ゾフルーザ錠 20mg，同顆粒 2%分包

第 2 部 (モジュール 2) : CTD の概要 (サマリー)

2.4 非臨床試験の概括評価

塩野義製薬株式会社

目次

略号及び用語定義一覧表 3
2.4 非臨床試験の概括評価 4
2.4.1 非臨床試験計画概略 4
2.4.2 薬理試験 5
2.4.2.1 効力を裏付ける試験 5
2.4.2.1.1 季節性インフルエンザウイルス感染前投与によるマウスにおける致死率改善効果と有効血漿中濃度の検討 5
2.4.2.1.2 季節性インフルエンザウイルス感染前投与によるマウスにおけるウイルス増殖抑制効果 7
2.4.2.1.3 薬剤感受性を低下させるアミノ酸変異ウイルスの特性評価 7
2.4.2.1.3.1 PA/I38 変異ウイルスの野生株ウイルス共存下における競合増殖性 8
2.4.2.1.3.2 フェレットを用いた PA/I38T 変異ウイルスの増殖性及び伝播性 9
2.4.2.1.3.3 PA/I201T が PA/I38 変異の増殖性に与える影響 10
2.4.2.1.3.4 PA/E23K 変異ウイルスの増殖性 11
2.4.2.2 副次的薬理試験 11
2.4.2.3 安全性薬理試験 11
2.4.2.4 薬力学的薬物相互作用 11
2.4.3 薬物動態試験 11
2.4.4 毒性試験 11
2.4.5 総括及び結論 11
2.4.5.1 季節性インフルエンザウイルスに対する予防効果 11
2.4.5.2 薬剤感受性低下ウイルスの増殖性及び伝播性 12
2.4.6 参考文献一覧 13

略号及び用語定義一覧表

略号	英語	日本語
CEN	cap-dependent endonuclease	キャップ依存性エンドヌクレアーゼ
MC	methylcellulose aqueous solution	メチルセルロース水溶液
PA	polymerase acidic protein	ポリメラーゼ酸性タンパク質
PA/E23K	glutamic acid-to-lysine substitution at amino acid position 23 in polymerase acidic protein	PA の N 末端から 23 番目に位置するグルタミン酸がリシンに変異
PA/I201T	isoleucine-to-threonine substitution at amino acid position 201 in polymerase acidic protein	PA の N 末端から 201 番目に位置するイソロイシンがスレオニンに変異
PA/I38	isoleucine at amino acid position 38 in polymerase acidic protein	PA の N 末端から 38 番目に位置するイソロイシン
PA/I38F	isoleucine-to-phenylalanine substitution at amino acid position 38 in polymerase acidic protein	PA の N 末端から 38 番目に位置するイソロイシンがフェニルアラニンに変異
PA/I38M	isoleucine-to-methionine substitution at amino acid position 38 in polymerase acidic protein	PA の N 末端から 38 番目に位置するイソロイシンがメチオニンに変異
PA/I38T	isoleucine-to-threonine substitution at amino acid position 38 in polymerase acidic protein	PA の N 末端から 38 番目に位置するイソロイシンがスレオニンに変異
PK	pharmacokinetic	薬物動態
PK/PD	pharmacokinetics/pharmacodynamics	薬物動態/薬力学
S-033447	active form of baloxavir marboxil	バロキサビル マルボキシル活性体
$TCID_{50}$	50% tissue culture infectious dose	50%組織培養感染量

2.4　非臨床試験の概括評価

2.4.1　非臨床試験計画概略

バロキサビル マルボキシルは，プロドラッグであり，代謝 (加水分解) により生成したバロキサビル マルボキシル活性体 (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．A 型又は B 型インフルエンザウイルス感染症を効能・効果として，2018 年 2 月にゾフルーザ錠 10 mg 及び同 20 mg が承認され，2018 年 9 月にゾフルーザ顆粒 2%分包が承認された．[redacted]今回，ゾフルーザ錠 20 mg 及び同顆粒 2%分包について予防適応追加申請を行った．

今回申請する予防適応追加での用法・用量は，治療適応での用法・用量[redacted]と同じであることから，本申請に必要な安全性薬理試験，薬物動態試験及び安全性試験については，治療を効能・効果とした初回申請のときに実施した試験で充足しており，新たな試験は実施していない．一方，薬効薬理試験については，効力を裏付ける試験として，S-033447 懸濁液の皮下投与後にインフルエンザウイルスを感染させたマウスを用いて，A 型又は B 型の季節性インフルエンザウイルス感染に対する致死率改善効果，生存期間延長効果及び体重減少抑制効果を検討し，S-033447 の予防的な投与における抗ウイルス作用を評価した．

インフルエンザウイルスのポリメラーゼ酸性タンパク質 (PA) が有する CEN 活性中心において，S-033447 と直接的に相互作用する可能性が高いアミノ酸残基の 1 つとして，PA の N 末端から 38 番目に位置するイソロイシン (PA/I38) が考えられている．アミノ酸コドンの変異によって，PA の N 末端から 38 番目に位置するイソロイシンがスレオニンに変異 (PA/I38T) 又は PA の N 末端から 38 番目に位置するイソロイシンがメチオニンに変異 (PA/I38M) したインフルエンザウイルスは，S-033447 に対する感受性の低下を示すが，それらの増殖性は野生型ウイルスに比べ低かった [1.13 項 既承認医薬品に係る資料 (初回申請)，2.7.2.4.2 項，2.7.2.4.2.2 項参照]．しかしながら，薬剤感受性低下ウイルスがその野生型ウイルスとの共存下で，野生型ウイルスと同等又はそれ以上の増殖性を示す場合，実臨床で薬剤感受性低下ウイルスが流行する可能性が考えられることから，PA/I38 変異を有する遺伝子組換えウイルス並びに青少年及び成人患者対象第 3 相臨床試験 (以下，T0831 試験) の患者検体由来の PA/I38T 変異ウイルスをヒト由来初代培養細胞で継代培養し，野生型ウイルス共存下における PA/I38T 変異ウイルスの競合増殖性を評価した．また，T0831 試験及び小児患者対象の顆粒剤第 3 相臨床試験 (以下，T0833 試験) で認められた PA/I38 変異と同時に検出された PA/I201T (PA の N 末端から 201 番目に位置するイソロイシンがスレオニンに変異) が PA/I38T 変異ウイルス又は PA/I38M 変異ウイルスの増殖性に与える影響も検討した．

T0831 試験の患者検体由来の A(H3N2)型 PA/I38T 変異ウイルス及び成人患者対象錠剤第 2 相臨床試験 (以下，T0821 試験) の患者検体由来の A(H1N1)pdm09 型 PA/I38T 変異ウイルスを用いて，それらの野生型ウイルスとの混合比を変えてフェレットに感染させた後，ウイルスが動

物から動物に伝播するごとに宿主動物における PA/I38T 変異ウイルス及びその野生型ウイルスの RNA 量を測定し，PA/I38T 変異ウイルスの存在比を評価した．PA/I38T 変異ウイルスの単独感染下及び野生型ウイルス競合下におけるフェレット内の増殖性及びフェレット間の伝播性について検討した．

PA の N 末端から 23 番目に位置するグルタミン酸がリシンに変異 (PA/E23K) したインフルエンザウイルスに対する S-033447 の感受性は，それらの野生型ウイルス [A(H1N1)型：rgA/WSN/33，A(H3N2)型：rgA/Victoria/3/75] と比較して A(H1N1)型では 5 倍，A(H3N2)型では 6 倍の感受性低下を示した [1.13 項 既承認医薬品に係る資料 (初回申請)，2.7.2.4.2.1 項及び評価資料 5.3.5.4-08 参照]．また，公的機関により暫定的に示されている S-033447 の薬剤感受性の基準となる情報のうち，国立感染症研究所のホームページには，CEN 阻害薬については世界保健機関 (WHO) の暫定基準に準じ，感受性試験において 3 倍以上の感受性低下が認められた場合に感受性低下ウイルスと判定すると記載されている [1]．PA/E23K の変異を有したインフルエンザウイルスは初回申請時に実施した S-033447 に対する感受性試験で野生型ウイルスの感受性よりも 3 倍以上の低下を示したことから，PA/E23K を有する A(H1N1)型，A (H3N2)型及び B 型の遺伝子組換えウイルスとそれらの野生型ウイルスをヒト由来初代培養細胞にそれぞれ感染させ PA/E23K 変異ウイルスの増殖性を検討した．

2.4.2　薬理試験

2.4.2.1　効力を裏付ける試験

2.4.2.1.1　季節性インフルエンザウイルス感染前投与によるマウスにおける致死率改善効果と有効血漿中濃度の検討

バロキサビル マルボキシルは，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ことから，インフルエンザウイルス感染症の治療に有効である．このことから，バロキサビル マルボキシルを予防的に投与した場合においても抗ウイルス作用を発揮し，インフルエンザウイルス感染症の発症抑制効果が期待できるものと考えた．非臨床薬理試験では，マウスへ S-033447 懸濁液をウイルス感染前に単回皮下投与し，致死率改善効果，生存期間延長効果及び体重減少抑制効果を指標として予防的な投与による有効性を検討した．また，マウスの生存期間の有意な延長が認められる条件 (用量及び感染時間) 並びにその時の S-033447 の血漿中濃度から，予防的な投与により有効性が得られる S-033447 の血漿中濃度を検討した．

ヒトでは，単回経口投与後にバロキサビル マルボキシルは速やかに活性体である S-033447 に代謝され，S-033447 の血漿中濃度は時間経過に伴い緩やかに低下する (消失半減期は約 90 時間) [1.13 項 既承認医薬品に係る資料 (初回申請)，2.7.1.2.1.3 項参照]．一方，動物では，ウイルス感染マウスにおけるバロキサビル マルボキシル単回経口投与後の血漿中 S-033447 の消失半減期は 2～3 時間であり，投与後速やかに消失することが示されている [1.13 項 既承認医薬品に係る資料 (初回申請)，2.6.4.3.4.1 項参照]．これらのことから，マウスでヒトに近い薬物動態 (PK) プロファイルを得るためには臨床投与経路である経口投与での評価は不適と判断し，代替経路を検討した．マウスに 0.8，1.6，3.2 又は 6.4 mg/kg の用量の S-033447 懸濁液を非絶食下で

単回皮下投与し，48，72，96，120 及び 192 時間後における S-033447 の血漿中濃度を測定した結果，いずれの用量においても，投与 48 時間後に最も高い値を示した後，時間経過に伴い緩やかに低下する PK プロファイル (濃度推移) が得られた．したがって，インフルエンザウイルス感染に対する予防的な投与による有効性を検討する試験では，ヒトに近い PK プロファイルを示すマウスモデルとして，S-033447 懸濁液を投与後，少なくとも 192 時間 (8 日間) まで S-033447 の血漿中濃度を維持できる皮下投与での評価が適切であると判断した (2.6.2.2.1 項参照).

各用量 10 例の雌性 BALB/c マウスに，0.8 又は 1.6 mg/kg の用量の S-033447 懸濁液あるいは媒体 [0.5%メチルセルロース水溶液 (MC)] を単回皮下投与し，それぞれ投与 48，72 又は 96 時間後に致死量 [4.00×10^2 50% tissue culture infectious dose ($TCID_{50}$)] の A 型の季節性インフルエンザウイルス実験室株 (A/PR/8/34 株) を経鼻接種した (2.6.2.2.2.1 項参照)．S-033447 懸濁液を 0.8 又は 1.6 mg/kg の用量で皮下投与し，48，72 又は 96 時間後にウイルス接種したいずれの条件においても，観察終了となる感染 28 日後まで，媒体対照群に対して致死率が改善し，生存期間は有意に延長した．さらに，感染 7 日後までの体重変化率 (感染当日の体重を 100%としたときの，感染後の体重変化率) を測定した結果，S-033447 投与群におけるウイルス感染後の体重減少は用量依存的に抑制された.

各用量 10 例の雌性 BALB/c マウスに，1.6，3.2 又は 6.4 mg/kg の用量の S-033447 懸濁液あるいは媒体 (0.5% MC) を単回皮下投与し，それぞれ投与 48，72 又は 96 時間後に致死量 (1.80×10^3 $TCID_{50}$) の B 型の季節性インフルエンザウイルス実験室株 (B/Hong Kong/5/72 株) を経鼻接種した (2.6.2.2.2.2 項参照)．S-033447 懸濁液を 1.6，3.2 又は 6.4 mg/kg の用量で皮下投与し，48，72 又は 96 時間後にウイルス接種したいずれの条件においても，観察終了となる感染 28 日後まで，媒体対照群に対して致死率が改善した．また，S-033447 懸濁液を 1.6 mg/kg の用量で皮下投与し 48 時間後にウイルス接種した場合を除いて，いずれの用量及び感染時間においても，生存期間は媒体対照群に対して有意に延長した．さらに，感染 7 日後までの体重変化率を測定した結果，S-033447 投与群におけるウイルス感染後の体重減少は用量依存的に抑制された.

S-033447 の感染前投与により，媒体対照群に対して生存期間の有意な延長を示す用量及び感染時間における血漿中濃度を検討した．初回申請時に，ヒトにおける用法・用量の根拠を設定するために実施した非臨床薬理試験に基づく薬物動態/薬力学 (PK/PD) 解析では，マウス肺内ウイルス力価と最も相関する PK パラメータは，S-033447 の $C\tau$ (初回投与時の投与間隔時間後における血漿中濃度) であることが示されている [1.13 項 既承認医薬品に係る資料 (初回申請)，2.6.2.2.4.6 項参照]．また，臨床試験結果に基づく PK/PD 解析により，バロキサビル マルボキシル投与における S-033447 の C_{24hr} (投与 24 時間後の血漿中濃度) の増大に伴って投与翌日のウイルス力価の減少量が大きくなることが示されている [1.13 項 既承認医薬品に係る資料 (初回申請)，2.7.2.3.3.3 項参照]．したがって，ヒトにおける予防投与においても，単回経口投与後，一定以上の S-033447 血漿中濃度が維持されていれば，インフルエンザウイルス感染後のウイルス増殖が抑制され，インフルエンザウイルス感染症の発症抑制効果が発揮されるものと考えた．そこで，マウスに S-033447 懸濁液を単回皮下投与し，数日後にウイルスを感染させたときの有効性を評価した．その結果，本マウスで S-033447 の感染前投与により有意な生存期間延

長効果を示した条件 (用量及び感染時間) における感染 24 時間後の S-033447 血漿中濃度は，A/PR/8/34 株に対しては 0.444 ng/mL 以上，B/Hong Kong/5/72 株に対しては 2.35 ng/mL 以上であった (2.6.2.2.3 項参照).

2.4.2.1.2　季節性インフルエンザウイルス感染前投与によるマウスにおけるウイルス増殖抑制効果

前項で評価した S-033447 懸濁液のウイルス感染前投与による致死率改善効果，生存期間延長効果及び体重減少抑制効果が，肺内ウイルス増殖抑制効果に基づいて発揮されていることを裏付けるため，生存期間延長効果の認められた血漿中濃度を示す条件 (用量及び感染時間) における肺内ウイルス力価を評価した.

A 型インフルエンザウイルスに関しては，各用量及び各測定時点につき 9 又は 10 例の雌性 BALB/c マウスに 1.6 又は 3.2 mg/kg の用量の S-033447 懸濁液あるいは媒体 (0.5% MC) を単回皮下投与した．1.6 mg/kg 投与 96 時間後 (感染 24 時間後の血漿中濃度が 0.444 ng/mL となる条件)，3.2 mg/kg 投与 72 時間後 (感染 24 時間後の血漿中濃度が 2.35 ng/mL となる条件) 又は媒体投与 72 時間後に，それぞれ致死量 (4.00×10^2 $TCID_{50}$) の A/PR/8/34 株を経鼻接種し，感染 1，2，4，6，8 及び 10 日後の肺内ウイルス力価を測定した (2.6.2.2.4.1 項参照)．S-033447 投与群の肺内ウイルス力価は，いずれも感染 1 日後から媒体対照群と比べて有意に低い値を示し，感染 10 日後には定量下限値 (1.50 $\log_{10}$ $TCID_{50}$) に達した．また 1.6 mg/kg の用量 (96 時間後にウイルス接種) では感染 4 日後まで，3.2 mg/kg の用量 (72 時間後にウイルス接種) では，感染 6 日後まで，肺内ウイルス力価は媒体対照群に対して有意に低い値を示した．また，両用量を比較した結果，感染 24 時間後の S-033447 血漿中濃度が高い 3.2 mg/kg の用量 (72 時間後にウイルス接種) の方が肺内ウイルス力価は低く，低い値を示した期間も長かった.

B 型インフルエンザウイルスに関しては，各用量及び各測定時点につき 10 例の雌性 BALB/c マウスに 3.2 又は 6.4 mg/kg の用量の S-033447 懸濁液あるいは媒体 (0.5% MC) を単回皮下投与した．3.2 mg/kg 投与 72 時間後 (感染 24 時間後の血漿中濃度が 2.35 ng/mL となる条件)，6.4 mg/kg 投与 48 時間後 (感染 24 時間後の血漿中濃度が 8.70 ng/mL となる条件) 又は媒体投与 72 時間後に，それぞれ致死量 (1.80×10^3 $TCID_{50}$) の B/Hong Kong/5/72 株を経鼻接種し，感染 1，2，4，6，8 及び 10 日後の肺内ウイルス力価を測定した (2.6.2.2.4.2 項参照)．S-033447 投与群の肺内ウイルス力価は，いずれも感染 1 日後から媒体対照群と比べて有意に低い値を示し，感染 10 日後には定量下限値 (1.50 $\log_{10}$ $TCID_{50}$) に達した．また 3.2 mg/kg の用量 (72 時間後にウイルス接種) では感染 4 日後まで，6.4 mg/kg の用量 (48 時間後にウイルス接種) では感染 6 日後まで，肺内ウイルス力価は媒体対照群に対して有意に低い値を示した．両用量を比較した結果，感染 24 時間後の S-033447 血漿中濃度が高い 6.4 mg/kg の用量 (48 時間後にウイルス接種) の方が肺内ウイルス力価は低く，低い値を示した期間も長かった.

2.4.2.1.3　薬剤感受性を低下させるアミノ酸変異ウイルスの特性評価

2016/2017 シーズンに実施した小児患者対象の錠剤第 3 相臨床試験 (T0822 試験) で認められた PA/I38T 変異ウイルスや PA/I38M 変異ウイルスに対する S-033447 の感受性及びそれら変異

ウイルスの増殖性を，リバースジェネティクス法により作製した遺伝子組換えウイルスを用いて検討した．その結果，PA/I38T 変異ウイルスや PA/I38M 変異ウイルスに対する S-033447 の感受性は，それらの野生型ウイルスと比較して低下した．また，PA/I38T 変異ウイルスや PA/I38M 変異ウイルスの増殖性は，それらの野生型ウイルスと比較して低下した [1.13 項 既承認医薬品に係る資料 (初回申請)，2.7.2.4.2.2 項参照]．今回，野生型ウイルス共存下における PA/I38 変異ウイルスの競合増殖性を PA/I38T 変異，PA/I38F 変異及び PA/I38M 変異を有する遺伝子組換えウイルスを用いて *in vitro* で検討した．PA/I38T 変異ウイルスに関しては，臨床分離株を用いて増殖性及び野生型ウイルス共存下での競合増殖性を *in vitro* で評価し，またフェレットの直接接触により，ウイルスを伝播させたときの PA/I38T 変異ウイルスの増殖性及び伝播性を *in vivo* で検討した．さらに，PA/I38 変異と同時に検出された PA/I201T が PA/I38T 変異及び PA/I38M 変異ウイルスの増殖性に与える影響並びに PA/E23K 変異ウイルスの増殖性を遺伝子組換えウイルスを用いて *in vitro* で評価した．

2.4.2.1.3.1　　PA/I38 変異ウイルスの野生株ウイルス共存下における競合増殖性

野生型ウイルス共存下における PA/I38 変異ウイルスの競合増殖性を，リバースジェネティクス法により作製した PA/I38 変異を有する遺伝子組換えウイルス及び患者検体由来の PA/I38T 変異ウイルスを用いて評価した．

PA/I38 変異 [PA/I38T，PA/I38F (PA の N 末端から 38 番目に位置するイソロイシンがフェニルアラニンに変異) 又は PA/I38M] を有する遺伝子組み換えウイルス (rgA/WSN/33-PA/I38T，rgA/WSN/33-PA/I38F，rgA/Victoria/3/75-PA/I38T，rgA/Victoria/3/75-PA/I38M 又は rgB/Maryland/1/59-PA/I38T) とそれぞれの野生型ウイルス (rgA/WSN/33，rgA/Victoria/3/75 又は rgB/Maryland/1/59) を 1:1 で混合し，MDCK 細胞 (イヌ腎臓由来株化細胞) に共感染させ，継代培養を 3 回繰り返した．継代ごとの培養上清に含まれる野生型ウイルスと PA/I38 変異ウイルスの存在比を，サンガーシークエンス法で PA/I38 コドンを含む塩基配列を解析することにより，定性的に評価した．その結果，今回評価したいずれの PA/I38 変異ウイルスにおいても，継代培養回数に従ってその存在比が低下し，野生型ウイルスが優勢となった [2.6.2.2.5.1 項参照]．

T0831 試験の 3 患者から分離した A(H3N2)型の PA/I38T 変異ウイルスの増殖性を検討するため，バロキサビル マルボキシル投与前検体から分離した野生型ウイルス及びバロキサビル マルボキシル投与後検体から分離した PA/I38T 変異ウイルスを，それぞれヒト鼻腔上皮由来の初代培養細胞に感染させて，経時的に培養上清中のウイルス力価を測定した．その結果，1 患者由来の PA/I38T 変異ウイルスは，野生型ウイルスと比較して増殖性の低下を示したが，その他 2 患者由来の PA/I38T 変異ウイルスは，野生型ウイルスと同等の増殖性を示した [2.6.2.2.5.2 項参照]．

増殖性を確認した上記の 3 患者検体由来の野生型ウイルスと PA/I38T 変異ウイルスを 1:1 で混合し，ヒト鼻腔上皮由来の初代培養細胞に感染させて，継代培養を 3 回繰り返した．継代ごとの培養上清に含まれる PA/I38T 変異ウイルスの存在比率を，次世代シークエンス法で PA/I38 コドンを含む塩基配列を解析することにより，定量的に評価した．その結果，いずれの PA/I38T

変異ウイルスにおいても，複数回の継代培養に従ってその存在比率が低下し，野生型ウイルスが優勢になった [2.6.2.2.5.3 項参照].

2.4.2.1.3.2　　フェレットを用いた PA/I38T 変異ウイルスの増殖性及び伝播性

T0821 試験及び T0831 試験で検出された患者検体由来の野生型ウイルス及び PA/I38T 変異ウイルスを用いて，一対でのフェレット直接接触により，ウイルスを接種したフェレットから 3 匹の未感染フェレットへ順次ウイルスを伝播させ，PA/I38T 変異ウイルスの増殖性及び伝播性を評価した.

A(H3N2)型又は A(H1N1)pdm09 型の PA/I38T 変異ウイルスが検出された患者のバロキサビル マルボキシル投与前検体から分離した野生型ウイルス及びバロキサビル マルボキシル投与後検体から分離した PA/I38T 変異ウイルスをそれぞれ単独又は混合比を変えてフェレット [ドナーフェレット (DF)] に経鼻接種し感染させた. ウイルスの混合比は, 100:0 (100%野生型株), 80:20 (80%野生型株，20%PA/I38T 変異株)，50:50 (50%野生型株，50%PA/I38T 変異株)，20:80 (20%野生型株，80%PA/I38T 変異株)，0:100 (100%PA/I38T 変異株) とし，DF に感染させ伝播させることを 50:50 の混合比では 2 グループで，その他の混合比についてはそれぞれ 1 グループで実施した. DF はウイルスを経鼻接種した 24 時間後に未感染のフェレット [レシピエントフェレット 1 (RF1)] と同居させ直接接触させた．RF1 でウイルス感染が確認されると同居を止め，その 24 時間後に RF1 は別のフェレット [レシピエントフェレット 2 (RF2)] と同居させた．RF2 も RF1 の時と同様の方法で別のフェレット [レシピエントフェレット 3 (RF3)] と同居させた．各フェレットの鼻汁中に含まれるウイルス RNA 量を定量し野生型ウイルスと PA/I38T 変異ウイルスの存在比をパイロシークエンシング法で解析し，PA/I38T 変異ウイルスの存在比を検討した．また，A(H3N2)型及び A(H1N1)pdm09 型の PA/I38 変異ウイルスと野生型ウイルスをそれぞれ単独感染させたドナー及びレシピエントについては，最初にウイルスが検出されてから最後にウイルスが検出されるまでの期間，各フェレットのウイルス力価を毎日測定し，単独感染時のフェレットにおけるウイルス増殖性を検討した.

A(H3N2)型又は A(H1N1)pdm09 型の PA/I38T 変異ウイルスとその野生型ウイルスをそれぞれ単独感染 (混合比 100:0 及び 0:100) させたドナー及びレシピエントのウイルス力価を測定した結果，全てのフェレットで感染が確認され，直接接触の伝播を 3 回繰り返すことができた．また，各レシピエント (RF1，RF2 及び RF3) で最初にウイルスが検出されてから最後に検出されるまでの期間におけるウイルス量 (ウイルス力価の AUC) を指標にしてウイルス増殖性を評価したところ，いずれのウイルス株においても PA/I38T 変異ウイルスと野生型ウイルスのウイルス力価の AUC に有意な差は認められなかった．したがって，単独感染下での A(H3N2)型及び A(H1N1)pdm09 型の PA/I38T 変異ウイルスは，それらの野生型ウイルスと同様に増殖及び伝播することが示された.

次に PA/I38T 変異ウイルスを野生型ウイルスと共感染させたドナーとレシピエントにおけるウイルス存在比を検討した．A(H3N2)型では 80:20 の混合比のグループ及び 50:50 の混合比の 2 グループともに最終的に RF3 で野生型ウイルスが優勢になった. 一方, 20:80 の混合比のグループのみ最終的に RF3 で A(H3N2)型 PA/I38T 変異ウイルスが優勢になった．A(H1N1)pdm09 型で

は，80:20 の混合比のグループ及び 50:50 の混合比の 1 グループの RF3 で PA/I38T 変異ウイルスは検出限界以下となり，20:80 の混合比のグループ及び 50:50 の混合比のもう 1 グループも RF3 まで野生型ウイルスが優勢であった.

野生型ウイルスと共感染させたドナーとレシピエントにおいて，各フェレットで最初のウイルス検出時から最後にウイルスが検出されるまでの期間にみられたフェレット内の PA/I38T 変異ウイルスの存在比率の変化量を解析し，フェレット内の PA/I38T 変異ウイルスの増殖性を検討した．A(H3N2)型 PA/I38T 変異ウイルスは，DF 及び RF1 では野生型ウイルスと競合して感染した．しかし，フェレット内の PA/I38T 変異ウイルスの割合は伝播後一定か，もしくは減少する傾向を示し，80:20 の混合比及び 50:50 の混合比のグループの RF2 と RF3 では，PA/I38T 変異ウイルスの感染は認められなかった．一方，A(H1N1)pdm09 型 PA/I38T 変異ウイルスについてはフェレット内での割合はほぼ一定であった．また，フェレットにおける PA/I38T 変異ウイルスの存在比率を DF と RF1 間，RF1 と RF2 間，RF2 と RF3 間で比較し，伝播前後の PA/I38T 変異ウイルスの存在比率の変化量を解析し，フェレット間の PA/I38T 変異ウイルスの伝播性を評価した．A(H3N2)型 PA/I38T 変異ウイルスの存在比は伝播前後でほぼ一定であったが，A(H1N1)pdm09 型については DF-RF1 間及び RF1-RF2 間の伝播で PA/I38T 変異ウイルスの存在比は低下していた.

以上の結果から，A(H3N2)型 PA/I38T 変異ウイルスは，野生型ウイルスとの競合下ではフェレット間の伝播性は野生型と同等であるが，フェレット内における増殖性は野生型ウイルスよりも劣っていることが示唆された．また，A(H1N1)pdm09 型 PA/I38T 変異ウイルスは，野生型ウイルスとの競合下ではフェレット内の増殖性は野生型ウイルスと同等であるが，フェレット間の伝播性は野生型ウイルスよりも劣っていることが示唆された. A(H3N2)型及び A(H1N1)pdm09 型の PA/I38T 変異ウイルスは，単独感染下ではそれらの野生型ウイルスと同様の増殖及び伝播を示した．したがって，野生型ウイルスとの競合下では，A(H3N2)型の PA/I38T 変異ウイルスの場合は，フェレット内の増殖性が野生型ウイルスと比較して劣るため，A(H1N1)pdm09 型の PA/I38T 変異ウイルスの場合は，フェレット間の伝播性が野生型ウイルスと比較して劣るために, 野生型ウイルスを PA/I38T 変異ウイルスより大きな割合で感染させた条件下では, フェレット間でウイルスが伝播するに従い PA/I38T 変異ウイルスの存在比が低下すると考えられる [2.6.2.2.5.4 項参照].

2.4.2.1.3.3　PA/I201T が PA/I38 変異の増殖性に与える影響

T0831 試験及び T0833 試験で PA/I38 変異と同時に検出された PA/I201T が，PA/I38T 変異ウイルス又は PA/I38M 変異ウイルスの増殖性に与える影響を検討するため，リバースジェネティクス法により，A(H3N2)型の A/Victoria/3/75 ウイルスに，PA/I38T，PA/I38M，PA/I201T をそれぞれ導入した遺伝子組換えウイルス並びに PA/I38T・PA/I201T 又は PA/I38M・PA/I201T の 2 種類の変異を導入した遺伝子組換えウイルスを作製した．MDCK 細胞又は RPMI2650 細胞 (ヒト鼻扁平上皮癌由来細胞) に感染させ，経時的に培養上清中のウイルス力価を測定した [2.6.2.2.5.5 項参照]．その結果，PA/I38T 変異ウイルス及び PA/I38M 変異ウイルスの力価は，野生型ウイルスの力価に比べて低下傾向を示したが，PA/I201T 変異ウイルスの力価は，野生型ウ

イルスの力価とほぼ同等であった．PA/I201T を導入した PA/I38T 変異ウイルス又は PA/I38M 変異ウイルスの力価は，PA/I38 変異のみを有するウイルスの力価とほぼ同等であった．本試験条件下で評価した PA/I201T は，PA/I38 変異ウイルスの増殖性に影響を与える変異ではないと考えられる．

2.4.2.1.3.4　PA/E23K 変異ウイルスの増殖性

T0821 試験及び 2018/2019 シーズンに実施した予防投与試験 (以下 T0834 試験) で認められた PA/E23K 変異を有するインフルエンザウイルスの増殖性を検討するため，リバースジェネティクス法により作製した PA/E23K を有する遺伝子組換えウイルス [A(H1N1)型：rgA/WSN/33-PA/E23K，A(H3N2)型：rgA/Victoria/3/75-PA/E23K，B 型：rgB/Maryland/1/59-PA/E23K] とその野生型ウイルス [A(H1N1)型：rgA/WSN/33，A(H3N2)型：rgA/Victoria/3/75，B 型：rgB/Maryland/1/59] を MDCK 細胞及び RPMI2650 細胞にそれぞれ感染させ，経時的に培養上清中のウイルス力価を測定した [2.6.2.2.5.6 項参照]．その結果，A(H1N1)型及び A(H3N2)型の PA/E23K 変異ウイルスの増殖性は，野生型ウイルスと比較して低下した．また，B 型の PA/E23K 変異ウイルスの増殖性は，ウイルス増殖初期では野生型ウイルスと同等であったが，増殖ピーク以降では野生型ウイルスと比べて低下した．したがって，PA/E23K 変異ウイルスの増殖性はそれらの野生型ウイルスと比べて低下する傾向にあると考えられる．

2.4.2.2　副次的薬理試験

本申請に際して新たな試験は実施していない．

2.4.2.3　安全性薬理試験

本申請に際して新たな試験は実施していない．

2.4.2.4　薬力学的薬物相互作用

本申請に際して新たな試験は実施していない．

2.4.3　薬物動態試験

本申請に際して新たな試験は実施していない．

2.4.4　毒性試験

本申請に際して新たな試験は実施していない．

2.4.5　総括及び結論

2.4.5.1　季節性インフルエンザウイルスに対する予防効果

S-033447 懸濁液を単回皮下投与し，数日後に季節性インフルエンザウイルスを接種したマウスで，感染 24 時間後の血漿中濃度が A 型インフルエンザウイルスに対しては 0.444 ng/mL 以上，B 型インフルエンザウイルスに対しては 2.35 ng/mL 以上となる条件で，S-033447 はウイル

ス増殖を抑制することで，致死及び体重減少を抑制し，生存期間の延長効果を示した．したがって，バロキサビル マルボキシルは，予防的な投与においても，インフルエンザウイルスに感染した時期にウイルス増殖を抑制するために必要な S-033447 血漿中濃度を維持していれば，インフルエンザウイルス感染症の発症に対する予防効果が期待できる．

2.4.5.2　　薬剤感受性低下ウイルスの増殖性及び伝播性

S-033447 の感受性を低下させる PA/I38 変異がウイルスの増殖性に与える影響を検討するため，PA/I38 変異ウイルスの増殖性及びその野生型ウイルスとの競合増殖性を評価した．その結果，A(H1N1)型，A(H3N2)型又は B 型インフルエンザウイルスに，薬剤感受性を低下させる PA/I38T，PA/I38M 又は PA/I38F を導入した遺伝子組換えウイルスのそれぞれに対応する野生型ウイルスとの競合増殖性は，低いことが明らかとなった．また，T0831 試験の患者の検体から分離した A(H3N2)型の PA/I38T 変異ウイルスには，単独感染下ではその野生型ウイルスと同等の増殖性を示す PA/I38 変異ウイルスも認められたが，このような PA/I38 変異ウイルスでも，それらに対応する野生型ウイルスとの競合増殖性は低いことが明らかとなった．今回評価した野生型ウイルス共存下における PA/I38 変異ウイルスの競合増殖性は，遺伝子組換えウイルス並びに臨床分離株を用いた評価において，いずれも低いと結論した．また，T0831 試験及び T0833 試験で PA/I38 変異と同時に検出された PA/I201T が PA/I38 変異ウイルスの増殖性に与える影響を評価した結果，今回実施した試験条件下では，PA/I201T はウイルスの増殖性を低下させる PA/I38 の変異を相補し，PA/I38 変異ウイルスの増殖性に影響を与える変異ではないと考えられる．

T0821 試験及び T0831 試験で検出された患者検体由来の野生型及び PA/I38T 変異ウイルスを用いて，一対でのフェレット直接接触により，ウイルスを接種したフェレットから 3 匹の未感染フェレットへ順次ウイルスを伝播させ，PA/I38T 変異ウイルスの増殖性及び伝播性を評価した．その結果，A(H3N2)型 PA/I38T 変異ウイルスは，野生型ウイルスとの競合下ではフェレット間の伝播性は野生型と同等であるが，フェレット内における増殖性は野生型ウイルスよりも劣っていることが示唆された．また A(H1N1)pdm09 型 PA/I38T 変異ウイルスは，野生型ウイルスとの競合下ではフェレット内の増殖性は野生型ウイルスと同等であるが，フェレット間の伝播性は野生型ウイルスよりも劣っていることが示唆された．A(H3N2)型及び A(H1N1)pdm09 型の PA/I38T 変異ウイルスは単独感染下ではそれらの野生型ウイルスと同様に増殖や伝播を示した．したがって，これらのウイルス株の場合，野生型ウイルスとの競合下では，PA/I38T 変異ウイルスの宿主内での増殖性又は宿主間における伝播性が野生型ウイルスよりも劣っていたために，野生型ウイルスを PA/I38T 変異ウイルスよりも大きな割合で共感染させた条件下では，フェレット間でウイルスが伝播するに従い PA/I38T 変異ウイルスの存在比は低下したものと考えられる．

T0821 試験及び T0834 試験で認められた PA/E23K 変異について，ウイルスの増殖性に与える影響を A(H1N1)型，A(H3N2)型及び B 型の PA/E23K を有する遺伝子組換えウイルスとその野生型ウイルスを用いて検討した．その結果，PA/E23K 変異ウイルスの増殖性はそれらの野生型ウイルスと比べて低下する傾向を示した．

薬剤感受性低下ウイルスがその野生型ウイルスとの共存下で野生型ウイルスと同等又はそれ以上の増殖性を示す場合，実臨床において薬剤感受性低下ウイルスが流行する可能性が考えられることから，PA/I38T 変異を有する遺伝子組換えウイルス及び臨床分離株を用いて，野生型ウイルス共存下における PA/I38T 変異ウイルスの競合増殖性を培養細胞で評価した．その結果，PA/I38T 変異ウイルスの競合増殖性はその野生型ウイルスよりも低いことが明らかとなった．一方で，PA/I38 変異ウイルスは培養細胞において野生型と同等の増殖性を示すこと，マウスやハムスターを用いた動物モデルで野生型と同等の増殖性や病原性を示すこと，並びにフェレットでは，飛沫を介して PA/I38 変異ウイルスが伝播することを示す非臨床研究の報告もある [2, 3, 4, 5]．実臨床では，2018/2019 シーズン及び 2019/2020 シーズンの特定使用成績調査 (感受性調査) [第 3 回及び 4 回安全性定期報告，添付資料 5.3.6-03，5.3.6-04 参照] 並びに 2019/2020 シーズンの国立感染症研究所の報告 [6] でバロキサビル マルボキシルが投与されていない検体から PA/I38 変異が少数例ながら検出されており，S-033447 に対して 3 倍以上の感受性低下が認められるウイルスがヒトからヒトへ伝播した可能性が示唆されている．しかしながら，このような感受性低下ウイルスが野生型ウイルスの増殖性を顕著に上回るという報告はなく，流行することを示唆するエビデンスは得られていない．流行するインフルエンザウイルスの特性はシーズンにより異なるため，今後も引き続き S-033447 に対する低感受性ウイルスの出現動向を注意深くモニターする必要があると考えられる．

2.4.6　　参考文献一覧

1. 国立感染症研究所．抗インフルエンザ薬耐性株サーベイランス 2020 年 1 月 9 日．https://www.niid.go.jp/niid/ja/influ-resist/9293-flu-r20200109.html.
2. Takashita E, Kawakami C, Ogawa R, et al. Influenza A (H3N2) virus exhibiting reduced susceptibility to baloxavir due to a polymerase acidic subunit I38T substitution detected from a hospitalised child without prior baloxavir treatment, Japan, January 2019. Euro Surveill 2019;24:1900170.
3. Takashita E, Ichikawa M, Morita H, et al. Human-to-human transmission of influenza A(H3N2) virus with reduced susceptibility to baloxavir, Japan, February 2019. Emerg Infect Dis 2019;25(11):2108-11.
4. Imai M, Yamashita M, Sakai-Tagawa Y, et al. Influenza A variants with reduced susceptibility to baloxavir isolated from Japanese patients are fit and transmit through respiratory droplets. Nat Microbiol 2020;5:27-33.
5. Checkmahomed L, M'hamdi Z, Carbonneau J, et al. Impact of the baloxavir-resistant polymerase acid I38T substitution on the fitness of contemporary influenza A(H1N1)pdm09 and A(H3N2) strains. J Infect Dis 2020;221(1):63-70.
6. Takashita E, Abe T, Morita H, et al. Influenza A(H1N1)pdm09 Virus Exhibiting Reduced Susceptibility to Baloxavir Due to a PA E23K Substitution Detected From a Child Without Baloxavir Treatment. Antiviral Res 2020;180:104828.