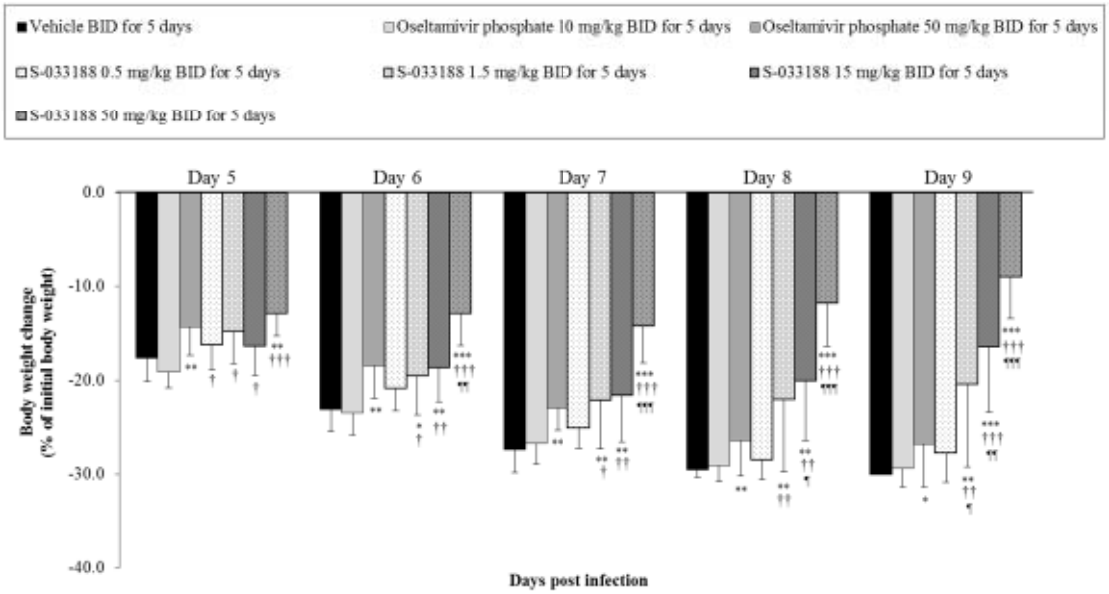
(C) Effect of delayed treatment with 1.5 mg/kg of S-033188 in combination with oseltamivir phosphate



The following P values were calculated by log-rank test and the fixed-sequence procedure: ** $P < 0.01$ vs vehicle, ¶¶ $P < 0.01$, ††† $P < 0.0001$ vs oseltamivir phosphate 10 mg/kg, ¶¶ $P < 0.01$ vs oseltamivir phosphate 50 mg/kg.

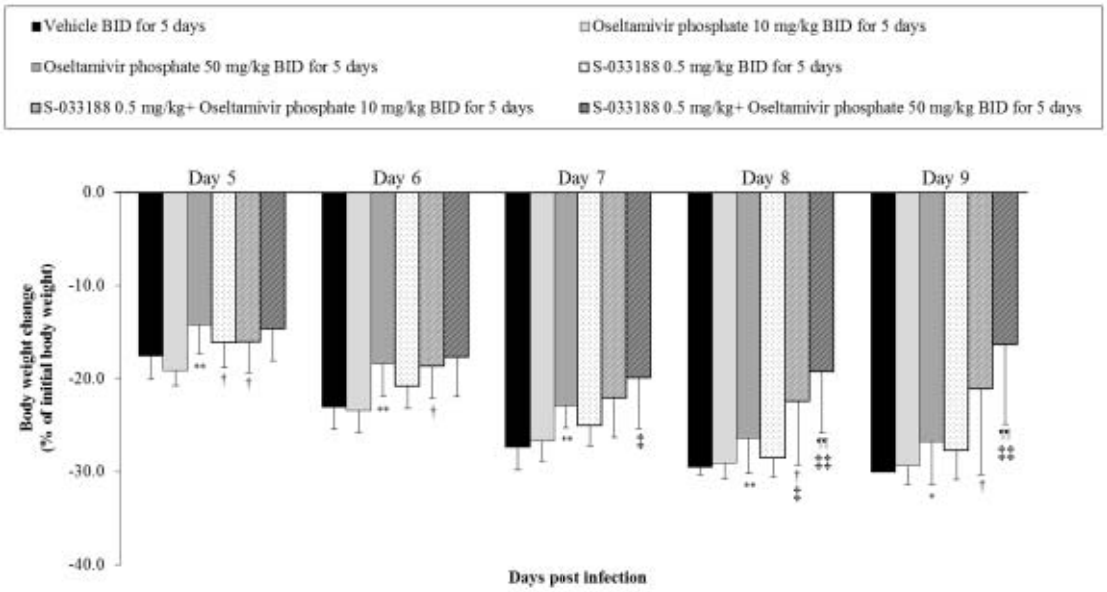
図 2.6.2.2-18　A/PR/8/34 株感染マウスにおける S-033188 とオセルタミビルリン酸塩の併用投与による体重減少抑制効果

(A) Effect of delayed treatment with S-033188 or oseltamivir phosphate alone



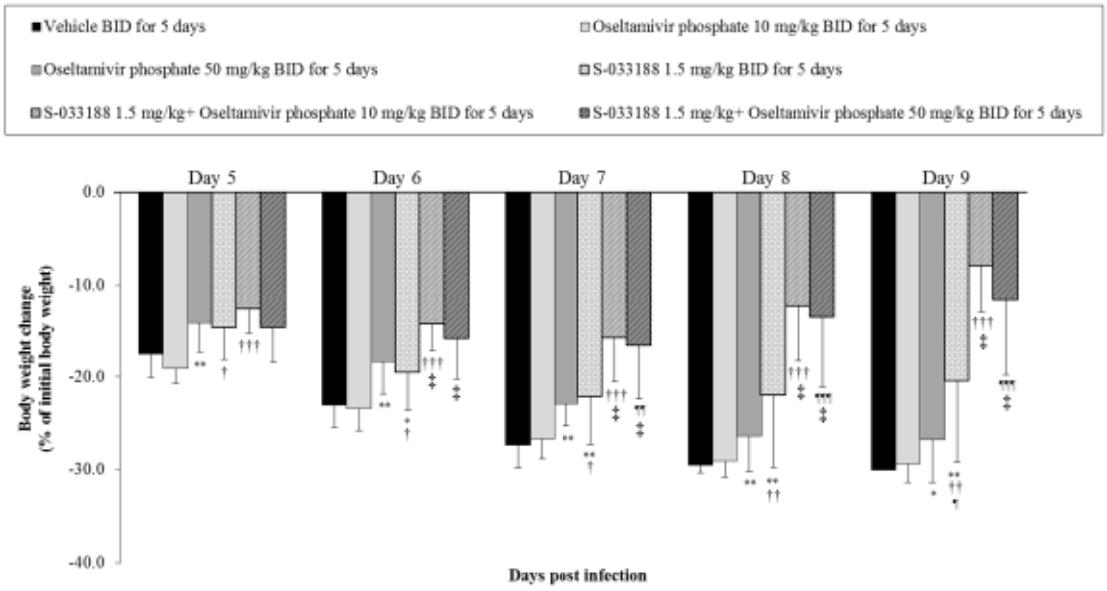
Data represent as relative value, with body weight of each mouse in the morning on the day of infection being 100%, and the percentages of body weight of died mice were regarded as 70%.
Each bar represents the mean body weight change ± S.D. of 10 mice.
The following P values were calculated by the one-way analysis of variance followed by pairwise comparisons and the fixed sequence procedure: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.0001$ vs vehicle, † $P < 0.05$, †† $P < 0.01$, ††† $P < 0.0001$ vs oseltamivir phosphate 10 mg/kg, ¶ $P < 0.05$, ¶¶ $P < 0.01$, ¶¶¶ $P < 0.0001$ vs oseltamivir phosphate 50 mg/kg.

(B) Effect of delayed treatment with 0.5 mg/kg of S-033188 in combination with oseltamivir phosphate



Data represent as relative value, with body weight of each mouse in the morning on the day of infection being 100%, and the percentages of body weight of died mice were regarded as 70%.
Each bar represents the mean body weight change ± S.D. of 10 mice.
The following P values were calculated by the one-way analysis of variance followed by pairwise comparisons and the fixed sequence procedure: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs vehicle, † $P < 0.05$ vs oseltamivir phosphate 10 mg/kg, ¶¶ $P < 0.01$ vs oseltamivir phosphate 50 mg/kg, ‡ $P < 0.05$, ‡‡ $P < 0.01$ vs S-033188 0.5 mg/kg.

(C) Effect of delayed treatment with 1.5 mg/kg of S-033188 in combination with oseltamivir phosphate



Data represent as relative value, with body weight of each mouse in the morning on the day of infection being 100%, and the percentages of body weight of died mice were regarded as 70%.
Each bar represents the mean body weight change ± S.D. of 10 mice.
The following P values were calculated by the one-way analysis of variance followed by pairwise comparisons and the fixed sequence procedure: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs vehicle, † $P < 0.05$, †† $P < 0.01$, ††† $P < 0.0001$ vs oseltamivir phosphate 10 mg/kg, ¶ $P < 0.05$, ¶¶ $P < 0.01$, ¶¶¶ $P < 0.0001$ vs oseltamivir phosphate 50 mg/kg, ‡ $P < 0.05$ vs S-033188 1.5 mg/kg.

2.6.2.2.4.12 A 型インフルエンザウイルス感染フェレットモデルにおける S-033188 の治療効果

評価資料 4.2.1.1-29
概要表 2.6.3.2.36，2.6.3.2.37

雌性フェレットに 3.0 $\log_{10}$(1.00 × 10^3) $TCID_{50}$(非致死量) の A/Kadoma/3/2006 株を経鼻接種した 24 時間後に，20 又は 60 mg/kg/日 (10 又は 30 mg/kg BID) の用量の S-033188 を 1 日経口投与した．投与開始から 2 日間の鼻腔洗浄液内ウイルス力価の推移及び体温変化量の推移を治療効果の指標とした．対照薬として，臨床用量相当である 10 mg/kg/日 (5 mg/kg BID) の用量のオセルタミビルリン酸塩を 2 日間反復経口投与し，同様にウイルス力価及び体温変化量を測定した．

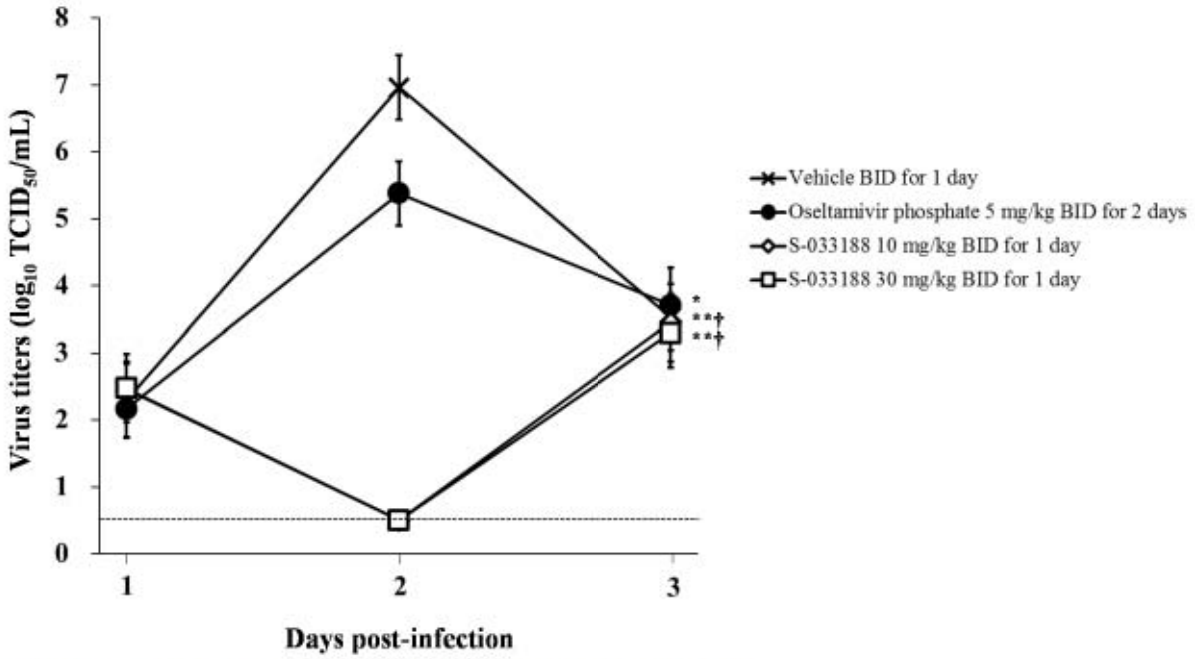
S-033188 を投与した群の投与開始から 2 日間の鼻腔洗浄液内ウイルス力価は，媒体対照群あるいはオセルタミビルリン酸塩投与群のそれらに比べて有意に低く，投与開始から 1 日後において，いずれの用量においてもウイルス力価は定量下限である 0.5 $\log_{10}TCID_{50}$/mL 未満となった (図 2.6.2.2-19). S-033188 の 10 及び 30 mg/kg BID 投与群の投与開始から 2 日間の体温変化量は，媒体対照群及びオセルタミビルリン酸塩 BID 投与群のそれらに比べて有意に小さく，体温上昇の抑制を示した (図 2.6.2.2-20).

一方，オセルタミビルリン酸塩 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，媒体対照群のそれに比べて有意に低かったが (図 2.6.2.2-19)，2 日間の体温変化量については有意な差はなかった (図 2.6.2.2-20).

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ときの S-033447 の血漿中 C_{max} と最終採血時点までの血漿中濃度－時間曲線下面積 (AUC_{all}) は用量の増加に伴い増大した (表 2.6.2.2-24). フェレットに 10 mg/kg の用量の S-033188 を単回経口投与した群における血漿中の S-033447 の C_{max} 及び AUC_{all} は，マウスに 5～15 mg/kg の用量の S-033188 を単回経口投与した群における血漿中の S-033447 の C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}inf}$ に相当した．

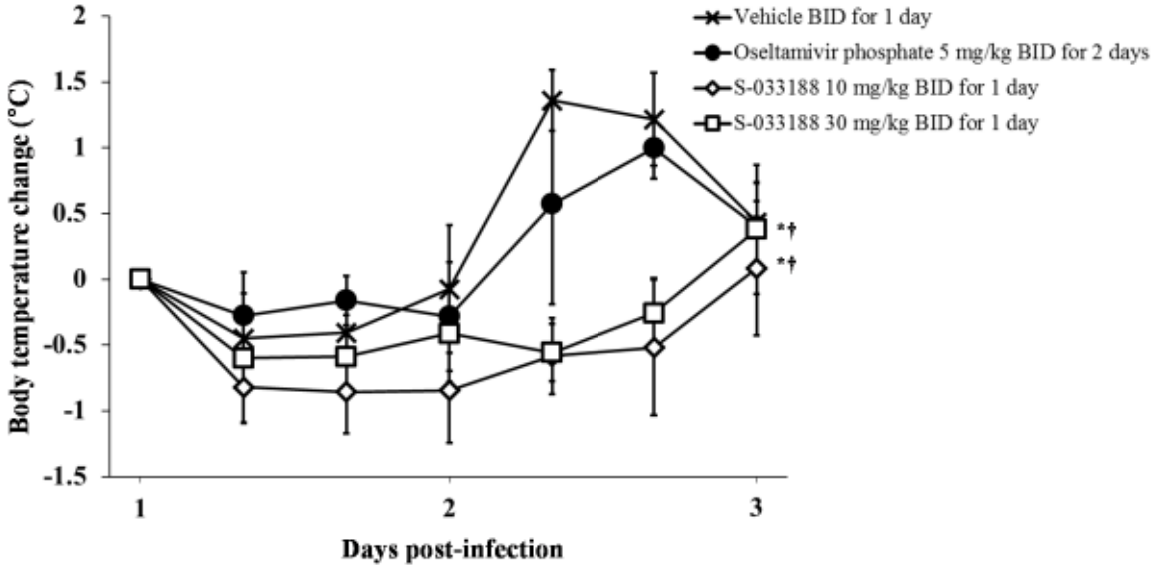
以上の結果から，S-033188 は，A 型インフルエンザウイルスの感染に対して，オセルタミビルリン酸塩よりも強力なウイルス増殖抑制効果を発揮し，優れた治療効果を示すと考えている．

図 2.6.2.2-19　A/Kadoma/3/2006株感染フェレットにおけるS-033188の鼻腔洗浄液内ウイルス力価低下作用



Broken line represents the lower limit of quantification (0.5 $\log_{10}$ $TCID_{50}$/mL)
Each point represents the mean ±S.D. of 4 ferrets.
The following P values for the overall time (from 2 to 3 days post-infection [dpi]) were calculated by the two-way analysis of variance followed by pairwise comparisons and the fixed-sequence procedure: * $P < 0.01$ vs vehicle, ** $P < 0.0001$ vs vehicle, † $P < 0.0001$ vs oseltamivir phosphate 5 mg/kg.

図 2.6.2.2-20　A/Kadoma/3/2006株感染フェレットにおけるS-033188の体温変化量の抑制効果



Each point represents the mean ± S.D. of 4 ferrets.
The following P values for the overall time (from 8 to 72 hours after first administration) were calculated by the two-way analysis of variance followed by pairwise comparisons and the fixed-sequence procedure: * $P < 0.0001$ vs vehicle, † $P < 0.0001$ vs oseltamivir phosphate 5 mg/kg.

表 2.6.2.2-24　フェレットにおける S-033188 単回経口投与後の S-033447 の薬物動態パラメータ

PK parameters of S-033447	10 mg/kg	30 mg/kg
C_{max} (ng/mL)	66.6 ± 14.6	365 ± 316
T_{max} (hr)	1.50 ± 0.58	2.00 ± 1.41
$t_{1/2,z}$ (hr)[a]	6.91 ± 3.79	4.44 ± 0.67
AUC_{all} (ng·hr/mL)	421 ± 119	3240 ± 3240
$AUC_{0\text{-}inf}$ (ng·hr/mL)	460 ± 130	3300 ± 3290

Data are expressed as the mean ± S.D. of 4 ferrets.
a $t_{1/2,\ (6\text{-}24\ hr)}$.

2.6.2.2.4.13 A 型インフルエンザウイルス感染免疫抑制マウスモデルにおける肺内ウイルス力価低下作用

評価資料 4.2.1.1-30，4.2.1.1-31
概要表 2.6.3.2.38，2.6.3.2.39，2.6.3.2.40

健康なヒトでは，インフルエンザウイルスに対し，感染初期には自然免疫の非特異的防御機能により，感染後期にはウイルス抗原によって誘導される獲得免疫の特異的作用により，効率よくウイルスを排除する [15]．ところが，がんや糖尿病などの慢性疾患患者は免疫機能が低下していることから，いわゆるインフルエンザのハイリスクグループとして認識されており，発症した場合に重症化しやすいことが知られている [16]．そこで，このような免疫機能が低下しているハイリスクグループに対する S-033188 の有効性を，免疫抑制状態を誘導したマウスモデルで検討した．

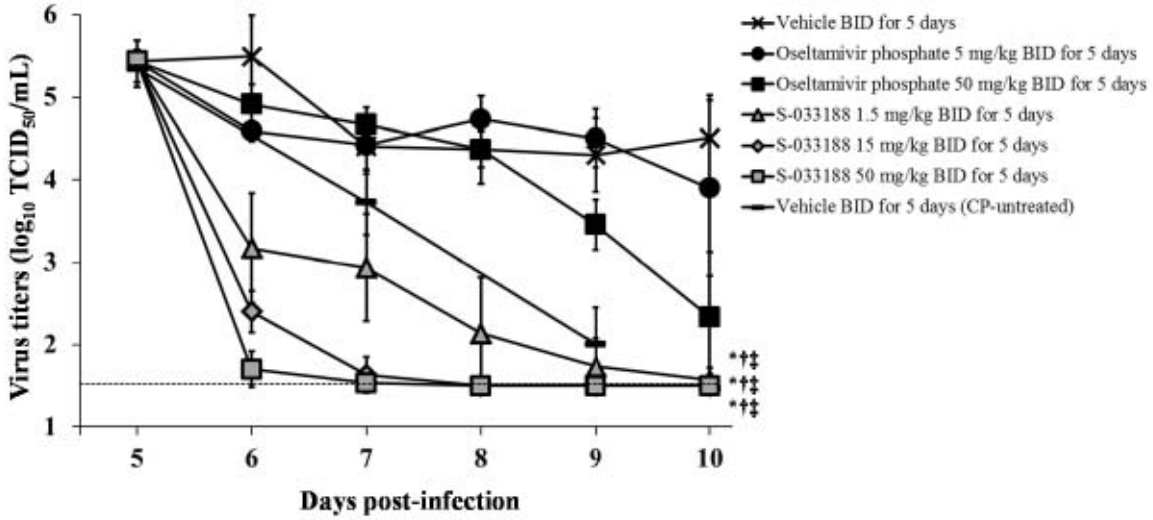
雌性 BALB/c マウスに 0.2 mg/mouse の用量のシクロフォスファミド (CP) をウイルス接種の前日から QD 11 日間皮下投与することで免疫抑制状態を誘導した後，2.0 $\log_{10}$ (1.00×10^2) $TCID_{50}$ (非致死量) の A/PR/8/34 株を経鼻接種した．経鼻接種後 5 日目に，3, 30 又は 100 mg/kg/日 (1.5, 15 又は 50 mg/kg BID) の用量の S-033188 を 5 日間反復経口投与し，投与開始から 5 日間，肺内ウイルス力価と体重減少率を経時的に測定した．対照薬として，臨床用量に相当する 10 mg/kg/日 (5 mg/kg BID) あるいはその 10 倍量である 100 mg/kg/日 (50 mg/kg BID) の用量のオセルタミビルリン酸塩を 5 日間反復経口投与し，同様に肺内ウイルス力価と体重減少率を経時的に測定した．

CP 投与マウスはウイルス接種後 5 日目から 10 日目の間，4 $\log_{10}$ $TCID_{50}$/mL 以上の肺内ウイルス力価を維持したのに対し，CP 非投与マウスの肺内ウイルス力価は，ウイルス接種後 9 日目には 2 $\log_{10}$ $TCID_{50}$/mL まで減少したことから，CP 投与によるマウスのウイルス感染期間延長効果を確認した (図 2.6.2.2-21)．S-033188 の 1.5，15 及び 50 mg/kg BID 投与群は，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を示した後，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 (1.5 $\log_{10}$ $TCID_{50}$/mL) に達した．S-033188 の 1.5，15 及び 50 mg/kg BID 投与群は，媒体対照群，あるい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．肺内ウイルス力価の低下作用に伴い，S-033188 の 1.5，15 及び 50 mg/kg BID 投与群は，媒体対照群，あるいはオセルタミビルリン酸塩の 5 及び 50 mg/kg BID 投与群に比べて体重減少率が有意に小さかった (図 2.6.2.2-22)．

以上の結果から，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

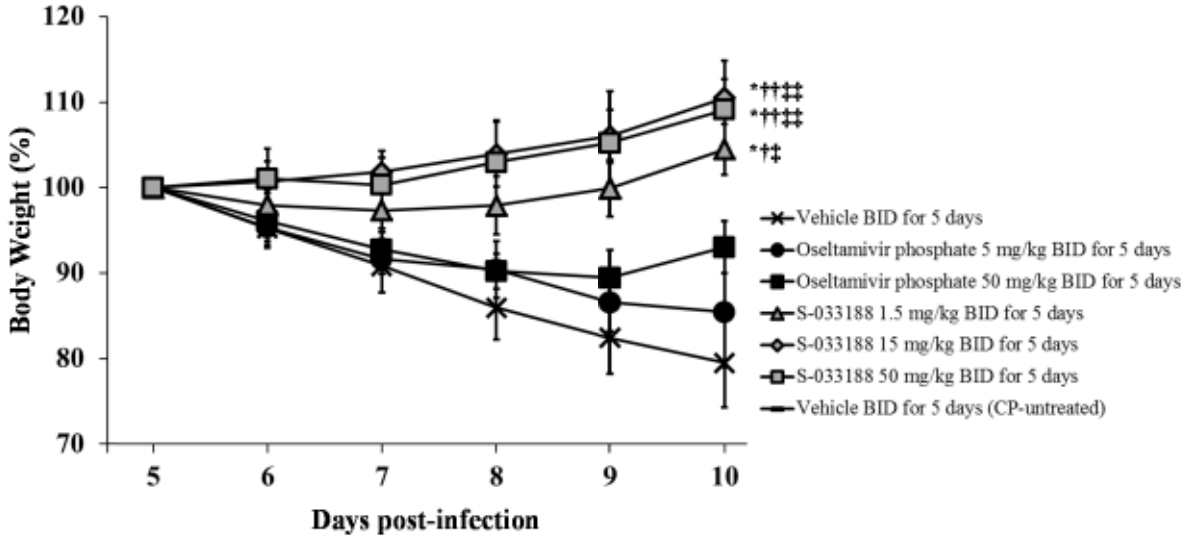
ミビルリン酸塩よりも強力なウイルス増殖抑制効果を発揮し，体内のウイルスをより早期に消失させる効果があると考えている．

図 2.6.2.2-21　A/PR/8/34 株感染免疫抑制マウスにおける S-033188 の経時的な肺内ウイルス力価低下作用



Broken line represents the lower limit of quantification (1.5 log_{10} $TCID_{50}$/mL)
Each point represents the mean ± S.D. of 5 mice.
The following P values for the overall time (from 5 to 10 dpi) were calculated by the linear model with heteroscedastic errors and the fixed-sequence procedure: * $P < 0.0001$ vs vehicle, † $P < 0.0001$ vs oseltamivir phosphate 5 mg/kg.
The following P value for the overall time (from 5 to 10 dpi) was calculated by the linear model with heteroscedastic errors: ‡ $P < 0.0001$ vs oseltamivir phosphate 50 mg/kg.

図 2.6.2.2-22　A/PR/8/34 株感染免疫抑制マウスにおける S-033188 の経時的な体重減少抑制効果



Data represent as relative value, with the body weight of each mouse on 5 dpi being 100%.
Each point represents the mean ± S.D. of 5 mice.
The following P values for the overall time (from 5 to 10 dpi) were calculated by the mixed model repeated measures and the fixed-sequence procedure: * $P < 0.0001$ vs vehicle, † $P < 0.0005$ vs oseltamivir phosphate 5 mg/kg, †† $P < 0.0001$ vs oseltamivir phosphate 5 mg/kg.
The following P values for the overall time (from 5 to 10 dpi) were calculated by the mixed model repeated measures: ‡ $P < 0.005$ vs oseltamivir phosphate 50 mg/kg, ‡‡ $P < 0.0001$ vs oseltamivir phosphate 50 mg/kg.

次に，S-033188 を 5 日間投与している間に，S-033447 に対する感受性が低下したウイルスが出現するか確認するため，肺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解析した．肺試料中のウイルス RNA 量を測定した結果，全試料の RNA 量はサンガー法による解析が実施できる下限である 4.0 $\log_{10}$ viral particles/mL を上回っていた．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 遺伝子を解析した結果，投与開始から 1，3 及び 5 日後の何れにおいても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 ($C_{τ}$: 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．

2.6.2.2.5 *In vivo* における季節性以外のインフルエンザウイルスに対する作用

2.6.2.2.5.1 高病原性鳥インフルエンザウイルス (A/H5N1) に対する S-033188 の治療効果

評価資料 4.2.1.1-32
概要表 2.6.3.2.41，2.6.3.2.42

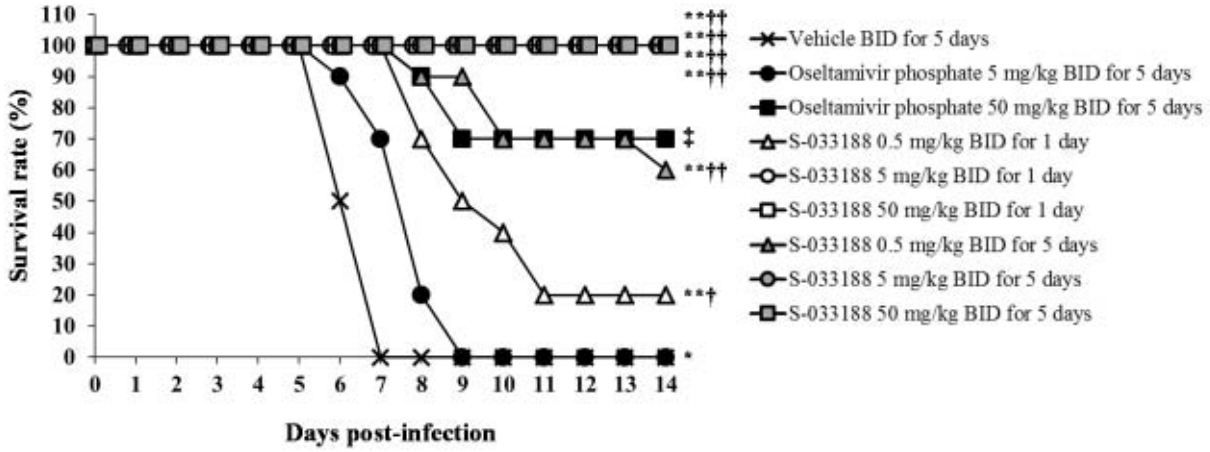
雌性 BALB/c マウスにヒトから分離された A/H5N1 亜型の高病原性鳥インフルエンザウイルス A/Hong Kong/483/97 株 [1.9 $\log_{10}(0.75 \times 10^2)$ $TCID_{50}$(致死量)] を経鼻接種した直後に，1，10 又は 100 mg/kg/日 (0.5，5 又は 50 mg/kg BID) の用量の S-033188 を 1 日あるいは 5 日間反復経口投与し，接種から 14 日間の生存率と投与開始から 1，3 及び 5 日後のマウスの肺内ウイルス力価をもとめ，それらの推移を対照薬と比較した．対照薬として，臨床用量に相当する 10 mg/kg/日 (5 mg/kg BID) あるいはその 10 倍量である 100 mg/kg/日 (50 mg/kg BID) の用量のオセルタミビルリン酸塩を 5 日間反復経口投与し，同様に生存率と肺内ウイルス力価を測定した．

その結果，5 及び 50 mg/kg の用量の S-033188 を BID 1 日あるいは BID 5 日間投与した群は，接種 14 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 の用量のオセルタミビルリン酸塩を BID 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 (図 2.6.2.2-23).

5 及び 50 mg/kg の用量の S-033188 を BID 1 日あるいは BID 5 日間投与した群の投与開始から 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 の用量のオセルタミビルリン酸塩を BID 5 日間投与した群のそれに比べて有意に低かった (図 2.6.2.2-24).

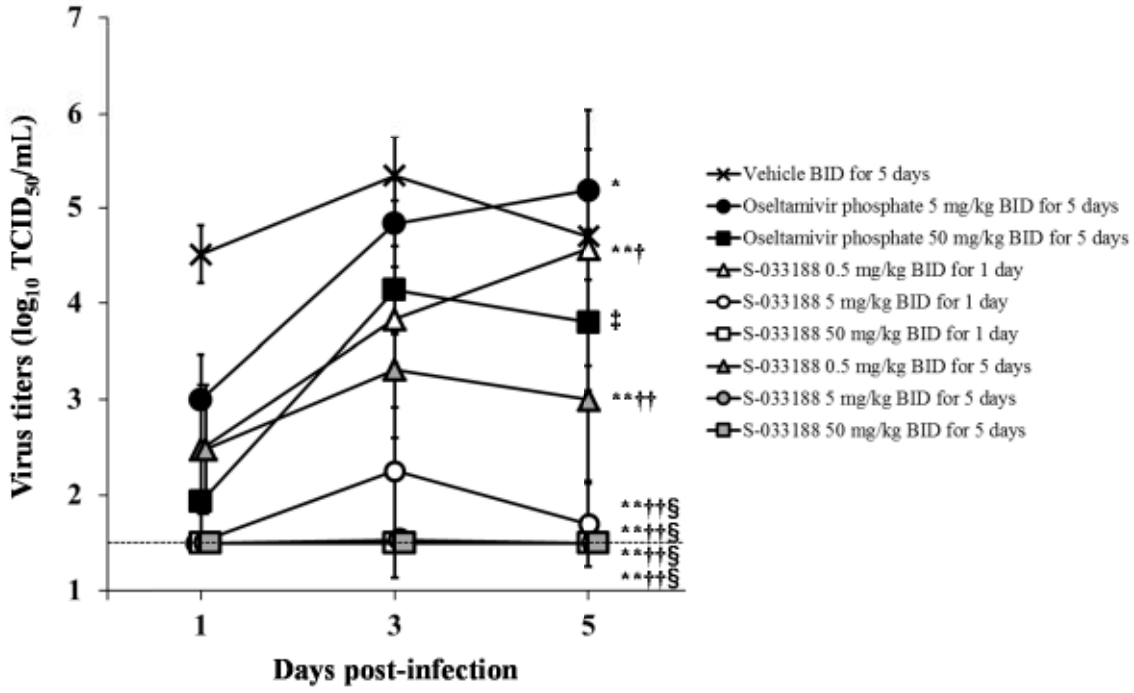
以上の結果から，S-033188 は，高病原性鳥インフルエンザウイルスの感染に対し，オセルタミビルリン酸塩よりも強力なウイルス増殖抑制効果を発揮し，優れた治療効果を示すと考えている．

図 2.6.2.2-23　A/Hong Kong/483/97 株感染マウスにおける S-033188 の致死率改善効果



The following P values were calculated by the log-rank test and the fixed-sequence procedure: * $P < 0.005$ vs vehicle, ** $P < 0.0001$ vs vehicle, † $P < 0.005$ vs oseltamivir phosphate 5 mg/kg, †† $P < 0.0001$ vs oseltamivir phosphate 5 mg/kg.
The following P values were calculated by the log-rank test: ‡ $P < 0.0001$ vs vehicle.

図 2.6.2.2-24　A/Hong Kong/483/97 株感染マウスにおける S-033188 の肺内ウイルス力価低下作用



Broken line represents the lower limit of quantification (1.5 $\log_{10}$ $TCID_{50}$/mL)
Each point represents the mean ± S.D. from 5 mice.
The following P values for the overall time (from 1 to 5 dpi) were calculated by the two-way analysis of variance followed by pairwise comparisons and the fixed-sequence procedure: * $P < 0.05$ vs vehicle, ** $P < 0.0001$ vs vehicle, † $P < 0.005$ vs oseltamivir phosphate 5 mg/kg,
†† $P < 0.0001$ vs oseltamivir phosphate 5 mg/kg.
The following P values for the overall time (from 1 to 5 dpi) were calculated by the two-way analysis of variance followed by pairwise comparisons:
‡ $P < 0.0001$ vs vehicle, § $P < 0.0001$ vs oseltamivir phosphate 50 mg/kg.

2.6.2.2.5.2 鳥インフルエンザウイルス (A/H7N9) に対する治療効果

評価資料 4.2.1.1-33
概要表 2.6.3.2.43，2.6.3.2.44

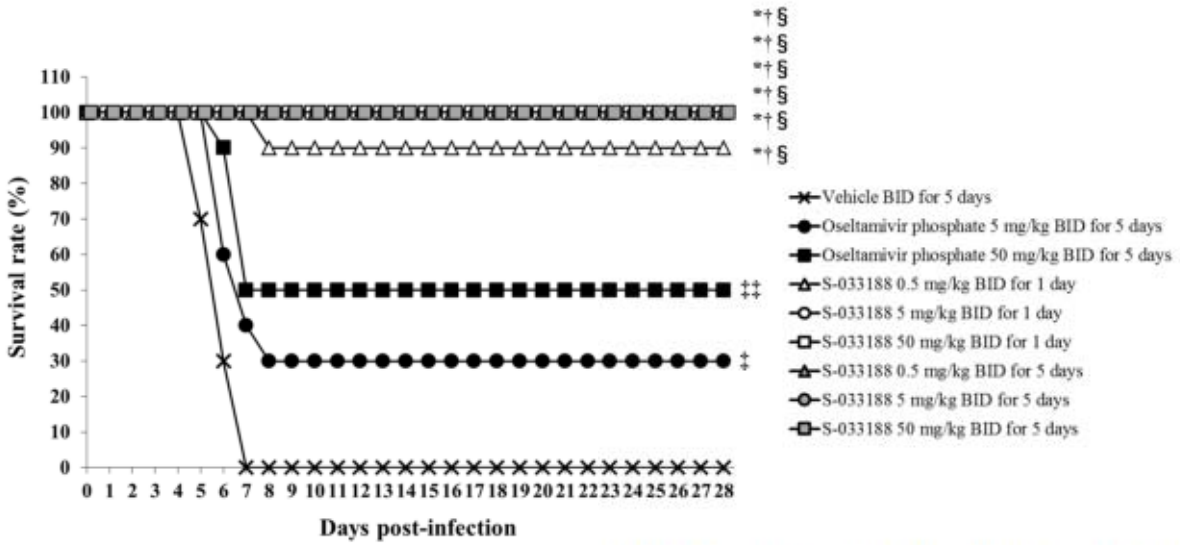
雌性 BALB/c マウスにヒトから分離された A/H7N9 亜型の鳥インフルエンザウイルス A/Anhui/1/2013 株 [5.6 $\log_{10}$ (4.00×10^5) $TCID_{50}$ (致死量)] を経鼻接種した直後に，1，10 又は 100 mg/kg/日 (0.5, 5 又は 50 mg/kg BID) の用量の S-033188 を 1 日あるいは 5 日間反復経口投与し，接種から 28 日間の生存率と投与開始から 1，3 及び 5 日目のマウスの肺内ウイルス力価をもとめ，それらの推移を対照薬と比較した．対照薬として，臨床用量に相当する 10 mg/kg/日 (5 mg/kg BID) あるいはその 10 倍量である 100 mg/kg/日 (50 mg/kg BID) の用量のオセルタミビルリン酸塩を 5 日間反復経口投与し，同様に生存率と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 (図 2.6.2.2-25).

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かった (図 2.6.2.2-26).

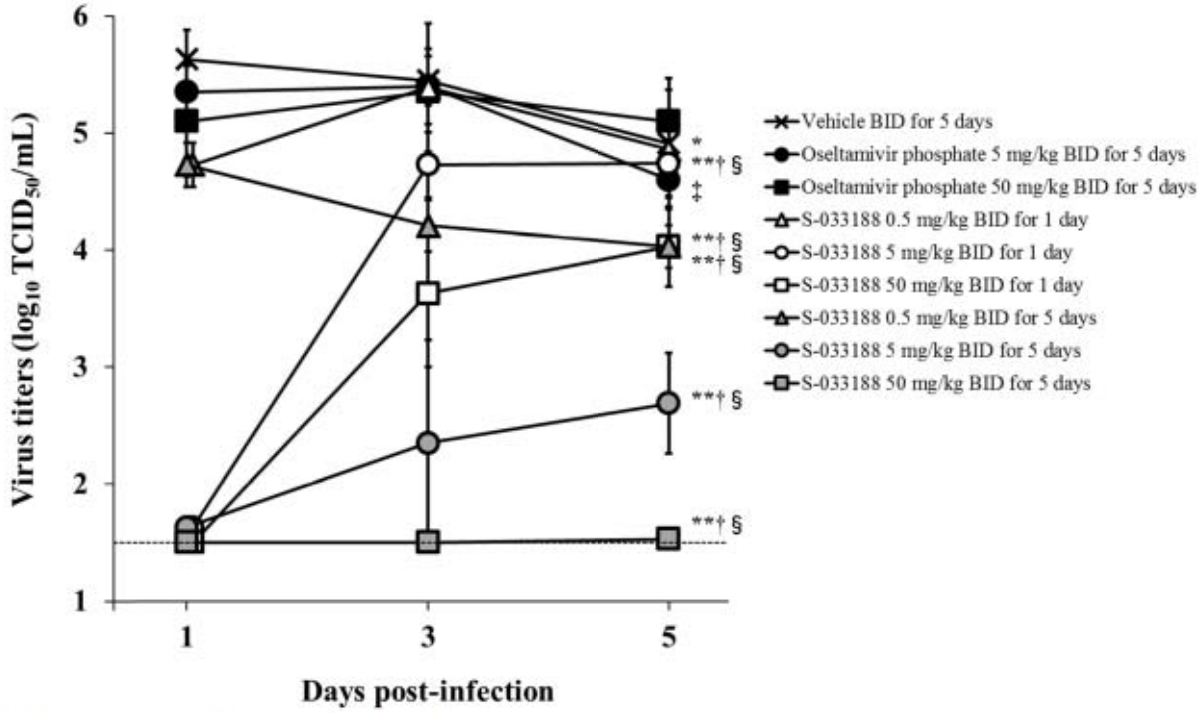
以上の結果から，S-033188 は，A/H7N9 亜型を有する鳥インフルエンザウイルスの感染に対し，オセルタミビルリン酸塩よりも強力なウイルス増殖抑制効果を発揮し，優れた治療効果を示すと考えている．

図 2.6.2.2-25　A/Anhui/1/2013 株感染マウスにおける S-033188 の致死率改善効果



The following P values were calculated by the log rank test and the fixed sequence procedure: * $P < 0.0001$ vs vehicle, † $P < 0.005$ vs oseltamivir 5 mg/kg.
The following P values were calculated by the log rank test: ‡ $P < 0.05$ vs vehicle, ‡‡ $P < 0.001$ vs vehicle, § $P < 0.05$ vs oseltamivir 50 mg/kg.

図 2.6.2.2-26 A/Anhui/1/2013 株感染マウスにおける S-033188 の肺内ウイルス力価低下作用



Each point represents the mean ± S.D. from 5 mice.
The broken line represents the lower limit of quantification (1.50 log_{10} $TCID_{50}$/mL).
The following P values for the overall time (from 1 to 5 dpi) were calculated by the two-way analysis of variance followed by pairwise comparison and the fixed sequence procedure: * $P < 0.01$ vs vehicle, ** $P < 0.0001$ vs vehicle, † $P < 0.0001$ vs oseltamivir 5 mg/kg.
The following P values for the overall time (from 1 to 5 dpi) were calculated by the two-way analysis of variance followed by pairwise comparison: ‡ $P < 0.05$ vs vehicle, § $P < 0.0001$ vs oseltamivir 50 mg/kg.

2.6.2.3 副次的薬理試験

2.6.2.3.1 選択性

2.6.2.3.1.1 培養細胞に対する細胞傷害作用

評価資料 4.2.1.2-01
概要表 2.6.3.3.1

S-033447 (濃度 : 0.39～200 μmol/L) を含む培地中で MDBK, MDCK, RPMI2650 あるいは A549 細胞を 3 日間培養し，脱水素酵素活性を指標として，陰性対照群 (0.5% DMSO 添加群) に対して生細胞数が 50%に低下する濃度を CC_{50} として算出したところ，S-033447 の CC_{50} は 17.30～47.52 μmol/L であった (表 2.6.2.3-1).

以上の結果から，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あると結論した.

表 2.6.2.3-1　培養細胞に対する S-033447 の細胞傷害作用

	CC_{50} (μmol/L)	
	S-033447	
Cell lines	Mean	S.D.
MDBK	47.52	1.18
MDCK	18.94	4.36
RPMI2650	22.79	3.23
A549	17.30	6.57

The mean and S.D. were calculated from 3 independent experiments.

2.6.2.3.1.2 季節性インフルエンザウイルス感染による細胞変性に対する抑制効果と細胞傷害作用との乖離

評価資料 4.2.1.2-02
概要表 2.6.3.3.2

S-033447 のウイルス増殖に起因した細胞変性に対する抑制効果と，S-033447 の細胞傷害作用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．2 株の A 型あるいは 2 株の B 型インフルエンザウイルスを MDCK 細胞に感染させ，S-033447 (濃度 : 0.128～400 nmol/L) 又は対照薬のリバビリン (濃度 : 3.91～125 μmol/L) やファビピラビル (濃度 : 0.977～31.3 μmol/L) 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%に抑制する濃度を算出した．また，S-033447 (濃度 : 16～50000 nmol/L)，リバビリン (濃度 : 62.5～2000 μmol/L) 又はファビピラビル (濃度 : 31.3～1000 μmol/L) 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に対する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 (表 2.6.2.3-2)．なお，ファビピラビルは，CC_{50} を算出できなかったので，SI を算出しなかった．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.

表 2.6.2.3-2　S-033447，リバビリン及びファビピラビルのウイルス増殖に起因した細胞変性に対する抑制効果と細胞傷害作用の乖離

	EC_{50} (nmol/L)							
	S-033447			Ribavirin			Favipiravir	
Strain	Mean	SD	SI[a]	Mean	SD	SI[a]	Mean	SD
A/WSN/33 (A/H1N1)	1.23	0.83	2409.07	83336.77	24987.93	7.13	8731.48	366.66
A/Victoria/3/75 (A/H3N2)	1.59	1.09	1856.61	64730.41	8546.75	9.18	7473.68	1015.20
B/Maryland/1/59	5.73	3.48	516.35	34642.81	3421.60	17.16	4322.54	482.38
B/Hong Kong/5/72	2.02	1.31	1463.26	23239.97	9205.56	25.58	2885.77	1015.42

The mean and S.D. were calculated from 3 independent experiments.

a The mean value of CC_{50} (S-033447: 2960.98 ± 1324.78 nmol/L, ribavirin: 594415.82 ± 279626.10 nmol/L) was divided with the mean values of EC_{50}. The SI of favipiravir was not calculated because the CC_{50} of favipiravir could not be calculated.

2.6.2.3.1.3 ヒト各種組織由来株化細胞に対する細胞傷害作用

評価資料 4.2.1.2-03
概要表 2.6.3.3.3

S-033447 (濃度：0.01～100 μmol/L) を含む培地中で増殖期 (細胞がコンフルエントに達しておらず，細胞増殖能を有している状態) の BJ 細胞 (ヒト包皮由来株化線維芽細胞)，HEK-293 細胞 (ヒト胎児腎由来株化細胞)，HepG2 細胞 (ヒト肝癌由来株化細胞)，HK2 細胞 (ヒト腎近位尿細管由来株化上皮細胞)，HUVEC 細胞 (ヒト臍帯静脈由来株化内皮細胞)，Jurkat 細胞 (ヒト T 細胞性白血病由来株化細胞)，MRC-5 細胞 (ヒト胎児肺由来株化線維芽細胞)，SH-SY5Y 細胞 (ヒト神経芽細胞腫由来株化細胞) あるいは SK-N-SH 細胞 (ヒト神経芽細胞腫由来株化細胞) を 48 時間培養し，培養後の細胞中 ATP (アデノシン三リン酸) 量を指標として，陰性対照群 (0.3% DMSO 添加群) 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．また，S-033447 (濃度：0.01～100 μmol/L) を含む培地中で非増殖期 (細胞がほぼコンフルエントに達して，増殖を停止した状態) の HEK-293 細胞，HK2 細胞，Jurkat 細胞，MRC-5 細胞あるいは SH-SY5Y 細胞を 48 時間培養し，IC_{50} を算出した．

増殖期の各種細胞に対する S-033447 の IC_{50} は，いずれも 2.2～50 μmol/L の範囲内であった (表 2.6.2.3-3)．また，非増殖期の各種細胞に対する IC_{50} は，いずれも> 3.0 μmol/L～> 100 μmol/L の濃度域であった．以上の結果から，各種細胞間における細胞傷害作用を示す濃度に差が認められたものの，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の抑制効果を示す濃度 (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あると結論した．

表 2.6.2.3-3　培養細胞に対する S-033447 の細胞傷害作用

	IC_{50} (μmol/L)	
	S-033447	
Cell lines	増殖期	非増殖期
BJ	28	N/A
HEK-293	50	>100
HepG2	44	N/A
HK2	7.9	14
HUVEC	37	N/A
Jurkat	2.2	>3.0
MRC-5	22	48
SH-SY5Y	8.9	19
SK-N-SH	18	N/A

The mean was calculated from 2 independent experiments.
Abbreviation: N/A, not applicable.

2.6.2.3.1.4 ヒト細胞に対するミトコンドリア毒性

評価資料 4.2.1.2-04
概要表 2.6.3.3.4

細胞は ATP 産生経路として解糖系及びミトコンドリアによるクエン酸回路を保持する．グルコース含有培地で培養された細胞は，ミトコンドリアに障害が起きた場合，解糖系により ATP 産生を維持する．しかし，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，解糖系においてガラクトースから十分量の ATP を産生できず，ミトコンドリア依存的になるため，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 [17]．この性質を利用し，グルコース及びガラクトース含有培地間における細胞中 ATP 含量を比較することで，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．

HepG2 細胞を S-033188 又は S-033447 曝露下でグルコース又はガラクトースを含有した培地を用いて培養し，培養後の細胞中 ATP 量を陰性対照群 (1.0% DMSO 添加群) に対して 50%低下させる化合物の濃度 (IC_{50}) を算出した．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，曝露期間は 24 時間及び 6 日間の 2 種類を設定した．24 時間培養条件下ではウシ胎児血清 (FBS) 存在下及び非存在下で，6 日間培養条件下では FBS 存在下のみで試験を実施した．

24 時間培養条件下において，S-033188 及び S-033447 曝露下の IC_{50} は全ての培養条件下で 200 μmol/L を超える値であった．グルコース含有培地及びガラクトース含有培地における 6 日間培養条件下において S-033188 曝露下の IC_{50} はそれぞれ 20.5 及び 16.0 μmol/L，S-033447 曝露下の IC_{50} はそれぞれ 11.1 及び 8.79 μmol/L であった．

いずれの条件においても，S-033188 及び S-033447 曝露下において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 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．

2.6.2.3.1.5 各種受容体，イオンチャネル及びトランスポーター結合及び酵素アッセイ

評価資料 4.2.1.2-05
概要表 2.6.3.3.5

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．

これらの結果から，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．

2.6.2.4 安全性薬理試験

2.6.2.4.1 中枢神経系

2.6.2.4.1.1 ラットの中枢神経系に対する作用

評価資料 4.2.1.3-01
概要表 2.6.3.4.1.1

S-033188 を 0 (対照群)，200，600 及び 2000 mg/kg の用量で雄性 Sprague-Dawley 系ラット (各群 6 例) に単回経口投与し，投与前並びに投与後 1，2，4，6，8 及び 24 時間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) 法を用いて評価した．対照群には，媒体 [0.5%メチルセルロース水溶液 (MC)] を投与した．

S-033188 はいずれの用量においても投与後 24 時間までの一般症状に対して影響を及ぼさなかった．

S-033188 の 600 及び 2000 mg/kg 投与により，投与後 1～2 時間で体温の低値が認められた．両投与群の体温は，投与後 1 時間に最も低値 (対照群と比較してそれぞれ 0.52°C 及び 0.67°C の低値) を示したが，いずれも日内変動範囲内の値であり投与後 4 時間には対照群と同程度にまで回復した．これらの変化は一般症状に異常が認められていないことを考慮すると，生理学的に大きな影響を示唆する変化ではないと考えられた．また，S-033188 の 2000 mg/kg 投与で，投与直後～投与後 1 時間，投与後 1～2 時間，及び投与直後～投与後 8 時間において，媒体投与群と比較して僅かな尿量減少が認められた．

以上の結果から，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．

2.6.2.4.2 心血管系

2.6.2.4.2.1 *In vitro* におけるモルモット乳頭筋標本の心筋活動電位に対する作用

評価資料 4.2.1.3-02，4.2.1.3-03
概要表 2.6.3.4.2.1

雄性 Hartley 系モルモットの心臓から摘出した右心室乳頭筋標本 (各濃度 5 例) に S-033188 又は S-033447 を適用し，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，APD_{30} 及び APD_{90} 並びに APD_{30-90} を評価した．S-033188 は 0.1，0.3 及び 1 μmol/L (0.0572，0.171 及び 0.572 μg/mL)，S-033447 は 0.082，0.25 及び 0.83 μmol/L (0.040，0.12 及び 0.40 μg/mL) の濃度を，対照群は媒体 [0.1%ジメチルスルホキシド (DMSO)] をそれぞれ適用した．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．

2.6.2.4.2.2 hERG 導入細胞におけるカリウム電流に対する作用

評価資料 4.2.1.3-04, 4.2.1.3-05
概要表 2.6.3.4.2.1

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 (各濃度 5 例) に，S-033188 又は S-033447 を適用し，ホールセル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，適用前値に対する抑制率 (媒体対照群の抑制率を基に補正) を算出した．S-033188 は 1，3 及び 10 µmol/L (0.572，1.71 及び 5.72 µg/mL)，S-033447 は 0.56，2.06 及び 8.44 µmol/L (0.30，1.00 及び 4.08 µg/mL) の濃度，対照群は媒体 (0.1% DMSO) をそれぞれ適用した．

S-033188 は 1，3 及び 10 µmol/L の濃度でそれぞれ 0.46%，−0.94%及び 2.18%の hERG 電流抑制率を示し，いずれの適用濃度においても hERG 電流に影響を及ぼさなかった．これらの成績から，IC_{50} は 10 µmol/L (5.72 µg/mL) を超える濃度と推定された．また，S-033447 は 0.56，2.06 及び 8.44 µmol/L の濃度でそれぞれ 0.24%，2.72%及び 26.0%の hERG 電流抑制率を示し，IC_{50} は 15.11 µmol/L (7.31 µg/mL) と推定された．

2.6.2.4.2.3 *In vivo* における無麻酔サルの血圧，心拍数及び心電図に対する作用

評価資料 4.2.1.3-06
概要表 2.6.3.4.2.2

S-033188 を 0 (対照群)，200 及び 400 mg/kg の用量で，雄性カニクイザル (4 例) に 7 日間の投与間隔で漸増的に経口投与し，投与前並びに投与後 2，4，6，8，10 及び 24 時間における血圧，心拍数及び心電図 (PR 間隔，QRS 間隔，QT 間隔及び補正 QT 間隔) についてテレメトリー法を用いて評価した．また，上記各時点における S-033188 及び S-033447 の血漿中濃度を測定し，血漿中曝露との関係を評価した．対照群には，媒体 (0.5 w/v% MC) を投与した．

S-033188 はいずれの用量においても，投与後 24 時間まで，いずれのパラメータにも影響を及ぼさなかった．また，全ての用量で S-033188 の投与に起因する不整脈は観察されなかった．

一般症状観察では，S-033188 は 200 及び 400 mg/kg の用量で異常便 (軟便，下痢又は白色便) がそれぞれ 2 例 (投与後 6 時間) 及び 3 例 (投与後 4～10 時間) に観察された．また，200 mg/kg 投与の 1 例，400 mg/kg 投与の 3 例で摂餌量の低下 (いずれも投与 1 及び 2 日後) が認められた．さらに，400 mg/kg 投与の 1 例で投与後約 3 時間に嘔気嘔吐がみられた．

S-033188 を 200 及び 400 mg/kg の用量で経口投与したときの S-033447 の C_{max} は，それぞれ 1.02 及び 1.64 µg/mL で，時間 0 から 24 時間までの血漿中濃度－時間曲線下面積 ($AUC_{0\text{-}24hr}$) は，それぞれ 16.1 及び 26.2 µg·hr/mL であった．一方，S-033188 の血漿中濃度については，ほとんどの時点で定量下限未満 (BLQ) (< 0.00500 µg/mL) であり，曝露が確認された時点においても，その値は S-033447 に比べ極めて低い値 (0.00890 µg/mL 以下) であったことから C_{max}，$AUC_{0\text{-}24hr}$ 及び T_{max} は算出しなかった．

以上の結果から，S-033188 は，200 及び 400 mg/kg の単回経口投与でサルの心血管系に影響を及ぼさないと判断した．

2.6.2.4.3 呼吸系

2.6.2.4.3.1 ラットの呼吸機能に対する作用

評価資料 4.2.1.3-07
概要表 2.6.3.4.3.1

S-033188 を 0 (対照群)，200，600 及び 2000 mg/kg の用量で雄性 Sprague-Dawley 系ラット (各群 8 例) に単回経口投与し，投与前並びに投与後 1，2，4，6，8 及び 24 時間における呼吸数，1 回換気量及び分時換気量について，無拘束下で whole-body plethysmograph (WBP) 法により評価した．対照群には媒体 (0.5w/v% MC) を投与した．

S-033188 はいずれの用量においても，全てのパラメータに影響を及ぼさなかった．

以上の結果から，S-033188 の単回経口投与では，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．

2.6.2.5 薬力学的薬物相互作用試験

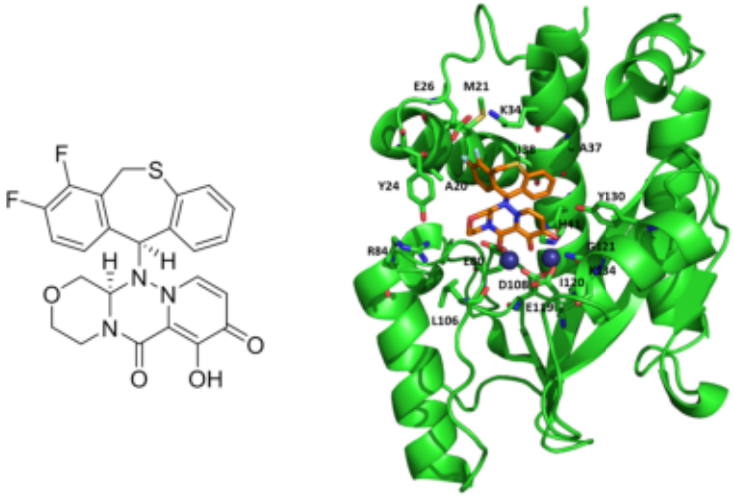
該当する試験なし．

2.6.2.6 考察及び結論

2.6.2.6.1 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 2.6.2.6-1) 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 [18]. 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 2.6.2.6-1　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 [18] 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 2.6.2.6-1)．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 2.6.2.6-1　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 18 記載の表を改変して使用)

2.6.2.6.2 *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) や (2.6.2.2.1.7 項)，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 2.6.2.6-1 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．

2.6.2.6.3 *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．

2.6.2.6.4 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 [19]．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．

2.6.2.6.5 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_t 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_t 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．

2.6.2.6.6 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 [16]．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 [20]．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．

2.6.2.6.7 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．

2.6.2.6.8 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 [21]．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．

2.6.2.6.9 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 2.6.2.6-1) 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 (2.6.2.2.2.4 項) が，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．

2.6.2.6.10 安全性薬理

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_{30-90} 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.

2.6.2.7 図表

図表は，本文中の適切な場所に記載した．

2.6.2.8 参考文献

1. Palese P, Shaw ML. Orthomyxoviridae: The viruses and their replication. In: Knipe DM, Howley PM. Fields Virology. 5th ed. Philadelphia: Wolters Kluwer Lippincott Williams & Wilkins 2007; 1647-74.
2. 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. Horimoto T, Kawaoka Y. Pandemic Threat Posed by Avian Influenza A Viruses. Clin Microbiol Rev 2001; 14 (1): 129–49.
5. Gubareva LV. Molecular mechanisms of influenza virus resistance to neuraminidase inhibitors. Virus Res 2004; 103 (1-2): 199-203.
6. Chou T-C, Talalay P. Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. Adv Enzyme Regul 1984; 22: 27-55.
7. Kowalinski E, Zubieta C, Wolkerstorfer A, et al. Structural analysis of specific metal chelating inhibitor binding to the endonuclease domain of influenza pH1N1 (2009) polymerase. PLoS Pathog 2012; 8: e1002831.
8. Stevaert A, Dallocchio R, Dessi A, et al. Mutational analysis of the binding pockets of the diketo acid inhibitor L-742,001 in the influenza virus PA endonuclease. J Virol 2013; 87: 10524-38.
9. Carel B,, Rienk J, Germaine M, et al. [redacted] microneutralization assay for antigenic characterization of human influenza viruses. Vaccine 2017; 35: 46-52.
10. 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.
11. 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.
12. 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.
13. Bohnert T, Gan L.S. Plasma protein binding: from discovery to development J Pharm Sci 2013, 102: 2953–2994..
14. 大正富山医薬品株式会社．ファビピラビル添付文書．2017 年 3 月改訂（第 3 版、承認条件の改訂等）
15. 鶴留 雅人, 伊藤 康彦. 宿主細胞反応と免疫応答 呼吸器粘膜の感染防御機構. 日本臨床 2006; 64 (10): 1808-12.
16. 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: S133-38.

17. 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.
18. 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.
19. 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.
20. 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.
21. 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