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)

2.6 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 4
2.6.1.1 医薬品の構造及び薬理学的特性 5
2.6.1.2 効能・効果及び用法・用量 6

略号及び用語定義一覧表

略号	英語	日本語
S-033447	active form of baloxavir marboxil	バロキサビル マルボキシル活性体

2.6.1　緒言

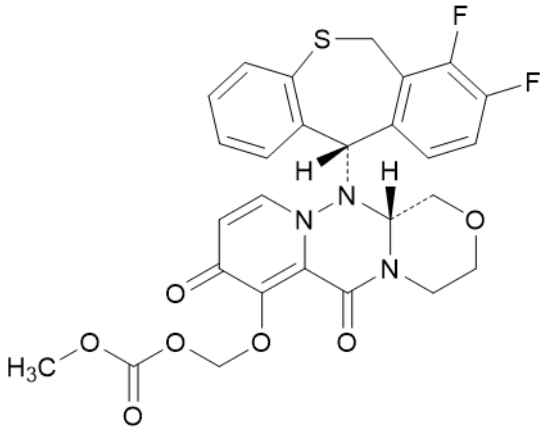
バロキサビル マルボキシルは，A 型又は B 型インフルエンザウイルス感染症を効能・効果として，2018 年 2 月にゾフルーザ錠 10 mg 及び同 20 mg が承認され，2018 年 9 月に同顆粒 2%分包が承認された．[redacted]今回，ゾフルーザ錠 20 mg 及び同顆粒 2%分包について予防適応追加申請を行った．

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，必要な非臨床安全性薬理試験，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バロキサビル マルボキシル活性体 (S-033447) 懸濁液を皮下投与し，数日後にインフルエンザウイルスを接種したマウスを用いて，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．

2.6.1.1　医薬品の構造及び薬理学的特性

バロキサビル マルボキシルは，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ものと考えられる．

1. 医薬品の構造



バロキサビル マルボキシル

2. 薬理学的特性

- *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 RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ阻害剤の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 [1.13 項 既承認医薬品に係る資料 (初回申請)，2.6.2.2.1.4 項参照].
- S-033447 懸濁液をマウスに単回皮下投与した数日後に A 型又は B 型の季節性インフルエンザウイルスを接種した結果，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認められ，肺内ウイルス力価の低下作用も示した．バロキサビル マルボキシルを予防的に投与したインフルエンザウイルス感染患者の同居家族又は共同生活者において，ウイルス感染症の発症抑制効果を発揮することが期待される．

2.6.1.2　効能・効果及び用法・用量

(1) 効能・効果 (案)

A 型又は B 型インフルエンザウイルス感染症の治療及びその予防

(下線部：予防適応追加申請での追加・変更箇所)

(2) 用法・用量 (案)

【用法・用量】

〈治療〉

1. 通常，成人及び 12 歳以上の小児には，20 mg 錠 2 錠又は顆粒 4 包 (バロキサビル マルボキシルとして 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 錠又は顆粒 8 包 (バロキサビル マルボキシルとして 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 錠 2 錠又は顆粒 4 包 (バロキサビル マルボキシルとして 40 mg)
20 kg 以上 40 kg 未満	20 mg 錠 1 錠又は顆粒 2 包 (バロキサビル マルボキシルとして 20 mg)
10 kg 以上 20 kg 未満	10 mg 錠 1 錠[redacted] (バロキサビル マルボキシルとして 10 mg)
[redacted]	[redacted]

〈予防〉

1. 通常，成人及び 12 歳以上の小児には，20 mg 錠 2 錠又は顆粒 4 包 (バロキサビル マルボキシルとして 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 錠又は顆粒 8 包 (バロキサビル マルボキシルとして 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 錠 2 錠又は顆粒 4 包 (バロキサビル マルボキシルとして 40 mg)
20 kg 以上 40 kg 未満	20 mg 錠 1 錠又は顆粒 2 包 (バロキサビル マルボキシルとして 20 mg)
10 kg 以上 20 kg 未満	顆粒 1 包 (バロキサビル マルボキシルとして 10 mg)
10 kg 未満	顆粒 50 mg/kg (バロキサビル マルボキシルとして 1 mg/kg)

[redacted]，下線部：予防適応追加申請での追加箇所

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)

2.6 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 6
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 10
2.6.2.2.1 マウスにおける S-033447 懸濁液の皮下投与時の血漿中 S-033447 濃度 10
2.6.2.2.2 季節性インフルエンザウイルス感染マウスモデルにおける S-033447 の感染前投与による効果 11
2.6.2.2.2.1 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-033447 の感染前投与による致死率改善及び体重減少抑制効果 11
2.6.2.2.2.2 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-033447 の感染前投与による致死率改善及び体重減少抑制効果 15
2.6.2.2.3 インフルエンザウイルス感染マウスモデルにおける S-033447 の感染前投与により有効性を示す血漿中 S-033447 濃度の検討 19
2.6.2.2.4 季節性インフルエンザウイルス感染マウスモデルにおける S-033447 の感染前投与による肺内ウイルス増殖抑制効果 20
2.6.2.2.4.1 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-033447 の感染前投与による肺内ウイルス増殖抑制効果 20
2.6.2.2.4.2 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-033447 の感染前投与による肺内ウイルス増殖抑制効果 21
2.6.2.2.5 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 22
2.6.2.2.5.1 PA/I38 変異ウイルスの野生型ウイルス共存下における競合増殖性 23
2.6.2.2.5.2 臨床で分離された PA/I38T 変異ウイルスの増殖性 25
2.6.2.2.5.3 臨床で分離された PA/I38T 変異ウイルスの野生型ウイルス共存下における競合増殖性 27
2.6.2.2.5.4 フェレットにおける臨床で分離された PA/I38T 変異ウイルスの伝播性 27
2.6.2.2.5.5 PA/I201T が PA/I38 変異ウイルスの増殖性に与える影響 33
2.6.2.2.5.6 PA/E23K 変異ウイルスの増殖性 36
2.6.2.3 副次的薬理試験 39
2.6.2.4 安全性薬理試験 39
2.6.2.5 薬力学的薬物相互作用 40
2.6.2.6 考察及び結論 40

2.6.2.6.1 マウスモデルにおける S-033447 の感染前投与による有効性 40
2.6.2.6.2 インフルエンザウイルス臨床株感染に対する有効性 41
2.6.2.6.3 PA/I38 変異ウイルスの野生型ウイルス共存下における競合増殖性 41
2.6.2.6.4 PA/I201T が PA/I38 変異ウイルスの増殖性に与える影響 42
2.6.2.6.5 PA/E23K 変異ウイルスの増殖性 43
2.6.2.7 図表 43
2.6.2.8 参考文献 43

表

表 2.6.2.2-1　マウスにおける S-033447 懸濁液単回皮下投与時の血漿中 S-033447 濃度（インフルエンザウイルス感染 24 時間後）.....20
表 2.6.2.2-2　ヒト由来初代培養細胞における継代培養ごとの PA/I38T 変異の存在比率(%).....27

図

図 2.6.2.2-1　マウスにおける S-033447 懸濁液単回皮下投与時の血漿中 S-033447 濃度推移.....11
図 2.6.2.2-2　S-033447 懸濁液皮下投与 48 時間後の A/PR/8/34 株感染マウスにおける致死率改善効果.....12
図 2.6.2.2-3　S-033447 懸濁液皮下投与 72 時間後の A/PR/8/34 株感染マウスにおける致死率改善効果.....13
図 2.6.2.2-4　S-033447 懸濁液皮下投与 96 時間後の A/PR/8/34 株感染マウスにおける致死率改善効果.....13
図 2.6.2.2-5　S-033447 懸濁液皮下投与 48 時間後の A/PR/8/34 株感染マウスにおける体重減少抑制効果.....14
図 2.6.2.2-6　S-033447 懸濁液皮下投与 72 時間後の A/PR/8/34 株感染マウスにおける体重減少抑制効果.....14
図 2.6.2.2-7　S-033447 懸濁液皮下投与 96 時間後の A/PR/8/34 株感染マウスにおける体重減少抑制効果.....15
図 2.6.2.2-8　S-033447 懸濁液皮下投与 48 時間後の B/Hong Kong/5/72 株感染マウスにおける致死率改善効果.....16
図 2.6.2.2-9　S-033447 懸濁液皮下投与 72 時間後の B/Hong Kong/5/72 株感染マウスにおける致死率改善効果.....16
図 2.6.2.2-10　S-033447 懸濁液皮下投与 96 時間後の B/Hong Kong/5/72 株感染マウスにおける致死率改善効果.....17
図 2.6.2.2-11　S-033447 懸濁液皮下投与 48 時間後の B/Hong Kong/5/72 株感染マウスにおける体重減少抑制効果.....17
図 2.6.2.2-12　S-033447 懸濁液皮下投与 72 時間後の B/Hong Kong/5/72 株感染マウスにおける体重減少抑制効果.....18
図 2.6.2.2-13　S-033447 懸濁液皮下投与 96 時間後の B/Hong Kong/5/72 株感染マウスにおける体重減少抑制効果.....18
図 2.6.2.2-14　S-033447 懸濁液皮下投与後の A/PR/8/34 株感染マウスにおける肺内ウイルス増殖抑制効果.....21
図 2.6.2.2-15　S-033447 懸濁液皮下投与後の B/Hong Kong/5/72 株感染マウスにおける肺内ウイルス増殖抑制効果.....22

図 2.6.2.2-16　PA/I38 変異ウイルスの野生型ウイルス共存下における競合増殖性 24
図 2.6.2.2-17　ヒト鼻腔上皮由来の初代培養細胞における培養上清中のウイルス力価の推移 26
図 2.6.2.2-18　直接接触の伝播におけるフェレット鼻汁中の感染性ウイルス力価とウイルス力価の AUC 値 30
図 2.6.2.2-19　A(H3N2)型ウイルス感染によるウイルス RNA 量 (A) 及び野生型ウイルスと PA/I38T 変異ウイルスの存在比率 (B) 31
図 2.6.2.2-20　A(H1N1)pdm09 型ウイルス感染によるウイルス RNA 量 (A) 及び野生型ウイルスと PA/I38T 変異ウイルスの存在比率 (B) 32
図 2.6.2.2-21　パイロシークエンシング法によるフェレット鼻汁中の PA/I38T 変異ウイルス存在比率の変化 33
図 2.6.2.2-22　PA/I201T 変異ウイルス，PA/I201T を導入した PA/I38T 変異ウイルス，PA/I38T 変異ウイルス及び野生型ウイルスの培養細胞上清中のウイルス力価の推移 34
図 2.6.2.2-23　PA/I201T 変異ウイルス，PA/I201T を導入した PA/I38M 変異ウイルス，PA/I38M 変異ウイルス及び野生型ウイルスの培養細胞上清中のウイルス力価の推移 35
図 2.6.2.2-24　PA/E23K 変異を有する rgA/WSN/33 (H1N1) ウイルスの培養細胞上清中のウイルス力価の推移 37
図 2.6.2.2-25　PA/E23K 変異を有する rgA/Victoria/3/75 (H3N2) ウイルスの培養細胞上清中のウイルス力価の推移 38
図 2.6.2.2-26　PA/E23K 変異を有する rgB/Maryland/1/59 ウイルスの培養細胞上清中のウイルス力価の推移 39

略号及び用語定義一覧表

略号	英語	日本語
ANOVA	analysis of variance	分散分析
CEN	cap-dependent endonuclease	キャップ依存性エンドヌクレアーゼ
$EC_{50\,(90)}$	50% (90%) effective concentration	50% (90%) 有効濃度
IC_{50}	50% inhibitory concentration	50%阻害濃度
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
SD	standard deviation	標準偏差
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

2.6.2　薬理試験の概要文

2.6.2.1　まとめ

バロキサビル マルボキシルはプロドラッグであり，インフルエンザウイルス感染マウスモデルへの経口投与により，代謝 (加水分解) されてバロキサビル マルボキシル活性体 (S-033447) となり，マウス肺内のウイルス増殖を抑制することで，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発揮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)，2.6.2.2.4.8，2.6.2.2.4.9 及び 2.6.2.2.4.10 項参照]．このことから，インフルエンザウイルス感染前の予防的な投与においても，感染を引き起こす時期に，ウイルス増殖を抑制するために必要な S-033447 の血漿中濃度を維持していれば，ウイルス増殖及びそれに起因する致死や体重減少を抑制し，生存期間の延長効果を示すものと考えられる．

マウスにおけるバロキサビル マルボキシル経口投与時の血漿中 S-033447 の消失半減期は，2～3 時間であり，ヒト (約 90 時間) と比べて短い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 及び 2.7.1.2.1.3 項参照]．そこで，非臨床試験では，S-033447 の血漿中濃度を一定期間維持させるために，S-033447 懸濁液をマウスへ皮下投与し，一定時間経過後にインフルエンザウイルスを接種して，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た．マウスに 0.8 又は 1.6 mg/kg の用量の S-033447 懸濁液を単回皮下投与し，48，72 又は 96 時間後に A 型 H1N1 亜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) を接種した結果，いずれの条件においても，媒体対照群に対して致死率が改善し，生存期間が有意に延長した．また，マウスに 1.6，3.2 又は 6.4 mg/kg の用量の S-033447 懸濁液を単回皮下投与し，48，72 又は 96 時間後に 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) を接種した結果，いずれの条件においても，媒体対照群に対して致死率が改善し，1.6 mg/kg の用量で単回皮下投与した 48 時間後にウイルスを接種した場合を除いて，生存期間が媒体対照群に対して有意に延長した．さらに，S-033447 懸濁液を皮下投与した A 型及び B 型インフルエンザウイルスのいずれの感染マウスモデルにおいても，ウイルス感染後の体重減少が用量依存的に抑制された．

次に，マウスへの S-033447 懸濁液のインフルエンザウイルス感染前投与により，生存期間延長効果が認められた条件 (用量及び感染時間) における，S-033447 の血漿中濃度を検討した．その結果，感染 24 時間後の血漿中 S-033447 濃度が，A/PR/8/34 株感染マウスモデルでは 0.444 ng/mL 以上，B/Hong Kong/5/72 株感染マウスモデルでは 2.35 ng/mL 以上を示す条件 (用量及び感染時間) で，媒体対照群に対して有意な生存期間延長効果を示した．また，これらの効果を示した投与群において，ウイルス感染 10 日後までの肺内ウイルス力価を評価した結果，感染 1 日後より，媒体対照群に対して有意に低い肺内ウイルス力価を示し，感染 10 日後には定量下限に達した．以上の結果から，マウスへの S-033447 懸濁液のインフルエンザウイルス感染前の単回皮下投与により，感染 24 時間後の血漿中 S-033447 濃度が 2.35 ng/mL 以上を示す条件 (用量及び感染時間) において，S-033447 は A 型及び B 型の季節性インフルエンザウイルス感染に伴う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発揮するものと考えられる．

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) が有するキャップ依存性エンドヌクレアーゼ (cap-dependent endonuclease; 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/I38 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/I38 変異ウイルスの競合増殖性を検討した．遺伝子組換えウイルスを用いた検討では，野生型ウイルスと PA/I38 変異ウイルスを 1:1 の混合比で MDCK 細胞 (イヌ腎臓由来株化細胞) に感染させ，48 時間後に回収した培養上清を新たに調製した MDCK 細胞に感染させる操作を 3 回繰り返し，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により定性的に評価した．その結果，PA/I38 変異ウイルスの存在比は，継代培養回数に従って低下することが確認された．臨床分離株を用いた検討では，第 3 相試験で A(H3N2)型の PA/I38T 変異ウイルスが検出された 3 患者について，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又は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，経時的に培養上清を回収してウイルス力価を測定した．その結果，1 患者由来の PA/I38T 変異ウイルスは増殖性の低下を示したが，残り 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．さらに，これら 3 患者由来の野生型ウイルスと PA/I38T 変異ウイルスを 1:1 の混合比でヒト鼻腔上皮由来の初代培養細胞に感染させ，48 時間後に回収した培養上清を新たに調製した同細胞に感染させる操作を 3 回繰り返し，継代ごとの培養上清に含まれる野生型ウイルスと PA/I38T 変異ウイルスの存在比率を次世代シークエンス法により定量的に解析した．その結果，PA/I38T 変異ウイルスの存在比率は，継代培養回数に従って低下し，野生型ウイルスが優勢となった．

2015/2016 シーズンに実施した成人患者対象の錠剤第 2 相臨床試験 (T0821 試験) 及び青少年及び成人患者対象第 3 相臨床試験 (T0831 試験) において，バロキサビル マルボキシル投与後検体から検出した A(H3N2)型又は A(H1N1)pdm09 型の PA/I38T 変異ウイルスと投与前検体から分離したそれらの野生型ウイルスの混合比を変えてフェレットに感染させ，動物から動物に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検討した．その結果 A(H3N2)型の PA/I38T 変異ウイルスは，野生型ウイルスとの競合下においてフェレット間の伝播性は野生型ウイルスと同等であるが，フェレット内の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 型の PA/I38T 変異ウイルスは，野生型ウイルスとの競合下において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．

薬剤感受性低下ウイルスの増殖性低下を相補する変異は，薬剤感受性低下ウイルス流行の懸

念を高めるため，第 3 相試験でバロキサビル マルボキシル投与後に 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を検討した．これらの変異を有する遺伝子組換えウイルスを作製し，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，経時的に培養上清を回収してウイルス力価を測定し，その増殖性を比較した．その結果，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．

T0821 試験及び 2018/2019 シーズンに実施した予防投与試験 (T0834 試験) で認められた A(H1N1)型及び A(H3N2)型の 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した．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 MDCK 細胞及び RPMI2650 細胞にそれぞれ感染させ，経時的に培養上清を回収してウイルス力価を測定した．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にあると考えられる．

2.6.2.2　効力を裏付ける試験

2.6.2.2.1　マウスにおける S-033447 懸濁液の皮下投与時の血漿中 S-033447 濃度

評価資料 4.2.1.1-01

概要表 2.6.3.2.1

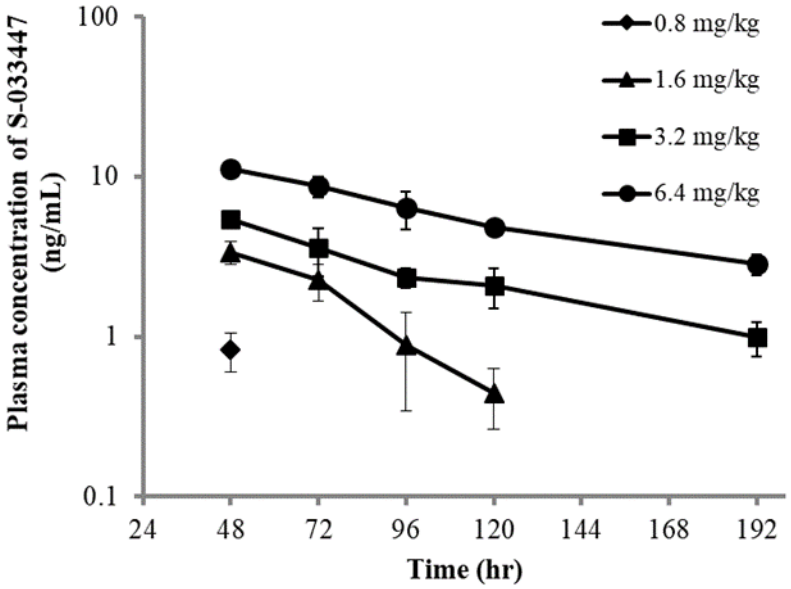
初回申請時に実施した A 型の季節性インフルエンザウイルス感染マウスにおけるバロキサビル マルボキシル経口投与時の血漿中 S-033447 の薬物動態 (PK) パラメータ解析の結果 [1.13 項 既承認医薬品に係る資料 (初回申請), 2.6.4.3.4.1 項参照] から，マウスにバロキサビル マルボキシルを単回経口投与したときの血漿中 S-033447 の消失半減期は 2～3 時間であり，日本人健常成人 [1.13 項 既承認医薬品に係る資料 (初回申請), 2.7.1.2.1.3 項参照] にバロキサビル マルボキシルを経口投与したときの血漿中 S-033447 の消失半減期 (約 90 時間) と比べて短いことが示されている．そこで，非臨床における本剤の予防的な投与による効果を評価するにあたり，マウスにおいて，血漿中 S-033447 濃度を一定期間維持することができる投与方法を検討することを目的として，S-033447 懸濁液 [媒体 : 0.5%メチルセルロース水溶液 (MC)] の皮下投与時における血漿中 S-033447 濃度推移を検討した．

マウス血漿中 S-033447 濃度は，血漿試料を除タンパク抽出後，LC/MS/MS (液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析法) で定量した．定量範囲は，0.100～100 ng/mL で設定し，その測定法は，定量範囲内で選択性，精度，真度及び各種条件の安定性に関してバリデートされた．本測定法は，S-033447 懸濁液の皮下投与時におけるマウス血漿中 S-033447 濃度測定に十分な選択性及び感度を有していた．

各用量及び各測定時点につき 4 例の雌性 BALB/c 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 時間後における血漿中 S-033447 濃度を測定した結果，血漿中 S-033447 濃度は，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，時間経過に伴い緩やかに低下した (図 2.6.2.2-1). S-033447 を 0.8 及び 1.6 mg/kg の用量で投与した群で，それぞれ投与 72～192 時間後及び 192 時間後において，血漿中 S-033447 濃度が定量下限未満 (< 0.100 ng/mL) となる例が認められた．

以上の結果から，マウスへの S-033447 懸濁液の単回皮下投与により，S-033447 の血漿中濃度を一定期間維持できることが確認できたため，上記投与方法を用いて，S-033447 のインフルエンザウイルス感染前投与による有効性を評価することとした．

図 2.6.2.2-1　　マウスにおける S-033447 懸濁液単回皮下投与時の血漿中 S-033447 濃度推移



S-033447 = active form of baloxavir marboxil
Each symbol represents the mean and standard deviation (SD) of 4 mice. When the error bar was not seen, the error was smaller than the symbol.
The mean value containing the value below the lower limit of quantification was not plotted in the figure.

2.6.2.2.2　　季節性インフルエンザウイルス感染マウスモデルにおける S-033447 の感染前投与による効果

バロキサビル マルボキシルのインフルエンザウイルス感染症に対する予防効果を検討することを目的に，マウスに S-033447 懸濁液を単回皮下投与し，48，72 又は 96 時間後に致死量の A 型又は B 型の季節性インフルエンザウイルスを感染させ，致死率，生存期間及び体重変化率 (感染当日の体重を 100%としたときの, 感染後の体重変化率) を指標として有効性を評価した.

2.6.2.2.2.1　　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-033447 の感染前投与による致死率改善及び体重減少抑制効果

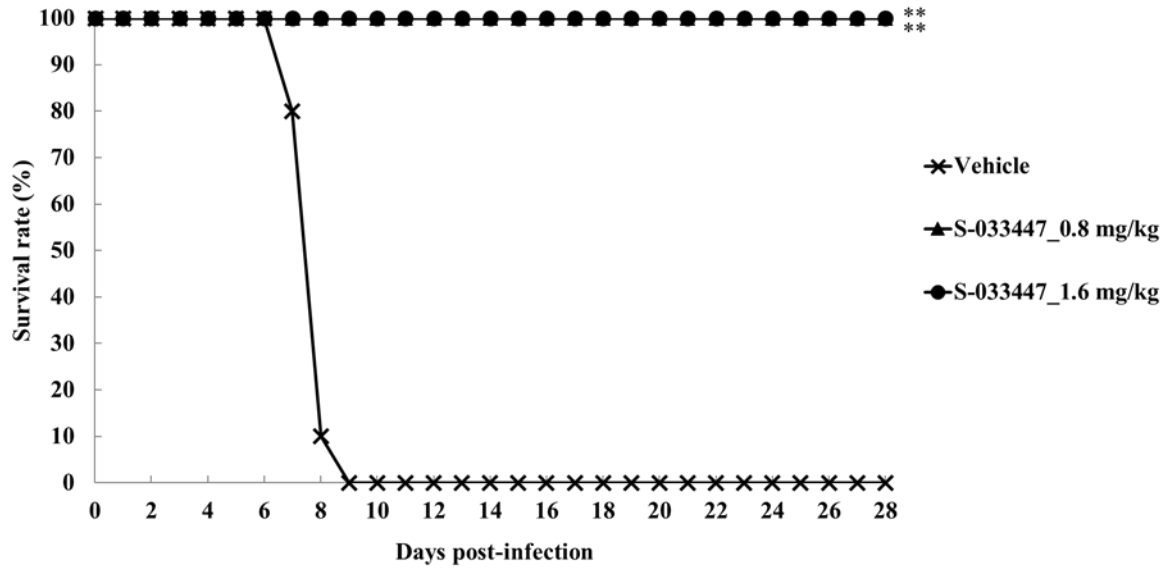
評価資料 4.2.1.1-01

概要表 2.6.3.2.2，2.6.3.2.3

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% MC) を単回皮下投与し，48 時間後に致死量 [4.00×10^2 50% tissue culture infectious dose ($TCID_{50}$)] の A/PR/8/34 株を経鼻接種した結果，感染 28 日後における生存率は，媒体対照群 (0.5% MC 投与群) では 0%，0.8 又は 1.6 mg/kg 投与群では 100%であった (図 2.6.2.2-2). また，0.8 又は 1.6 mg/kg の用量の S-033447 懸濁液あるいは媒体を単回皮下投与し，72 時間後に A/PR/8/34 株を接種したときの感染 28 日後における生存率は，媒体対照群では 10%，0.8 mg/kg 投与群では 20%，1.6 mg/kg 投与群では 100%であった (図 2.6.2.2-3). さらに，0.8 又は 1.6 mg/kg の用量の S-033447 懸濁液あるいは媒体を単回皮下投与し，96 時間後に A/PR/8/34 株を接種したときの感染 28 日後における生存率は, 媒体対照群では 0%, 0.8 mg/kg 投与群では 10%, 1.6 mg/kg

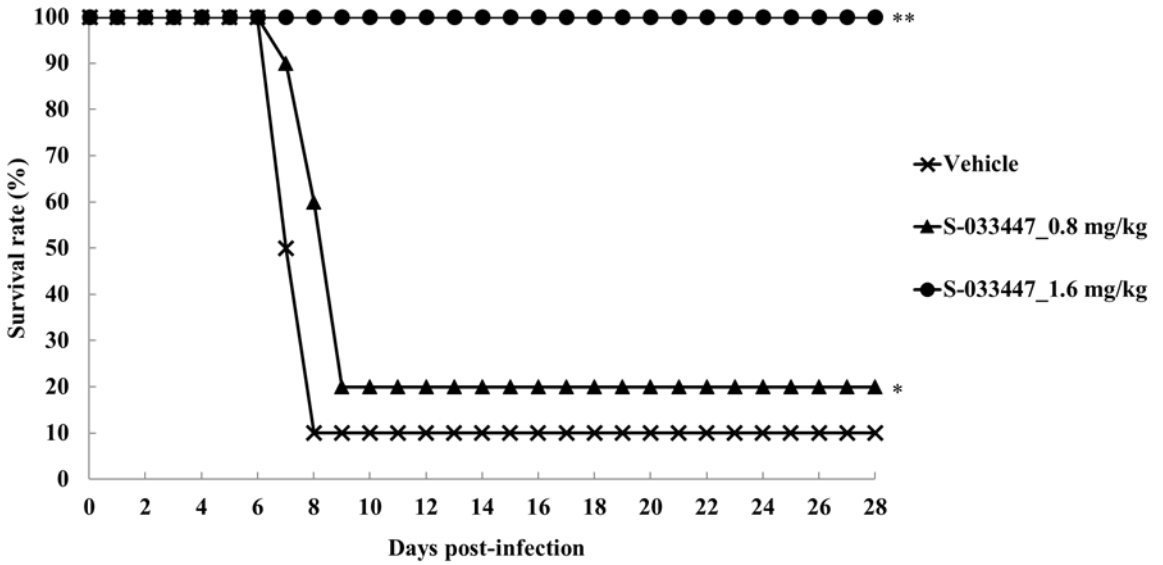
投与群では 100%であった (図 2.6.2.2-4)．したがって，S-033447 懸濁液を 0.8 又は 1.6 mg/kg の用量で皮下投与し，48，72 又は 96 時間後に A/PR/8/34 株を接種したいずれの条件においても，感染 28 日後まで，媒体対照群に対して致死率が改善した．また，いずれの用量及び感染時間においても，媒体対照群に対して S-033447 投与群の生存期間は有意に延長した．さらに，感染 7 日後までの体重変化率を測定した結果，S-033447 投与群では，ウイルス感染後の体重減少が用量依存的に抑制された (図 2.6.2.2-5，図 2.6.2.2-6，図 2.6.2.2-7).

図 2.6.2.2-2　S-033447 懸濁液皮下投与 48 時間後の A/PR/8/34 株感染マウスにおける致死率改善効果



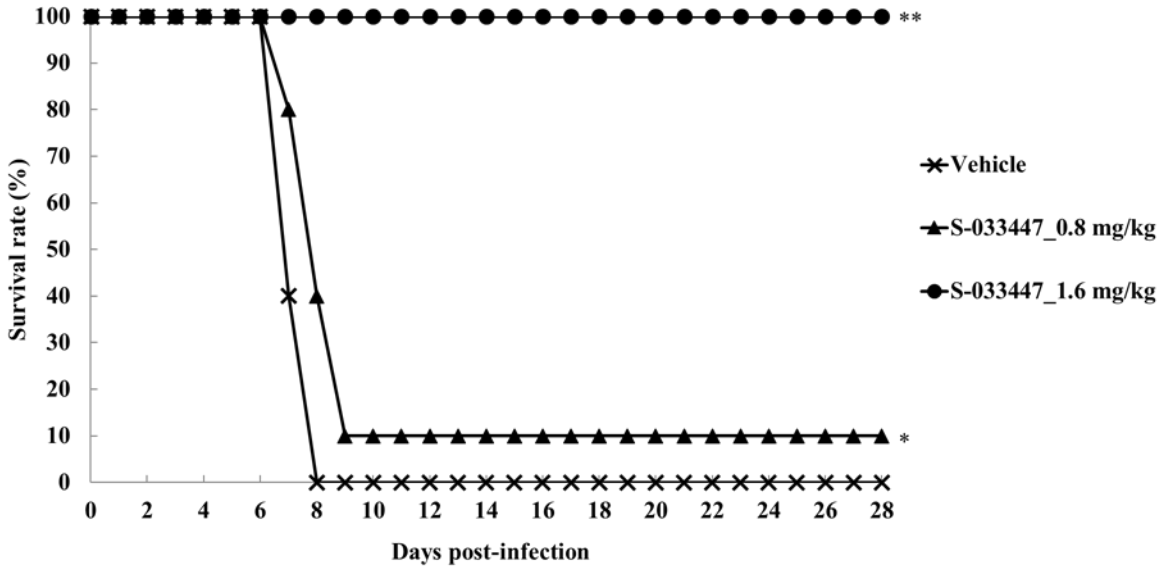
The following p-values were calculated by the log-rank test (multiplicity was adjusted by fixed-sequence procedure):
** $p < 0.0001$ vs vehicle.

図 2.6.2.2-3　　S-033447 懸濁液皮下投与 72 時間後の A/PR/8/34 株感染マウスにおける致死率改善効果



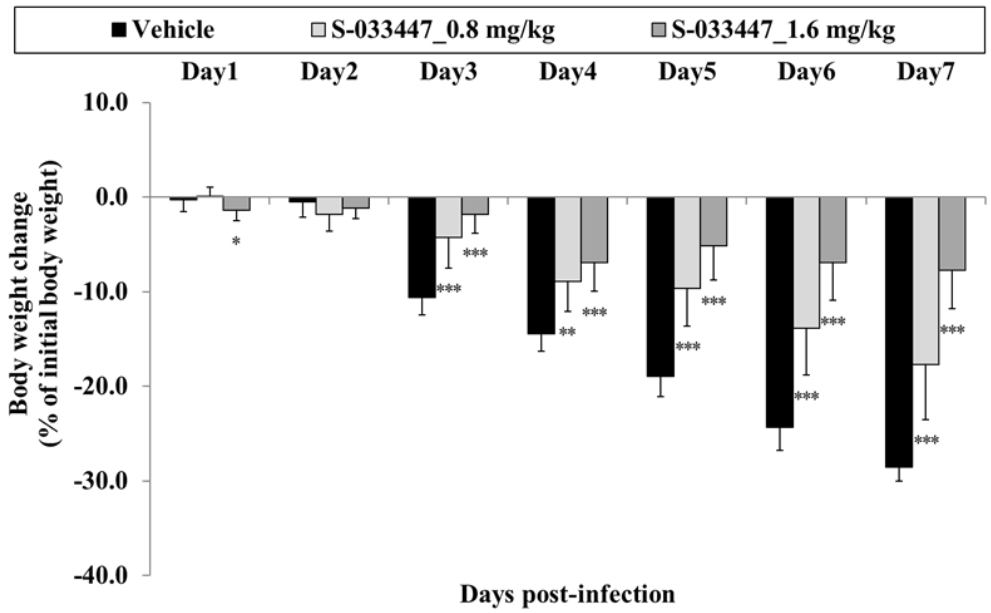
The following p-values were calculated by the log-rank test (multiplicity was adjusted by fixed-sequence procedure):
* $p < 0.05$, ** $p < 0.0001$ vs vehicle.

図 2.6.2.2-4　　S-033447 懸濁液皮下投与 96 時間後の A/PR/8/34 株感染マウスにおける致死率改善効果



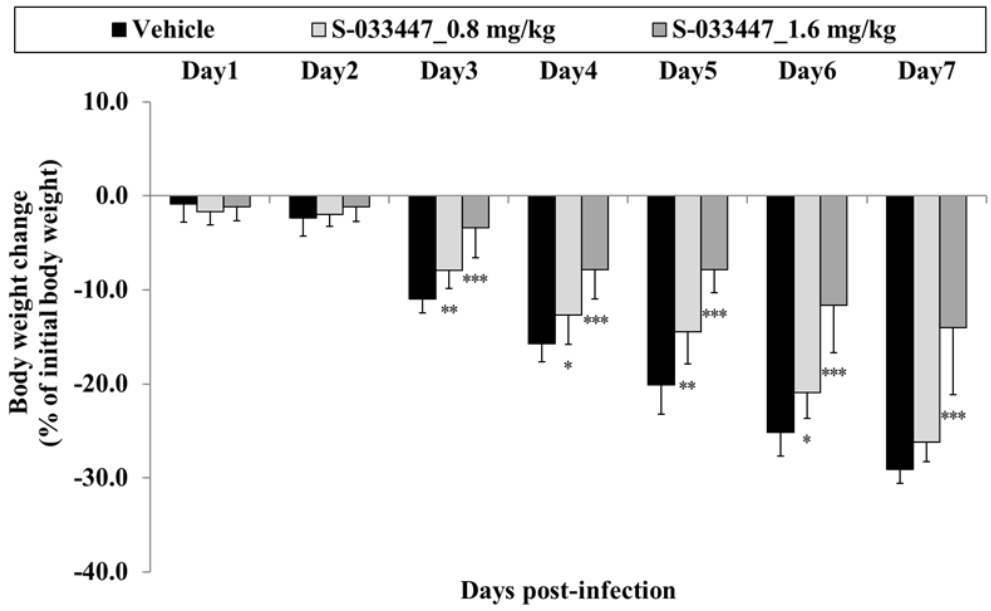
The following p-values were calculated by the log-rank test (multiplicity was adjusted by fixed-sequence procedure):
* $p < 0.05$, ** $p < 0.0001$ vs vehicle.

図 2.6.2.2-5　　S-033447 懸濁液皮下投与 48 時間後の A/PR/8/34 株感染マウスにおける体重減少抑制効果



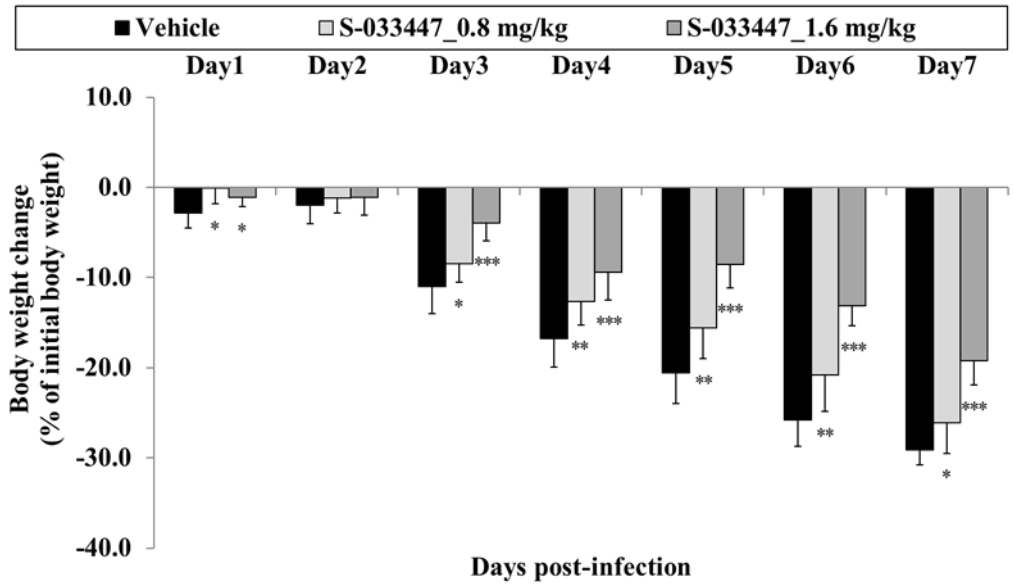
Data represent as relative value, with body weight of each mouse in the morning on the day of infection being 100%, and the percentages of body weight of died mice were regarded as 70%. Each bar represents the mean body weight change ± SD of 10 mice. The following p-values were calculated by the one-way analysis of variance (ANOVA) model with equal variance assumption including the fixed effect of group and the contrast method (multiplicity was adjusted by fixed-sequence procedure): * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.0001$ vs vehicle.

図 2.6.2.2-6　　S-033447 懸濁液皮下投与 72 時間後の A/PR/8/34 株感染マウスにおける体重減少抑制効果



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 ± SD of 10 mice. The following p-values were calculated by the one-way ANOVA model with equal variance assumption including the fixed effect of group and the contrast method (multiplicity was adjusted by fixed-sequence procedure): * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.0001$ vs vehicle.

図 2.6.2.2-7　　S-033447 懸濁液皮下投与 96 時間後の A/PR/8/34 株感染マウスにおける体重減少抑制効果



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 ± SD of 10 mice. The following p-values were calculated by the one-way ANOVA model with equal variance assumption including the fixed effect of group and the contrast method (multiplicity was adjusted by fixed-sequence procedure): * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.0001$ vs vehicle.

2.6.2.2.2.2　　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-033447 の感染前投与による致死率改善及び体重減少抑制効果

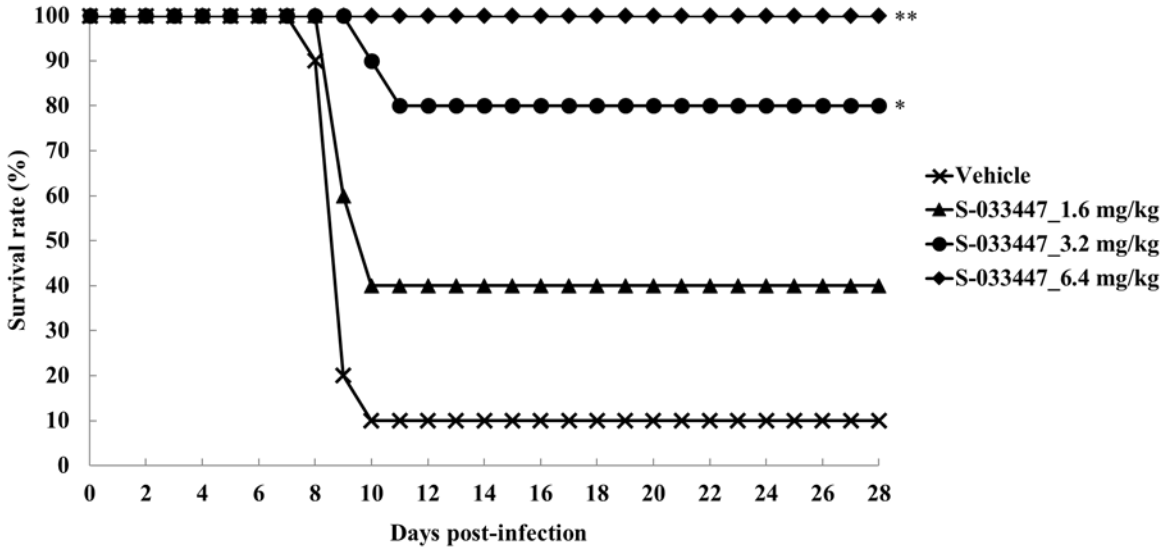
評価資料 4.2.1.1-02

概要表 2.6.3.2.4，2.6.3.2.5

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，48 時間後に致死量 (1.80×10^3 $TCID_{50}$) の B/Hong Kong/5/72 株を経鼻接種した結果, 感染 28 日後における生存率は, 媒体対照群では 10%, 1.6 mg/kg 投与群では 40%, 3.2 mg/kg 投与群では 80%, 6.4 mg/kg 投与群では 100%であった (図 2.6.2.2-8). また，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を単回皮下投与し，72 時間後に B/Hong Kong/5/72 株を接種したときの感染 28 日後における生存率は，媒体対照群では 10%，1.6 mg/kg 投与群では 50%，3.2 又は 6.4 mg/kg 投与群では 100%であった (図 2.6.2.2-9). さらに，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を単回皮下投与し，96 時間後に B/Hong Kong/5/72 株を接種したときの感染 28 日後における生存率は，媒体対照群では 20%，1.6 mg/kg 投与群では 50%，3.2 mg/kg 投与群では 70%，6.4 mg/kg 投与群では 100%であった (図 2.6.2.2-10). したがって，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 B/Hong Kong/5/72 株を接種したいずれの条件においても，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 B/Hong Kong/5/72 株を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，S-033447 投与群の生存期間は媒体対照群に対して有意に延長した．さら

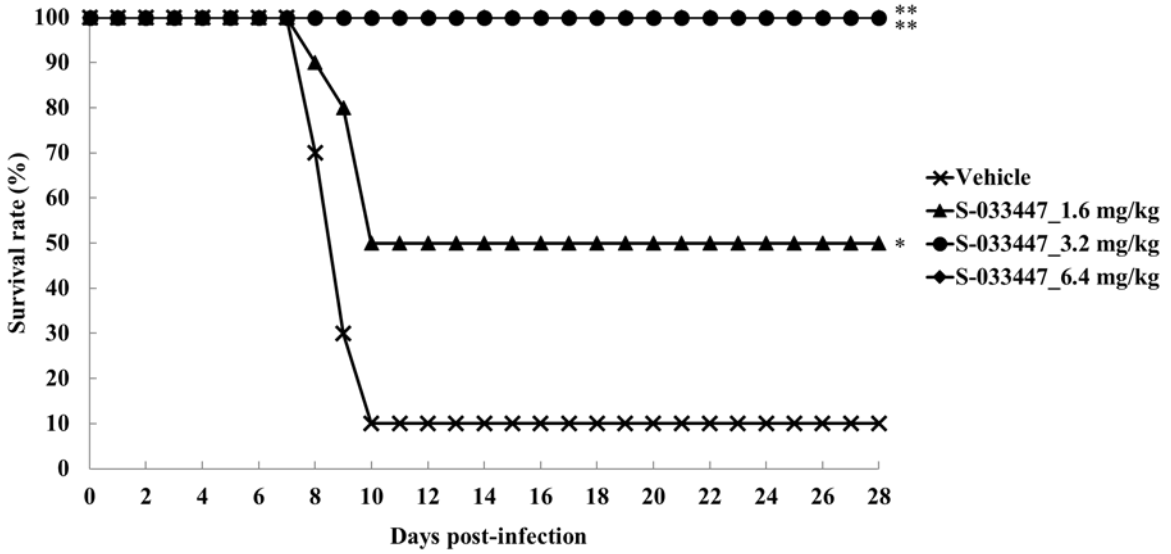
に，感染 7 日後までの体重変化率を測定した結果，S-033447 投与群ではウイルス感染後の体重減少が用量依存的に抑制された (図 2.6.2.2-11，図 2.6.2.2-12，図 2.6.2.2-13).

図 2.6.2.2-8　S-033447 懸濁液皮下投与 48 時間後の B/Hong Kong/5/72 株感染マウスにおける致死率改善効果



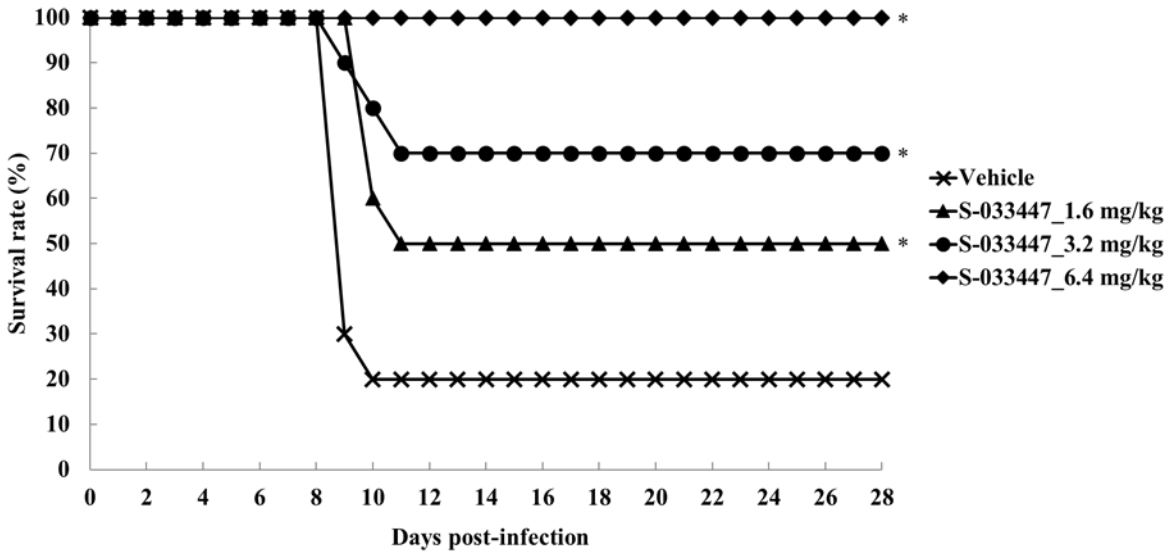
The following p-values were calculated by the log-rank test (multiplicity was adjusted by fixed-sequence procedure):
* p < 0.05, ** p < 0.0001 vs vehicle.

図 2.6.2.2-9　S-033447 懸濁液皮下投与 72 時間後の B/Hong Kong/5/72 株感染マウスにおける致死率改善効果



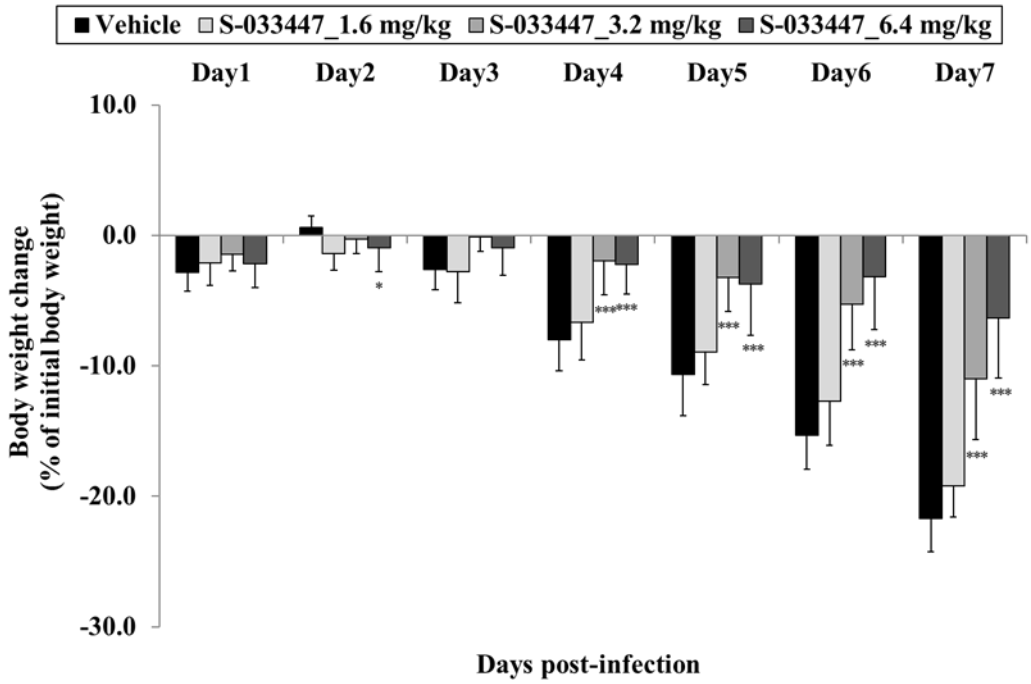
The following p-values were calculated by the log-rank test (multiplicity was adjusted by fixed-sequence procedure):
* p < 0.05, ** p < 0.0001 vs vehicle.

図 2.6.2.2-10　S-033447 懸濁液皮下投与 96 時間後の B/Hong Kong/5/72 株感染マウスにおける致死率改善効果



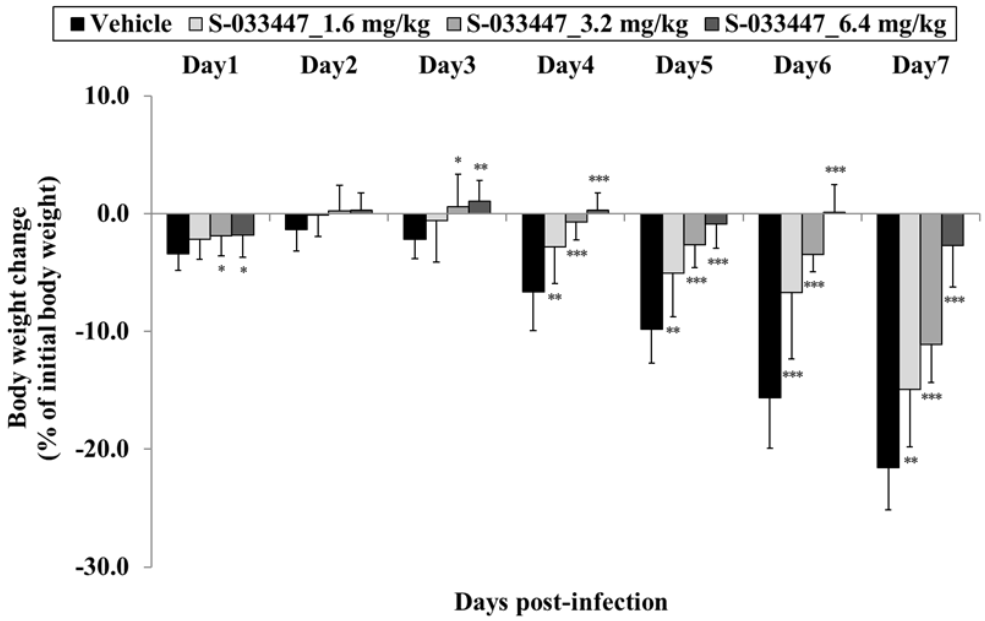
The following p-values were calculated by the log-rank test (multiplicity was adjusted by fixed-sequence procedure):
* $p < 0.05$ vs vehicle.

図 2.6.2.2-11　S-033447 懸濁液皮下投与 48 時間後の B/Hong Kong/5/72 株感染マウスにおける体重減少抑制効果



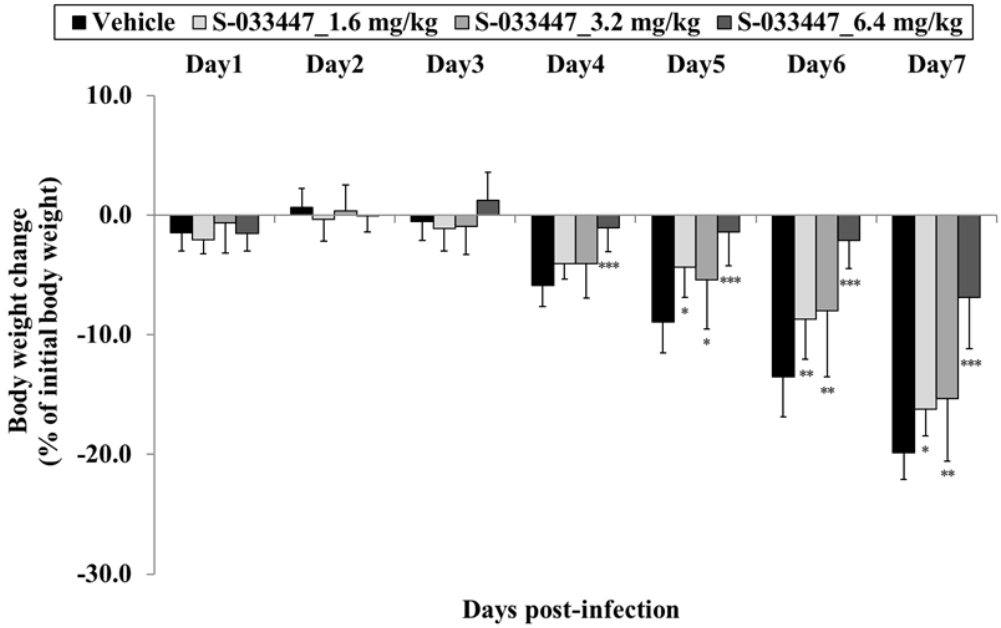
Data represent as relative value, with body weight of each mouse in the morning on the day of infection being 100%, and the percentages of body weight of died mice were regarded as 70%. Each bar represents the mean body weight change ± SD of 10 mice. The following p-values were calculated by the one-way ANOVA model with equal variance assumption including the fixed effect of group and the contrast method (multiplicity was adjusted by fixed-sequence procedure): * $p < 0.05$, *** $p < 0.0001$ vs vehicle.

図 2.6.2.2-12　S-033447 懸濁液皮下投与 72 時間後の B/Hong Kong/5/72 株感染マウスにおける体重減少抑制効果



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 ± SD of 10 mice. The following p-values were calculated by the one-way ANOVA model with equal variance assumption including the fixed effect of group and the contrast method (multiplicity was adjusted by fixed-sequence procedure): * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.0001$ vs vehicle.

図 2.6.2.2-13　S-033447 懸濁液皮下投与 96 時間後の B/Hong Kong/5/72 株感染マウスにおける体重減少抑制効果



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 ± SD of 10 mice. The following p-values were calculated by the one-way ANOVA model with equal variance assumption including the fixed effect of group and the contrast method (multiplicity was adjusted by fixed-sequence procedure): * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.0001$ vs vehicle.

2.6.2.2.3　インフルエンザウイルス感染マウスモデルにおける S-033447 の感染前投与により有効性を示す血漿中 S-033447 濃度の検討

評価資料 4.2.1.1-01, 4.2.1.1-02

概要表 2.6.3.2.1

インフルエンザの発症は，感染したインフルエンザウイルスの増殖に起因し，その治療にあたっては，S-033447 がウイルス増殖を抑制することにより効果を発揮するものと考えられる．初回申請時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) 解析において，S-033447 投与開始 24 時間後の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_{τ} (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，ヒト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]．これらのことから，予防投与においても，投与後，一定以上の血漿中 S-033447 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，インフルエンザの発症に対して抑制効果が発揮されるものと考えた．今回実施した非臨床薬理試験では，マウスに S-033447 懸濁液を単回皮下投与し，一定時間経過後にウイルスを感染させ，その有効性を評価した．本マウスモデルで，S-033447 の感染前投与により生存期間延長効果が認められた用量及び感染時間における，感染 24 時間後の血漿中 S-033447 濃度を検討した．

上述した A/PR/8/34 株感染マウスモデルにおいて，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 時間後にウイルスを接種したいずれの条件においても，媒体対照群に対して生存期間が有意に延長した．2.6.2.2.1 項に示す S-033447 懸濁液の単回皮下投与時の血漿中 S-033447 濃度測定結果より，S-033447 懸濁液を 0.8 又は 1.6 mg/kg の用量で単回皮下投与し, 48, 72 及び 96 時間後にウイルスを感染させたときの, 感染 24 時間後の血漿中 S-033447 濃度 (表 2.6.2.2-1) は, 0.8 mg/kg の用量では, それぞれ 0.381, 0.0553 及び 0.187 ng/mL, 1.6 mg/kg の用量では，それぞれ 2.25，0.883 及び 0.444 ng/mL と考えられる．0.8 mg/kg の用量においては，各群 4 例で S-033447 を皮下投与したマウスのうち 1 又は 2 例のマウスの血漿中 S-033447 濃度が定量下限未満であったことから，全例で血漿中 S-033447 濃度が定量できた 1.6 mg/kg の用量における結果を用いて，血漿中 S-033447 濃度と有効性の関係を検討することが妥当と考えた．したがって，インフルエンザウイルス感染前に S-033447 懸濁液をマウスに皮下投与することにより，感染 24 時間後の血漿中 S-033447 濃度が少なくとも 0.444 ng/mL 以上となる条件 (用量及び感染時間) において，A 型インフルエンザウイルスの感染に対して有効性を示すものと考えられる．

次に，上述した B/Hong Kong/5/72 株感染マウスモデルにおいて，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 時間後にウイルスを接種したところ, S-033447 懸濁液を 1.6 mg/kg の用量で投与し，48 時間後にウイルスを接種した場合を除いて，いずれの条件においても, S-033447 投与群の生存期間は媒体対照群に対して有意に延長した. 2.6.2.2.1 項に示す S-033447 懸濁液の単回皮下投与時の血漿中 S-033447 濃度測定結果より，S-033447 懸濁

液を単回皮下投与し，48，72 及び 96 時間後にウイルスを感染させたときの，感染 24 時間後の血漿中 S-033447 濃度 (表 2.6.2.2-1) は，1.6 mg/kg の用量では，それぞれ 2.25，0.883 及び 0.444 ng/mL，3.2 mg/kg の用量では，それぞれ 3.58，2.35 及び 2.07 ng/mL，6.4 mg/kg の用量では，それぞれ 8.70，6.40 及び 4.80 ng/mL と考えられる．上述した通り，1.6 mg/kg の用量で皮下投与し，投与 48 時間後にウイルスを接種した条件 (感染 24 時間後の血漿中 S-033447 濃度が 2.25 ng/mL) では，媒体対照群に対して有意な生存期間の延長が認められなかったが，感染 24 時間後の血漿中 S-033447 濃度が 2.35 ng/mL 以上となる条件においては全て，媒体対照群に対して有意な生存期間の延長が認められた．したがって，インフルエンザウイルス感染前に S-033447 懸濁液をマウスに皮下投与することにより，感染 24 時間後の血漿中 S-033447 濃度が少なくとも 2.35 ng/mL 以上となる条件 (用量及び感染時間) において，B 型インフルエンザウイルスの感染に対して有効性を示すものと考えられる．

表 2.6.2.2-1　マウスにおける S-033447 懸濁液単回皮下投与時の血漿中 S-033447 濃度（インフルエンザウイルス感染 24 時間後）

S-033447 投与量 (mg/kg)	感染 24 時間後の血漿中濃度 (ng/mL)		
	投与 48 時間後感染群	投与 72 時間後感染群	投与 96 時間後感染群
0.8	0.381 *[a]	0.0553 *[a]	0.187 *[a]
1.6	2.25 [a]	0.883 [a, b]	0.444 [a, b]
3.2	3.58 [b]	2.35 [b]	2.07 [b]
6.4	8.70 [b]	6.40 [b]	4.80 [b]

a　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生存期間の有意な延長が認められた．
b　B 型インフルエンザウイルス感染マウスモデルにおいて生存期間の有意な延長が認められた．
* 0.8 mg/kg の用量は定量下限未満 (< 0.100 ng/mL) となる個体がいたため，生存期間の延長が認められたが，有効濃度として除外した．

2.6.2.2.4　季節性インフルエンザウイルス感染マウスモデルにおける S-033447 の感染前投与による肺内ウイルス増殖抑制効果

2.6.2.2.2 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，S-033447 懸濁液の投与により，媒体対照群に対して有意な生存期間延長効果が認められた感染 24 時間後の血漿中 S-033447 濃度を示す条件 (用量及び感染時間) における，ウイルス接種 10 日後までの肺内ウイルス力価を評価した．

2.6.2.2.4.1　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-033447 の感染前投与による肺内ウイルス増殖抑制効果

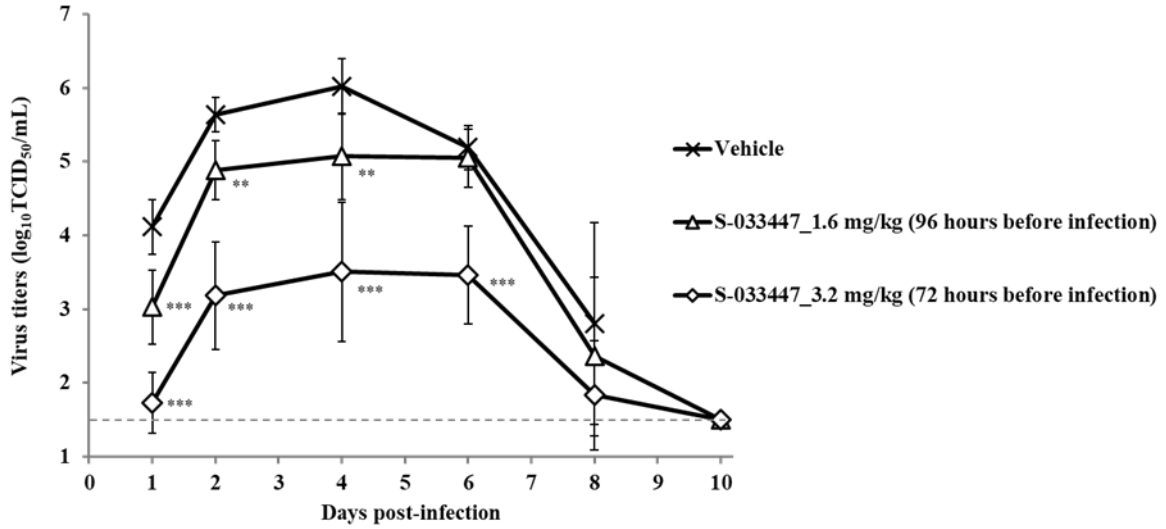
評価資料 4.2.1.1-03

概要表 2.6.3.2.6

2.6.2.2.2.1 項で，A/PR/8/34 株感染マウスにおいて，S-033447 懸濁液の投与により，媒体対照群に対して有意な生存期間延長効果が認められた条件 (感染 24 時間後の血漿中濃度が 0.444 ng/mL 以上となる用量及び感染時間) における肺内ウイルス増殖抑制効果を検討するため，

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 S-033447 懸濁液又は媒体 (0.5% MC) を単回皮下投与し，1.6 mg/kg の用量の投与 96 時間後 (感染 24 時間後の血漿中 S-033447 濃度が 0.444 ng/mL)，3.2 mg/kg の用量の投与 72 時間後 (感染 24 時間後の血漿中 S-033447 濃度が 2.35 ng/mL) 又は媒体の投与 72 時間後に，致死量 (4.00×10^2 $TCID_{50}$) の A/PR/8/34 株を経鼻接種した．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結果，S-033447 懸濁液の投与群において，感染 1 日後より，媒体対照群と比べて有意に低い肺内ウイルス力価を示し，感染 10 日後には定量下限 (1.50 $\log_{10}$ $TCID_{50}$/mL) に達した．また，S-033447 の 1.6 mg/kg の用量 (96 時間後にウイルス接種) では感染 1，2 及び 4 日後において，3.2 mg/kg の用量 (72 時間後にウイルス接種) では感染 1，2，4 及び 6 日後において，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 (図 2.6.2.2-14)．さらに，3.2 mg/kg の用量 (72 時間後にウイルス接種) において，1.6 mg/kg の用量 (96 時間後にウイルス接種) と比べて，肺内ウイルス力価は低い値で推移したことから，血漿中 S-033447 濃度依存的に肺内ウイルス増殖が抑制されるものと考えられる (表 2.6.2.2-1).

図 2.6.2.2-14　S-033447 懸濁液皮下投与後の A/PR/8/34 株感染マウスにおける肺内ウイルス増殖抑制効果



Each point represents the mean ± SD of 2 to 10 mice. None of mice survived in vehicle group on day 10 after infection. Broken line represents the lower limit of quantification [1.50 $\log_{10}$ 50% tissue culture infectious dose ($TCID_{50}$)/mL]. The following p-values were calculated by one-way ANOVA at each time point (multiplicity was adjusted using the Dunnett method): ** $p < 0.01$, *** $p < 0.0001$ vs vehicle.

2.6.2.2.4.2　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-033447 の感染前投与による肺内ウイルス増殖抑制効果

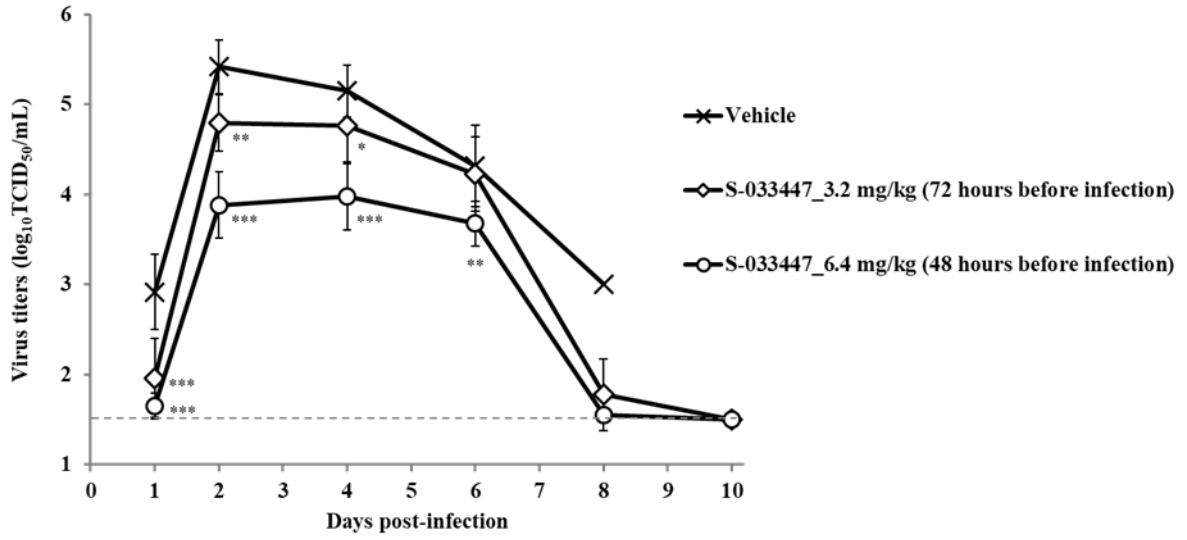
評価資料 4.2.1.1-04

概要表 2.6.3.2.7

2.6.2.2.2.2 項で，B/Hong Kong/5/72 株感染マウスにおいて，S-033447 懸濁液の投与により，媒体対照群に対して有意な生存期間改善効果が認められた条件 (感染 24 時間後の血漿中濃度が

2.35 ng/mL 以上となる用量及び感染時間) における肺内ウイルス増殖抑制効果を検討するため，各用量及び各測定時点につき 10 例の雌性 BALB/c マウスに S-033447 懸濁液又は媒体 (0.5% MC) を単回皮下投与し，3.2 mg/kg の用量の投与 72 時間後 (感染 24 時間後の血漿中 S-033447 濃度が 2.35 ng/mL)，6.4 mg/kg の用量の投与 48 時間後 (感染 24 時間後の血漿中 S-033447 濃度が 8.70 ng/mL) 又は媒体の投与 72 時間後に，致死量 (1.80×10^3 $TCID_{50}$) の B/Hong Kong/5/72 株を経鼻接種した．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結果，S-033447 投与群において，感染 1 日後より，媒体対照群と比べて有意に低い肺内ウイルス力価を示し，感染 10 日後には定量下限に達した．また，S-033447 の 3.2 mg/kg の用量 (72 時間後にウイルス接種) では感染 1，2 及び 4 日後において，6.4 mg/kg の用量 (48 時間後にウイルス接種) では感染 1，2，4 及び 6 日後において，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 (図 2.6.2.2-15)．さらに，6.4 mg/kg の用量 (48 時間後にウイルス接種) においては，3.2 mg/kg の用量 (72 時間後にウイルス接種) と比べて，肺内ウイルス力価は低い値で推移したことから，血漿中 S-033447 濃度依存的に肺内ウイルス増殖が抑制されるものと考えられる (表 2.6.2.2-1)．

図 2.6.2.2-15　S-033447 懸濁液皮下投与後の B/Hong Kong/5/72 株感染マウスにおける肺内ウイルス増殖抑制効果



Each point represents the mean ± SD of 5 to 10 mice except for n=1. None of mice survived in vehicle group on day 10 after infection. Broken line represents the lower limit of quantification (1.50 log_{10} $TCID_{50}$/mL). The following p-values were calculated by one-way ANOVA at each time point (multiplicity was adjusted using the Dunnett method): * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.0001$ vs vehicle.

2.6.2.2.5　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 A(H3N2)型の 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 (rgA/Victoria/3/75) と比較して低下した．ま

た，A(H3N2)型の 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]．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．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遺伝子組換えウイルスを用いて *in vitro* で評価した．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，さらに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 *in vivo* で検討した．また，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も遺伝子組換えウイルスを用いて *in vitro* で評価した．

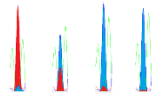
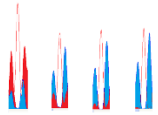
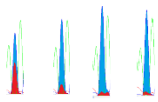
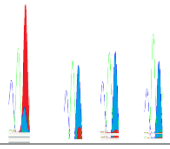
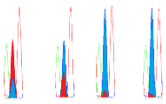
2.6.2.2.5.1　　PA/I38 変異ウイルスの野生型ウイルス共存下における競合増殖性

評価資料 4.2.1.1-05
概要表 2.6.3.2.8

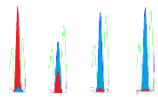
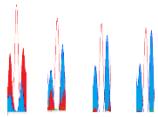
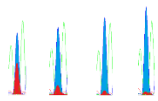
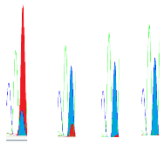
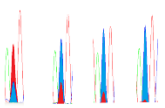
増殖性が低下した PA/I38 変異ウイルスを野生型ウイルスと共存させることで，PA/I38 変異ウイルスの存在比がどのように推移するかについて，継代培養ごとに確認し，野生型ウイルス共存下における PA/I38 変異ウイルスの増殖性を比較した．PA/I38T を有する遺伝子組換えウイルス[A(H1N1)型：rgA/WSN/33-PA/I38T]，[A(H3N2)型：rgA/Victoria/3/75-PA/I38T] 及び [B 型：rgB/Maryland/1/59-PA/I38T]，並びに PA/I38F (PA の N 末端から 38 番目に位置するイソロイシンがフェニルアラニンに変異) を有する遺伝子組換えウイルス [A(H1N1)型：rgA/WSN/33-PA/I38F] 及び PA/I38M を有する遺伝子組換えウイルス [A(H3N2)型：rgA/Victoria/3/75-PA/I38M] をそれぞれリバースジェネティクス法により作製した．これら変異ウイルス株と対応する野生型ウイルスをそれらの感染力価を指標に 1:1 で混合し，MDCK 細胞に感染させ，48 時間後に回収した培養上清を，新たに調製した MDCK 細胞に感染させる継代培養を 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 (図 2.6.2.2-16).

図 2.6.2.2-16　　PA/I38 変異ウイルスの野生型ウイルス共存下における競合増殖性

(A) Lineage 1

Strain	Codon of PA 38 AA	Sanger sequencing Chromatograms (Linage 1) P0 P1 P2 P3
rgA/WSN/33 WT+PA/I38T A(H1N1)	WT: ATA PA/I38T: ACA	
rgA/WSN/33 WT+PA/I38F A(H1N1)	WT: ATA PA/I38F: TTT	
rgA/Victoria/3/75 WT+PA/I38T A(H3N2)	WT: ATA PA/I38T: ACA	
rgA/Victoria/3/75 WT+PA/I38M A(H3N2)	WT: ATA PA/I38M: ATG	
rgB/Maryland/1/59 WT+PA/I38T	WT: ATC PA/I38T: ACC	

(B) Lineage 2

Strain	Codon of PA 38 AA	Sanger sequencing Chromatograms (linage 2) P0 P1 P2 P3
rgA/WSN/33 WT+PA/I38T A(H1N1)	WT: ATA PA/I38T: ACA	
rgA/WSN/33 WT+PA/I38F A(H1N1)	WT: ATA PA/I38F: TTT	
rgA/Victoria/3/75 WT+PA/I38T A(H3N2)	WT: ATA PA/I38T: ACA	
rgA/Victoria/3/75 WT+PA/I38M A(H3N2)	WT: ATA PA/I38M: ATG	
rgB/Maryland/1/59 WT+PA/I38T	WT: ATC PA/I38T: ACC	

P = passage; WT = wild type
MDCK cells were coinfected with recombinant WT (blue chromatogram) and PA/I38-substituted viruses (red chromatogram) at a ratio of 1 to 1 based on viral titers (P0). The culture supernatant was collected at 48 hours post infection, and fresh MDCK cells were infected with the collected viruses, followed by repeating passages of the viruses in cell culture three times (P1 to P3) in duplicate as lineage 1 and lineage 2. The nucleotide sequence of the PA segment of the viruses were analyzed by Sanger sequencing, and the sequence chromatogram showed the codon 38 in the PA subunit.

2.6.2.2.5.2　　臨床で分離された PA/I38T 変異ウイルスの増殖性

評価資料 4.2.1.1-06
概要表 2.6.3.2.9

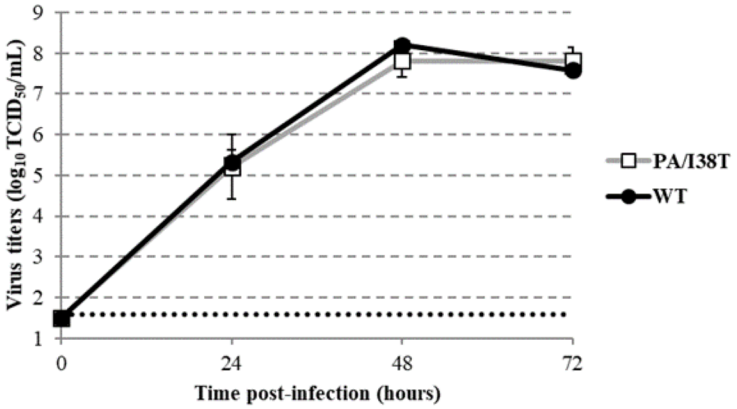
青少年及び成人患者対象第 3 相臨床試験 (以下，T0831 試験) において，A(H3N2)型の PA/I38T 変異ウイルスが検出された 3 患者のバロキサビル マルボキシル投与前検体から分離した野生型ウイルス及び投与後検体から分離した PA/I38T 変異ウイルスを用いて，それぞれのウイルスの増殖性を比較した．なお，これら 3 患者からバロキサビル マルボキシル投与後に分離した PA/I38T 変異ウイルスのプラーク数を 50%抑制するために必要な S-033447 濃度 (EC_{50}) は 36～53 ng/mL であり，投与前に分離した野生型ウイルスの EC_{50} (0.31～0.69 ng/mL) と比較して，S-033447 に対する感受性は低下していた [1].

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又は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，感染後 24～72 時間まで培養上清を回収してウイルス力価を測定した．その結果，1 患者 (Subject No.： C*) 由来の PA/I38T 変異ウイルスは，ウイルス増殖初期である感染 24 時間後のウイルス力価の平均値が，その野生型ウイルスと比較して 1 $\log_{10}$ $TCID_{50}$ 以上低く，増殖性の低下を示した．しかし，その他の 2 患者 (Subject No.： A* 及び B*) 由来の PA/I38T 変異ウイルスは，それぞれの野生型のウイルス力価と同等であり，野生型ウイルスと同等の増殖性を示した (図 2.6.2.2-17).

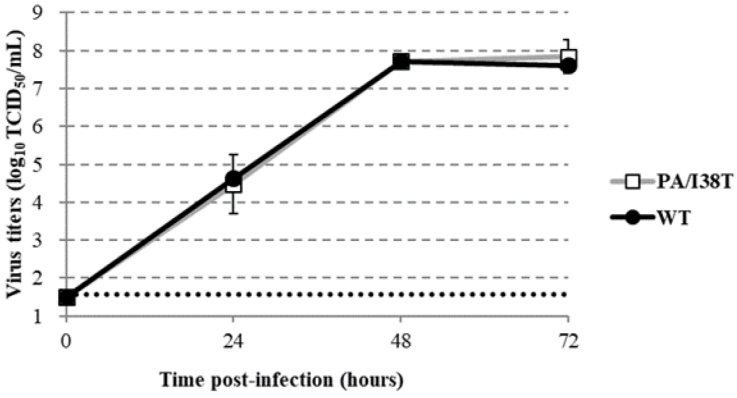
＊新薬承認情報提供時に置き換え

図 2.6.2.2-17　　ヒト鼻腔上皮由来の初代培養細胞における培養上清中のウイルス力価の推移

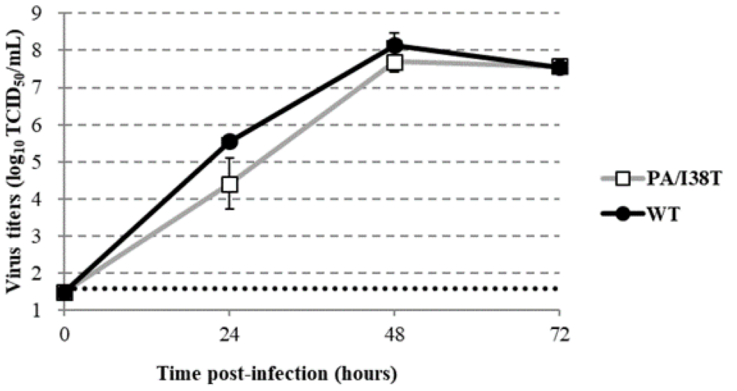
(A) Subject No.:　A*



(B) Subject No.:　B*



(C) Subject No.:　C*



WT = wild type
Each symbol represents the mean and standard deviation of triplicate experiments.
The lower limit of quantification of the virus titers was 1.57 $\log_{10}$ $TCID_{50}$/mL and indicated by a dashed line, and undetectable virus titers were defined as 1.50 $\log_{10}$ $TCID_{50}$/mL.

＊新薬承認情報提供時に置き換え

2.6.2.2.5.3　臨床で分離された PA/I38T 変異ウイルスの野生型ウイルス共存下における競合増殖性

評価資料 4.2.1.1-07
概要表 2.6.3.2.10

前項で増殖性を確認した 3 患者由来の野生型ウイルスと PA/I38T 変異ウイルスを用いて，それらの感染力価を指標に 1:1 で混合し，ヒト鼻腔上皮由来の初代培養細胞に共感染させ，48 時間後に回収した上清を再度細胞に感染させる操作を 3 回繰り返し継代培養した．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となった (表 2.6.2.2-2).

表 2.6.2.2-2　ヒト由来初代培養細胞における継代培養ごとの PA/I38T 変異の存在比率 (%)

Passage No.	Subject No.		
	A*	B*	C*
P0	35.9 ± 4.79	40.6 ± 0.04	45.1 ± 0.46
P1	18.6 ± 11.12	56.2 ± 10.69	11.5 ± 14.57
P2	15.6 ± 16.01	25.5 ± 0.88	6.1 ± 8.59
P3	1.4 ± 1.95	1.6 ± 2.31	0.8 ± 1.12

P = Passage
Each value represents the mean ± range of duplicate.
MucilAir human nasal epithelial cells were coinfected with clinically isolated wild type and PA/I38-substituted viruses at a ratio of 1 to 1 based on viral titers (P0). The culture supernatant was collected at 48 hours post infection, and fresh MucilAir human nasal epithelial cells were infected with the collected viruses, followed by repeating passages of the viruses in cell culture three times (P1 to P3).

2.6.2.2.5.4　フェレットにおける臨床で分離された PA/I38T 変異ウイルスの伝播性

評価資料 4.2.1.1-08
概要表 2.6.3.2.11，2.6.3.2.12

前項において，PA/I38 変異ウイルスをヒト由来初代培養細胞で継代培養し，PA/I38T 変異ウイルスの増殖性や野生型ウイルスとの競合増殖性を検討したところ，PA/I38T 変異はウイルスの増殖性を低下させる変異であり，野生型ウイルス共存下では PA/I38T 変異ウイルスの存在比率は継代するごとに減少し，野生型ウイルスが優勢になることが示された．本試験では，一対のフェレットにおける直接接触による伝播を 3 回繰り返し，PA/I38T 変異ウイルス及びその野生型ウイルスが伝播するごとに PA/I38T 変異ウイルスの存在比を検討し，野生型ウイルスとの競合下における PA/I38T 変異ウイルスの増殖性及び伝播性について評価した．

T0821 試験で A(H1N1)pdm09 型 PA/I38T 変異ウイルスが検出された患者及び T0831 試験で A(H3N2)型 PA/I38T 変異ウイルスが検出された患者について，それぞれバロキサビル 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投与後検体から分離した PA/I38T 変異ウイルスの混合比を変えて，A(H1N1)pdm09 型は計 10^5 $TCID_{50}$ のインフルエンザウイルスを，A(H3N2)

型は計 10^4 $TCID_{50}$ のインフルエンザウイルスをフェレット [ドナーフェレット (DF)] に経鼻接種し感染させた．野生型：変異株の混合比は，100:0，80:20，50:50，20:80，0:100 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．ウイルスを経鼻接種した 24 時間後にドナーのフェレットを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によってウイルスを伝播させた．RF1 に感染が確認されると DF との同居を止め，24 時間後に [レシピエントフェレット 2 (RF2)] と同居させた．RF2 は感染が確認されると，RF1 との同居を止め 24 時間後に [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，また野生型ウイルスと 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により解析した．

A(H3N2)型及び A(H1N1)pdm09 型について，野生型ウイルスと PA/I38T 変異ウイルスをそれぞれ単独感染 (混合比 100:0 及び 0:100) させ，ドナー及びレシピエントにおけるウイルス力価を測定した結果，全てのレシピエントから感染性のウイルスが検出された．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) は，A(H3N2)型の野生型ウイルスで 18.42，PA/I38T 変異ウイルスで 17.68，A(H1N1)pdm09 型の野生型ウイルスで 35.17，PA/I38T 変異ウイルスで 33.29 であった．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 (図 2.6.2.2-18)．また，PA/I38T 変異ウイルスを単独感染させ伝播させた場合，いずれのウイルス株でも野生型ウイルスが RF1，RF2 又は RF3 で一時的に検出限界付近 (5%) で検出されたものの，野生型に復帰することはなかった．以上の結果，A(H3N2)型及び A(H1N1)pdm09 型の PA/I38T 変異ウイルスは，単独で感染させると直接接触の伝播を 3 回繰り返すことができ，野生型と同様に伝播・増殖することが示された (図 2.6.2.2-19，図 2.6.2.2-20)．

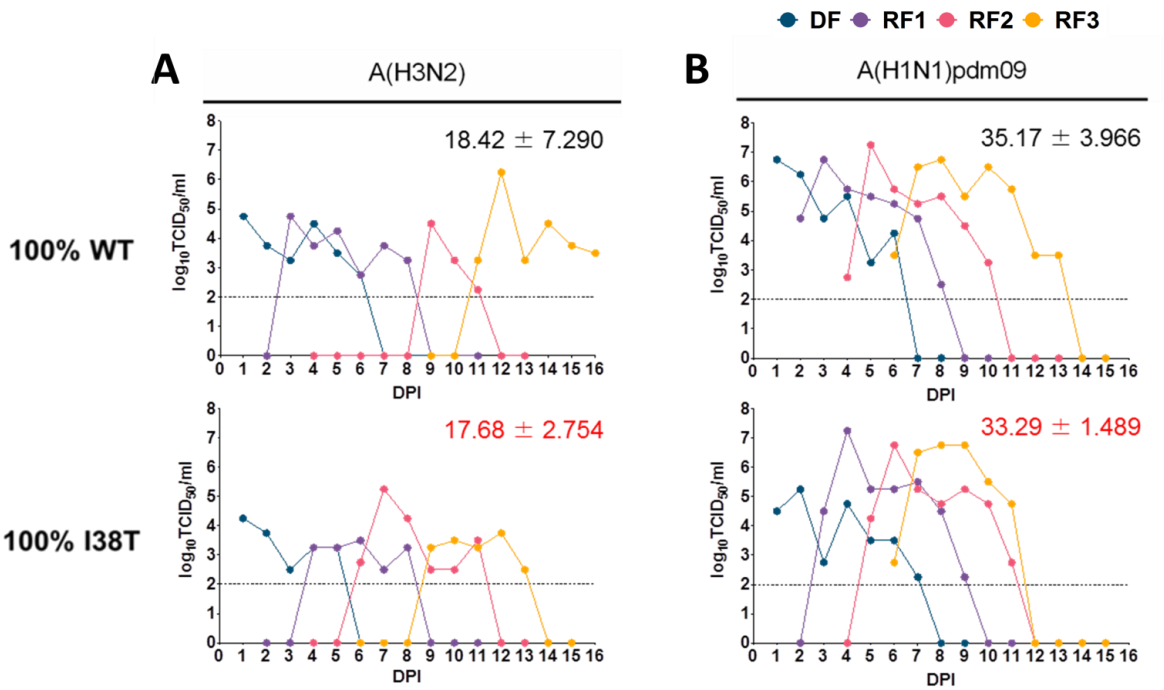
次に，A(H3N2)型の野生型ウイルス及び PA/I38T 変異ウイルスの混合比を変えて感染させ，DF と各レシピエントの鼻汁中の PA/I38T 変異ウイルスの存在比を測定した．80:20 の混合比のグループ及び 50:50 の混合比の 2 グループでは，最終的に RF3 で野生型ウイルスが優勢になった．20:80 の混合比のグループのみ，最終的に RF3 で PA/I38T 変異ウイルスが優勢になった (図 2.6.2.2-19)．各フェレットで最初のウイルス検出時から最後にウイルスが検出されるまでの期間にみられたフェレット内の PA/I38T 変異ウイルスの存在比率の変化量を解析し，フェレット内の PA/I38T 変異ウイルスの増殖性を評価した．その結果，PA/I38T 変異ウイルスは DF と RF1 で野生型ウイルスと競合して感染したが，その後 PA/I38T 変異ウイルスの割合は一定か，もしくは減少する傾向を示した．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 変異ウイルスは感染しなかった (図 2.6.2.2-21-A 及び図 2.6.2.2-19)．次に，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検討し，フェレット間の PA/I38T 変異ウイルスの伝播性を評価した．伝播前後の PA/I38T 変異ウイルスの存在比はほぼ一定であり，PA/I38T 変異ウイルスの存在比率の変化量に明確な傾向は認められなかった (図 2.6.2.2-21-C)．以上のことから，A(H3N2)型の PA/I38T 変異ウイルスは，野生型ウイルスと

の競合下において，フェレット間の伝播性は野生型と同等であり，フェレット内の増殖性は野生型ウイルスと比較して劣っていることが示唆された．

A(H1N1)pdm09 型の野生型ウイルス及び PA/I38T 変異ウイルスの混合比を変えて感染させ，DF と各レシピエントの鼻汁中の PA/I38T 変異ウイルスの存在比を測定した．80:20 の混合比のグループ及び 50:50 の混合比の 1 グループで，最終的に RF3 で野生型ウイルスが優勢になり，PA/I38T 変異ウイルスは検出限界以下となった．20:80 の混合比のグループと 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 (図 2.6.2.2-20)．フェレット内の PA/I38T 変異ウイルスの増殖性を評価した結果, 各レシピエントにおける PA/I38T 変異ウイルスの割合はほぼ一定であり，割合に変化があるレシピエントでも明確な傾向は認められなかった (図 2.6.2.2-21-B 及び図 2.6.2.2-20)．フェレット間の PA/I38T 変異ウイルスの伝播性を評価した結果，伝播後に PA/I38T 変異ウイルスの存在比が増加することはなく，DF から RF1 への伝播並びに RF1 から RF2 への伝播において PA/I38T 変異ウイルスの存在比の低下が認められた (図 2.6.2.2-21-D)．以上のことから，A(H1N1)pdm09 型の PA/I38T 変異ウイルスは，野生型ウイルスとの競合下においてフェレット内の増殖性は野生型と同等であるが，フェレット間の伝播性については野生型ウイルスと比較して劣っていることが示唆された．

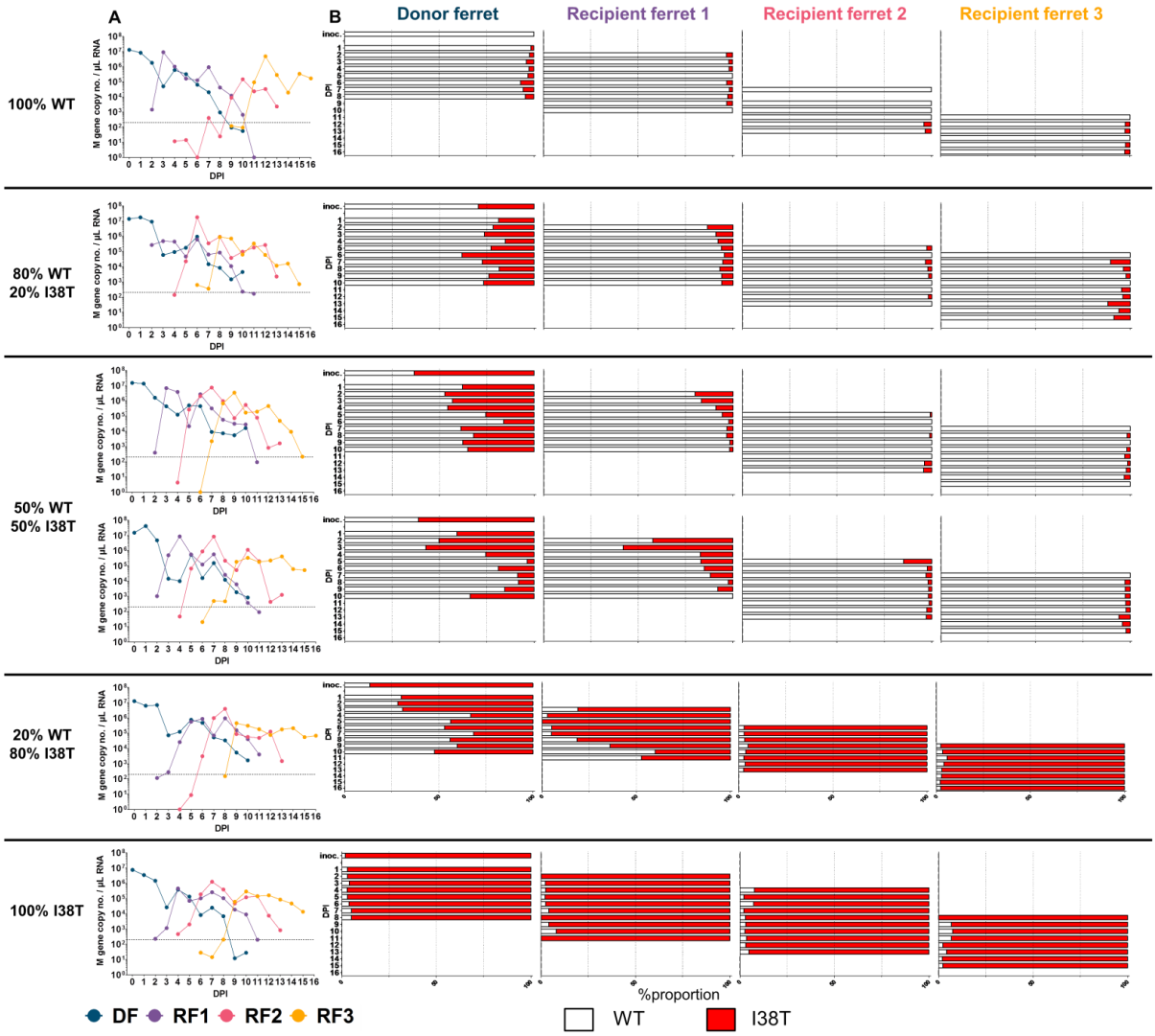
フェレット直接接触による伝播モデルでは，A(H3N2)型の PA/I38T 変異ウイルスの場合，野生型ウイルスとの競合下でフェレット内の増殖性が野生型ウイルスと比較して劣るため，また，A(H1N1)pdm09 型の PA/I38T 変異ウイルスの場合は，野生型ウイルスとの競合下でフェレット間の伝播性が野生型ウイルスと比較して劣るために，野生型ウイルスを PA/I38T 変異ウイルスより大きな割合で感染させた条件下では，フェレット間でウイルスが伝播するに従い PA/I38T 変異ウイルスの存在比が低下するものと考えられる．

図 2.6.2.2-18　　直接接触の伝播におけるフェレット鼻汁中の感染性ウイルス力価とウイルス力価の AUC 値



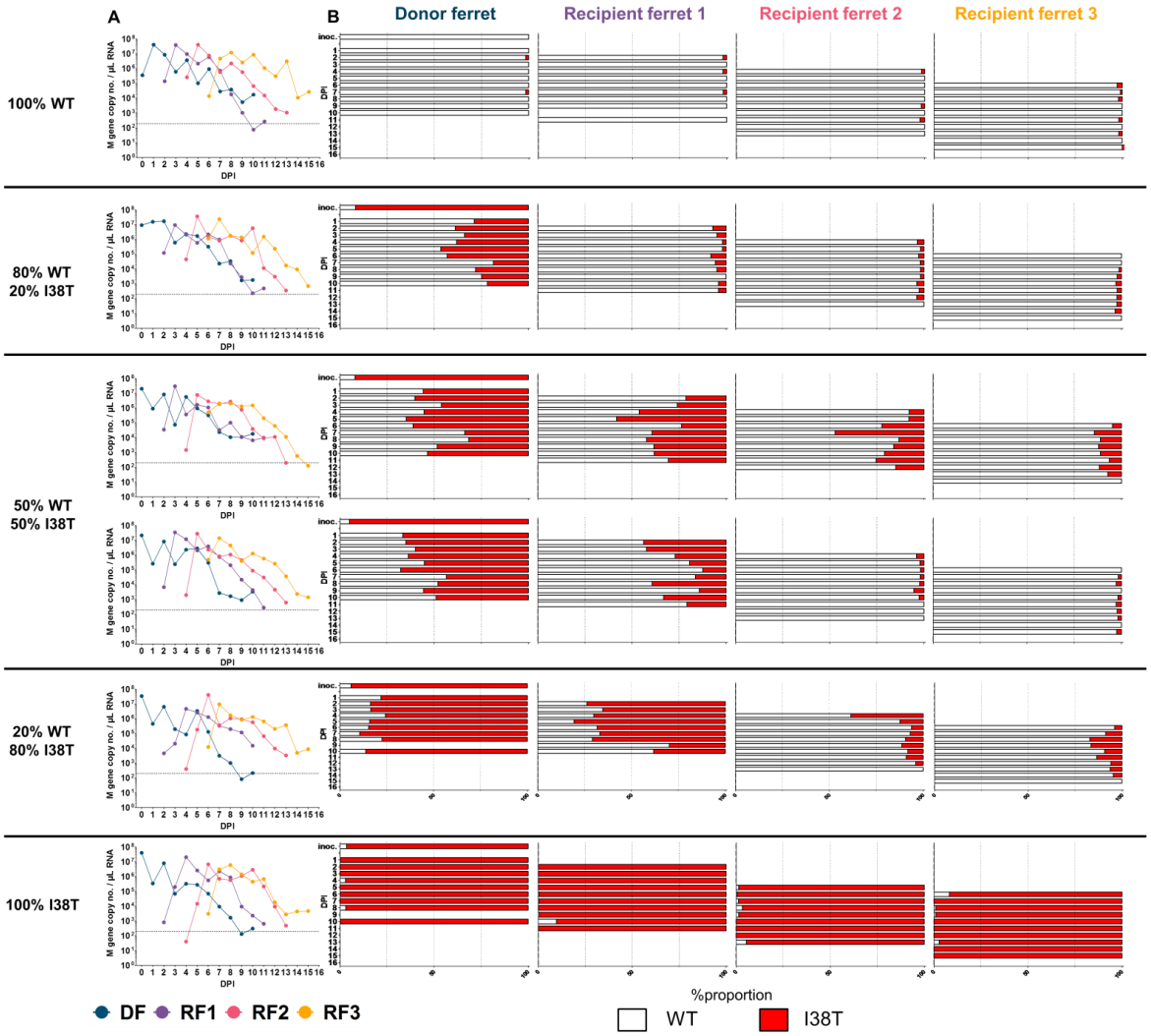
DPI = Day of post infection
ウイルス力価の AUC 値は平均値 ± 標準偏差を示す.

図 2.6.2.2-19　　A(H3N2)型ウイルス感染によるウイルス RNA 量 (A) 及び野生型ウイルスと PA/I38T 変異ウイルスの存在比率 (B)



(A) Viral RNA was quantified by number of M gene copies (influenza A) per µL of total RNA. Samples below 200 M gene copies/µL RNA (y-axis dotted line) were not considered for pyrosequencing analysis. (B) The relative proportion of virus encoding WT PA (white bars) and PA/I38T (red bars) in each nasal wash sample was determined by pyrosequencing. 0 DPI, inoc.: inoculum.
DPI = Day of post infection
WT = wild type

図 2.6.2.2-20　　A(H1N1)pdm09 型ウイルス感染によるウイルス RNA 量 (A) 及び野生型ウイルスと PA/I38T 変異ウイルスの存在比率 (B)



(A) Viral RNA was quantified by number of M gene copies (influenza A) per µL of total RNA. Points below 200 M gene copies/µL RNA (y-axis dotted line) were not considered for pyrosequencing analysis. (B) The relative proportion of virus encoding WT PA (white bars) and PA/I38T (red bars) in each nasal wash sample was determined by pyrosequencing. 0 DPI, inoc.: inoculum.
DPI = Day of post infection
WT = wild type

図 2.6.2.2-21　　パイロシークエンシング法によるフェレット鼻汁中の PA/I38T 変異ウイルス存在比率の変化

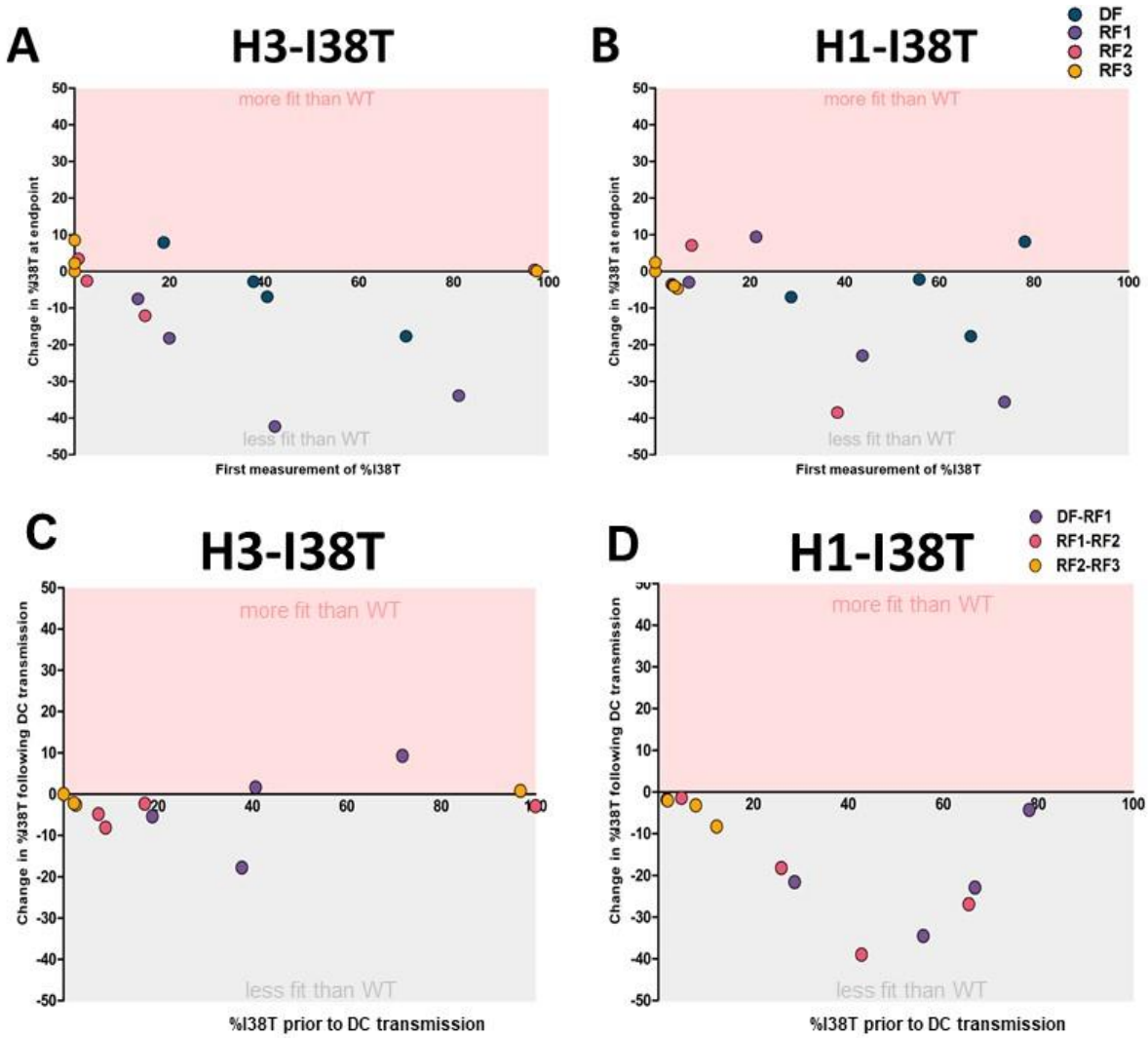


図 A 及び図 B：A(H3N2)型 PA/I38T 変異ウイルス及び A(H1N1)pdm09 型 PA/I38T 変異ウイルスのフェレット内における存在比率の変化．横軸は個体ごとの最初にウイルスが検出された時の PA/I38T 変異ウイルスの存在比率，縦軸は最初にウイルスが検出された時から最後にウイルスが検出された時までの PA/I38T 変異ウイルスの存在比率の変化量を示す．
図 C 及び図 D：A(H3N2)型 PA/I38T 変異ウイルス及び A(H1N1)pdm09 型 PA/I38T 変異ウイルスのフェレット間の PA/I38T 変異ウイルスの存在比率の変化．横軸は，個体間ごとの伝播前の PA/I38T 変異ウイルスの存在比率，縦軸は，伝播前から伝播後の PA/I38T 変異ウイルスの存在比率の変化量を示す．

2.6.2.2.5.5　　PA/I201T が PA/I38 変異ウイルスの増殖性に与える影響

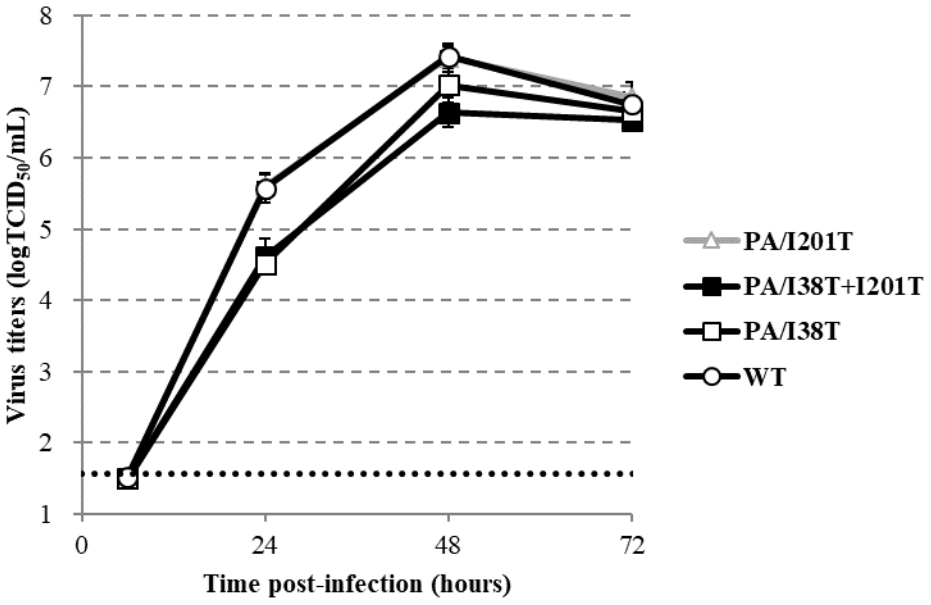
評価資料 4.2.1.1-09
概要表 2.6.3.2.13

T0831 試験及び小児患者対象の顆粒剤第 3 相試験 (以下，T0833 試験) の A(H3N2)型感染患者で，バロキサビル マルボキシル投与後に PA/I201T が PA/I38 変異と同時に検出されたことから，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した．リバースジェネティクス法により，A(H3N2)型の rgA/Victoria/3/75 ウイルスに，PA/I38T，PA/I38M 又は 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 と PA/I201T

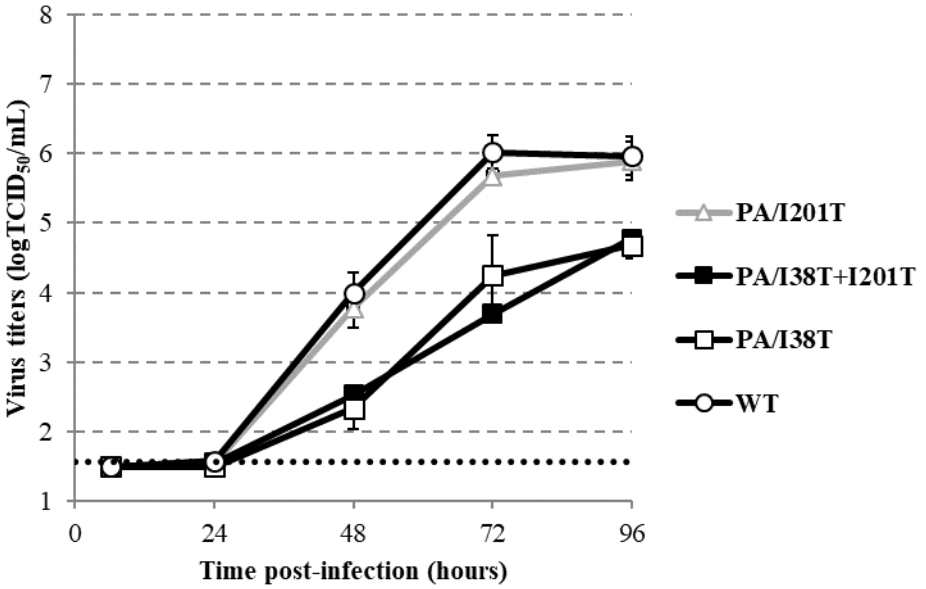
又は PA/I38M と PA/I201T を導入した遺伝子組換えウイルスを作製し，MDCK 細胞又は RPMI2650 細胞に感染させ，それぞれの感染後 6 ～ 72 時間又は 96 時間までウイルス力価を測定した．その結果，MDCK 細胞及び RPMI2650 細胞培養上清中の PA/I38T 変異ウイルス又は PA/I38M 変異ウイルスの力価は，野生型ウイルスの力価に比べて低下傾向を示したが，PA/I201T 変異ウイルスの力価は，野生型ウイルスの力価とほぼ同等であった (図 2.6.2.2-22, 図 2.6.2.2-23)．また，PA/I201T を導入した PA/I38T 変異ウイルス又は 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．以上の結果から，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．

図 2.6.2.2-22 PA/I201T 変異ウイルス，PA/I201T を導入した PA/I38T 変異ウイルス，PA/I38T 変異ウイルス及び野生型ウイルスの培養細胞上清中のウイルス力価の推移

(A) MDCK cells



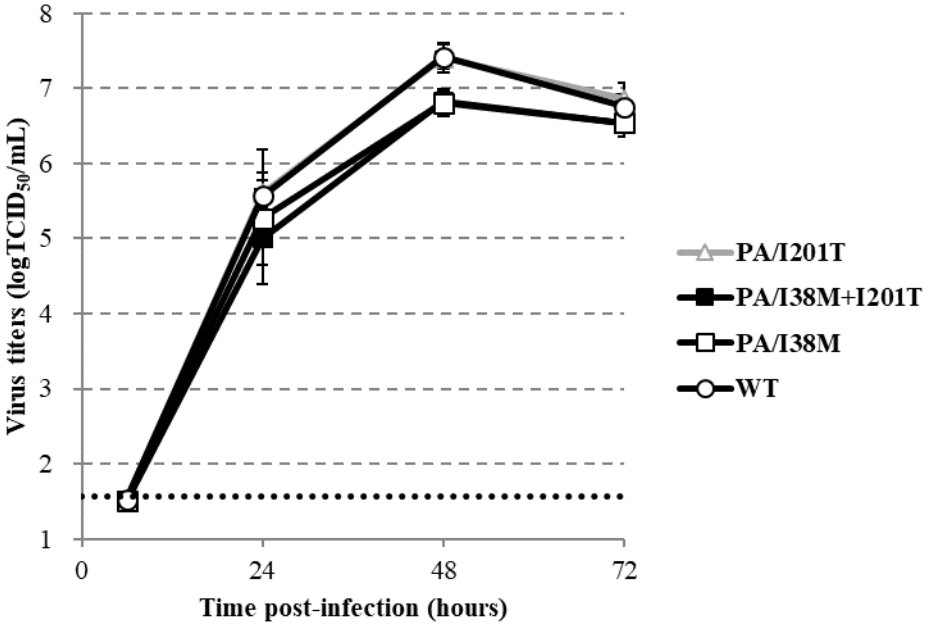
(B) RPMI2650 cells



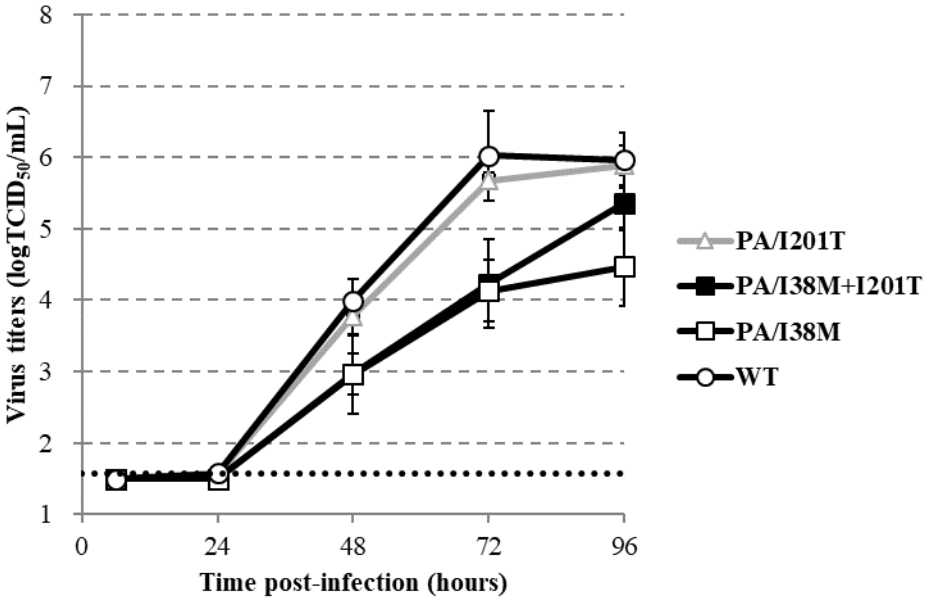
WT = wild type; $TCID_{50}$ = tissue culture infectious dose 50
Each symbol represents the mean and standard deviation of triplicate experiments.
The lower limit of quantification of the virus titers was 1.57 $\log_{10}$ $TCID_{50}$/mL and indicated by a dashed line, and undetectable virus titers were defined as 1.50 $\log_{10}$ $TCID_{50}$/mL.

図 2.6.2.2-23　PA/I201T 変異ウイルス，PA/I201T を導入した PA/I38M 変異ウイルス，PA/I38M 変異ウイルス及び野生型ウイルスの培養細胞上清中のウイルス力価の推移

(A) MDCK cells



(B) RPMI2650 cells



Each symbol represents the mean and standard deviation of triplicate experiments.
The lower limit of quantification of the virus titers was 1.57 $\log_{10}$ $TCID_{50}$/mL and indicated by a dashed line, and undetectable virus titers were defined as 1.50 $\log_{10}$ $TCID_{50}$/mL.

2.6.2.2.5.6　　PA/E23K 変異ウイルスの増殖性

評価資料 4.2.1.1-10

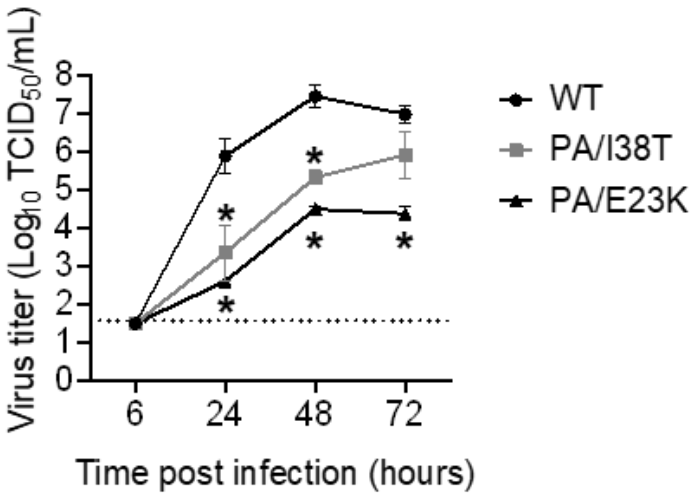
概要表 2.6.3.2.14

T0821 試験及び T0834 試験で認められた A(H1N1)型及び A(H3N2)型の 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した．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とその野生型ウイルスを MDCK 細胞及び RPMI2650 細胞に感染させ，それぞれ感染後 6～72 時間及び 6～96 時間に培養上清を回収してウイルス力価を測定した．その結果，PA/I38T 変異 A 型インフルエンザウイルス [A(H1N1)型：rgA/WSN/33-PA/E23K 及び A(H3N2)型：rgA/Victoria/3/75-PA/E23K] の力価は，それぞれの野生型ウイルス [A(H1N1)型 : rgA/WSN/33 及び A(H3N2)型 : rgA/Victoria/3/75] の力価と比べて，有意に低値だった (図 2.6.2.2-24，図 2.6.2.2-25)．また，PA/I38T 変異 B 型インフルエンザウイルス (rgB/Maryland/1/59-PA/E23K) の力価は，MDCK 細胞では感染後 24 時間，RPMI2650 細胞では感染後 24～48 時間のウイルス増殖初期において野生型ウイルス (rgB/Maryland/1/59) の力価と同程度であったが，MDCK 細胞では感染後 48～72 時間，RPMI2650 細胞では感染後 72～96 時間の増殖ピーク以降の時点の力価は，その野生型ウイルス (rgB/Maryland/1/59) と比べて有意に低値であった (図 2.6.2.2-26).

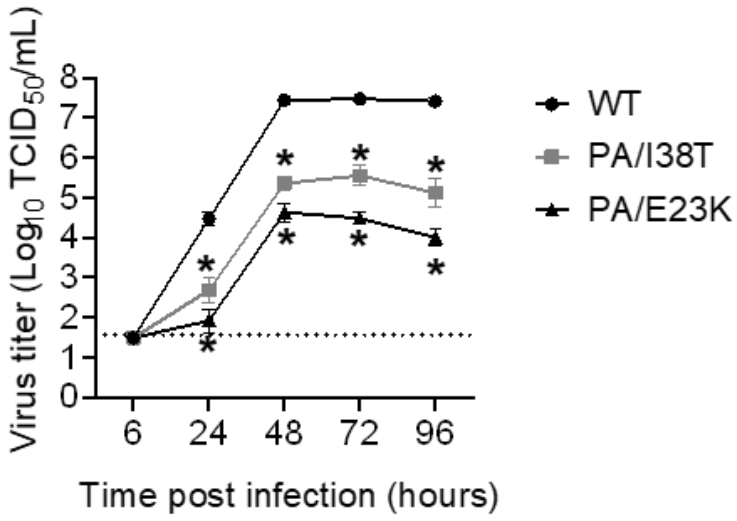
したがって，PA/E23K 変異ウイルスの増殖性はそれらの野生型ウイルスと比べて低下する傾向にあると考えられる．

図 2.6.2.2-24　　PA/E23K 変異を有する rgA/WSN/33 (H1N1) ウイルスの培養細胞上清中のウイルス力価の推移

(A) MDCK cells



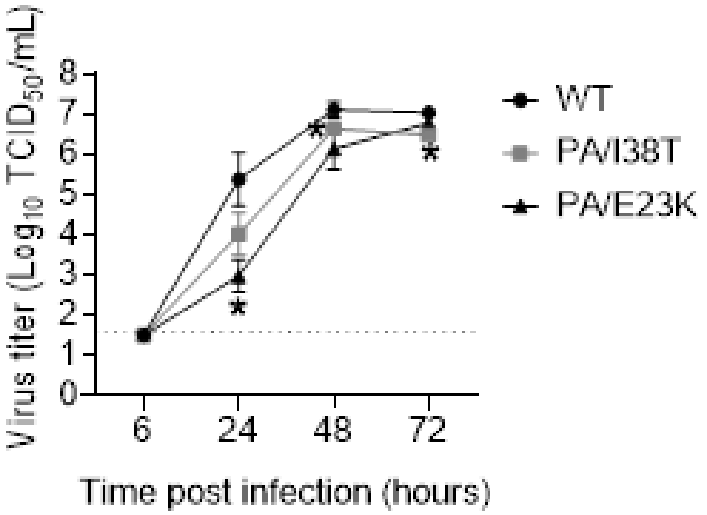
(B) RPMI2650 cells



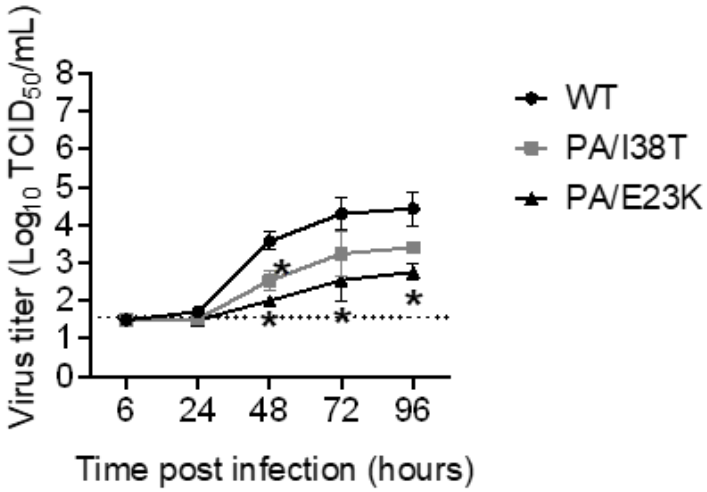
WT = wild type; $TCID_{50}$ = tissue culture infectious dose 50.
Each symbol represents the mean and standard deviation of triplicate experiments.
The lower limit of quantification of the virus titers was 1.57 $\log_{10}$ $TCID_{50}$/mL and indicated by a dashed line, and undetectable virus titers were defined as 1.50 $\log_{10}$ $TCID_{50}$/mL.
*P < 0.05 to WT by Welch's *t*-test

図 2.6.2.2-25　　PA/E23K 変異を有する rgA/Victoria/3/75 (H3N2) ウイルスの培養細胞上清中のウイルス力価の推移

(A) MDCK cells



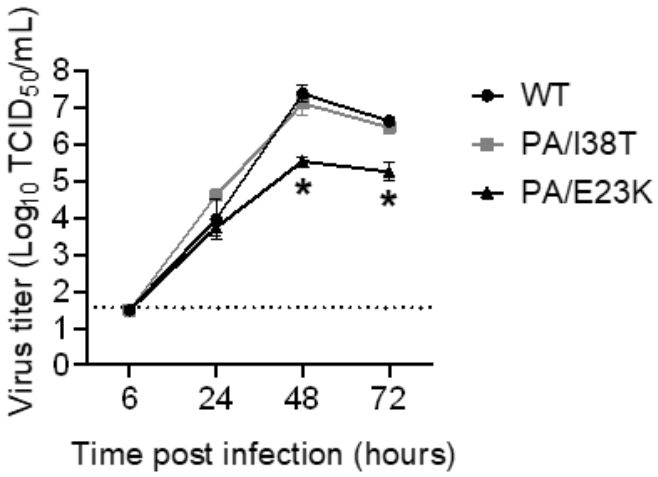
(B) RPMI2650 cells



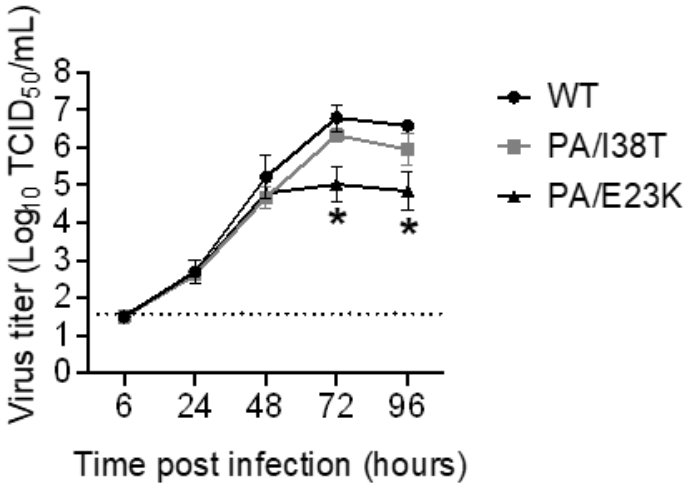
Each symbol represents the mean and standard deviation of triplicate experiments.
The lower limit of quantification of the virus titers was 1.57 $\log_{10}$ $TCID_{50}$/mL and indicated by a dashed line, and undetectable virus titers were defined as 1.50 $\log_{10}$ $TCID_{50}$/mL.
*$P < 0.05$ to WT by Welch's *t*-test

図 2.6.2.2-26　　PA/E23K 変異を有する rgB/Maryland/1/59 ウイルスの培養細胞上清中のウイルス力価の推移

(A) MDCK cells



(B) RPMI2650 cells



Each symbol represents the mean and standard deviation of triplicate experiments.
The lower limit of quantification of the virus titers was 1.57 $\log_{10}$ $TCID_{50}$/mL and indicated by a dashed line, and undetectable virus titers were defined as 1.50 $\log_{10}$ $TCID_{50}$/mL.
*$P < 0.05$ to WT by Welch's *t*-test

2.6.2.3　　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.

2.6.2.4　　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.

2.6.2.5　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.

2.6.2.6　考察及び結論

2.6.2.6.1　マウスモデルにおける S-033447 の感染前投与による有効性

非臨床でのインフルエンザウイルス感染前の S-033447 の予防的な投与による有効性について，血漿中 S-033447 を一定期間維持することができる S-033447 懸濁液のマウスへの皮下投与により評価した．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 時間後に致死量の A/PR/8/34 株を接種したいずれの条件においても，用量依存的な体重減少抑制効果が認められ, 媒体対照群に対して生存期間が有意に延長した. また, 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 時間後に致死量の B/Hong Kong/5/72 株を接種したいずれの条件においても，用量依存的な体重減少抑制効果が認められ，1.6 mg/kg 投与 (48 時間後にウイルス接種) を除く全ての S-033447 投与群において，媒体対照群に対して生存期間が有意に延長した.

A 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共通して設定した 1.6 mg/kg の用量の S-033447 懸濁液の皮下投与による有効性の比較では，A/PR/8/34 株感染に対しては，48，72 及び 96 時間後にウイルスを接種したいずれの条件においても，感染 28 日後における生存率は 100%を示したのに対し，B/Hong Kong/5/72 株感染に対しては，48，72 及び 96 時間後にウイルスを接種したときの感染 28 日後における生存率は，それぞれ，40%，50%及び 50%であり，S-033447 は，B/Hong Kong/5/72 株と比べて，A/PR/8/34 株感染に対して，より高い有効性を示した．また，上記の A/PR/8/34 株及び B/Hong Kong/5/72 株感染マウスモデルにおいて，媒体対照群に対して有意な生存期間の延長効果が認められたときの，感染 24 時間後の血漿中 S-033447 濃度は，それぞれ 0.444 及び 2.35 ng/mL 以上であり，S-033447 は，B/Hong Kong/5/72 株と比べて，A/PR/8/34 株感染に対して，より低い血漿中 S-033447 濃度で有効性を示した．一方，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，*in vitro* ウイルス増殖阻害活性の評価において，A/PR/8/34 株及び B/Hong Kong/5/72 株に対する S-033447 のウイルス放出抑制効果 [90%有効濃度 (EC_{90})] は, それぞれ 0.79 及び 2.2 nmol/L (それぞれ 1.58 及び 4.4 ng/mL) であった [2]．これらのことから，マウスへの S-033447 懸濁液のウイルス感染前投与により，S-033447 は *in vitro* ウイルス増殖阻害活性に応じた肺内ウイルス増殖抑制作用を示すものと考えられる.

2.6.2.2.4 項に示すとおり，マウスに S-033447 懸濁液を単回皮下投与し，一定時間経過後に A 型又は B 型の季節性インフルエンザウイルスを接種することで，感染 1 日後より，媒体対照群と比べて有意に低い肺内ウイルス力価を示したことから，S-033447 は，投与後速やかに肺内ウイルス増殖を抑制したものと考えられる．また，感染 2 日後以降においても，S-033447 投与群では，媒体対照群に対して，血漿中 S-033447 濃度に依存して肺内ウイルス力価の上昇が持続的に抑制され，感染 10 日後には肺内ウイルス力価は定量下限に達した．一方で，媒体対照群においては，感染 8 日後まで，S-033447 投与群と比べて肺内ウイルス力価は高い値で推移し，定量下限に達することなく感染 10 日後までに全例が死亡したため，感染 10 日後の媒体対照群の肺

内ウイルス力価は測定することができなかった．これらの結果から，マウスへの S-033447 懸濁液のインフルエンザウイルス感染前の単回皮下投与により，S-033447 は A 型及び B 型の季節性インフルエンザウイルス感染に伴うウイルス増殖を持続的に抑制することで，致死及び体重減少を抑制し，生存期間の延長効果を発揮するものと考えられる．

2.6.2.6.2　　インフルエンザウイルス臨床株感染に対する有効性

In vitro ウイルス増殖阻害活性の評価において，S-033447 は，2006 年から 2013 年の間に日本国内で分離された A 型 (5 株) 及び B 型 (2 株) の季節性インフルエンザウイルス臨床株に対して，ウイルス放出抑制効果 [EC_{90}：それぞれ 0.63～0.95 nmol/L (1.26～1.90 ng/mL) 及び 6.1～6.5 nmol/L (12.2～13.0 ng/mL)] を発揮することが示されている [2]．これらの季節性インフルエンザウイルス臨床株に対する EC_{90} は，季節性インフルエンザウイルス実験室株 (A/PR/8/34 株及び B/Hong Kong/5/72 株) に対する EC_{90} [それぞれ 0.79 及び 2.2 nmol/L (それぞれ 1.58 及び 4.4 ng/mL)] と同程度であった．また，S-033447 は，2015 年から 2017 年の間にアジア太平洋地域で分離された A 型 (1 株) 及び B 型 (3 株) の季節性インフルエンザウイルス臨床株に対しても，同程度のウイルス放出抑制効果 [50%有効濃度 (EC_{50})：それぞれ 0.6 nmol/L (1.2 ng/mL) 及び 1.7～4.1 nmol/L (3.4～8.2 ng/mL)] を示すことが報告されている [3]．

さらに，細胞へのウイルス感染後のフォーカス形成を指標とした *in vitro* ウイルス増殖阻害活性の評価において，S-033447 は，2017 年から 2018 年に日本国内で分離された A 型 H1N1 亜型 (114 株) 及び A 型 H3N2 亜型 (76 株) の季節性インフルエンザウイルス臨床株に対して，フォーカス形成抑制効果 [50%阻害濃度 (IC_{50})：それぞれ平均 0.28 nmol/L (0.56 ng/mL) 及び平均 0.16 nmol/L (0.32 ng/mL)] を示し，A/PR/8/34 株に対しても同程度の活性 [IC_{50}：0.17 nmol/L (0.34 ng/mL)] を発揮することが報告されている [4]．

これらのことから，ヒトにおける季節性インフルエンザウイルス臨床株感染に対しても，バロキサビル マルボキシルの予防投与により，感染を引き起こす時期に，ウイルス増殖を抑制するために必要な血漿中 S-033447 濃度を維持していれば，インフルエンザ感染症の発症に対する予防効果が期待できる．

2.6.2.6.3　　PA/I38 変異ウイルスの野生型ウイルス共存下における競合増殖性

アミノ酸変異により薬剤感受性が低下したインフルエンザウイルスが流行する可能性を推察する非臨床研究として，その変異ウイルスと野生型ウイルスを培養細胞に共感染させ，ウイルス増殖に伴う変異ウイルスの存在比率の推移をモニターする方法が知られている [5]．例えば，ウイルス増殖に伴って変異ウイルスの存在比率が顕著に低下すれば，その変異ウイルスが広く流行する可能性は低いことが推察される．今回，PA/I38T を有する臨床分離株を，その野生型ウイルスと混合し，ヒト由来細胞に感染させて，複数回の継代培養後に変異ウイルスと野生型ウイルスの存在比率を評価した．その結果，PA/I38T 変異ウイルスの存在比率は，継代培養に従って徐々に低下し，3 回継代後には 1%程度になった．この傾向は，単一感染条件で示す増殖性がその野生型と同等である PA/I38T 変異ウイルスにおいても同様であり，複数回の継代培養で野生型ウイルスが優勢となった．このように，今回試験した PA/I38 変異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，米国 CDC (Centers for Disease Control and Prevention) の報告でも，PA/I38 変異ウイルスは，培養細胞やフェレットモデルにおいて増殖性又は競合増殖性が劣ることが確認されており [6]，2018/19 シーズンに実施されたバロキサビル マルボキシルの予防投与試験 (T0834 試験) においても，本剤による治療を受けた初発患者からプラセボ投与群の被験者へ PA/I38 変異ウイルスの伝播は認められなかった [16]．一方で，国立感染症研究所，東京大学医科学研究所及びカナダケベック大学の非臨床研究によれば，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において野生型と同等の増殖性や病原性を示すこと，フェレットにおいては，飛沫を介して PA/I38 変異ウイルスが伝播することも確認されている [7, 8, 9, 10]．また，2018/2019 シーズンの国立感染症研究所及び東京大学医科学研究所の報告では，バロキサビル マルボキシルが投与されていない 8 例及び 2 例の患者から PA/I38 変異が検出されており [7, 8, 9, 11]，2018/2019 シーズンの特定使用成績調査 (感受性調査) ではバロキサビル マルボキシルが投与されていない 5 例から PA/I38 変異が検出されている [第 3 回安全性定期報告，添付資料 5.3.6-03 参照]．2019/2020 シーズンの国立感染症研究所の報告では，バロキサビル マルボキシルが投与されていない 1 例の患者から PA/E23K 変異が検出されており [14]，2019/2020 シーズンの特定使用成績調査 (感受性調査) ではバロキサビル マルボキシルが投与されていない 160 例のうち 1 例から PA/I38T 変異が検出されている [第 4 回安全性定期報告，添付資料 5.3.6-04 参照]．上記の報告からも現時点では散発的と考えられるものの，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．

2.6.2.6.4　PA/I201T が PA/I38 変異ウイルスの増殖性に与える影響

変異ウイルスの増殖性に関する特性に変化を及ぼすアミノ酸変異は相補変異と呼ばれ，この変異がウイルスに導入されると，そのウイルスは野生型と同等もしくはそれ以上の増殖性を有する薬剤感受性低下ウイルスになることが報告されている [12, 13]．これまで，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た検討により，A(H3N2)型の PA/I38T 変異ウイルス及び 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することを確認している [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]．T0831 試験及び T0833 試験の A(H3N2)型感染患者から，バロキサビル マルボキシル投与後に PA/I201T が PA/I38 変異と同時に検出されたため，PA/I201T が PA/I38T や PAI38M の相補変異であるか否か，遺伝子組換えウイルスを用いて検証した．その結果，A(H3N2)型の PA/I38T 変異ウイルス又は PA/I38M 変異ウイルスに PA/I201T を導入したウイルスの増殖性は，PA/I201T を導入していない PA/I38T 変異ウイルス及び PA/I38M 変異ウイルスの増殖性とほぼ同等であった．したがって，本試験条件下で評価した PA/I201T は，ウイルスの増殖性を低下させる PA/I38 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．

2.6.2.6.5　　PA/E23K 変異ウイルスの増殖性

PA/E23K 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 (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 [15]．これらのことを踏まえ，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れらの野生型ウイルスを用いて PA/E23K 変異ウイルスの増殖性を検討した結果，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．

PA/I38 変異ウイルスは，マウスやハムスターを用いた動物モデルにおいて野生型と同等の増殖性や病原性を示すことが文献報告されている [9, 10]．一方で，PA/E23K 変異による病原性に対する影響を評価した非臨床試験や文献報告は認められないが，野生型ウイルスと比べて増殖性が低下する傾向にあることから，病原性についても，野生型株と比べて減弱すると推察される．

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. Uehara T, Hayden FG, Kawaguchi K, et al. Treatment-emergent influenza variant viruses with reduced baloxavir susceptibility: Impact on clinical and virologic outcomes in uncomplicated influenza. J Infect Dis 2020;221(3):346-55.
2. Noshi T, Kitano M, Taniguchi K, et al. In vitro characterization of baloxavir acid, a first-in-class cap-dependent endonuclease inhibitor of the influenza virus polymerase PA subunit. Antiviral Res 2018;160:109-17.
3. Koszalka P, Tilmanis D, Roe M, Vijaykrishna D, Hurt AC. Baloxavir marboxil susceptibility of influenza viruses from the Asia-Pacific, 2012-2018. Antiviral Res 2019;164:91-6.
4. Takashita E, Morita H, Ogawa R, et al. Susceptibility of Influenza Viruses to the Novel Cap-Dependent Endonuclease Inhibitor Baloxavir Marboxil. Front Microbiol 2018;9:3026.
5. Takashita E, Kiso M, Fujisaki S et al. Characterization of a large cluster of influenza A(H1N1)pdm09 viruses cross-resistant to oseltamivir and peramivir during the 2013-2014 influenza season in Japan. Antimicrob Agents Chemother 2015;59(5):2607-17.
6. Chesnokov A, Patel MC, Mishin VP, et al. Replicative fitness of seasonal influenza A viruses with decreased susceptibility to baloxavir. J Infect Dis 2020;221:367-71.
7. 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.

8. 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.
9. 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.
10. 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.
11. 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 2019 年 11 月 26 日，2019/2020 シーズン (データ更新日：2019 年 11 月 26 日)，表 1．抗インフルエンザ薬耐性株検出情報 [A(H1N1)pdm09, A(H3N2). B]．http://www.nih.go.jp/niid/ja/influ-resist.html，Accessed Dec 16, 2019.
12. Goldhill DH, te Velthuis AJW, Fletcher RA, et al. The mechanism of resistance to favipiravir in influenza. Proc Natl Acad Sci USA 2018;115(45):11613-8.
13. Wu NC, Young AP, Dandekar S, et al. Systematic identification of H274Y compensatory mutations in influenza A virus neuraminidase by high-throughput screening. J Virol 2013;87(2):1193-9.
14. 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.
15. 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.
16. Ikematsu H, Hayden FG, Kawaguchi K, et al. Baloxavir Marboxil for prophylaxis against influenza in household cwontacts. N Engl J Med 2020;383:309-20.

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)

2.6 非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.3 薬理試験概要表

塩野義製薬株式会社

目次

略号及び用語定義一覧表 3
2.6.3 薬理試験概要表 4
2.6.3.1 薬理試験：一覧表 4
2.6.3.2 効力を裏付ける試験 6
2.6.3.2.1 マウスにおける血漿中 S-033447 濃度測定法と S-033447 懸濁液の皮下投与時の血漿中 S-033447 濃度 6
2.6.3.2.2 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-033447 の感染前投与による致死率改善効果 7
2.6.3.2.3 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-033447 の感染前投与による体重減少抑制効果 9
2.6.3.2.4 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-033447 の感染前投与による致死率改善効果 10
2.6.3.2.5 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-033447 の感染前投与による体重減少抑制効果 12
2.6.3.2.6 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-033447 の感染前投与による肺内ウイルス増殖抑制効果 13
2.6.3.2.7 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-033447 の感染前投与による肺内ウイルス増殖抑制効果 14
2.6.3.2.8 PA/I38 変異ウイルスの野生型ウイルス共存下における競合増殖性 15
2.6.3.2.9 臨床で分離された PA/I38 変異ウイルスの増殖性 16
2.6.3.2.10 臨床で分離された PA/I38 変異ウイルスの野生型ウイルス共存下における競合増殖性 17
2.6.3.2.11 フェレットにおける臨床で分離された A(H3N2)型 PA/I38T 変異ウイルスの伝播性 18
2.6.3.2.12 フェレットにおける臨床で分離された A(H1N1) pdm09 型 PA/I38T 変異ウイルスの伝播性 24
2.6.3.2.13 PA/I201T が PA/I38 変異ウイルスの増殖性に与える影響 30
2.6.3.2.14 PA/E23K 変異ウイルスの増殖性 31
2.6.3.3 副次的薬理試験 33
2.6.3.4 安全性薬理試験 33
2.6.3.5 薬力学的薬物相互作用 33

略号及び用語定義一覧表

略号	英語
ANOVA	analysis of variance
LLOQ	lower limit of quantification
MC	methylcellulose aqueous solution
MDCK	Madin-Darby canine kidney
SD	standard deviation
S-033447	active form of baloxavir marboxil
$TCID_{50}$	50% tissue culture infectious dose

2.6.3 薬理試験概要表

2.6.3.1 薬理試験：一覧表

Test Article: S-033447

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Study Number	Location in CTD
Primary Pharmacodynamics					
Method for Determination of S-033447 in Mouse Plasma and Plasma Concentration of S-033447 after Single Subcutaneous Administration	Mice	S-033447: Subcutaneous, Single	Shionogi & Co., Ltd.	S-033188-EB-301-N	4.2.1.1-01
Prophylactic Effect of S-033447 against Lethal Infection with Influenza A Virus in Mice	Mice	S-033447: Subcutaneous, Single	Shionogi & Co., Ltd.	S-033188-EB-301-N	4.2.1.1-01
Prophylactic Effect of S-033447 against Lethal Infection with Influenza B Virus in Mice	Mice	S-033447: Subcutaneous, Single	Shionogi & Co., Ltd.	S-033188-EB-303-N	4.2.1.1-02
Inhibitory Effect of Prophylactic Treatment with S-033447 on Virus Replication in Mice Lethally Infected with Influenza A Virus	Mice	S-033447: Subcutaneous, Single	Shionogi & Co., Ltd.	S-033188-EB-347-N	4.2.1.1-03
Inhibitory Effect of Prophylactic Treatment with S-033447 on Virus Replication in Mice Lethally Infected with Influenza B Virus	Mice	S-033447: Subcutaneous, Single	Shionogi & Co., Ltd.	S-033188-EB-348-N	4.2.1.1-04
Competitive Fitness of Reverse Genetics-derived Influenza Viruses with Amino Acid Substitutions in Cultured Cells	MDCK cells [canine kidney-derived cells] infected with influenza A or B virus laboratory strains	In vitro	Shionogi & Co., Ltd.	S-033188-EB-337-N	4.2.1.1-05
Replicative Capacity of Influenza Virus derived from Patients in S-033188 Clinical Study in Primary Human Nasal Epithelial Cells	MucilAir human nasal epithelial cells infected with influenza A(H3N2) viruses derived from swab samples in Phase 3 study	In vitro	Shionogi & Co., Ltd.	S-033188-EB-345-N	4.2.1.1-06
Competitive Fitness of Influenza Virus derived from Patients in S-033188 Clinical Study in Primary Human Nasal Epithelial Cells	MucilAir human nasal epithelial cells infected with influenza	In vitro	Shionogi & Co., Ltd.	S-033188-EB-346-N	4.2.1.1-07

	A(H3N2) viruses derived from swab samples in Phase 3 study				
Transmission of the Influenza Virus with Reduced Susceptibility to S-033447 derived from Patients in S-033188 Clinical Study	Ferrets A(H3N2) viruses isolated from swab samples in Phase 3 study A(H1N1)pdm09 viruses isolated from swab samples in Phase 2 study	N/A	[redacted]	S-033188-EF-328-N	4.2.1.1-08
Replicative Capacity of Reverse Genetics-derived Influenza Viruses with Amino Acid Substitutions in Cultured Cells Effects of PA/I201T Substitution on Replicative Capacity of PA/I38 Substitution Virus	MDCK cells and RPMI2650 cells [human nasal squamous cell carcinoma-derived cells] infected with influenza A virus laboratory strains	In vitro	Shionogi & Co., Ltd.	S-033188-EB-339-N	4.2.1.1-09
Replicative Capacity of Reverse Genetics-derived Influenza Viruses with PA/E23K Substitutions in Cultured Cells	MDCK cells and RPMI2650 cells infected with influenza A or B virus laboratory strains	In vitro	Shionogi & Co., Ltd.	S-033188-EB-355-N	4.2.1.1-10

Active form of baloxavir marboxil is expressed as S-033447.
MDCK = Madin-Darby canine kidney; PA = polymerase acidic protein; PA/I201T = isoleucine-to-threonine substitution at amino acid position 201 in polymerase acidic protein; PA/E23K = glutamic acid-to-lysine substitution at amino acid position 23 in polymerase acidic protein
PA/I38 = isoleucine at amino acid position 38 in polymerase acidic protein
N/A = not applicable

2.6.3.2 効力を裏付ける試験

2.6.3.2.1 マウスにおける血漿中 S-033447 濃度測定法と S-033447 懸濁液の皮下投与時の血漿中 S-033447 濃度

Determination method for the concentration of S-033447 in mouse plasma

Test Article: S-033447

Test Site	Shionogi & Co., Ltd.	
Matrix	Mouse plasma (Anticoagulant: heparin sodium)	
Analytical System	LC/MS/MS	
LLOQ (ng/mL)	0.100	
Calibration Curve Range (ng/mL)	0.1 to 100	
QC Levels (ng/mL) Within-run Precision (RSD, %) Within-run Accuracy (%)	0.100 2.5 120.0	0.300, 3.00, 80.0 1.2 to 4.8 98.9 to 113.7
Stability in Plasma	Stable after 3 freeze/thaw (−20°C/room temperature) cycles, at least 20 days at −20°C, and at least 4 hours at room temperature	
Processed Extract Stability	Stable at least 96 hours at 15°C	
LC/MS/MS = liquid chromatography with tandem mass spectrometry, LLOQ = lower limit of quantification, QC = quality control, RSD = relative standard deviation		
Study Number	S-033188-EB-301-N	

Determination of plasma concentration after a single subcutaneous administration

Test Article: S-033447

Species/Strain		Mouse/ BALB/cAnNCrlCrlj			
Gender/Number of Animals		Female/4 at each sampling point			
Vehicle/Formulation		0.5% MC/Suspension			
Method of Administration		Single subcutaneous administration under non-anesthesia			
Dose (mg/kg)		0.8, 1.6, 3.2, 6.4			
Sample (Sampling Time)		Plasma (48, 72, 96, 120, 192 hours after administration)			
		Plasma Concentration (ng/mL)			
Dose (mg/kg)		0.8	1.6	3.2	6.4
Time (hr)	48	0.825 ± 0.225	3.39 ± 0.57	5.45 ± 0.65	11.2 ± 0.8
	72	0.381 [a] ± 0.382 [a]	2.25 ± 0.59	3.58 ± 1.19	8.70 ± 1.26
	96	0.0553 [a] ± 0.0643 [a]	0.883 ± 0.542	2.35 ± 0.32	6.40 ± 1.70
	120	0.187 [a] ± 0.233 [a]	0.444 ± 0.183	2.07 ± 0.58	4.80 ± 0.45
	192	0.0393 [a] ± 0.0785 [a]	0.0495 [a] ± 0.0990 [a]	0.986 ± 0.240	2.83 ± 0.41
MC = methylcellulose aqueous solution a The value below the LLOQ (< 0.100 ng/mL) was treated as zero in the calculation of mean and standard deviation (SD) values Data are expressed as the mean ± SD of 4 mice.					
Study Number		S-033188-EB-301-N			

2.6.3.2.2 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-033447 の感染前投与による致死率改善効果

Test Article: S-033447

Species/Strain		Mouse/ BALB/cAnNCrlCrlj								
Gender/Number of Animals		Female/10 per group								
Virus		A/PR/8/34 (H1N1)								
Vehicle/Formulation		0.5% MC/Suspension								
Method of Administration		Single subcutaneous administration under non-anesthesia								
Dose (mg/kg)		0.8, 1.6								
Treatment		Mice were intranasally inoculated with 4.00×10^2 $TCID_{50}$ of the virus suspension (100 μL/mouse) under anesthesia 48, 72 or 96 hours after administration.								
Evaluation Item		Survival time								
Evaluation Method		Mice were examined daily for death through 28 days after infection. Mice were euthanized and regarded as dead when their body weights in the morning were lower than 70% of the initial body weights (in the morning on the day of virus infection) according to humane endpoints.								
Timing of Virus Inoculation		48 hours after administration			72 hours after administration			96 hours after administration		
Test Articles		Vehicle	S-033447		Vehicle	S-033447		Vehicle	S-033447	
Dose (mg/kg)		0	0.8	1.6	0	0.8	1.6	0	0.8	1.6
Animal Number (Survived/Total)	Day 0	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10
	Day 1	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10
	Day 2	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10
	Day 3	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10
	Day 4	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10
	Day 5	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10
	Day 6	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10
	Day 7	8/10	10/10	10/10	5/10	9/10	10/10	4/10	8/10	10/10
	Day 8	1/10	10/10	10/10	1/10	6/10	10/10	0/10	4/10	10/10
	Day 9	0/10	10/10	10/10	1/10	2/10	10/10	0/10	1/10	10/10
	Day 10	0/10	10/10	10/10	1/10	2/10	10/10	0/10	1/10	10/10
	Day 11	0/10	10/10	10/10	1/10	2/10	10/10	0/10	1/10	10/10
	Day 12	0/10	10/10	10/10	1/10	2/10	10/10	0/10	1/10	10/10
	Day 13	0/10	10/10	10/10	1/10	2/10	10/10	0/10	1/10	10/10
	Day 14	0/10	10/10	10/10	1/10	2/10	10/10	0/10	1/10	10/10
	Day 15	0/10	10/10	10/10	1/10	2/10	10/10	0/10	1/10	10/10
	Day 16	0/10	10/10	10/10	1/10	2/10	10/10	0/10	1/10	10/10

	Day 17	0/10	10/10	10/10	1/10	2/10	10/10	0/10	1/10	10/10
	Day 18	0/10	10/10	10/10	1/10	2/10	10/10	0/10	1/10	10/10
	Day 19	0/10	10/10	10/10	1/10	2/10	10/10	0/10	1/10	10/10
	Day 20	0/10	10/10	10/10	1/10	2/10	10/10	0/10	1/10	10/10
	Day 21	0/10	10/10	10/10	1/10	2/10	10/10	0/10	1/10	10/10
	Day 22	0/10	10/10	10/10	1/10	2/10	10/10	0/10	1/10	10/10
	Day 23	0/10	10/10	10/10	1/10	2/10	10/10	0/10	1/10	10/10
	Day 24	0/10	10/10	10/10	1/10	2/10	10/10	0/10	1/10	10/10
	Day 25	0/10	10/10	10/10	1/10	2/10	10/10	0/10	1/10	10/10
	Day 26	0/10	10/10	10/10	1/10	2/10	10/10	0/10	1/10	10/10
	Day 27	0/10	10/10	10/10	1/10	2/10	10/10	0/10	1/10	10/10
	Day 28	0/10	10/10	10/10	1/10	2/10	10/10	0/10	1/10	10/10
p-value vs vehicle		–	<0.0001	<0.0001	–	0.0491	<0.0001	–	0.0159	<0.0001
$TCID_{50}$ = 50% tissue culture infectious dose Day 0, The day of virus inoculation The p-values were calculated by the log-rank test (multiplicity was adjusted by fixed-sequence procedure).										
Study Number		S-033188-EB-301-N								

2.6.3.2.3 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-033447 の感染前投与による体重減少抑制効果

Test Article: S-033447

Species/Strain		Mouse/ BALB/cAnNCrlCrlj								
Gender/Number of Animals		Female/10 per group								
Virus		A/PR/8/34 (H1N1)								
Vehicle/Formulation		0.5% MC/Suspension								
Method of Administration		Single subcutaneous administration under non-anesthesia								
Dose (mg/kg)		0.8, 1.6								
Treatment		Mice were intranasally inoculated with 4.00×10^2 $TCID_{50}$ of the virus suspension (100 μL/mouse) under anesthesia 48, 72 or 96 hours after administration.								
Evaluation Item		Body weight change								
Evaluation Method		Mice were examined daily for body weights 1 to 7 days post-infection (Day 1 to Day 7). Mice were euthanized and regarded as dead when their body weights in the morning were lower than 70% of the initial body weights (in the morning on the day of virus infection) according to humane endpoints.								
Timing of Virus Inoculation		48 hours after administration			72 hours after administration			96 hours after administration		
Test Articles		Vehicle	S-033447		Vehicle	S-033447		Vehicle	S-033447	
Dose (mg/kg)		0	0.8	1.6	0	0.8	1.6	0	0.8	1.6
Body Weight Change (% of Initial Body Weight)	Day 1	−0.3 ± 1.3	0.0 ± 1.1	−1.4 ± 1.1 *	−0.9 ± 1.9	−1.7 ± 1.4	−1.1 ± 1.5	−2.9 ± 1.7	−0.1 ± 1.8 *	−1.1 ± 1.0 *
	Day 2	−0.5 ± 1.7	−1.8 ± 1.8	−1.1 ± 1.2	−2.4 ± 1.9	−2.0 ± 1.3	−1.2 ± 1.5	−2.0 ± 2.1	−1.2 ± 1.7	−1.1 ± 1.9
	Day 3	−10.6 ± 1.9	−4.2 ± 3.3 ***	−1.8 ± 2.0 ***	−11.0 ± 1.4	−7.9 ± 2.0 **	−3.4 ± 3.2 ***	−11.0 ± 3.0	−8.5 ± 2.0 *	−3.9 ± 2.0 ***
	Day 4	−14.5 ± 1.8	−8.9 ± 3.2 **	−6.9 ± 3.1 ***	−15.7 ± 1.9	−12.7 ± 3.1 *	−7.9 ± 3.1 ***	−16.8 ± 3.1	−12.7 ± 2.6 **	−9.4 ± 3.1 ***
	Day 5	−19.0 ± 2.1	−9.7 ± 3.9 ***	−5.2 ± 3.6 ***	−20.1 ± 3.1	−14.5 ± 3.4 **	−7.9 ± 2.4 ***	−20.6 ± 3.4	−15.6 ± 3.4 **	−8.5 ± 2.6 ***
	Day 6	−24.3 ± 2.4	−13.8 ± 4.9 ***	−6.9 ± 4.0 ***	−25.1 ± 2.5	−20.9 ± 2.8 *	−11.6 ± 5.0 ***	−25.8 ± 2.9	−20.8 ± 4.0 **	−13.1 ± 2.3 ***
	Day 7	−28.5 ± 1.5	−17.7 ± 5.9 ***	−7.8 ± 4.1 ***	−29.1 ± 1.5	−26.2 ± 2.1	−14.0 ± 7.1 ***	−29.1 ± 1.6	−26.1 ± 3.4 *	−19.2 ± 2.7 ***
Day 1, One day after virus inoculation Each value represents the mean ± SD of the living mice at each day. When the mouse died before evaluated time point, the body weight change of the mouse was regarded as −30%. The following p-values were calculated by using the one-way analysis of variance (ANOVA) model with equal variance assumption including the fixed effect of group and the contrast method (multiplicity was adjusted by fixed-sequence procedure). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.0001$ vs vehicle.										
Study Number		S-033188-EB-301-N								

2.6.3.2.4　　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-033447 の感染前投与による致死率改善効果

Test Article: S-033447

Species/Strain		Mouse/ BALB/cAnNCrlCrlj											
Gender/Number of Animals		Female/10 per group											
Virus		B/Hong Kong/5/72 (mouse-adapted)											
Vehicle/Formulation		0.5% MC/Suspension											
Method of Administration		Single subcutaneous administration under non-anesthesia											
Dose (mg/kg)		1.6, 3.2, 6.4											
Treatment		Mice were intranasally inoculated with 1.80×10^3 $TCID_{50}$ of the virus suspension (100 µL/mouse) under anesthesia 48, 72 or 96 hours after administration.											
Evaluation Item		Survival time											
Evaluation Method		Mice were examined daily for death through 28 days after infection. Mice were euthanized and regarded as dead when their body weights in the morning were lower than 70% of the initial body weights (in the morning on the day of virus infection) according to humane endpoints.											
Timing of Virus Inoculation		48 hours after administration				72 hours after administration				96 hours after administration			
Test Articles		Vehicle	S-033447			Vehicle	S-033447			Vehicle	S-033447		
Dose (mg/kg)		0	1.6	3.2	6.4	0	1.6	3.2	6.4	0	1.6	3.2	6.4
Animal Number (Survived/Total)	Day 0	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10
	Day 1	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10
	Day 2	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10
	Day 3	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10
	Day 4	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10
	Day 5	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10
	Day 6	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10
	Day 7	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10
	Day 8	9/10	10/10	10/10	10/10	7/10	9/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10
	Day 9	2/10	6/10	10/10	10/10	3/10	8/10	10/10	10/10	3/10	10/10	9/10	10/10
	Day 10	1/10	4/10	9/10	10/10	1/10	5/10	10/10	10/10	2/10	6/10	8/10	10/10
	Day 11	1/10	4/10	8/10	10/10	1/10	5/10	10/10	10/10	2/10	5/10	7/10	10/10
	Day 12	1/10	4/10	8/10	10/10	1/10	5/10	10/10	10/10	2/10	5/10	7/10	10/10
	Day 13	1/10	4/10	8/10	10/10	1/10	5/10	10/10	10/10	2/10	5/10	7/10	10/10
	Day 14	1/10	4/10	8/10	10/10	1/10	5/10	10/10	10/10	2/10	5/10	7/10	10/10
	Day 15	1/10	4/10	8/10	10/10	1/10	5/10	10/10	10/10	2/10	5/10	7/10	10/10
	Day 16	1/10	4/10	8/10	10/10	1/10	5/10	10/10	10/10	2/10	5/10	7/10	10/10
	Day 17	1/10	4/10	8/10	10/10	1/10	5/10	10/10	10/10	2/10	5/10	7/10	10/10

	Day 18	1/10	4/10	8/10	10/10	1/10	5/10	10/10	10/10	2/10	5/10	7/10	10/10
	Day 19	1/10	4/10	8/10	10/10	1/10	5/10	10/10	10/10	2/10	5/10	7/10	10/10
	Day 20	1/10	4/10	8/10	10/10	1/10	5/10	10/10	10/10	2/10	5/10	7/10	10/10
	Day 21	1/10	4/10	8/10	10/10	1/10	5/10	10/10	10/10	2/10	5/10	7/10	10/10
	Day 22	1/10	4/10	8/10	10/10	1/10	5/10	10/10	10/10	2/10	5/10	7/10	10/10
	Day 23	1/10	4/10	8/10	10/10	1/10	5/10	10/10	10/10	2/10	5/10	7/10	10/10
	Day 24	1/10	4/10	8/10	10/10	1/10	5/10	10/10	10/10	2/10	5/10	7/10	10/10
	Day 25	1/10	4/10	8/10	10/10	1/10	5/10	10/10	10/10	2/10	5/10	7/10	10/10
	Day 26	1/10	4/10	8/10	10/10	1/10	5/10	10/10	10/10	2/10	5/10	7/10	10/10
	Day 27	1/10	4/10	8/10	10/10	1/10	5/10	10/10	10/10	2/10	5/10	7/10	10/10
	Day 28	1/10	4/10	8/10	10/10	1/10	5/10	10/10	10/10	2/10	5/10	7/10	10/10
p-value vs vehicle		–	0.0633	0.0003	<0.0001	–	0.0241	<0.0001	<0.0001	–	0.0276	0.0130	0.0003
Day 0, The day of virus inoculation The p-values were calculated by the log-rank test (multiplicity was adjusted by fixed-sequence procedure).													
Study Number		S-033188-EB-303-N											

2.6.3.2.5 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-033447 の感染前投与による体重減少抑制効果

Test Article: S-033447

Species/Strain		Mouse/ BALB/cAnNCrlCrlj											
Gender/Number of Animals		Female/10 per group											
Virus		B/Hong Kong/5/72 (mouse-adapted)											
Vehicle/Formulation		0.5% MC/Suspension											
Method of Administration		Single subcutaneous administration under non-anesthesia											
Dose (mg/kg)		1.6, 3.2, 6.4											
Treatment		Mice were intranasally inoculated with 1.80×10^3 $TCID_{50}$ of the virus suspension (100 μL/mouse) under anesthesia 48, 72 or 96 hours after administration.											
Evaluation Item		Body weight change											
Evaluation Method		Mice were examined daily for body weights 1 to 7 days post-infection (Day 1 to Day 7). Mice were euthanized and regarded as dead when their body weights in the morning were lower than 70% of the initial body weights (in the morning on the day of virus infection) according to humane endpoints.											
Timing of Virus Inoculation		48 hours after administration				72 hours after administration				96 hours after administration			
Test Articles		Vehicle	S-033447			Vehicle	S-033447			Vehicle	S-033447		
Dose (mg/kg)		0	1.6	3.2	6.4	0	1.6	3.2	6.4	0	1.6	3.2	6.4
Body Weight Change (% of Initial Body Weight)	Day 1	−2.8 ± 1.4	−2.1 ± 1.7	−1.4 ± 1.3	−2.2 ± 1.8	−3.4 ± 1.4	−2.1 ± 1.7	−1.9 ± 1.7 *	−1.8 ± 1.9 *	−1.5 ± 1.5	−2.1 ± 1.1	−0.7 ± 2.5	−1.5 ± 1.5
	Day 2	0.6 ± 0.8	−1.4 ± 1.2	−0.3 ± 1.1	−1.0 ± 1.9*	−1.3 ± 1.8	−0.1 ± 1.9	0.2 ± 2.2	0.3 ± 1.5	0.7 ± 1.5	−0.4 ± 1.8	0.4 ± 2.2	0.0 ± 1.4
	Day 3	−2.6 ± 1.6	−2.8 ± 2.4	−0.1 ± 1.1	−1.0 ± 2.1	−2.2 ± 1.6	−0.6 ± 3.5	0.6 ± 2.7 *	1.0 ± 1.8 **	−0.5 ± 1.6	−1.1 ± 1.9	−0.9 ± 2.4	1.2 ± 2.3
	Day 4	−8.0 ± 2.4	−6.7 ± 2.9	−1.9 ± 2.6 ***	−2.2 ± 2.3 ***	−6.6 ± 3.3	−2.8 ± 3.1 **	−0.7 ± 1.5 ***	0.3 ± 1.5 ***	−5.9 ± 1.7	−4.0 ± 1.3	−4.1 ± 2.9	−1.0 ± 2.0 ***
	Day 5	−10.7 ± 3.2	−8.9 ± 2.5	−3.2 ± 2.6 ***	−3.7 ± 3.9 ***	−9.8 ± 2.9	−5.0 ± 3.7 **	−2.6 ± 1.9 ***	−0.9 ± 2.1 ***	−8.9 ± 2.6	−4.4 ± 2.5 *	−5.4 ± 4.1 *	−1.4 ± 2.8 ***
	Day 6	−15.3 ± 2.6	−12.7 ± 3.4	−5.3 ± 3.5 ***	−3.2 ± 4.0 ***	−15.6 ± 4.3	−6.7 ± 5.6 ***	−3.4 ± 1.5 ***	0.1 ± 2.4 ***	−13.5 ± 3.4	−8.7 ± 3.4 **	−8.0 ± 5.5 **	−2.1 ± 2.3 ***
	Day 7	−21.7 ± 2.5	−19.2 ± 2.4	−11.0 ± 4.7 ***	−6.3 ± 4.6 ***	−21.5 ± 3.6	−14.9 ± 4.8 **	−11.1 ± 3.2 ***	−2.7 ± 3.5 ***	−19.9 ± 2.2	−16.2 ± 2.2 *	−15.3 ± 5.2 **	−6.8 ± 4.3 ***
Day 1, One day after virus inoculation Each value represents the mean ± SD of the living mice at each day. When the mouse died before evaluated time point, the body weight change of the mouse was regarded as −30%. The following p-values were calculated by using the one-way ANOVA model with equal variance assumption including the fixed effect of group and the contrast method (multiplicity was adjusted by fixed-sequence procedure). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.0001$ vs vehicle.													
Study Number		S-033188-EB-303-N											

2.6.3.2.6 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-033447 の感染前投与による肺内ウイルス増殖抑制効果

Test Article: S-033447

Species/Strain		Mouse/ BALB/cAnNCrlCrlj		
Gender/Number of Animals		Female/59-60 per group (9-10/each evaluation time point)		
Virus		A/PR/8/34 (H1N1)		
Vehicle/Formulation		0.5% MC/Suspension		
Method of Administration		Single subcutaneous administration under non-anesthesia		
Dose (mg/kg)		1.6, 3.2		
Treatment		Mice were intranasally inoculated with 4.00×10^2 $TCID_{50}$ of the virus suspension (100 μL/mouse) under anesthesia 72 or 96 hours after administration.		
Evaluation Items		Virus titers in lungs on days 1, 2, 4, 6, 8 and 10 after infection		
Evaluation Method		Virus titers were measured by standard $TCID_{50}$ method using MDCK cells. Mice were euthanized and regarded as dead when their body weights in the morning were lower than 70% of the initial body weights (in the morning on the day of virus infection) according to humane endpoints.		
Test Articles		Vehicle	S-033447	
Dose (mg/kg)		0	1.6	3.2
Timing of Virus Inoculation		72 hours after administration	96 hours after administration	72 hours after administration
Virus Titer (log_{10} $TCID_{50}$/mL)	Day 1	4.12 ± 0.37	3.03 ± 0.50 ***	1.73 ± 0.41 ***
	Day 2	5.64 ± 0.23	4.88 ± 0.40 **	3.18 ± 0.73 ***
	Day 4	6.02 ± 0.38	5.07 ± 0.59 **	3.51 ± 0.94 ***
	Day 6	5.19 ± 0.30	5.05 ± 0.40	3.46 ± 0.66 ***
	Day 8	2.80 ± 1.37	2.36 ± 1.07	1.83 ± 0.74
	Day 10	–	1.50 ± 0.00	1.50 ± 0.00
MDCK = Madin-Darby canine kidney Day 1, One day after virus inoculation; –, missing value (none of the mice survived) Each value represents the mean ± SD of 2 to 10 mice. Lower limit of quantification is 1.50 log_{10} $TCID_{50}$/mL. The following p-values were calculated by one-way ANOVA at each time point (multiplicity was adjusted using the Dunnett method). ** $p < 0.01$, *** $p < 0.0001$ vs vehicle. The observations on days 8 and 10 after infection (Day 8 and Day 10) were excluded from the analysis set of the ANOVA model because only two mice survived on Day 8 and none of the mice survived on Day 10 in vehicle group.				
Study Number	S-033188-EB-347-N			

2.6.3.2.7 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-033447 の感染前投与による肺内ウイルス増殖抑制効果

Test Article: S-033447

Species/Strain		Mouse/ BALB/cAnNCrlCrlj		
Gender/Number of Animals		Female/60 per group (10/each evaluation time point)		
Virus		B/Hong Kong/5/72 (mouse-adapted)		
Vehicle/Formulation		0.5% MC/Suspension		
Method of Administration		Single subcutaneous administration under non-anesthesia		
Dose (mg/kg)		3.2, 6.4		
Treatment		Mice were intranasally inoculated with 1.80×10^3 $TCID_{50}$ of the virus suspension (100 μL/mouse) under anesthesia 48 or 72 hours after administration.		
Evaluation Items		Virus titers in lungs on days 1, 2, 4, 6, 8 and 10 after infection		
Evaluation Method		Virus titers were measured by standard $TCID_{50}$ method using MDCK cells. Mice were euthanized and regarded as dead when their body weights in the morning were lower than 70% of the initial body weights (in the morning on the day of virus infection) according to humane endpoints.		
Test Articles		Vehicle	S-033447	
Dose (mg/kg)		0	3.2	6.4
Timing of Virus Inoculation		72 hours after administration	72 hours after administration	48 hours after administration
Virus Titer (log_{10} $TCID_{50}$/mL)	Day 1	2.92 ± 0.41	1.96 ± 0.44 ***	1.65 ± 0.15 ***
	Day 2	5.42 ± 0.30	4.79 ± 0.31 **	3.88 ± 0.37 ***
	Day 4	5.15 ± 0.29	4.77 ± 0.41 *	3.97 ± 0.37 ***
	Day 6	4.32 ± 0.45	4.23 ± 0.41	3.68 ± 0.25 **
	Day 8	3.00	1.78 ± 0.40	1.55 ± 0.08
	Day 10	–	1.50 ± 0.00	1.50 ± 0.00
Day 1, One day after virus inoculation; –, missing value (none of the mice survived) Each value represents the mean ± SD of 5 to 10 mice except for n=1. Lower limit of quantification is 1.50 log_{10} $TCID_{50}$/mL. The following p-values were calculated by one-way ANOVA at each time point (multiplicity was adjusted using the Dunnett method). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.0001$ vs vehicle. The observations on days 8 and 10 after infection (Day 8 and Day 10) were excluded from the analysis set of the ANOVA model because only one mouse survived on Day 8 and none of the mice survived on Day 10 in vehicle group.				
Study Number	S-033188-EB-348-N			

2.6.3.2.8 PA/I38 変異ウイルスの野生型ウイルス共存下における競合増殖性

Species/Biological material	MDCK cells infected with influenza A virus laboratory strains (rgA/WSN/33 [H1N1], rgA/WSN/33-PA/I38T [H1N1], rgA/WSN/33-PA/I38F [H1N1], rgA/Victoria/3/75 [H3N2], rgA/Victoria/3/75-PA/I38T [H3N2], and rgA/Victoria/3/75-PA/I38M [H3N2]) or influenza B viruses (rgB/Maryland/1/59 and rgB/Maryland/1/59-PA/I38T)
Evaluation items	Sequencing chromatograms at the position 38 in the PA subunit
Evaluation method	Viral infection: The confluent monolayer of MDCK cells in 24-well plates were coinfected with WT virus and the virus harboring I38 substitution at a ratio of 1 to 1 based on viral titers at 200 $TCID_{50}$/well. After 1-hour incubation, the cells were washed and incubated at 37°C in a CO_2 incubator. The culture supernatant of MDCK cells was collected at 48 hours post infection. Fresh MDCK cells were infected with the viruses in culture supernatant from the previous passage. Passage of the viruses in cell culture was repeated three times. Sequence analysis: Each culture supernatant of the infected cells was subjected to RT-PCR for amplification of the PA segment with specific primers. Sanger sequencing of the RT-PCR products was conducted.
Results: For all tested virus pair, the population of PA/I38X was greater than or comparable level to that of WT at Passage 0, whereas the population of PA/I38X decreased to the basal level and WT increased to a dominant population at Passage 3.	
$TCID_{50}$ = 50% tissue culture infectious dose; PA/I38F = isoleucine-to-phenylalanine substitution at amino acid position 38 in polymerase acidic protein; PA/I38M =isoleucine-to-methionine substitution at amino acid position 38 in polymerase acidic protein; PA/I38T = isoleucine-to-threonine substitution at amino acid position 38 in polymerase acidic protein; RT-PCR = reverse transcription-polymerase chain reaction; WT = wild type The assay was performed in duplicate.	
Study number	S-033188-EB-337-N

2.6.3.2.9 臨床で分離された PA/I38 変異ウイルスの増殖性

Biological material	MucilAir human nasal epithelial cells infected with A(H3N2) influenza viruses isolated from the nasopharyngeal/pharyngeal swab samples in phase 3 (T0831) (Strains: T0831_253104_D1, T0831_253104_D9-PA/I38T, T0831_339111_D1, T0831_339111_D5-PA/I38T, T0831_344103_D1, T0831_344103_D5-PA/I38T)			
Evaluation items	The virus titers ($TCID_{50}$/mL)			
Evaluation method	Viral infection: The confluent monolayer MucilAir human nasal epithelial cells in 24-well plates were infected with the clinical isolates at 500 $TCID_{50}$/well. After 1-hour incubation, the cells were washed and incubated at 37°C in a CO_2 incubator. The culture fluids were collected at 0, 24, 48 and 72 hours after inoculation and stored until the viral titration was performed. Measurement of the viral titers: The stored culture fluids were diluted and added into MDCK-SIAT1 monolayers on 96-well plates and the cells were absorbed by centrifuging at 1000 rpm for 30 minutes at room temperature. After removal of the inoculum, MDCK-SIAT1 cells were washed and incubated at 33°C in a CO_2 incubator for 3 days. After incubation, virus-induced cytopathic effect was observed, and virus titers were expressed as $\log_{10}$ $TCID_{50}$/mL.			
Results				
Strains	Virus titer ($\log_{10}$ $TCID_{50}$/mL)			
	MucilAir human nasal epithelial cells			
	0 hours	24 hours	48 hours	72 hours
T0831_253104_D1 (WT)	1.50 ± 0.00	5.33 ± 0.30	8.20 ± 0.00	7.59 ± 0.14
T0831_253104_D9-PA/I38T	1.50 ± 0.00	5.21 ± 0.79	7.81 ± 0.39	7.81 ± 0.34
T0831_339111_D1 (WT)	1.50 ± 0.00	4.63 ± 0.05	7.71 ± 0.08	7.60 ± 0.05
T0831_339111_D5-PA/I38T	1.50 ± 0.00	4.47 ± 0.78	7.71 ± 0.08	7.83 ± 0.44
T0831_344103_D1 (WT)	1.50 ± 0.00	5.55 ± 0.15	8.14 ± 0.32	7.55 ± 0.04
T0831_344103_D5-PA/I38T	1.50 ± 0.00	4.41 ± 0.68	7.70 ± 0.29	7.58 ± 0.08
Each value represents the mean ± standard deviation (SD) of triplicate.				
Study number	S-033188-EB-345-N			

2.6.3.2.10 臨床で分離された PA/I38 変異ウイルスの野生型ウイルス共存下における競合増殖性

Species/Biological material	MucilAir human nasal epithelial cells infected with A(H3N2) influenza viruses isolated from the nasopharyngeal/pharyngeal swab samples in phase 3 study (T0831) (Strains: T0831_253104_D1, T0831_253104_D9-PA/I38T, T0831_339111_D1, T0831_339111_D5-PA/I38T, T0831_344103_D1, T0831_344103_D5-PA/I38T)
Evaluation items	Proportion of amino acid at position 38 in the PA subunit
Evaluation method	Viral infection: The WT virus and the virus harboring I38T substitution isolated from patients in S-033188 clinical study were premixed at 1 to 1 ratio based on viral titers calculated as $TCID_{50}$/mL. The confluent monolayer of MucilAir human nasal epithelial cells in transwell-24 plates were infected with the premixed viruses at 500 $TCID_{50}$/well each. After 1-hour incubation, the cells were washed and incubated at 37°C in a CO_2 incubator. The culture supernatant of MucilAir human nasal epithelial cells were collected at 48 hours post infection. The collected samples were measured the titers using MDCK-SIAT1 cells. Fresh MucilAir human nasal epithelial cells were infected with the viruses in culture supernatant from the previous passage. Passage of the viruses in cell culture was repeated three times. NGS analysis: Each culture supernatant of the infected cells was subjected to NGS analysis with Illumina MiSeq system.

Results

Strains		Passage 0	Passage 1	Passage 2	Passage 3
T0831_253104_D1 + T0831_253104_D9-PA/I38T	Average of PA/I38T mean ± range (%)	35.9 ± 4.79	18.6 ± 11.12	15.6 ± 16.01	1.4 ± 1.95
	Proportion of PA/I38T (%)	32.54	26.48	26.95	2.76
		39.31	10.76	4.31	-
T0831_339111_D1 + T0831_339111_D5-PA/I38T	Average of PA/I38T mean ± range (%)	40.6 ± 0.04	56.2 ± 10.69	25.5 ± 0.88	1.6 ± 2.31
	Proportion of PA/I38T (%)	40.58	48.68	26.10	3.26
		40.64	63.80	24.86	-
T0831_344103_D1 + T0831_344103_D5-PA/I38T	Average of PA/I38T mean ± range (%)	45.1 ± 0.46	11.5 ± 14.57	6.1 ± 8.59	0.8 ± 1.12
	Proportion of PA/I38T (%)	44.75	1.22	-	-
		45.40	21.82	12.15	1.59

NGS = next generation sequencing
Each value represents the mean ± range of duplicate.
The lower limit of quantification (LLOQ) for the proportion of PA/I38T was 1% and " - " indicated less than 1%.
The averages and ranges were calculated with samples below LLOQ set to "0".

Study number	S-033188-EB-346-N

2.6.3.2.11　フェレットにおける臨床で分離された A(H3N2)型 PA/I38T 変異ウイルスの伝播性

Species/Strain	Mustela putorius furo/ Outbred
Sex/Number of Animals	Male and female/ 24 ferrets
Virus	The culture supernatant including A(H3N2) influenza viruses isolated from the nasopharyngeal/pharyngeal swab samples (subject # [redacted] pre- and post-S-033188 treatment) in S-033188 phase 3 study (clinical study protocol No. [redacted]T0831)
Infectious dose	10^5 $TCID_{50}$
Evaluation Item	Infectious viral shedding, Value of area under the curve for $TCID_{50}$, Viral RNA, % proportion of PA/I38T, Change in %38T at endpoint, Change in %38T following DC transmission
Evaluation Method	Infectious viral shedding in nasal washes was measured in MDCK-SIAT1 cells as $TCID_{50}$. Value of area under the curve for $TCID_{50}$ was measured by approximating the definite integral of the curve using Graphpad Prism. Viral RNA in nasal washes was quantified by number of M gene copies (influenza A) per μL of total RNA compared to known standards by RT-PCR. The relative proportion of virus encoding WT PA and PA/I38T in each nasal wash sample was determined by pyrosequencing
Study number	S-033188-EF-328-N

- A(H3N2)型 PA/I38T 変異ウイルスの存在比率

Ratio (by $TCID_{50}$) of WT to 38T at an initial infection		100 : 0				80 : 20			
ferret		DF	RF1	RF2	RF3	DF	RF1	RF2	RF3
% proportion of I38T (‘-‘: sample quality insufficient for pyrosequencing)	Day 0	0				29.5			
	Day 1	1.6				18.8			
	Day 2	2.2	3.2			21.7	13.4		
	Day 3	4	1.9			26.3	9		
	Day 4	2.5	1.8	-		15.2	7.8	-	
	Day 5	3	0	-		22.8	6.1	2.6	
	Day 6	7	3	-		38.2	4.5	0	0
	Day 7	5.6	1.7	0		27.4	5.3	3.3	10.4
	Day 8	4.5	2.5	-		18.5	6.9	2	3.5
	Day 9	-	3.1	0	-	23.9	5.9	1.5	2.2
	Day 10	-	0	0	-	26.7	5.9	0	0
	Day 11		-	0	0		-	0	4.5
	Day 12			3.9	2.4			1.8	3.8
	Day 13			3.2	2.6			0	11.8
	Day 14				0				5.9

	Day 15				2.3				8.5
	Day 16				2.7				
Ratio of WT to 38T at an initial infection		50 : 50				50 : 50			
ferret		DF	RF1	RF2	RF3	DF	RF1	RF2	RF3
% proportion of I38T	Day 0	63.4				61.1			
	Day 1	37.8				40.7			
	Day 2	47.2	20			50.3	42.3		
	Day 3	43.2	16.7			57.2	58		
	Day 4	45.7	8.9	-		25.6	17.1	-	
	Day 5	25.5	5.6	0.8		3.6	16.9	14.9	
	Day 6	16	2.1	0	-	18.8	15	2.2	-
	Day 7	38.7	3.1	0	0	8.7	11.9	3	0
	Day 8	32	3.3	1	1.5	8.3	2.4	1.8	2.7
	Day 9	37.7	1.6	0	0	15.5	8	1.5	2.5
	Day 10	35	1.8	0	1.8	33.8	0	1.7	2.6
	Day 11		-	0	2.9		-	1.3	2.3
	Day 12			3.8	1.3			2.5	2.1
	Day 13			4.2	3.2			2.8	5.9
	Day 14				3.1				4.1
	Day 15				0				2.2
	Day 16								
Ratio of WT to 38T at an initial infection		20 : 80				0 : 100			
ferret		DF	RF1	RF2	RF3	DF	RF1	RF2	RF3
% proportion of I38T	Day 0	86.7				98.2			
	Day 1	70				97.1			
	Day 2	71.8	-			7.1	100		
	Day 3	69.3	81.1			96.1	97.7		
	Day 4	33	97.2	-		97.2	97.6	92.3	
	Day 5	43.7	100	-		97.1	97.8	97.9	
	Day 6	47	94.9	97.1		96.3	97.5	92.7	-
	Day 7	31.6	95	97.1		95	95.8	97.9	-
	Day 8	44	81.5	96.8	-	95	100	97.1	100
	Day 9	40.2	64	95	97.6	-	95.8	96.9	93.3
	Day 10	52.3	39.9	96.3	96.6	-	92	97.4	92.6
	Day 11		47.2	97.2	94.2		100	96.5	93.3

	Day 12			96.5	95.9			97	97.8
	Day 13			97.5	97.1			95.3	95.8
	Day 14				97.2				98
	Day 15				97.9				97.8
	Day 16				97.7				

- RNA 1 μL 当たりの M 遺伝子のコピー数

Ratio of WT to 38T at an initial infection		100 : 0				80 : 20			
ferret		DF	RF1	RF2	RF3	DF	RF1	RF2	RF3
M gene copy number / μL RNA	Day 0	13095700				13933100			
	Day 1	8366220				17589100			
	Day 2	1804550	1442.35			9134160	267080		
	Day 3	50451.3	9123370			59547.6	483746		
	Day 4	600273	1023000	11.72		93323.7	447741	139.67	
	Day 5	321920	163978	14.1		176859	46650.7	22611.8	
	Day 6	64194.8	126311	1		952626	620569	18132100	637.17
	Day 7	20658.7	926488	409.47		14857.3	63467.9	345879	360.54
	Day 8	941.86	42084.8	24.64		8470.05	85190.3	936501	889332
	Day 9	93.68	12260.1	8918.48	120.17	1484.6	10825.8	37915.3	712638
	Day 10	55.21	663.5	147653	93.44	4490.82	230.3	97004.2	62653.2
	Day 11	59.66	1	23554.6	92817.4	1272.59	167.85	182859	335810
	Day 12			33576.3	4892650			269129	59763.4
	Day 13			2320	283351			2274.8	11672.2
	Day 14				19417.5				16105.7
	Day 15				341381				718.92
	Day 16				168205				
Ratio of WT to 38T at an initial infection		50 : 50				50 : 50			
ferret		DF	RF1	RF2	RF3	DF	RF1	RF2	RF3
M gene copy number / μL RNA	Day 0	15176000				15245300			
	Day 1	13669600				41786500			
	Day 2	1622860	393.31			4794050	1022.32		
	Day 3	443208	6910430			14384.9	501583		
	Day 4	123966	3877760	4.28		10028.3	8684180	47.17	

	Day 5	505396	21429.1	266936		533135	564661	67158.5	
	Day 6	453171	2763850	2060230	1	15907.9	123332	891305	20.4
	Day 7	9120.36	320045	7490750	2233.07	153148	577142	8457900	494.58
	Day 8	7413.94	57874.6	972922	685434	12230.7	25790.1	220241	469.89
	Day 9	5519.8	31597.4	73786.1	3466030	1852.03	6162.02	52990.4	185550
	Day 10	16386.1	28107	544619	169571	834.19	372.77	1141920	340519
	Day 11	30.32	93.44	78795.2	195342	24.47	91.1	204193	181314
	Day 12			820.28	461952			431	227404
	Day 13			1629.04	49100			1250	417246
	Day 14				9340				61481.2
	Day 15				216.02				52602.4
	Day 16								
Ratio of WT to 38T at an initial infection		20 : 80				0 : 100			
ferret		DF	RF1	RF2	RF3	DF	RF1	RF2	RF3
M gene copy number / μL RNA	Day 0	12832100				7743630			
	Day 1	6369240				3541260			
	Day 2	7086870	115.25			1494140	231.51		
	Day 3	73185.7	280			26766.4	1168.17		
	Day 4	124395	26236.6	1		390516	465766	470.72	
	Day 5	766554	570929	8.77		135888	71661.2	2040.47	
	Day 6	482380	879523	3084.49		8377.03	104926	191768	28.67
	Day 7	53164.3	70964.7	987764		25460	262627	1283200	14.42
	Day 8	34191.9	957689	4016080	151.26	7031.05	107296	396019	205.07
	Day 9	5386.54	156772	88814.1	459305	12.16	19009.6	48922.9	62275.6
	Day 10	1664.52	41384.9	57261.3	310692	28.17	9093.5	122741	294340
	Day 11	2111.09	4050.44	49325.2	183287	15.68	200.31	146221	143127
	Day 12			127384	76867.8			7563.96	165084
	Day 13			1492.8	179655			844.19	86546.7
	Day 14				215184				48222.2
	Day 15				56143.1				13846.1
	Day 16				69025.2				

● フェレットにおける鼻汁中の感染性ウイルス力価

Ratio of WT to 38T at an initial infection		100 : 0				0 : 100			
ferret		DF	RF1	RF2	RF3	DF	RF1	RF2	RF3
Infectious virus titre in nasal wash ($log_{10}TCID_{50}$/mL) (‘0’: sample below the lower limit of quantitation at 2.0 $log_{10}TCID_{50}$/mL)	Day 1	4.75				4.25			
	Day 2	3.75	0			3.75	0		
	Day 3	3.25	4.75			2.5	0		
	Day 4	4.5	3.75	0		3.25	3.25	0	
	Day 5	3.5	4.25	0		3.25	3.25	0	
	Day 6	2.75	2.75	0		0	3.5	2.75	0
	Day 7	0	3.75	0		0	2.5	5.25	0
	Day 8	0	3.25	0		0	3.25	4.25	0
	Day 9	0	0	4.5	0	0	0	2.5	3.25
	Day 10	0	0	3.25	0	0	0	2.5	3.5
	Day 11	0	0	2.25	3.25	0	0	3.5	3.25
	Day 12			0	6.25			0	3.75
	Day 13			0	3.25			0	2.5
	Day 14				4.5				0
	Day 15				3.75				0
	Day 16				3.5				
Area under curve (AUC) by $TCID_{50}$		N/A	22.5	10	22.75	N/A	15.75	20.75	16.25
Group mean AUC ± SD (n=3)		18.42 ± 7.29				17.58 ± 2.754			

● フェレット内及びフェレット間における PA/I38T 変異ウイルスの存在比率の変化量

Within-host fitness coinfection group	80 : 20				50 : 50				50 : 50				20: 80			
Individual ferret	DF	RF1	RF2	RF3	DF	RF1	RF2	RF3	DF	RF1	RF2	RF3	DF	RF1	RF2	RF3
Initial %38T detection	18.8	13.4	2.6	0	37.8	20	0.8	0	40.7	42.3	14.9	0	70	81.1	97.1	97.6
Final %38T detection	26.7	5.9	0	8.5	35	1.8	4.2	0	33.8	0	2.8	2.2	52.3	47.2	97.5	97.7
Change in %38T over time	+7.9	-7.5	-2.6	+8.5	-2.8	-18.2	+3.4	0	-6.9	-42.3	-12.1	+2.2	-17.7	-33.9	+0.4	+0.1

Between-host fitness coinfection group	80 : 20			50 : 50			50 : 50			20: 80		
DC transmission event ferret pair (index-recipient)	DF-RF1	RF1-RF2	RF2-RF3	DF-RF1	RF1-RF2	RF2-RF3	DF-RF1	RF1-RF2	RF2-RF3	DF-RF1	RF1-RF2	RF2-RF3
%38T in index ferret prior to DC transmission	18.8	7.8	2.6	37.8	8.9	0	40.7	17.2	2.2	71.8	100	96.8
First detection of %38T in recipient following DC transmission	13.4	2.6	0	20	0.8	0	42.3	14.9	0	81.1	97.1	97.6
Change in %38T following DC transmission	-5.4	-5.2	-2.6	-17.8	-8.1	0	+1.6	-2.3	-2.2	+9.3	-2.9	+0.8

2.6.3.2.12　フェレットにおける臨床で分離された A(H1N1) pdm09 型 PA/I38T 変異ウイルスの伝播性

Species/Strain	Mustela putorius furo/ Outbred
Sex/Number of Animals	Male and female/ 24 ferrets
Virus	The culture supernatant including A(H1N1)pdm09 influenza viruses isolated from the nasopharyngeal/pharyngeal swab samples (subject # [redacted] pre- and post-S-033188 treatment) in S-033188 phase 2 study (clinical study protocol No. [redacted]T0821)
Infectious dose	10^4 $TCID_{50}$
Evaluation Item	Infectious viral shedding, Value of area under the curve for $TCID_{50}$, Viral RNA, % proportion of PA/I38T, Change in %38T at endpoint, Change in %38T following DC transmission
Evaluation Method	Infectious viral shedding in nasal washes was measured in MDCK-SIAT1 cells as $TCID_{50}$. Value of area under the curve for $TCID_{50}$ was measured by approximating the definite integral of the curve using Graphpad Prism. Viral RNA in nasal washes was quantified by number of M gene copies (influenza A) per µL of total RNA compared to known standards by RT-PCR. The relative proportion of virus encoding WT PA and PA/I38T in each nasal wash sample was determined by pyrosequencing
Study number	S-033188-EF-328-N

- A(H1N1) pdm09 型 PA/I38T 変異ウイルスの存在比率

Ratio of WT to 38T at an initial infection		100 : 0				80 : 20			
ferret		DF	RF1	RF2	RF3	DF	RF1	RF2	RF3
% proportion of I38T ('-': sample quality insufficient for pyrosequencing)	Day 0	0				93.3			
	Day 1	0				28.7			
	Day 2	1.5	2			38.7	7.1		
	Day 3	0	0			33.9	4.9		
	Day 4	0	2	1.6		38.1	2	3.5	
	Day 5	0	0	0		46.5	2	1.8	
	Day 6	0	0	0	2.7	43.1	8	2.7	0
	Day 7	1.6	1.8	0	1.1	18.6	5.7	1.9	0
	Day 8	0	0	0	2	28.1	4.9	1.8	1.1
	Day 9	0	0	1.8	0	24.9	0	1.8	2.1
	Day 10	0	0	0	0	21.7	4	3.7	2.8
	Day 11		0	2.5	1.9		4.1	2.4	2.1
	Day 12			0	0			3.7	2.3
	Day 13			0	1.9			0	2.3

	Day 14				0				3.2
	Day 15				2.3				0
	Day 16								
Ratio of WT to 38T at an initial infection		50 : 50				50 : 50			
ferret		DF	RF1	RF2	RF3	DF	RF1	RF2	RF3
% proportion of I38T	Day 0	96.1				92.7			
	Day 1	55.8				66.7			
	Day 2	60.3	21.3			65	43.8		
	Day 3	46.2	25.9			60	42.2		
	Day 4	55.4	46.1	7.7		63.8	27	3.8	
	Day 5	64.9	58.2	7.9		55.2	19.3	2	
	Day 6	61.3	23.7	22.2	4.7	67.7	12.3	1.7	0
	Day 7	33.7	39.3	47.1	14.3	43.6	16.3	1.9	1.5
	Day 8	31.6	42.2	13.2	11.1	47.9	39.4	2.2	2.7
	Day 9	48.4	38.3	16	12.1	55.6	14.2	5.2	0
	Day 10	53.6	38.2	20.8	11.1	49	33.2	2.4	1.8
	Day 11		30.7	25.4	6.3		20.8	0	2.7
	Day 12			14.8	11.7			0	2.2
	Day 13				7.2			0	1.7
	Day 14				0				0
	Day 15				0				2.4
	Day 16								
Ratio of WT to 38T at an initial infection		20 : 80				0 : 100			
ferret		DF	RF1	RF2	RF3	DF	RF1	RF2	RF3
% proportion of I38T	Day 0	96.4				96.6			
	Day 1	78.1				99.8			
	Day 2	83.7	73.8			100	100		
	Day 3	83.6	65.4			100	100		
	Day 4	75.7	70.2	38.5		97.1	100	-	
	Day 5	84.1	80.7	12.3		100	100	98.6	
	Day 6	84.6	68.3	6.1	4	99.8	99.5	99.4	91.8
	Day 7	89.4	67	6.8	8.8	100	99.4	98.8	100
	Day 8	77.5	70.9	9.3	17.1	96.9	99.9	96.7	99.1
	Day 9	77.7	29.7	11.3	16.6	-	99.3	98.6	99.1
	Day 10	86.2	38.2	8.1	9.3	99.8	90.3	100	100

	Day 11		-	8.9	13.4		100	100	100
	Day 12			3.8	5.9			100	100
	Day 13			0	6.3			94.6	97.2
	Day 14				4.7				100
	Day 15				0				100
	Day 16								

- RNA 1 μL 当たりの M 遺伝子のコピー数

Ratio of WT to 38T at an initial infection		100 : 0				80 : 20			
ferret		DF	RF1	RF2	RF3	DF	RF1	RF2	RF3
M gene copy number / μL RNA	Day 0	358000				9320000			
	Day 1	40600000				15700000			
	Day 2	8560000	141000			17200000	125000		
	Day 3	614000	38600000			615000	9440000		
	Day 4	3660000	9610000	259000		2340000	2110000	45500	
	Day 5	103000	2160000	40500000		1730000	597000	36400000	
	Day 6	934000	5980000	7560000	14000	325000	2220000	1540000	1150000
	Day 7	28800	719000	582000	4790000	23600	999000	848000	23800000
	Day 8	38900	18200	2240000	12200000	34600	24100	1780000	1810000
	Day 9	5450	1050	578000	2580000	1730	2880	856000	1390000
	Day 10	17400	76.197	65800	8730000	1850	237.085	5810000	123000
	Day 11		273.239	15300	1080000		499.257	11600	1550000
	Day 12			1890	307000			3090	240000
	Day 13			1080	3090000			359.945	17600
	Day 14				10900				9480
	Day 15				27000				721.803
	Day 16								
Ratio of WT to 38T at an initial infection		50 : 50				50 : 50			
ferret		DF	RF1	RF2	RF3	DF	RF1	RF2	RF3
M gene copy number / μL RNA	Day 0	20300000				21800000			
	Day 1	928000				264000			
	Day 2	8420000	35400			8400000	6930		
	Day 3	75600	30100000			246000	34700000		

	Day 4	5700000	373000	1480		2360000	11900000	2030	
	Day 5	954000	1690000	7760000		2860000	2100000	28500000	
	Day 6	331000	1110000	2850000	516000	307000	4000000	2350000	499000
	Day 7	24300	33100	1890000	2080000	2760	753000	847000	14000000
	Day 8	10900	105000	2740000	2060000	1700	208000	1090000	4550000
	Day 9	11100	11400	779000	1340000	929.541	22100	467000	402000
	Day 10	18400	6740	38900	1550000	3440	4430	90000	1310000
	Day 11		10000	8910	208000		285.876	31200	588000
	Day 12			11500	63000			4650	265000
	Day 13			199.743	11500			630.021	37600
	Day 14				592.567				2400
	Day 15				127.088				1420
	Day 16								
Ratio of WT to 38T at an initial infection		20 : 80				0 : 100			
ferret		DF	RF1	RF2	RF3	DF	RF1	RF2	RF3
M gene copy number / μL RNA	Day 0	34300000				40400000			
	Day 1	457000				347000			
	Day 2	6450000	4670			8030000	822.742		
	Day 3	200000	20884.3			69300	200000		
	Day 4	87200	4750000	410.492		333000	20800000	41.2752	
	Day 5	3410000	2650000	185000		280000	2600000	14700	
	Day 6	131000	1310000	41400000	12500	70700	554000	6800000	3080
	Day 7	3220	338000	369000	9570000	9390	2300000	710000	3090000
	Day 8	1040	201000	1070000	1730000	1690	882000	586000	6100000
	Day 9	83.3606	120000	944000	869000	132.919	9490	1110000	1420000
	Day 10	217.712	15300	579000	1340000	311.404	2320	2900000	450000
	Day 11			66700	669000		650.178	218000	690000
	Day 12			9880	206000			9370	18700
	Day 13			3350	377000			487.697	2800
	Day 14				5050				4440
	Day 15				8900				4740
	Day 16								

● フェレットにおける鼻汁中の感染性ウイルス力価

Ratio of WT to 38T at an initial infection		100 : 0				0 : 100			
ferret		DF	RF1	RF2	RF3	DF	RF1	RF2	RF3
Infectious virus titre in nasal wash ($log_{10}TCID_{50}$/mL) (‘0’: sample below the lower limit of quantitation at 2.0 $log_{10}TCID_{50}$/mL)	Day 1	6.75				4.5			
	Day 2	6.25	4.75			5.25	0		
	Day 3	4.75	6.75			2.75	4.5		
	Day 4	5.5	5.75	2.75		4.75	7.25	0	
	Day 5	3.25	5.5	7.25		3.5	5.25	4.25	
	Day 6	4.25	5.25	5.75	3.5	3.5	5.25	6.75	2.75
	Day 7	0	4.75	5.25	6.5	2.25	5.5	5.25	6.5
	Day 8	0	2.5	5.5	6.75	0	4.5	4.75	6.75
	Day 9	0	0	4.5	5.5	0	2.25	5.25	6.75
	Day 10	0	0	3.25	6.5	0	0	4.75	5.5
	Day 11		0	0	5.75		0	2.75	4.75
	Day 12			0	3.5			0	0
	Day 13			0	3.5			0	0
	Day 14				0				0
	Day 15				0				0
	Day 16								
Area under the curve (AUC) by $TCID_{50}$		N/A	32.88	32.88	39.75	N/A	34.5	33.75	31.63
Group mean AUC ± SD (n=3)		35.17 ± 3.966				33.29 ± 1.489			

● フェレット内及びフェレット間における PA/I38T 変異ウイルスの存在比率の変化量

Within-host coinfection group	80 : 20				50 : 50				50 : 50				20: 80			
Individual ferret	DF	RF1	RF2	RF3	DF	RF1	RF2	RF3	DF	RF1	RF2	RF3	DF	RF1	RF2	RF3
Initial %38T detection	28.7	7.1	3.5	0	55.8	21.3	7.7	4.7	66.7	43.8	3.8	0	78.1	73.8	38.5	4
Final %38T detection	21.7	4.1	0	0	53.6	30.7	14.8	0	49	20.8	0	2.4	86.2	38.2	0	0
Change in %38T over time	-7	-3	-3.5	0	-2.2	+9.4	+7.1	-4.7	-17.7	-23	-3.8	+2.4	+8.1	-35.6	-38.5	-4

Between-host fitness coinfection group	80 : 20			50 : 50			50 : 50			20: 80		
DC transmission event ferret pair (index-recipient)	DF-RF1	RF1-RF2	RF2-RF3	DF-RF1	RF1-RF2	RF2-RF3	DF-RF1	RF1-RF2	RF2-RF3	DF-RF1	RF1-RF2	RF2-RF3
%38T in index ferret prior to DC transmission	28.7	4.9	1.8	55.8	25.9	7.9	66.7	42.8	2	78.1	65.4	12.3
First detection of %38T in recipient following DC transmission	7.1	3.5	0	21.3	7.7	4.7	43.8	3.8	0	73.8	38.5	4
Change in %38T following DC transmission	-21.6	-1.4	-1.8	-34.5	-18.2	-3.2	-22.9	-39	-2	-4.3	-26.9	-8.3

2.6.3.2.13 PA/I201T が PA/I38 変異ウイルスの増殖性に与える影響

Species/Biological material	MDCK cells and RPMI2650 cells infected with influenza A virus laboratory strains (rgA/Victoria/3/75 [H3N2], rgA/Victoria/3/75-PA/I38T [H3N2], rgA/Victoria/3/75-PA/I38M [H3N2], rgA/Victoria/3/75-PA/I201T [H3N2], rgA/Victoria/3/75-PA/I38T+I201T [H3N2], rgA/Victoria/3/75-PA/I38M+I201T [H3N2])
Evaluation items	The virus titers ($TCID_{50}$/mL)
Evaluation method	Viral infection: The confluent monolayer cells in 24-well plates were infected with the recombinant viruses at 10 $TCID_{50}$/well for MDCK cells and 100 $TCID_{50}$/well for RPMI2650 cells, respectively. After 1-hour incubation, the cells were washed and incubated at 37°C in a CO_2 incubator. The culture fluids of MDCK cells were collected at 6, 24, 48, and 72 hours, or those of RPMI2650 cells were collected at 6, 24, 48, 72, and 96 hours after inoculation and stored until the viral titration was performed. Measurement of the Viral Titer: The stored culture fluids were diluted and added into MDCK monolayers on 96-well plates. After 1-hour incubation, MDCK cells were washed and incubated at 37°C in a CO_2 incubator for 3 days. After incubation, virus-induced cytopathic effect was observed, and virus titers were expressed as $\log_{10}$ $TCID_{50}$/mL.

Results

Strains	Cells	Virus titer ($\log_{10}$ $TCID_{50}$/mL)				
		6 hours	24 hours	48 hours	72 hours	96 hours
rgA/Victoria/3/75 (H3N2)	MDCK	1.50 ± 0.00	5.57 ± 0.21	7.42 ± 0.14	6.76 ± 0.08	N/T
rgA/Victoria/3/75-PA/I38T (H3N2)	MDCK	1.50 ± 0.00	4.51 ± 0.09	7.02 ± 0.24	6.65 ± 0.03	N/T
rgA/Victoria/3/75-PA/I38M (H3N2)	MDCK	1.50 ± 0.00	5.27 ± 0.21	6.81 ± 0.31	6.54 ± 0.37	N/T
rgA/Victoria/3/75-PA/I201T (H3N2)	MDCK	1.52 ± 0.04	5.60 ± 0.17	7.41 ± 0.20	6.85 ± 0.21	N/T
rgA/Victoria/3/75-PA/I38T+I201T (H3N2)	MDCK	1.50 ± 0.00	4.61 ± 0.25	6.64 ± 0.20	6.53 ± 0.10	N/T
rgA/Victoria/3/75-PA/I38M+I201T (H3N2)	MDCK	1.50 ± 0.00	5.01 ± 0.61	6.82 ± 0.17	6.53 ± 0.17	N/T
rgA/Victoria/3/75 (H3N2)	RPMI2650	1.50 ± 0.00	1.58 ± 0.08	3.99 ± 0.29	6.02 ± 0.24	5.97 ± 0.28
rgA/Victoria/3/75-PA/I38T (H3N2)	RPMI2650	1.50 ± 0.00	1.50 ± 0.00	2.33 ± 0.30	4.24 ± 0.58	4.68 ± 0.19
rgA/Victoria/3/75-PA/I38M (H3N2)	RPMI2650	1.50 ± 0.00	1.50 ± 0.00	2.96 ± 0.56	4.13 ± 0.43	4.47 ± 0.55
rgA/Victoria/3/75-PA/I201T (H3N2)	RPMI2650	1.50 ± 0.00	1.56 ± 0.10	3.78 ± 0.28	5.68 ± 0.11	5.89 ± 0.28
rgA/Victoria/3/75-PA/I38T+I201T (H3N2)	RPMI2650	1.50 ± 0.00	1.55 ± 0.04	2.53 ± 0.09	3.70 ± 0.12	4.77 ± 0.12
rgA/Victoria/3/75-PA/I38M+I201T (H3N2)	RPMI2650	1.50 ± 0.00	1.50 ± 0.00	2.97 ± 0.30	4.23 ± 0.62	5.36 ± 0.39

N/T; not tested
Each value represents the mean ± SD of triplicate.

Study number	S-033188-EB-339-N

2.6.3.2.14 PA/E23K 変異ウイルスの増殖性

Species/Biological material	MDCK cells and RPMI2650 cells infected with influenza A virus laboratory strains (rgA/WSN/33 [H1N1], rgA/WSN/33-PA/I38T, rgA/WSN/33-PA/I38N , rgA/WSN/33-PA/I38K, rgA/WSN/33-PA/I38S, rgA/WSN/33-PA/I38V, rgA/WSN/33-PA/I38L, rgA/WSN/33-PA/E23K, rgA/Victoria/3/75 [H3N2], rgA/Victoria/3/75-PA/I38T, rgA/Victoria/3/75-PA/I38N, rgA/Victoria/3/75-PA/I38K, rgA/Victoria/3/75-PA/I38S rgA/Victoria/3/75-PA/I38V rgA/Victoria/3/75-PA/I38L, rgA/Victoria/3/75-PA/E23K) or influenza B virus laboratory strain (rgB/Maryland/1/59 ,rgB/Maryland/1/59 -PA/I38T, rgB/Maryland/1/59 -PA/I38N, rgB/Maryland/1/59 -PA/I38S, rgB/Maryland/1/59 -PA/I38V, rgB/Maryland/1/59 -PA/I38L, rgB/Maryland/1/59 -PA/E23K)
Evaluation items	The virus titers ($TCID_{50}$/mL)
Evaluation method	Viral infection: The confluent monolayer cells in 24-well plates were infected with the recombinant viruses at 10 $TCID_{50}$/well for MDCK cells and 100 $TCID_{50}$/well for RPMI2650 cells, respectively. After 1-hour incubation, the cells were washed and incubated at 37°C in a CO_2 incubator. The culture fluids of MDCK cells were collected at 6, 24, 48, and 72 hours, or those of RPMI2650 cells were collected at 6, 24, 48, 72, and 96 hours after inoculation and stored until the viral titration was performed. Measurement of the Viral Titer: The stored culture fluids were diluted and added into MDCK monolayers on 96-well plates. After 1-hour incubation, MDCK cells were washed and incubated at 37°C in a CO_2 incubator for 3 days. After incubation, virus-induced cytopathic effect was observed, and virus titers were expressed as $\log_{10}$ $TCID_{50}$/mL.

Results

Strains	Cells	Virus titer ($\log_{10}$ $TCID_{50}$/mL)				
		6 hours	24 hours	48 hours	72 hours	96 hours
rgA/WSN/33 (H1N1)	MDCK	1.50 ± 0.00	5.88 ± 0.46	7.44 ± 0.30	6.98 ± 0.23	N/T
rgA/WSN/33-PA/I38T (H1N1)	MDCK	1.50 ± 0.00	3.36 ± 0.72	5.31 ± 0.18	5.91 ± 0.62	N/T
rgA/WSN/33-PA/I38N (H1N1)	MDCK	1.50 ± 0.00	2.50 ± 0.00	5.23 ± 0.21	5.60 ± 0.77	N/T
rgA/WSN/33-PA/I38K (H1N1)	MDCK	1.50 ± 0.00	2.81 ± 0.54	3.88 ± 0.66	4.46 ± 0.83	N/T
rgA/WSN/33-PA/I38S (H1N1)	MDCK	1.50 ± 0.00	3.93 ± 0.81	6.83 ± 0.91	7.11 ± 0.10	N/T
rgA/WSN/33-PA/I38V (H1N1)	MDCK	1.50 ± 0.00	6.07 ± 0.38	7.26 ± 0.05	7.00 ± 0.00	N/T
rgA/WSN/33-PA/I38L (H1N1)	MDCK	1.50 ± 0.00	5.02 ± 0.54	7.40 ± 0.36	6.75 ± 0.16	N/T
rgA/WSN/33-PA/E23K (H1N1)	MDCK	1.50 ± 0.00	2.60 ± 0.05	4.49 ± 0.08	4.37 ± 0.19	N/T
rgA/Victoria/3/75 (H3N2)	MDCK	1.50 ± 0.00	5.38 ± 0.66	7.11 ± 0.19	7.03 ± 0.15	N/T
rgA/Victoria/3/75-PA/I38T (H3N2)	MDCK	1.50 ± 0.00	4.01 ± 0.53	6.64 ± 0.06	6.48 ± 0.04	N/T
rgA/Victoria/3/75-PA/I38N (H3N2)	MDCK	1.50 ± 0.00	2.99 ± 0.61	6.43 ± 0.06	6.50 ± 0.21	N/T
rgA/Victoria/3/75-PA/I38K (H3N2)	MDCK	1.50 ± 0.00	1.55 ± 0.04	4.43 ± 0.28	5.52 ± 0.25	N/T
rgA/Victoria/3/75-PA/I38S (H3N2)	MDCK	1.50 ± 0.00	3.46 ± 0.14	6.16 ± 0.31	6.07 ± 0.23	N/T

rgA/Victoria/3/75-PA/I38V (H3N2)	MDCK	1.50 ± 0.00	5.17 ± 0.35	7.26 ± 0.12	6.80 ± 0.40	N/T
rgA/Victoria/3/75-PA/I38L (H3N2)	MDCK	1.50 ± 0.00	4.09 ± 0.58	7.07 ± 0.31	6.57 ± 0.14	N/T
rgA/Victoria/3/75-PA/E23K (H3N2)	MDCK	1.50 ± 0.00	2.97 ± 0.41	6.14 ± 0.51	6.78 ± 0.21	N/T
rgB/Maryland/1/59	MDCK	1.50 ± 0.00	3.99 ± 0.53	7.40 ± 0.24	6.65 ± 0.13	N/T
rgB/Maryland/1/59 -PA/I38T	MDCK	1.50 ± 0.00	4.63 ± 0.14	7.14 ± 0.31	6.48 ± 0.10	N/T
rgB/Maryland/1/59 -PA/I38N	MDCK	1.50 ± 0.00	4.49 ± 0.25	7.40 ± 0.05	6.72 ± 0.25	N/T
rgB/Maryland/1/59 -PA/I38S	MDCK	1.50 ± 0.00	4.21 ± 0.35	7.30 ± 0.27	6.56 ± 0.13	N/T
rgB/Maryland/1/59 -PA/I38V	MDCK	1.50 ± 0.00	4.80 ± 0.35	7.14 ± 0.13	6.97 ± 0.39	N/T
rgB/Maryland/1/59 -PA/I38L	MDCK	1.50 ± 0.00	4.87 ± 0.12	7.18 ± 0.22	6.70 ± 0.03	N/T
rgB/Maryland/1/59 -PA/E23K	MDCK	1.50 ± 0.00	3.75 ± 0.23	5.56 ± 0.10	5.26 ± 0.25	N/T
rgA/WSN/33 (H1N1)	RPMI2650	1.50 ± 0.00	4.48 ± 0.17	7.44 ± 0.10	7.48 ± 0.04	7.42 ± 0.08
rgA/WSN/33-PA/I38T (H1N1)	RPMI2650	1.50 ± 0.00	2.68 ± 0.31	5.36 ± 0.18	5.56 ± 0.24	5.13 ± 0.35
rgA/WSN/33-PA/I38N (H1N1)	RPMI2650	1.50 ± 0.00	1.70 ± 0.17	5.08 ± 0.52	6.06 ± 0.30	5.67 ± 0.30
rgA/WSN/33-PA/I38K (H1N1)	RPMI2650	1.50 ± 0.00	1.50 ± 0.00	3.55 ± 0.13	3.87 ± 0.36	3.81 ± 0.60
rgA/WSN/33-PA/I38S (H1N1)	RPMI2650	1.50 ± 0.00	3.48 ± 0.42	6.12 ± 0.40	6.62 ± 0.16	6.72 ± 0.25
rgA/WSN/33-PA/I38V (H1N1)	RPMI2650	1.50 ± 0.00	4.90 ± 0.46	7.55 ± 0.13	7.48 ± 0.04	7.19 ± 0.34
rgA/WSN/33-PA/I38L (H1N1)	RPMI2650	1.50 ± 0.00	3.83 ± 0.32	7.33 ± 0.00	7.24 ± 0.08	7.04 ± 0.27
rgA/WSN/33-PA/E23K (H1N1)	RPMI2650	1.50 ± 0.00	1.92 ± 0.29	4.63 ± 0.23	4.49 ± 0.16	4.00 ± 0.20
rgA/Victoria/3/75 (H3N2)	RPMI2650	1.50 ± 0.00	1.71 ± 0.10	3.57 ± 0.23	4.30 ± 0.41	4.43 ± 0.46
rgA/Victoria/3/75-PA/I38T (H3N2)	RPMI2650	1.50 ± 0.00	1.52 ± 0.04	2.53 ± 0.24	3.25 ± 0.59	3.41 ± 0.11
rgA/Victoria/3/75-PA/I38N (H3N2)	RPMI2650	1.52 ± 0.04	1.50 ± 0.00	2.06 ± 0.65	2.40 ± 0.15	2.90 ± 0.36
rgA/Victoria/3/75-PA/I38K (H3N2)	RPMI2650	1.50 ± 0.00	1.50 ± 0.00	1.50 ± 0.00	1.50 ± 0.00	2.10 ± 0.17
rgA/Victoria/3/75-PA/I38S (H3N2)	RPMI2650	1.50 ± 0.00	1.50 ± 0.00	2.00 ± 0.20	2.53 ± 0.87	3.57 ± 0.24
rgA/Victoria/3/75-PA/I38V (H3N2)	RPMI2650	1.50 ± 0.00	1.55 ± 0.04	3.36 ± 0.32	3.63 ± 0.50	4.31 ± 0.27
rgA/Victoria/3/75-PA/I38L (H3N2)	RPMI2650	1.50 ± 0.00	1.52 ± 0.04	2.75 ± 0.32	3.38 ± 0.79	3.57 ± 0.40
rgA/Victoria/3/75-PA/E23K (H3N2)	RPMI2650	1.50 ± 0.00	1.50 ± 0.00	2.00 ± 0.00	2.54 ± 0.56	2.75 ± 0.22
rgB/Maryland/1/59	RPMI2650	1.50 ± 0.00	2.70 ± 0.31	5.22 ± 0.56	6.80 ± 0.35	6.58 ± 0.08
rgB/Maryland/1/59 -PA/I38T	RPMI2650	1.50 ± 0.00	2.61 ± 0.10	4.67 ± 0.29	6.33 ± 0.10	5.95 ± 0.41
rgB/Maryland/1/59 -PA/I38N	RPMI2650	1.50 ± 0.00	2.80 ± 0.28	5.48 ± 0.37	6.19 ± 0.54	6.32 ± 0.19
rgB/Maryland/1/59 -PA/I38S	RPMI2650	1.50 ± 0.00	2.62 ± 0.04	4.69 ± 0.11	5.66 ± 0.54	5.68 ± 0.10
rgB/Maryland/1/59 -PA/I38V	RPMI2650	1.52 ± 0.04	2.82 ± 0.17	5.44 ± 0.32	6.32 ± 0.19	6.23 ± 0.49
rgB/Maryland/1/59 -PA/I38L	RPMI2650	1.52 ± 0.04	2.68 ± 0.11	5.00 ± 0.26	6.20 ± 0.62	5.87 ± 0.25
rgB/Maryland/1/59 -PA/E23K	RPMI2650	1.52 ± 0.04	2.63 ± 0.05	4.78 ± 0.19	5.02 ± 0.48	4.84 ± 0.52
N/T; not tested Each value represents the mean ± SD of triplicate.						
Study number	S-033188-EB-355-N					

2.6.3.3 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.

2.6.3.4 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.

2.6.3.5 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.