ゾコーバ錠 125mg

第 2 部 (モジュール 2) : CTD の概要 (サマリー)

2.4 非臨床試験の概括評価

塩野義製薬株式会社

目次

略号及び用語定義一覧表 4
2.4 非臨床試験の概括評価 7
2.4.1 非臨床試験計画概略 7
2.4.2 薬理試験 8
2.4.2.1 効力を裏付ける試験 8
2.4.2.1.1 作用機序 8
2.4.2.1.2 In vitro 活性 8
2.4.2.1.3 In vivo 活性 10
2.4.2.1.4 臨床で有効性が期待できる血漿中濃度 10
2.4.2.1.5 エンシトレルビルフマル酸に対する感受性低下 11
2.4.2.2 副次的薬理試験 12
2.4.2.3 安全性薬理試験 13
2.4.3 薬物動態試験 14
2.4.4 毒性試験 20
2.4.4.1 単回投与毒性試験 20
2.4.4.2 反復投与毒性試験 21
2.4.4.3 遺伝毒性試験 27
2.4.4.4 がん原性試験 27
2.4.4.5 生殖発生毒性試験 27
2.4.4.6 局所刺激性試験 30
2.4.4.7 その他の毒性試験 30
2.4.5 総括及び結論 31
2.4.6 参考文献一覧 32

表

表 2.4.2-1 マウスへの感染 24 時間後投与時の初回投与から 48 時間後の肺内ウイルス力価低下と C_{48hr}/PA-EC_{50} の関係性 11
表 2.4.2-2 安全性薬理コアバッテリー試験結果及び血漿中曝露量と申請用法用量における血漿中曝露量との比 14
表 2.4.3-1 エンシトレルビルフマル酸による各 CYP 阻害作用のまとめ 18
表 2.4.3-2 エンシトレルビルフマル酸による各 CYP 誘導作用のまとめ 19
表 2.4.3-3 エンシトレルビルフマル酸による各トランスポーター阻害作用のまとめ 20
表 2.4.4-1 エンシトレルビルフマル酸の反復経口投与毒性試験における主な毒性所見 26
表 2.4.4-2 エンシトレルビルフマル酸の反復経口投与毒性試験における無毒性量とエ

ンシトレルビルの血漿中曝露量及び臨床との曝露比 27
表 2.4.4-3 エンシトレルビルフマル酸の生殖発生毒性試験における主な毒性所見及び無毒性量 29
表 2.4.4-4 エンシトレルビルフマル酸の生殖発生毒性試験におけるエンシトレルビルの血漿中曝露量と臨床との曝露比 30

略号及び用語定義一覧表

略号	英語	日本語
3CL	3C-like	(3C 様)
A193V	alanine-to-valine at amino acid position 193	N 末端側から 193 番目のアラニンがバリンに置換
A234S	alanine-to-serine at amino acid position 234	N 末端側から 234 番目のアラニンがセリンに置換
A255V	alanine-to-valine at amino acid position 255	N 末端側から 255 番目のアラニンがバリンに置換
ACE2	angiotensin-converting enzyme 2	アンジオテンシン変換酵素 2
$AUC_{0\text{-}24\ (48)\ hr}$	area under the plasma concentration-time curve from time 0 to 24 (48) hours post-dose	時間 0 から投与後 24 (48) 時間までの血漿中濃度－時間曲線下面積
$AUC_{0\text{-}\tau}$	area under the concentration-time curve over the dosing interval τ	投与時から投与間隔時間 τ までの血漿中濃度–時間曲線下面積
BA	Bioavailability	バイオアベイラビリティ
BCRP	breast cancer resistance protein	乳がん耐性タンパク質
BLQ	below the lower limit of quantification	定量下限未満
BSEP	bile-salt export pump	胆汁酸排出トランスポーター
$C_{24(48hr)}$	plasma concentration at 24 (48) hours after first administration	初回投与から 24 (48) 時間後の血漿中濃度
CC_{50}	concentration achieving 50% of cytotoxicity	50%細胞障害濃度
CETP	cholesteryl ester transfer protein	コレステリルエステル転送タンパク
CM	Chylomicron	カイロミクロン
C_{max}	maximum plasma concentration	最高血漿中濃度
COVID-19	coronavirus disease 2019	新型コロナウイルス感染症
CYP	cytochrome P450	シトクロム P450
D48G	aspartic acid-to-glycine at amino acid position 48	N 末端側から 48 番目のアスパラギン酸がグリシンに置換
D.Bil	direct bilirubin	直接ビリルビン
$EC_{50\ (90,\ 99,\ 99.9)}$	50% (90%, 99%, 99.9%) effective concentration	50% (90%, 99%, 99.9%)有効濃度
F294L	phenylalanine-to-leucine at amino acid position 294	N 末端側から 294 番目のフェニルアラニンがロイシンに置換
GISAID	Global Initiative on Sharing All	(インフルエンザ及び新型コロナウイ

略号	英語	日本語
	Influenza Data	ルスの配列情報のデータベース)
GLP	Good Laboratory Practice	(医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準)
H246Y	histidine-to-tyrosine at amino acid position 246	N 末端側から 246 番目のヒスチジンがチロシンに置換
hAEC	human airway epithelial cells	ヒトプライマリー気管支上皮細胞
HDL	high density lipoprotein	高比重リポタンパク
hERG	human ether-à-go-go related gene	ヒト ether-à-go-go 関連遺伝子
I.Bil	indirect bilirubin	間接ビリルビン
IC_{50}	50% inhibitory concentration	50%阻害濃度
K88R	lysine-to-arginine at amino acid position 88	N 末端側から 88 番目のリシンがアルギニンに置換
K90R	lysine-to-arginine at amino acid position 90	N 末端側から 90 番目のリシンがアルギニンに置換
L87F	leucine-to-phenylalanine at amino acid position 87	N 末端側から 87 番目のロイシンがフェニルアラニンに置換
L89F	leucine-to-phenylalanine at amino acid position 89	N 末端側から 89 番目のロイシンがフェニルアラニンに置換
LC/MS	liquid chromatography with mass spectrometry	液体クロマトグラフィー/質量分析法
LDL	low density lipoprotein	低比重リポタンパク
M49L	methionine-to-leucine at amino acid position 49	N 末端側から 49 番目のメチオニンがロイシンに置換
M49(M/L)	mixture of no substation and methionine-to-leucine at amino acid position 49	(N 末端側から 49 番目のメチオニンの無置換とロイシンへの置換の混合)
MATE	multidrug and toxin extrusion	(有機カチオン/H^+交換輸送体)
nsp5	non-structural protein 5	(非構造タンパク質 5)
OAT	organic anion transporter	有機アニオントランスポーター
OATP	organic anion transporting polypeptide	有機アニオントランスポーターポリペプチド
OCT	organic cation transporter	有機カチオントランスポーター
P52S	proline-to-serine at amino acid position 52	N 末端側から 52 番目のプロリンがセリンに置換
PA-$EC_{50\ (90)}$	protein-adjusted $EC_{50\ (90)}$	(50% [90%] 有効濃度を血清タンパク存在量で補正した活性値)

略号	英語	日本語
PD	Pharmacodynamics	薬力学
PDE	Phosphodiesterase	ホスホジエステラーゼ
P-gp	P-glycoprotein	P 糖タンパク質
PK	Pharmacokinetics	薬物動態学
S144A	serine-to-alanine at amino acid position 144	144番目のセリンがアラニンに置換
SARS-CoV	severe acute respiratory syndrome coronavirus	重症急性呼吸器症候群コロナウイルス
T21I	threonine-to-isoleucine at amino acid position 21	N 末端側から 21 番目のトレオニンがイソロイシンに置換
T24I	threonine-to-isoleucine at amino acid position 24	N 末端側から 24 番目のトレオニンがイソロイシンに置換
T198I	threonine-to-isoleucine at amino acid position 198	N 末端側から 198 番目のトレオニンがイソロイシンに置換
T.Bil	total bilirubin	総ビリルビン
$TCID_{50}$	50% tissue culture infectious dose	50%組織細胞感染価
$Time_{High}$	total time above the target plasma concentration	目標を超える血漿中濃度を維持する時間
TK	Toxicokinetics	トキシコキネティクス
VLDL	very low density lipoprotein	超低比重リポタンパク
VOC	variants of concern	懸念される変異株
VOI	variants of interest	注目すべき変異株
VUM	variants under monitoring	監視下の変異株
WHO	World Health Organization	世界保健機関

2.4 非臨床試験の概括評価

2.4.1 非臨床試験計画概略

2019 年 12 月，中華人民共和国湖北省武漢市において原因不明の肺炎が数ヵ所で集団発生していることが報告された．疫学調査の結果，この肺炎が新型のコロナウイルスの感染によって発症していることが確認され，その原因ウイルスが重症急性呼吸器症候群ウイルス (SARS-CoV) -2 と命名された [1]．SARS-CoV-2 は，重症急性呼吸器症候群コロナウイルスと同様に，その外殻表面にあるスパイクタンパクが，標的である宿主細胞の細胞膜表面に発現するアンジオテンシン変換酵素 2 (ACE2) に特異的に結合することで, 宿主細胞へと侵入する. ACE2 は鼻粘膜上皮細胞，肺胞上皮細胞，小腸の腸上皮細胞などに発現している [1, 2].

また，SARS-CoV-2 は RNA ウイルスのため変異が起こりやすく，主な変異株は世界保健機関 (WHO) により，懸念される変異株 (VOC)，注目すべき変異株 (VOI)，監視下の変異株 (VUM) に分類管理されている [3]. 2022 年 1 月時点で, VOC に指定されている変異株は, アルファ株, ベータ株，ガンマ株，デルタ株及びオミクロン株があり，オミクロン株は 2021 年 11 月 26 日に VOC に新たに指定された [4].

エンシトレルビルフマル酸共結晶 (以下, エンシトレルビルフマル酸) は, 塩野義製薬株式会社によって創製された新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) 治療薬である．SARS-CoV-2 遺伝子にコードされる複合タンパク質のプロセシング及びウイルス複製に必須である 3C-like (3CL) プロテアーゼを阻害することにより SARS-CoV-2 の増殖を阻害する.

非臨床試験パッケージは ICH M3(R2) ガイドラインを考慮して作成した．非臨床試験には，薬理評価 (マウス) 及び毒性評価 (ラット，ウサギ及びサル) に一般的に用いられる動物を用いた．ヒトで認められた代謝物は，一般毒性試験で用いたラット又はサル，あるいはその両方で曝露が確認されており, 代謝の面でもこれらの動物種で評価することが適切であると判断した. また，in vivo 試験の投与経路は臨床予定投与経路である経口投与で実施した.

薬効薬理試験として，in vitro 評価では，SARS-CoV-2 3CL プロテアーゼ活性に対する阻害効果，SARS-CoV-2 感染細胞における抗ウイルス効果，ヒト及びマウス血清の抗 SARS-CoV-2 活性への影響，エンシトレルビルフマル酸に対する感受性低下株の分離及び低感受性株の薬剤感受性を検討した．マウスを用いた in vivo 評価では，エンシトレルビルフマル酸を感染直後又は感染 24時間後に投与した際の抗ウイルス効果を評価した．また，エンシトレルビルフマル酸を感染 24時間後に投与した際のマウスの体重変化，生存率及び生存期間を確認し，エンシトレルビルフマル酸による感染マウスの病態進展抑制効果を評価した.

副次的薬理試験として，各種受容体，イオンチャネル及びトランスポーターに対する阻害作用，ヒト初代培養細胞及び異なるヒト組織に由来する株化細胞への細胞障害作用並びにミトコンドリアに対する毒性作用について評価した.

安全性薬理試験としては，標準的なコアバッテリー試験である中枢神経系，呼吸系及び心血管系に及ぼす影響に関する試験を実施した.

薬物動態試験として，エンシトレルビルフマル酸の吸収，分布，代謝及び排泄について，毒性試験に用いた同一の動物種であるラット及びサルを使用して in vitro 及び in vivo にて評価し，毒性試験評価動物であるウサギを使用して in vivo における代謝も評価した．また in vitro 試験

で薬物動態学的薬物相互作用についても検討した.

毒性試験として，ラット及びサルを用いた 4 週間までの反復経口投与毒性試験，遺伝毒性試験 (不純物を含む)，ラット及びウサギを用いた生殖発生毒性試験，in vitro 光毒性試験及びヒトで認められた高比重リポタンパク質 (HDL) コレステロール減少機序解明のための試験を実施した.

主要な安全性薬理試験及び毒性試験は Good Laboratory Practice (GLP) 基準，主要な薬理試験及び薬物動態試験は信頼性基準を適用して実施した.

2.4.2 薬理試験

2.4.2.1 効力を裏付ける試験

2.4.2.1.1 作用機序

エンシトレルビルの標的酵素である SARS-CoV-2 3CL プロテアーゼは，SARS-CoV-2 遺伝子から翻訳されたポリタンパク質のプロセシングを行うことでウイルス複製を進行させる．そのため，同酵素は SARS-CoV-2 ウイルスの複製に必須と考えられている．SARS-CoV-2 が細胞に侵入すると，ウイルス RNA を鋳型にタンパク質が翻訳され，このうち非構造タンパク質はポリタンパク質として翻訳される．その後，このポリタンパク質は，自身に含まれるパパイン様プロテアーゼ，3CL プロテアーゼによるプロセシングを受け，ウイルスの複製や転写に必須である RNA 依存性 RNA ポリメラーゼやヘリカーゼ又は 3CL プロテアーゼそのもの，といったそれぞれ異なる機能を発揮する非構造タンパク質となる [5].

SARS-CoV-2 3CL プロテアーゼタンパク質を用いた阻害活性の検討から，エンシトレルビルフマル酸が SARS-CoV-2 3CL プロテアーゼ阻害活性を有することを示した．また，N 末端側から 15 番目のグリシンがセリンに置換 (G15S), N 末端側から 21 番目のトレオニンがイソロイシンに置換 (T21I)，N 末端側から 89 番目のロイシンがフェニルアラニンに置換 (L89F)，N 末端側から 90 番目のリシンがアルギニンに置換 (K90R)，N 末端側から 108 番目のプロリンがセリンに置換 (P108S), N 末端側から 132 番目のプロリンがヒスチジンに置換 (P132H), N 末端側から 24 番目のトレオニンがイソロイシンに置換 (T24I), N 末端側から 88 番目のリシンがアルギニンに置換 (K88R), N 末端側から 193 番目のアラニンがバリンに置換 (A193V), N 末端側から 246 番目のヒスチジンがチロシンに置換 (H246Y), 及び N 末端側から 255 番目のアラニンがバリンに置換 (A255V) した SARS-CoV-2 3CL プロテアーゼに対しても, エンシトレルビルフマル酸は wild-type と同等の酵素阻害活性を示し，IC_{50} は 0.0080～0.0150 μmol/L であった.

2.4.2.1.2 In vitro 活性

SARS-CoV-2 易感染性の細胞株である VeroE6/TMPRSS2 細胞及び HEK293T/ACE2-TMPRSS2 細胞を用いた in vitro 試験において, 従来株 (Pango lineage A: hCoV-19/Japan/TY/WK-521/2020 株), スパイクタンパク質に変異が認められている複数の SARS-CoV-2 臨床分離株 (アルファ株 [Pango lineage B.1.1.7: hCoV-19/Japan/QK002/2020 株，hCoV-19/Japan/QHN001/2020 株，hCoV-19/Japan/QHN002/2020 株]，ベータ株 [Pango lineage B.1.351: hCoV-19/Japan/TY8-612/2021 株]，ガンマ株 [Pango lineage P.1: hCoV-19/Japan/TY7-501/2021 株，hCoV-19/Japan/TY7-503/2021

株]，デルタ株 [Pango lineage B.1.617.2: hCoV-19/Japan/TY11-927-P1/2021 株]，シータ株 [Pango lineage P.3: hCoV-19/Japan/TY28-444/2021 株]，ラムダ株 [Pango lineage C.37: hCoV-19/Japan/TY33-456/2021 株]，ミュー株 [Pango lineage B.1.621: hCoV-19/Japan/TY26-717/2021 株] 及びオミクロン株 [Pango lineage B.1.1.529: hCoV-19/Japan/TY38-873/2021 株, hCoV-19/Japan/TY38-871/2021 株, hCoV-19/Japan/TY40-385/2022 株, hCoV-19/Japan/TY41-721/2022 株, hCoV-19/Japan/TY41-716/2022 株，hCoV-19/Japan/TY41-703/2022 株，hCoV-19/Japan/TY41-763/2022 株，hCoV-19/Japan/TY41-704/2022 株，hCoV-19/Japan/TY41-702/2022 株，hCoV-19/Japan/TY41-820/2022 株，hCoV-19/Japan/TY41-828/2022 株, hCoV-19/Japan/TY41-796/2022 株, hCoV-19/Japan/TY41-832/2022 株, hCoV-19/Japan/TY41-795/2022 株，hCoV-19/Japan/23-018/2022 株，hCoV-19/Japan/TY41-951/2023 株，hCoV-19/Japan/TY41-984/2023 株，hCoV-19/Japan/TY41-831/2022 株，hCoV-19/Japan/TY41-686/2022 株] 並びに従来株を起源としたマウス馴化株 (SARS-CoV-2 MA-P10 株 [mouse-adapted hCoV-19/Japan/TY/WK-521/2020 株]) に対してエンシトレルビルフマル酸は抗ウイルス活性を示した. 臨床分離株に対する 50%有効濃度 (EC_{50}) は VeroE6/TMPRSS2 細胞では 0.22～0.99 μmol/L, HEK293T/ACE2-TMPRSS2 細胞では 0.026～0.064 μmol/L であった．マウス馴化株に対するエンシトレルビルフマル酸の EC_{50} は，VeroE6/TMPRSS2 細胞では 0.12 μmol/L であった．VeroE6/TMPRSS2 細胞及び HEK293T/ACE2-TMPRSS2 細胞に対する 50%細胞障害濃度 (CC_{50}) は > 100 μmol/L 及び 55 μmol/L であり，エンシトレルビルフマル酸はスパイクタンパク質に変異が認められている複数の臨床分離株及びマウス馴化株に対して抗 SARS-CoV-2 活性を有し，臨床分離株及びマウス馴化株に対する感受性の違いは株間で小さいこと，並びに細胞障害を起こす濃度より極めて低い濃度で抗 SARS-CoV-2 活性を有することが示された．また，ヒト鼻腔あるいは気管支上皮由来細胞の MucilAir™に SARS-CoV-2 臨床分離株 (デルタ株 [Pango lineage B.1.617.2: hCoV-19/Japan/TY11-927-P1/2021 株]又はオミクロン株 [Pango lineage B.1.1.529: hCoV-19/Japan/TY38-873/2021 株，hCoV-19/Japan/TY41-702/2022 株]) を感染させたときの，エンシトレルビルフマル酸の EC_{50}，EC_{90}，EC_{99} 及び $EC_{99.9}$ は 0.0114～0.127，0.0514～0.195，0.121～0.335 及び 0.227～0.373 μmol/L を示し，ヒトプライマリー気道上皮細胞 (hAEC) においても抗 SARS-CoV-2 活性を有することが示された (2.6.2.2.1.2 項参照). またエンシトレルビルフマル酸はレムデシビル，ソトロビマブ，ベブテロビマブ，チキサゲビマブ/シルガビマブ，EIDD-1931 (モルヌピラビルの親化合物) 並びに PF-07321332 と併用することにより相加的な，また REGN-COV2 と併用することにより相加から相乗的なウイルス増殖抑制効果を示した (2.6.2.2.1.7 項参照). エンシトレルビルフマル酸の抗 SARS-CoV-2 活性に対するヒト血清及びマウス血清の影響を検討した結果，血清添加による抗 SARS-CoV-2 活性の potency shift がみられ，100%ヒト血清及び 100%マウス血清存在下でのエンシトレルビルフマル酸の推定の protein-adjusted EC_{50} ($PA\text{-}EC_{50}$) はそれぞれ 3.02 μmol/L 及び 3.93 μmol/L であり，血清非存在下のときの抗 SARS-CoV-2 活性と比較すると，potency shift はどちらも 6 倍であった．以上の結果より，エンシトレルビルフマル酸では血清による抗 SARS-CoV-2 活性への影響はヒト，マウス血清で同程度であることが示された (2.6.2.2.1.3 項参照).

2.4.2.1.3 In vivo 活性

In vivo 評価では, SARS-CoV-2 ガンマ株 (Pango lineage P1: hCoV-19/Japan/TY7-501/2021 株) を経鼻接種したマウス感染モデルを用いて, 感染直後又は感染 24 時間後にエンシトレルビルフマル酸を投与開始した際の抗ウイルス効果について，肺内ウイルス力価を指標に検討した．その結果，感染直後及び 24 時間後に投与開始したいずれの場合でも，用量依存的に肺内ウイルス力価の低下が認められ，エンシトレルビルフマル酸はマウスにおいて，ウイルス複製を阻害すると考えられた (2.6.2.2.2.1 項及び 2.6.2.2.2.2 項参照)．また，重篤な新型コロナウイルス感染症では死に至る場合もあることから，マウスに馴化した SARS-CoV-2 株を感染させたマウス致死モデルを用いて，感染から 14 日間の体重変化率，生存率及び生存期間を確認した．感染 24 時間後からエンシトレルビルフマル酸を 4，8，16 及び 32 mg/kg の用量で 12 時間ごとに 1 日 2 回の 5日間経口投与を実施した結果, 感染 14 日後における生存率は, 媒体対照群では 37.5%, 4 mg/kg 投与群では 91.7%，8，16 及び 32 mg/kg 投与群では 100%であり，エンシトレルビルフマル酸投与により生存期間が有意に延長し，感染に伴う体重減少が用量依存的に抑制された (2.6.2.2.2.3 項参照)．以上の結果から，エンシトレルビルフマル酸はマウスにおける SARS-CoV-2 感染に伴う病態進展を抑制するものと考えられた．

2.4.2.1.4 臨床で有効性が期待できる血漿中濃度

SARS-CoV-2 感染 24 時間後のマウスにエンシトレルビルフマル酸を投与開始した際，用量依存的に肺内ウイルス力価の低下が認められた (2.6.2.2.2.2 項参照)．薬物動態学 (PK)/薬力学 (PD) 解析から，初回投与から 48 時間後の肺内ウイルス力価の低下量と良好に相関するエンシトレルビルの PK パラメータは，時間 0 から投与後 48 時間までの血漿中濃度－時間曲線下面積 ($AUC_{0\text{-}48hr}$), 初回投与から 48 時間後の血漿中濃度 (C_{48hr}) 及び目標を超える血漿中濃度を維持する時間 ($Time_{High}$) (5 × PA-EC_{50}，10 × PA-EC_{50}) であった．血漿中濃度の維持に関連している C_{48hr}/PA-EC_{50}，$Time_{High}$ (5 × PA-EC_{50}，10 × PA-EC_{50}) が肺内ウイルス力価の低下とよく相関していることから，SARS-CoV-2 感染 24 時間後に投与開始したマウス感染モデルでは，抗 SARS-CoV-2 活性を発揮するために必要なエンシトレルビルの血漿中濃度を，投与期間を通じて維持することが肺内ウイルス力価を低下するために重要であることが示唆された．本マウスモデルにおける PK/PD 解析結果から，初回投与から 48 時間後の肺内ウイルス力価を 1 log_{10}，2 log_{10} 及び 3 log_{10} 50%組織細胞感染価 ($TCID_{50}$) /mL 低下させるために必要な C_{48hr}/PA-EC_{50} はそれぞれ，0.769，3.78 及び 14.7 であった (表 2.4.2-1)．VeroE6/TMPRSS2 細胞から求めたマウス PA-EC_{50} (2090 ng/mL [3.93 µmol/L]) を用いて計算すると，肺内ウイルス力価を 1 log_{10}，2 log_{10} 及び 3 log_{10} $TCID_{50}$/mL 低下させるために必要な C_{48hr} は，それぞれ，1610，7900 及び 30700 ng/mL と算出された．また，VeroE6/TMPRSS2 細胞から求めたヒト PA-EC_{50} (1610 ng/mL [3.02 µmol/L]) を用いて計算した場合，ヒトにおいてウイルス力価を 1 log_{10}，2 log_{10} 及び 3 log_{10} $TCID_{50}$/mL 低下させるために必要な血漿中濃度は，それぞれ，1240，6090 及び 23700 ng/mL と推定された．

申請用法用量 (375/125 mg [投与 1 日目のみ 375 mg，その後投与 2～5 日目に 125 mg 投与の 1日 1 回反復投与]) におけるヒトの C_{24hr} は 14000～17700 ng/mL (2.7.2.2.1.1 項参照) であり，マウス感染モデルにおける 2 log_{10} $TCID_{50}$/mL の肺内ウイルス力価低下と同等以上の効果が期待で

きる.

表 2.4.2-1 マウスへの感染 24 時間後投与時の初回投与から 48 時間後の肺内ウイルス力価低下と C_{48hr}/PA-EC_{50} の関係性

Virus titer reduction [a]	C_{48hr}/PA-EC_{50}
1 log_{10} $TCID_{50}$/mL	0.769
2 log_{10} $TCID_{50}$/mL	3.78
3 log_{10} $TCID_{50}$/mL	14.7

a Virus titer reduction by 1 log_{10}, 2 log_{10}, and 3 log_{10} $TCID_{50}$/mL compared to the mean virus titer of the vehicle treatment group 48 hours after the first administration of ensitrelvir fumaric acid in the mouse model

hAEC を用いた検討では SARS-CoV-2 感染 3 日後に気相側に培地を添加し，回収した培地中に含まれるウイルス量を指標としたエンシトレルビルフマル酸の EC_{90} は 0.0514～0.195 μmol/L (27.4～104 ng/mL) であり，VeroE6/TMPRSS2 細胞から求めたヒト血清の potency shift を掛け合わせた PA-EC_{90} は 0.308～1.17 μmol/L (164～624 ng/mL)，デルタ株に対する EC_{90} (0.117 μmol/L) とヒト血清の Potency shift を掛け合わせた PA-EC_{90} は 0.702 μmol/L (374 ng/mL) となった. また，ヒト血清タンパク結合率 97.7%で補正した EC_{90} は，2.23～8.48 μmol/L (1190～4520 ng/mL) であった.

申請用法用量におけるヒトの C_{24hr} は 14000～17700 ng/mL (2.7.2.2.1.1 項参照) であり，hAEC の PA-EC_{90} 及びヒト血清タンパク結合率で補正した EC_{90} を十分に超えていた.

2.4.2.1.5 エンシトレルビルフマル酸に対する感受性低下

エンシトレルビルフマル酸に対する低感受性ウイルスについて情報を得るため，SARS-CoV-2 を VeroE6/TMPRSS2 細胞に感染させ，エンシトレルビルフマル酸存在下で継代培養したところ，3CL プロテアーゼをコードする non-structural protein 5 (nsp5) の酵素活性中心近くに位置するアミノ酸に置換が認められ，N 末端側から 48 番目のアスパラギン酸がグリシンに置換 (D48G)，49 番目のメチオニンがロイシンに置換 (M49L)，52 番目のプロリンがセリンに置換 (P52S)，144番目のセリンがアラニンに置換 (S144A) したウイルスが分離された．また，S144A と M49L/S144A の混合による M49(M/L)/S144A のアミノ酸置換を有するウイルスも分離された. 一方で，nsp5 領域にアミノ酸の置換が見られたウイルスでは，11 個の nsp5 切断部位には，アミノ酸の置換は検出されなかった. リバースジェネティクス法により作出した nsp5 D48G, M49L, P52S，S144A 及び M49L/S144A のアミノ酸置換を有する組換えウイルスは，耐性ウイルス分離試験で得られたそれぞれのアミノ酸置換を有する分離ウイルスと同様に，エンシトレルビルフマル酸の感受性が 4.3 倍，17 倍，3.7 倍，9.2 倍及び 100 倍低下したことから (2.6.2.2.1.6 項参照)，nsp5 D48G，M49L，P52S，S144A 及び M49L/S144A のアミノ酸置換は，エンシトレルビルフマル酸の感受性低下の責任変異であると考えた．nsp5 D48G，M49L，P52S，S144A 及び M49L/S144A のアミノ酸置換を有するウイルスは，VeroE6/TMPRSS2 細胞において野生型ウイルスと同等の増殖能を示し，レムデシビル，PF-07321332，REGN-COV2 に対して交叉耐性を示

さなかった (2.6.2.2.1.5 項参照). ヒト鼻腔由来細胞の MucilAir™において，D48G，M49L，及び S144A のアミノ酸置換を持つウイルスの競合増殖能は，野生型ウイルスと同等であった．一方で，P52S 及び M49L/S144A のアミノ酸置換を持つウイルスは，野生型ウイルスと比較して，競合増殖能は低かった. 2022 年 5 月 27 日時点の Global Initiative on Sharing All Influenza Data (GISAID, https://www.gisaid.org/) の SARS-CoV-2 アミノ酸配列データを用いて nsp5 D48G，M49L，P52S，S144A 及び M49L/S144A のアミノ酸置換を有する配列の割合を解析したところ, D48G, M49L, P52S 及び S144A の割合は極めて低く (≤0.001%)，M49L/S144A のアミノ酸置換は検出されなかった．また，2023 年 3 月 15 日時点の GISAID の SARS-CoV-2 アミノ酸配列データを用い，3CL プロテアーゼ共結晶構造においてエンシトレルビルから 5Å 以内に位置する 24 種のアミノ酸の置換割合を解析したところ，アミノ酸配列は極めて高度に保存されていた (≥99.946%).

第 2/3 相試験 (T1221 試験) Phase 2a Part において，エンシトレルビルフマル酸投薬後に認められた nsp5 領域の N 末端側から 87 番目のロイシンがフェニルアラニンに置換 (L87F), N 末端側から 198 番目のトレオニンがイソロイシンに置換 (T198I), N 末端側から 234 番目のアラニンがセリンに置換 (A234S) 及び N 末端側から 246 番目のヒスチジンがチロシンに置換 (H246Y) した SARS-CoV-2 変異体をリバースジェネティクス法により調製し，エンシトレルビルフマル酸の抗 SARS-CoV-2 活性を評価した．L87F，T198I，A234S 及び H246Y のアミノ酸置換を有する変異体に対するエンシトレルビルフマル酸の EC_{50} は野生型と比較して，それぞれ 0.92 倍，1.5 倍，1.7 倍及び 0.90 倍となり，感受性の変化は認められなかった (2.6.2.2.1.6 項参照).

2.4.2.2 副次的薬理試験

エンシトレルビルフマル酸の各種受容体，イオンチャネル，トランスポーター及び酵素に対する作用，ヒトの初代培養細胞及び各種組織由来株化細胞に対する細胞毒性，並びに HepG2 細胞 (ヒト肝細胞癌細胞株) に対するミトコンドリア毒性を評価した.

各種受容体，イオンチャネル，トランスポーター及び酵素に対する作用を評価したところ，アデノシントランスポーターによるアデノシン取り込み作用に対する 50%阻害濃度 (IC_{50}) は 1.43 µmol/L であった. また, ホスホジエステラーゼ (PDE) 4A1A, PDE4B1, PDE4C1 及び PDE4D2 の酵素活性に対する IC_{50} は，それぞれ 63.2，69.1，75.7 及び 73.4 µmol/L であった．その他の受容体，イオンチャネル，トランスポーター及び酵素に対して 100 µmol/L (53.2 µg/mL) の濃度まで影響はなかった.

エンシトレルビルフマル酸のアデノシントランスポーターに対する IC_{50} (1.43 µmol/L) は，申請用法用量 (375/125 mg) における非結合型最高血漿中濃度 (C_{max}) (1.2 µmol/L；総薬物濃度 [28.1 µg/mL]，分子量 [531.88] 及びヒト血漿中タンパク結合率 [97.7%] から算出) の 1.2 倍であった (2.6.4.4.1.1 項及び 2.7.2.2.1.1 項参照). アデノシントランスポーターの阻害は，血中アデノシン濃度の上昇に繋がる可能性があり，アデノシンの主な薬理作用として中枢神経系 (睡眠導入の低下)，心血管系 (血圧及び心拍数の減少)，血小板凝集の阻害及び免疫系 (抗炎症効果) への影響が報告されている [6]. しかしながら，安全性薬理試験 (2.6.2.4 項参照) 並びにラット及びサルを用いた反復毒性試験 (2.6.6.3 項参照) においてエンシトレルビルフマル酸のアデノシントランスポーターの阻害に起因したと考えられる影響は認められなかった．さらに，第 1

相試験及び第 2/3 相試験 (T1221 試験) において，上述したような事象に関連するエンシトレルビルフマル酸投与に起因した有害事象は現時点では認められていない (2.5.5.2 項参照).

他にエンシトレルビルフマル酸による 4 種のサブタイプの PDE4 阻害活性が認められたが，その IC_{50} 値 (63.2～75.7 µmol/L) は，申請用法用量における非結合型 C_{max} (1.2 µmol/L) に対して 53～63 倍乖離しており，申請用法用量において非選択的 PDE4 阻害による懸念は低いと判断した.

異なるヒト組織に由来する 9 種の株化細胞及び 3 種のヒト初代培養細胞に対する CC_{50} は，いずれの細胞においても 72 µg/mL (135 µmol/L) 超える濃度と推定された (2.6.2.3.2 項及び 2.6.2.3.3 項参照). また，HepG2 細胞に対するミトコンドリア毒性は 300 µg/mL (564 µmol/L) まで認められなかった (2.6.2.3.4 項参照). エンシトレルビルフマル酸の各 SARS-CoV-2 株に対する EC_{50} (0.026～0.99 µmol/L；2.6.2.2.1.2 項参照) との間に約 140 倍以上の十分な乖離がみられたことから，エンシトレルビルフマル酸のヒト由来細胞及びミトコンドリアへの障害性に対する懸念は低いと判断した.

以上のことから，申請用法用量においてエンシトレルビルフマル酸投与に起因した副次的薬理作用による副作用発現の懸念は低いと判断した.

2.4.2.3 安全性薬理試験

安全性薬理コアバッテリー試験として，エンシトレルビルフマル酸の中枢神経系，心血管系及び呼吸系に及ぼす影響を検討した．安全性薬理コアバッテリー試験の概要及び血漿中曝露量と申請用法用量における血漿中曝露量との比を表 2.4.2-2 に示す.

表 2.4.2-2　安全性薬理コアバッテリー試験結果及び血漿中曝露量と申請用法用量における血漿中曝露量との比

試験種	投与量/適用濃度	特筆すべき所見	無影響量における血漿中曝露 (C_{max}) (ヒト曝露比)
ラット中枢神経系	0 (対照群), 20, 100, 1000 mg/kg	中枢神経系への影響なし (無影響量 1000 mg/kg)	294 µg/mL (10.5)[a]
hERG アッセイ	0 (対照群), 10, 30, 100 µmol/L (それぞれ 0, 5.32, 16.0, 53.2 µg/mL)	IC_{50} > 100 µmol/L (53.2 µg/mL)	−
サル心血管系	0 (対照群), 10, 50, 150 mg/kg	軽度な心拍数の増加 (≥ 50 mg/kg) (無影響量 10 mg/kg)	43.8 µg/mL (1.6)[b]
サル呼吸系	0 (対照群), 50, 150 mg/kg	なし (無影響量 150 mg/kg)	326 µg/mL (11.6)[b]

a ラット 2 週間反復経口投与毒性試験の 1000 mg/kg/日投与群の雄における投与 1 日目の C_{max} 値と健康成人対象第 1 相試験 (T1211 試験) の 375/125 mg (投与 1 日目のみ 375 mg, その後投与 2〜5 日目に 125 mg 投与の 1 日 1回反復投与) 投与 5 日目の C_{max} (28.1 µg/mL) (2.7.2.2.1.1 項参照) との比
b 各無影響量における C_{max} と第 1 相試験 (T1211 試験) の 375/125 mg 投与 5 日目の C_{max} (28.1 µg/mL) (2.7.2.2.1.1 参照) との比

ラット中枢神経系への作用を評価する試験 (2.6.2.4.1.1 項参照) では, 1000 mg/kg の用量まで中枢神経系への影響を示唆する変化はなく, 無影響量は 1000 mg/kg と判断した. ラットへの単回経口投与時の中枢神経系に対する無影響量における C_{max} と申請用法用量の C_{max} (28.1 µg/mL) との比は 10.5 倍であった (表 2.4.2-2).

ヒト ether-à-go-go 関連遺伝子 (hERG) 導入細胞におけるカリウム電流に対する作用試験において, hERG 電流に対する IC_{50} は 100 µmol/L (53.2 µg/mL) を超える濃度と推定された. また, サル心血管系及び呼吸系への作用を評価する試験では, 50 及び 150 mg/kg の用量で軽度な心拍数の増加が認められたが, 150 mg/kg の用量まで血圧, 心電図, 呼吸数及び血液ガスパラメータに影響は認められなかった. サルへのエンシトレルビルフマル酸は単回経口投与時の心血管系に対する無影響量 (10 mg/kg) 及び呼吸系に対する無影響量 (150 mg/kg) における C_{max} と, 申請用法用量の C_{max} (第 1 相試験 [T1211 試験] の 375/125 mg 投与 5 日目の C_{max} ; 28.1 µg/mL)との比はそれぞれ 1.6 又は 11.6 倍であった (表 2.4.4-2). なお, 第 1 相及び 2/3 相試験においてエンシトレルビルフマル酸投与に起因した中枢神経系, 心血管系及び呼吸系への影響を示唆する有害事象は認められていない (2.5.5.2 項参照).

以上の安全性薬理試験の結果から, 本剤の申請用法用量において, 中枢神経系, 心血管系及び呼吸系に関して, 重篤な有害事象が生じる可能性は低いと考えられる.

2.4.3　薬物動態試験

エンシトレルビルフマル酸の薬物動態試験は, 薬理試験及び毒性試験あるいはいずれかの試験で用いたマウス, ラット, ウサギ及びサルを用いて実施した.

エンシトレルビルフマル酸のラットにおけるバイオアベイラビリティ (BA) は 85.5% (2.6.4.3.1 項参照), 尿及び胆汁排泄率の和から推定される吸収率は, ラットで約 64% (2.6.4.6.1.1 項参照), サルで約 74% (2.6.4.6.2.1 項参照) であることから, エンシトレルビルフマル酸は高い

経口吸収性を示した．薬理試験でエンシトレルビルフマル酸を感染マウス（投与量：2～64 mg/kg）に単回経口投与したとき，並びに反復経口投与毒性試験でエンシトレルビルフマル酸をラット（投与量：20～100 mg/kg），ウサギ（投与量：30～100 mg/kg）及びサル（投与量：3～50 mg/kg）に 1 日 1 回反復経口投与したときの投与 1 日目の血漿中エンシトレルビルの C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24hr}$ は，用量に比例して増大し，上記用量範囲でエンシトレルビルの体内動態は線形であることが示された（2.6.4.3.3 項，2.6.4.3.4 項，2.6.4.3.5 項及び 2.6.4.3.6 項参照）．また，反復経口投与毒性試験でのトキシコキネティクス（TK）より，ラット及びサルの両種において，血漿中エンシトレルビルの C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24hr}$ に性差はみられなかった．さらに，反復経口投与により血漿中エンシトレルビルの C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24hr}$ は増加する傾向が認められたが，ラット，ウサギ及びサルのいずれも高用量（ラット：1000 mg/kg/日，ウサギ：300 mg/kg/日，サル雄：1000/300/100 mg/kg/日［投与 3 日目に 1000 mg/kg/日から 300 mg/kg/日，投与 8 日目に 300 mg/kg/日から 100 mg/kg/日に減量］，サル雌：300/100 mg/kg/日［投与 9 日目に 300 mg/kg/日から 100 mg/kg/日に減量］）では，投与 1 日目と比べて同等あるいは低下する傾向がみられた．

エンシトレルビルの in vitro 血清タンパク結合率に種差は認められず，ラット，ウサギ，サル及びヒトのいずれにおいても，エンシトレルビル濃度（0.5～50 µg/mL）に依存せず血清タンパク結合率は約 98%であり，ヒト血清におけるエンシトレルビルの主結合タンパクはアルブミンであった（2.6.4.4.1.1 項参照）．エンシトレルビルの in vitro 血球移行率に種差は認められず，ラット，サル及びヒトのいずれにおいても，エンシトレルビル濃度（0.5～50 µg/mL）における血球移行率は 5%～13%程度であり，ラット及びサル in vivo 試験の結果と同程度であった（2.6.4.4.1.2 項参照）．また，[^{14}C]-エンシトレルビルフマル酸を単回経口投与したとき，ラット及びサル血液中放射能濃度は血漿中放射能濃度と平行に推移し，時間と共に減少したことから，エンシトレルビル及びその代謝物の血球への残留性はないと考えられた（2.6.4.4.2.3 項参照）．

有色ラットを用いた [^{14}C]-エンシトレルビルフマル酸の組織分布試験において，エンシトレルビル及びその代謝物はラット組織に幅広く分布し，肝臓，毛様体/虹彩，歯髄，ブドウ膜においては，他の組織に比べて高い放射能濃度が認められた．大脳，小脳及び脊髄などの中枢神経系組織中放射能濃度は，測定したいずれの時点でも定量下限未満（BLQ）であり，エンシトレルビルは中枢移行性が低いと考えられた．メラニン含有組織を含むいずれの組織中放射能濃度も投与後 168 又は 336時間には BLQ まで減少したことから，組織残留性はないと考えられた（2.6.4.4.2.1 項参照）．また，妊娠ラットを用いた [^{14}C]-エンシトレルビルフマル酸の胎盤透過性試験において，エンシトレルビル及びその代謝物は胎盤を透過し，胎児への移行が認められた．胎児の組織中放射能濃度は，母動物の同一組織中放射能濃度と同等，あるいは低い値を示し，投与後 24 時間までに BLQ 付近まで減少したことから，エンシトレルビル及びその代謝物は胎児の各組織に残留しないと考えられた（2.6.4.4.2.2 項参照）．授乳ラットを用いた [^{14}C]-エンシトレルビルフマル酸の乳汁移行性試験において，乳汁中放射能濃度は血漿中放射能濃度と平行に推移し，血漿中放射能濃度に対する乳汁中放射能濃度の比がほぼ一定であったことから，エンシトレルビル及びその代謝物は乳汁移行するが，残留性はないと考えられた（2.6.4.6.1.2 項参照）．

[^{14}C]-エンシトレルビルフマル酸の凍結ヒト肝細胞を用いた in vitro 代謝物検索では，試料中放射能の大部分が未変化のエンシトレルビルとして残存しており，主要な代謝物として，M2

(glucuronide of oxidized ensitrelvir，推定)，ensitrelvir triazole *N*-desmethyl 及び ensitrelvir indazole *N*-desmethyl が検出された．また，ensitrelvir indazole 4-Cl 及び ensitrelvir 3-indazolinone が液体クロマトグラフィー/質量分析法 (LC/MS) クロマトグラムでのみ検出された (2.6.4.5.1.1 項参照)．ヒトシトクロム P450 (CYP) 分子種組み換え発現酵素やヒト肝ミクロソーム及び選択的 CYP 阻害剤を用いた検討から，ensitrelvir triazole *N*-desmethyl 及び ensitrelvir indazole *N*-desmethyl の生成には，CYP3A4/5 を含む複数の CYP 分子種が関与することが示唆された (2.6.4.5.1.2 項参照)．ヒト第 1 相試験 (T1211 試験) 試料を用いた in vivo 代謝物検索の結果，ヒト血漿の主要成分として未変化のエンシトレルビルが検出され， ensitrelvir indazole 4-Cl (M6)が主代謝物として検出された (2.7.2.2.1.1 項参照)．[^{14}C]-エンシトレルビルフマル酸を外国人健康成人に 375 mg で単回経口投与後の試料を用いた代謝物検索の結果，血漿中には主に未変化のエンシトレルビルが検出され，血漿中総放射能の 95.57%に相当した．また，代謝物として ensitrelvir indazole 4-Cl のみが検出され，血漿中総放射能に対し，4.11%に相当した (2.7.2.2.1.2 項参照)．

[^{14}C]-エンシトレルビルフマル酸のラット及びサル排泄試験の結果，エンシトレルビルの主排泄経路は，胆汁を介した糞中排泄であり，尿中排泄の寄与もあることが示された．未変化のエンシトレルビルは，ラット尿及び胆汁中にそれぞれ投与量の 0.3%及び 4.5%が排泄されており，尿中排泄 (ケージ洗浄液を含む) 及び胆汁中排泄率の和から推定される吸収率 (投与量の約 64%) に対して 1/10 程度であった (2.6.4.5.2.1 項及び 2.6.4.6.1.1 項参照)．ラット血漿中では，主に未変化のエンシトレルビルが検出され，代謝物として ensitrelvir indazole 4-Cl と ensitrelvir triazole *N*-desmethyl が検出された．ラット尿中では ensitrelvir triazole *N*-desmethyl が主代謝物として検出され，ラット胆汁中では ensitrelvir triazole *N*-desmethyl 及び M18 (glutathione conjugate of oxidized and defluorinated ensitrelvir，推定) が主代謝物として検出された (2.6.4.5.2.1 項参照)．また，未変化のエンシトレルビルは，サル尿及び胆汁中にそれぞれ投与量の 0.8%及び 4.9%が排泄されており，尿中排泄 (ケージ洗浄液を含む) 及び胆汁中排泄率の和から推定される吸収率 (投与量の約 74%) に対して 1/10 程度であった (2.6.4.5.2.3 項及び 2.6.4.6.2.1 項参照)．サル血漿中では，主に未変化のエンシトレルビルが検出され，代謝物として ensitrelvir indazole 4-Cl と ensitrelvir triazole *N*-desmethyl が検出された．サル尿中では，ensitrelvir triazole *N*-desmethyl が主代謝物として検出され，サル胆汁中では M2 (glucuronide of oxidized ensitrelvir，推定)，M11 (glucuronide of oxidized ensitrelvir indazole *N*-desmethyl，推定)，ensitrelvir triazole *N*-desmethyl，M9 (cysteine conjugate of oxidized and deflurorinated ensitrelvir，推定) が主代謝物として検出された (2.6.4.5.2.3 項参照)．

[^{14}C]-エンシトレルビルフマル酸を外国人健康成人に 375 mg で単回経口投与したとき，尿中及び糞便中の放射能排泄率は，それぞれ投与量の 25.8%及び 64.8%であった．投与後 48 時間以内に糞便中へ排泄された放射能は，投与量のわずか 14.0%であり，この値及び放射能の総回収率 (投与量の 90.6%) からエンシトレルビルフマル酸の経口吸収率は投与量の 76.5%と推定された．また，未変化のエンシトレルビルは，尿及び糞便中に，それぞれ投与量の 18.96%及び 50.73%が排泄された．尿中では，ensitrelvir triazole *N*-desmethyl，ensitrelvir indazole *N*-desmethyl が検出され，糞便中では，*N*-deindazolated form of ensitrelvir (推定)，ensitrelvir triazole *N*-desmethyl，ensitrelvir indazole *N*-desmethyl，ensitrelvir 3-indazolinone，ensitrelvir indazole 4-Cl が検出された

(2.7.2.2.1.2 項参照).

これらの結果より，体内に吸収されたエンシトレルビルはラット及びサルでは主に代謝を経て体外へと排泄されるが，ヒトでは主に未変化のエンシトレルビルとして，尿及び糞便中に排泄されると考えられた．エンシトレルビルの主な代謝経路は，脱メチル化，酸化及び脱フルオロ化と，それに続くグルクロン酸やグルタチオンなどの抱合化，クロル化及び脱インダゾール化と考えられた．また，ヒト肝細胞及びヒト第 1 相試験試料で検出された主要な代謝物はいずれも，ラット及びサルの肝細胞並びに in vivo 試験試料中で検出されていることから，ヒト特異的代謝物はなく，エンシトレルビル由来成分の血漿中総曝露に対して 10%を超える曝露を示す代謝物はないと判断した (2.7.2.2.1.1 項及び 2.7.2.2.1.2 項参照).

In vitro 薬物動態学的薬物相互作用試験の結果，エンシトレルビルは P 糖タンパク質 (P-gp) 及び乳がん耐性タンパク質 (BCRP) の基質であることが示された (2.6.4.7.1 項参照)．本邦の薬物相互作用ガイドライン [7]，FDA ガイダンス [8] 及び EMA ガイドライン [9] に従い，エンシトレルビルの血漿中濃度への影響を検討したところ，P-gp 及び BCRP 阻害剤あるいは誘導剤は，エンシトレルビルの血漿中濃度に影響を及ぼす可能性が示された．エンシトレルビルの代謝には CYP3A を含む複数の代謝酵素が関与しており，in vitro 検討からは CYP3A の寄与が比較的大きいと考えられるものの，[^{14}C]-エンシトレルビルフマル酸を単回経口投与後のヒト代謝物検索の結果から，消失に対する CYP3A 代謝の寄与は限定的であると考えられた (2.7.2.2.1.2 項参照)．単一の酵素が阻害されても他の酵素によってエンシトレルビルは代謝されることから，CYP3A 等の単一代謝酵素の阻害剤がエンシトレルビルの血漿中濃度の上昇に及ぼす影響の程度は小さいと考えられた.

また，エンシトレルビルは CYP2C8 及び CYP3A の阻害作用 (2.6.4.5.4.2 項参照)，CYP1A2，CYP2B6，CYP3A，CYP2C8，CYP2C9 及び CYP2C19 の誘導作用 (2.6.4.5.4.1 項参照)，P-gp，BCRP，有機アニオントランスポーターポリペプチド (OATP) 1B1，OATP1B3，有機アニオントランスポーター (OAT) 1，OAT3，有機カチオントランスポーター (OCT) 1，OCT2，multidrug and toxin extrusion (MATE) 1 の阻害作用を持つことが示された (2.6.4.7.2 項参照)．これらの結果を踏まえ，本邦の薬物相互作用ガイドライン [7]，FDA ガイダンス [8] 及び EMA ガイドライン [9] に従い，申請用法用量である 375/125 mg (投与 1 日目のみ 375 mg，その後投与 2～5 日目に 125 mg 投与の 1 日 1 回反復投与) 投与 5日目の C_{max} (28.1 μg/mL) (2.7.2.2.1.1 項参照) 及び血清タンパク結合率を基に，エンシトレルビルが各基質薬の血漿中濃度に及ぼす影響を考察した (表 2.4.3-1～表 2.4.3-3)．その結果，エンシトレルビルは，申請用法用量において CYP3A の阻害作用，CYP2B6 及び CYP3A の誘導作用並びに P-gp，BCRP，OATP1B1，OATP1B3 及び OAT3 の阻害作用を示し，これらの基質薬の血漿中濃度を変動させる可能性が示された (2.6.4.8 項参照).

結論として，エンシトレルビルフマル酸は良好な経口吸収性を示し，肝臓を含む幅広い組織に分布した後，複数の代謝経路を経て糞と尿に排出された．また，エンシトレルビル及び代謝物は，いずれの組織にも残留しないと考えられた．エンシトレルビルの代謝には CYP3A を含む複数の代謝酵素が関与し，その中では CYP3A の寄与が高いと推定されるが，消失に対する CYP3A 代謝の寄与は限定的であり，CYP3A 阻害剤の併用によるエンシトレルビルの血漿中濃度の変動への影響は小さいと考えられた．エンシトレルビルは P-gp 及び BCRP の基質であるた

め，これらの阻害剤及び誘導剤によりエンシトレルビルの血漿中濃度が変動する可能性が示された．また，エンシトレルビルは，申請用法用量において CYP3A の阻害作用，CYP2B6 及び CYP3A の誘導作用並びに P-gp，BCRP，OATP1B1，OATP1B3 及び OAT3 の阻害作用を示し，これらの基質薬の血漿中濃度を変動させる可能性が示された．

表 2.4.3-1 エンシトレルビルフマル酸による各 CYP 阻害作用のまとめ

CYP 分子種	可逆阻害		TDI		AUCR *	臨床 DDI 試験の必要性 (AUCR>1.25)
	IC_{50} (µmol/L)	Ki (µmol/L)	KI (µmol/L)	K_{inact} (1/min)		
CYP1A2	>100	50	N/A	N/A	1.03	No
CYP2B6	>100	50	N/A	N/A	1.02	No
CYP2C8	35	17.5	N/A	N/A	1.07	No
CYP2C9	>100	50	N/A	N/A	1.03	No
CYP2C19	>100	50	N/A	N/A	1.03	No
CYP2D6	>100	50	N/A	N/A	1.03	No
CYP3A (Midazolam)	>100	50	84	0.046	5.46	Yes
CYP3A (Testosterone)	>100	50	86	0.055	5.98	Yes

The DDI liability in clinical dosing regimen of 375/125 mg (375 mg on Day 1 of dosing, 125 mg once daily on Days 2 to 5 of dosing, C_{max} value =28.1 µg/mL [refer to module 2.7.2.2.1.1]) were evaluated.

DDI = drug-drug interaction; K_I = half-maximal inactivation concentration; k_{inact} = maximal inactivation rate constant; N/A = not applicable

Ki value was calculated as 1/2 IC_{50} value.

* AUCR were calculated using fmCYP (contribution ratio of CYP on clearance) as following;
CYP1A2, caffeine (fmCYP=0.9) [10]; CYP2B6, bupropion (fmCYP=0.52) [11]; CYP2C8, repaglinide (fmCYP=0.83) [12]; CYP2C9, tolbutamide (fmCYP=0.98) [13]; CYP2C19, omeprazole (fmCYP=0.86) [14]; CYP2D6, dextromethorphan (fmCYP=0.96) [15];CYP3A, midazolam (fmCYP=0.93, Fg = 0.57) [16].

表 2.4.3-2 エンシトレルビルフマル酸による各 CYP 誘導作用のまとめ

Enzyme	mRNA / activity	Human hepatocyte lot	EC_{50} (µmol/L)	E_{max} (fold change)	AUCR[a]	臨床 DDI 試験の必要性 (AUCR < 0.8)
CYP1A2	mRNA	HC10-49	N/A	N/A	N/A	No
		HC10-50	N/A	N/A	N/A	
		HC7-33	N/A	N/A	N/A	
	Activity	HC10-49	40.7	7.23	0.827	No
		HC10-50	41.2	5.50	0.870	
		HC7-33	44.1	4.95	0.891	
CYP2B6	mRNA	HC10-49	34.5	4.72	0.922	No
		HC10-50	59.3	13.2	0.859	
		HC7-33	33.2	7.10	0.874	
	Activity	HC10-49	45.3	25.5	0.700	Yes
		HC10-50	34.7	8.99	0.847	
		HC7-33	39.9	12.7	0.812	
CYP2C8	mRNA	HC10-49	NC	NC	N/A	No
		HC10-50	32.1	5.17	0.860	
		HC7-33	NC	NC	N/A	
CYP2C9	mRNA	HC10-49	NC	NC	N/A	No
		HC10-50	19.9	3.37	0.854	
		HC7-33	NC	NC	N/A	
CYP2C19	mRNA	HC10-49	N/A	N/A	N/A	Unlikely[b]
		HC10-50	N/A	N/A	N/A	
		HC7-33	N/A	N/A	N/A	
CYP3A	mRNA	HC10-49	17.7	8.05	0.202	Yes
		HC10-50	33.8	41.3	0.033	
		HC7-33	20.2	20.4	0.063	
	Activity	HC10-49	16.4	4.20	0.391	Yes
		HC10-50	11.7	3.05	0.477	
		HC7-33	N/A	N/A	N/A	

The DDI liability in clinical dosing regimen of 375/125 mg (375 mg on Day 1 of dosing, 125 mg once daily on Days 2 to 5 of dosing, C_{max} value =28.1 µg/mL [refer to module 2.7.2.2.1.1]) were evaluated.
E_{max} = maximum induction effect; N/A = not applicable; NC = not calculated

a AUCR were calculated using fmCYP (contribution ratio of CYP on clearance) as following; CYP1A2, caffeine (fmCYP=0.9) [10]; CYP2B6, bupropion (fmCYP=0.52) [11]; CYP2C8, repaglinide (fmCYP=0.83) [12]; CYP2C9, tolbutamide (fmCYP=0.98) [13]; CYP2C19, omeprazole (fmCYP=0.86) [14]; CYP3A, midazolam (fmCYP=0.93, Fg=0.57) [16].

b DDI liability on CYP2C19 was considered as unlikely because the change of CYP2C19 mRNA expression was less than those of CYP2C8 or CYP2C19 mRNA expression, and DDI liability on CYP2C8 and CYP2C9 was considered as none.

表 2.4.3-3　　エンシトレルビルフマル酸による各トランスポーター阻害作用のまとめ

Transporters	IC_{50} (μmol/L)	Cutoff value	Value	臨床 DDI 試験の必要性
P-gp	11.5	$I_{gut}/IC_{50} \geq 10$	245	Yes
BCRP	8.71	$I_{gut}/IC_{50} \geq 10$	324	Yes
OATP1B1	13.2	$1 + [I]_h/IC_{50} \geq 1.1$	1.12	Yes
OATP1B3	3.51	$1 + [I]_h/IC_{50} \geq 1.1$	1.45	Yes
OCT1	7.24	本邦の薬物相互作用ガイドライン, FDA: No criterion	N/A	N/A
		EMA: $[I]_h/IC_{50} \geq 0.04$	0.218	Yes
OCT2	202	$1 + C_{max,u}/IC_{50} \geq 1.1$	1.01	No
OAT1	47.7	$1 + C_{max,u}/IC_{50} \geq 1.1$	1.03	No
OAT3	8.37	$1 + C_{max,u}/IC_{50} \geq 1.1$	1.14	Yes
MATE1	82.3	$1 + C_{max,u}/IC_{50} \geq 1.02$	1.01	No
MATE2-K	> 250	$1 + C_{max,u}/IC_{50} \geq 1.02$	< 1.005	No
BSEP	> 150	本邦の薬物相互作用ガイドライン, FDA,: No criterion	N/A	N/A
		EMA: $C_{max,u}/IC_{50} \geq 1.02$	< 0.008	No

The DDI liability in clinical dosing regimen of 375/125 mg (375 mg on Day 1 of dosing, 125 mg once daily on Days 2 to 5 of dosing, C_{max} value =28.1 μg/mL [refer to module 2.7.2.2.1.1]) were evaluated.
BSEP = bile-salt export pump; $C_{max,u}$ = the unbound maximum plasma concentration; $[I]_h$ = the maximal unbound concentration in portal vein;
I_{gut} = maximum expected concentration in the intestinal lumen on the apical side of enterocytes (molar dose/250 mL) ;
N/A = not applicable

2.4.4　　毒性試験

2.4.4.1　　単回投与毒性試験

エンシトレルビルフマル酸の急性毒性を評価するための独立した単回投与毒性試験は実施していないが，ラット及びサル探索単回 TK 試験，ラット及びサル 2 週間反復経口投与毒性試験，並びにラットを用いた小核試験の投与初日の成績をもとに急性毒性を評価した．ラット 2 週間反復経口投与毒性試験及び小核試験において，それぞれ最高用量である 1000 mg/kg 及び 2000 mg/kg まで投与初日に死亡又は瀕死は発生しなかった．サル 2 週間反復経口投与毒性試験において，最高用量である 1000 mg/kg (雄) 又は 300 mg/kg (雌) まで投与初日に死亡又は瀕死は発生しなかったが，雄では嘔吐及び摂餌量減少が認められた．ラット及びサルの概略の致死量はそれぞれ 2000 mg/kg を超える量及び 1000 mg/kg を超える量と判断した (2.6.6.2 項参照).

ラット 2 週間反復経口投与毒性試験において 1000 mg/kg のエンシトレルビルフマル酸を投与したときの投与初日のエンシトレルビル血漿中 C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24hr}$ (294～375 μg/mL 及び 5400～6720 μg·hr/mL) は，申請用法用量である 375/125 mg (投与 1 日目のみ 375 mg，その後投与 2～5 日目に 125 mg 投与の 1 日 1 回反復投与) をヒトに投与したときのエンシトレルビル血漿中 C_{max} 及び投与時から投与間隔時間 τ までの血漿中濃度−時間曲線下面積 ($AUC_{0\text{-}\tau}$) (それぞれ 28.1 μg/mL 及び 518.3 μg·hr/mL) と比較して，いずれも 10～13 倍であった (2.6.6.3.1 項及び 2.7.2.2.1.1 項参照). また，サル 2 週間反復経口投与毒性試験において，雄性サルに 1000 mg/kg,

雌性サルに 300 mg/kg を投与した際の投与初日の C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24hr}$ (433～520 µg/mL 及び 8920～10700 µg·hr/mL) は, 申請用法用量である 375/125 mg をヒトに投与したときの C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}\tau}$ のそれぞれ 15～19 倍及び 17～21 倍であった (2.6.6.3.3 項及び 2.7.2.2.1.1 項参照).

2.4.4.2 反復投与毒性試験

ラット及びサル反復経口投与毒性試験で認められた所見の概要を表 2.4.4-1，各試験の無毒性量における血漿中曝露量 (C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24hr}$) 並びに申請用法用量における血漿中曝露量 (C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}\tau}$) との比を表 2.4.4-2 に示す.

ラット 2 週間 (投与量 : 20，100 及び 1000 mg/kg/日) 及び 4 週間反復経口投与毒性試験 (投与量 : 20，50 及び 1000 mg/kg/日) では，1000 mg/kg/日投与群まで毒性変化は認められず，無毒性量はいずれの試験も 1000 mg/kg/日と判断した (表 2.4.4-1). ラット 4 週間反復経口投与毒性試験の無毒性量 (1000 mg/kg/日) におけるエンシトレルビルの血漿中曝露量 (C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24hr}$) は，申請用法用量である 375/125 mg をヒトに投与したときの C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}\tau}$ (28.1 µg/mL 及び 518.3 µg·hr/mL) と比較して，それぞれ 9～13 倍及び 8～10 倍であり，十分な乖離があった (表 2.4.4-2).

サル 2 週間 (雄投与量 : 10，50 及び 1000/300/100 mg/kg/日 [投与 3 日目に 1000 mg/kg/日から 300 mg/kg/日，投与 8 日目に 300 mg/kg/日から 100 mg/kg/日に減量]，雌投与量 : 10，50 及び 300/100 mg/kg/日 [投与 9 日目に 300 mg/kg/日から 100 mg/kg/日に減量]) 及び 4 週間反復経口投与毒性試験 (投与量 : 3，10 及び 30 mg/kg/日) で認められた毒性所見は，死亡/瀕死，嘔吐，摂餌量減少を伴う体重減少，赤血球系パラメータ及び血小板の減少並びに血中炎症性マーカーの変動を伴う多臓器における炎症性変化であった (表 2.4.4-1). サル 4 週間反復経口投与毒性試験の無毒性量 (10 mg/kg/日) におけるエンシトレルビルの血漿中曝露量 (C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24hr}$) は，申請用法用量の C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}\tau}$ (28.1 µg/mL 及び 518.3 µg·hr/mL) と比較して，それぞれ 2.7～3.4 倍及び 2.3～3.6 倍であった (表 2.4.4-2).

サル 2 週間反復経口投与毒性試験では，1000 mg/kg/日の用量又は 1000 mg/kg/日から 300 mg/kg/日に減量して投与した雄，並びに 300 mg/kg/日の用量を投与した雌の一部の個体に死亡/瀕死例が発生した (2.6.6.3.3 項参照). また，サル 2 週間反復経口投与毒性試験の 1000/300/100 mg/kg/日 (雄)，300/100 mg/kg/日 (雌)，及びサル 4 週間反復経口投与毒性試験の 30 mg/kg/日の用量で継続的な摂餌量減少による獣医学的ケアを必要とする動物が発生した (2.6.6.3.3 項及び 2.6.6.3.4 項参照). これらの個体では，摂餌量の減少及び炎症性変化に起因すると考えられる低アルブミン血症 (2.2～3.0 g/dL [333～455 µmol/L]) を呈していた. エンシトレルビルの血清中主要結合タンパクはアルブミン (2.6.4.4.1.1 項参照) であり，一般的に血漿中薬物モル濃度が血漿中アルブミンのモル濃度を超えた場合に，アルブミン結合が飽和し，血中非結合型薬物濃度が急激に増加することが知られている [17]. 重篤な毒性が認められた個体の投与終了日の C_{max} は 211 µg/mL (397 µmol/L) 以上であり，血漿中アルブミンのモル濃度と同等又は超えていたことから，これら個体では非結合型の血漿中エンシトレルビル濃度の増加に伴い，毒性が強く発現した可能性が考えられた.

エンシトレルビルフマル酸に起因するその他の主な所見として，サルでは間接ビリルビン (I.Bil) の増加を主体とする総ビリルビンの増加，並びに HDL 及び低比重リポタンパク (LDL) コレステロールの減少が認められたが，いずれの変化も関連する病理組織学的変化を伴っていなかったため，毒性ではないと判断した (2.6.6.3.3 項及び 2.6.6.3.4 項参照)．サルで認められた毒性変化 (死亡/瀕死，嘔吐，摂餌量の減少，赤血球系パラメータの減少，血小板数の減少及び多臓器における炎症性変化), 並びにビリルビンの増加について, 以下に考察する．コレステロールへの影響については，第 1 相試験 (T1211 試験) において認められた HDL コレステロールの減少及びトリグリセリドの増加の発現機序を検討する目的で実施した試験の結果と共に 2.4.4.7 項で考察する．

- **死亡/瀕死の原因**

サル 2 週間反復経口投与毒性試験において，1000 又は 300 mg/kg/日の用量を反復投与した雄 2 例と 300 mg/kg/日の用量を反復投与した雌 1 例で, 嘔吐又は摂餌量減少を示した後に死亡又は瀕死が認められた．雄 2 例の死亡/瀕死例は，ストレス下にあったことを示唆する変化 (副腎皮質の肥大，胸腺皮質の単細胞壊死) 並びにそれに伴う免疫抑制性の変化 (脾臓やリンパ節におけるリンパ球減少，末梢血中リンパ球数の減少) 及び多臓器における感染性変化 (顎下リンパ節に菌塊を伴う重篤な化膿性炎，菌塊を伴う骨髄炎，心臓・肝臓・肺の血管内の炎症性細胞の集簇) が認められたことから，嘔吐や摂餌量減少による状態悪化及びストレスにより免疫抑制状態となり，日和見感染により死に至ったと考えられた．雌 1 例の瀕死例では，摂餌量減少及び貧血により全身状態が悪化し，瀕死に至ったと考えられた (2.6.6.3.3 項参照).

サル 2 週間反復経口投与毒性試験において死亡/瀕死が認められなかった 50 mg/kg/日における投与 14 日目の C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24hr}$ (それぞれ 378～404 µg/mL 及び 7390～7810 µg·hr/mL) は，申請用法用量における C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}\tau}$ (28.1 µg/mL 及び 518.3 µg·hr/mL) と比較して，それぞれ 13～14 倍及び 14～15倍であった (2.6.6.3.3 項及び 2.7.2.2.1.1 項参照)．一方で，瀕死又は死亡例が認められた 300 mg/kg/日以上の用量で投与した際の C_{max} は 409 µg/mL (769 µmol/L) 以上であり，サル 2 週間反復経口投与毒性試験の馴化期間中の血漿中アルブミン濃度 (3.5～4.5 g/dL [530～682 µmol/L]) を超えている．さらに，瀕死例では摂餌低下や炎症性変化に起因して低アルブミン血症 (血漿中アルブミン濃度：2.8 又は 3.0 g/dL [424 又は 455 µmol/L]) を呈していたため，上述のように死亡及び瀕死例では非結合型の血漿中エンシトレルビル濃度の増加に伴い，毒性が強く発現したと考えられた．一方，申請用法用量における C_{max} は 28.1 µg/mL (52.8 µmol/L) であり，ヒトのアルブミン濃度 (4.1～5.1 g/dL [621～773 µmol/L] [18]) に対し血漿中薬物濃度が十分に低いため，ヒトではアルブミン結合の飽和による非結合型の血漿中エンシトレルビル濃度の増加が起こる可能性は低いと考えられた．

死亡/瀕死の要因と考えられる日和見感染や貧血，それに関連する副作用は，本剤の第 1 相及び第 2/3 相試験において認められていない．死亡/瀕死例に認められた摂餌量減少や嘔吐は，他の生存例でも認められており，表 2.4.4-2 に示す通り，申請用法用量における曝露量はサル 2週間及び 4週間反復経口投与毒性試験の無毒性量における曝露量の範囲内である．さらに，本剤の第 1 相及び第 2/3 相試験では食欲に関連する有害事象は現時点では認められておらず，嘔吐及

び悪心が発現したものの，重篤なものは認められなかった (2.5.5.2 項参照).

以上のことから，申請用法用量では，死亡/瀕死に至る重篤な有害事象発現の可能性は極めて低いと考えられる.

- **嘔吐**

サル 2 週間反復経口投与毒性試験の 1000/300/100 mg/kg/日投与群の雄及び 300/100 mg/kg/日投与群の雌において, 嘔吐が認められた. 雌雄共に嘔吐の発現頻度は投与期間前半の方が高く，投与量減少に伴い発現頻度は低下する傾向にあった. また, 2 週間の休薬期間中に嘔吐は認められなかった (2.6.6.3.3 項参照).

嘔吐は，嘔吐中枢を刺激する原因によって中枢性と末梢性に大別され，中枢性の原因の一つとして, サルを含む複数の動物種で非選択的な PDE4 阻害による嘔吐作用が報告されている [19～22]. エンシトレルビルフマル酸の副次的薬理評価では，PDE4A1A，PDE4B1，PDE4C1 及び PDE4D2 の阻害作用 (IC_{50} = 63.2～75.7 µmol/L) が確認された (2.6.2.3.1 項参照). サル 2 週間反復経口投与毒性試験において嘔吐が認められた 1000/300/100 mg/kg/日投与群の雄及び 300/100 mg/kg/日投与群の雌の非結合型 C_{max} は 14～17 µmol/L (総薬物濃度 [433～520 µg/mL], 分子量 [531.88] 及びサル血漿中タンパク結合率 [98.3%] を基に算出) であり (2.6.6.3.3 項及び 2.6.4.4.1.1 項参照)，各種 PDE4 阻害の IC_{50} 値との乖離は 3.7～5.4 倍であった. 前述した通り，サルの高用量群ではエンシトレルビルとアルブミン結合の飽和が起こり，非結合型の血漿中エンシトレルビル濃度が増加した可能性がある. これらを考慮すると，サル 2 週間反復経口投与毒性試験の高用量群で認められた嘔吐は，非特異的 PDE4 阻害に起因している可能性がある. ヒトにおいては，PDE4 の IC_{50} 値 (63.2～75.7 µmol/L) が，申請用法用量における非結合型 C_{max} (1.2 µmol/L ; 総薬物濃度 [28.1 µg/mL], 分子量 [531.88] 及びヒト血漿中タンパク結合率 [97.7%] から算出) (2.6.4.4.1.1 項及び 2.7.2.2.1.1 項参照) に対して 53～63 倍乖離していることから，申請用法用量において非選択的 PDE4 阻害により嘔吐が起こる懸念は低いと考えられる (2.6.2.6.2 項参照).

申請用法用量におけるヒト曝露量は，サル 4 週間反復経口投与毒性試験の無毒性量における曝露量の範囲内 (C_{max}：2.7～3.4 倍及び AUC：2.3～3.6 倍) にあり (表 2.4.4-2)，本剤の第 1 相及び第 2/3 相試験において嘔吐，悪心が発現したものの，重篤なものはなかった (2.5.5.2 項参照). 以上のことから，申請用法用量において嘔吐や悪心が発現する可能性はあるが，嘔吐や悪心が更なる有害事象に繋がる懸念は低いと考えられる.

- **摂餌量の減少**

サル 2 週間反復経口投与毒性試験の 50 mg/kg/日以上の投与群及び 4 週間反復経口投与毒性試験の 30 mg/kg/日投与群において摂餌量減少が認められた. いずれの試験においても消化管への器質的変化は認められず，その機序は不明であった. サル 4 週間反復経口投与毒性試験の 30 mg/kg/日投与群で認められた摂餌量減少は投与 10 日目以降に発現した. 摂餌量減少は，休薬により回復した (2.6.6.3.3 項及び 2.6.6.3.4 項参照). 申請用法用量におけるヒト曝露量は，サル 4 週間反復経口投与毒性試験の無毒性量における曝露量の範囲内 (C_{max}：2.7～3.4 倍及び

$AUC_{0\text{-}24hr}$：2.3～3.6 倍) にあること (表 2.4.4-2)，エンシトレルビルフマル酸の臨床予定投与期間は 5日間と短期であること，本剤の第 1 相及び第 2/3 相試験では，食欲低下やそれに関連する有害事象は現時点では認められていない (2.5.5.2 項参照) ことから，申請用法用量では，食欲低下やそれに関連した有害事象が起こる可能性は低いと考えられる．

- **赤血球系パラメータの減少**

サル 2 週間反復経口投与毒性試験の 50 mg/kg/日以上の投与群及び 4 週間反復経口投与毒性試験の 30 mg/kg/日投与群において，赤血球系パラメータ (赤血球数，ヘモグロビン濃度及びヘマトクリット値) の減少が認められた．一部の動物では網状赤血球数の増加又は骨髄における造血反応を伴っていた．赤血球容積及び赤血球ヘモグロビン濃度に変動がないこと，血管内溶血を示唆する変化 (アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ，乳酸脱水素酵素，尿色調等の変動) を伴わなかったこと，脾臓でうっ血が認められたことから，30 mg/kg/日以上の投与群において認められた赤血球パラメータの減少は血管外溶血に起因すると考えられた．サル 2 週間及び 4 週間反復経口投与毒性試験のいずれにおいても，投与期間中に認められた赤血球系パラメータの減少は休薬により回復した (2.6.6.3.3 項及び 2.6.6.3.4 項参照).

サル 4 週間反復経口投与毒性試験において 30 mg/kg/日投与群で認められた赤血球系パラメータの減少 (貧血) は，投与 11日目から 27 日目の間に発現したが，本剤の臨床予定投与期間は 5日間と短期である．また，上述したように，申請用法用量におけるヒト曝露量は，サル 4 週間反復経口投与毒性試験の無毒性量における曝露量の範囲内 (C_{max}：2.7～3.4 倍及び $AUC_{0\text{-}24hr}$：2.3～3.6 倍) であること (表 2.4.4-2)，本剤の第 1 相及び第 2/3 相試験において，本剤の投与に関連した貧血やそれに関連した有害事象は現時点では認められていないことから (2.5.5.2 項参照)，申請用法用量では，貧血やそれに関連した有害事象が起こる可能性は低いと考えられる．

- **血小板数の減少**

サル 2 週間反復経口投与毒性試験の 50 mg/kg/日投与群の雌 1 例及び 1000/300/100 mg/kg/日投与群の雄 1 例において，血小板数の減少が認められた．1000/300/100 mg/kg/日投与群の雄では，骨髄において巨核球の増加が見られたことから，骨髄抑制作用を介した変化ではないと考えられた. 50 mg/kg/日投与群の雌では骨髄巨核球数の変化や出血性変化を伴わず, 軽度な変化であった．休薬解剖例では血小板数の減少は認められなかったことから，回復性があると考えられた (2.6.6.3.3 項参照).

サル 4 週間反復経口投与毒性試験では 30 mg/kg/日までの用量において，血小板数の減少は認められなかった (2.6.6.3.4 項参照).

申請用法用量におけるヒト曝露量は，サル 4 週間反復経口投与毒性試験の無毒性量における曝露量の範囲内 (C_{max}：2.7～3.4 倍及び $AUC_{0\text{-}24hr}$：2.3～3.6 倍) にあること (表 2.4.4-2)，本剤の第 1 相及び第 2/3 相試験において本剤の投与に関連した血小板数の減少やそれに関連した有害事象は現時点では認められていないことから (2.5.5.2 項参照)，申請用法用量では，血小板数の減少やそれに関連した有害事象が起こる可能性は低いと考えられる．

- **多臓器における炎症性変化**

サル 2 週間反復経口投与毒性試験の 50 mg/kg/日以上の投与群において，脾臓及びリンパ節における組織球及び形質細胞の増加，肺及び精巣上体の血管周囲並びに食道，涙腺，眼球 (結膜) 及び胆嚢の粘膜固有層に単核炎症細胞主体の炎症性細胞浸潤が認められた．また，サル 4 週間反復経口投与毒性試験では 30 mg/kg/日までの用量において，雌 1 例で胆嚢及び子宮の筋層において炎症性細胞浸潤が認められた (2.6.6.3.3 項及び 2.6.6.3.4 項参照)．生存例においてはいずれの臓器においても実質細胞や血管壁の変性は伴わなかった．上記より，サルにエンシトレルビルフマル酸を反復投与した際に認められた炎症性細胞浸潤は，細胞傷害に対する反応や血管壁傷害に起因したものではないことが示唆された．また，組織球及び形質細胞などの単核炎症細胞を主体とした炎症性病変は，炎症性病変が背景病変として認められることが知られている臓器に認められた [23, 24]．これらの臓器は外来異物によって炎症が起こりやすい場所と考えられることから，上記の炎症性変化はエンシトレルビルフマル酸による外来異物に対する免疫機能の亢進によって誘発された可能性が考えられた．なお，サル 2 週間反復経口投与毒性試験の 50 mg/kg/日投与群の雄，1000/300/100 mg/kg/日投与群の雄及び 300/100 mg/kg/日投与群の雌において，フィブリノーゲンの増加が認められ，これらは上記の単核炎症細胞を主体とした炎症性病変に関連した変化であると考えられた．

サル反復経口投与毒性試験で認められた全ての炎症性変化及び炎症性マーカー変動は休薬により回復した．

申請用法用量におけるヒト曝露量は，サル 4 週間反復経口投与毒性試験の無毒性量における曝露量の範囲内 (C_{max} : 2.7～3.4 倍及び $AUC_{0\text{-}24hr}$: 2.3～3.6 倍) にあること (表 2.4.4-2)，本剤の第 1 相及び第 2/3 相試験において，本剤の投与に関連する炎症性マーカーの変動や炎症性変化を示唆する変化は現時点では認められていないことから (2.5.5.2 項参照)，申請用法用量では，炎症やそれに関連した変化が起こる可能性は低いと考えられる．

- **ビリルビンの増加**

サル 2 週間反復経口投与毒性試験の 50 mg/kg/日以上の投与群及び 4 週間反復経口投与毒性試験の 30 mg/kg/日投与群において総ビリルビン (T.Bil) 及び直接ビリルビン (D.Bil) の増加が認められた．T.Bil の増加よりも D.Bil の増加の方が小さく，血清中ビリルビンの増加は I.Bil の増加が主体であった．しかし，いずれの個体においても血液化学的検査及び病理組織学的検査において，他に胆汁うっ滞及び肝胆道障害を示唆する変化は認められなかった (2.6.6.3.3 項及び 2.6.6.3.4 項参照)．また血清ビリルビンの増加は休薬により回復した．

エンシトレルビルフマル酸は OATP1B1 及び OATP1B3 阻害作用を有する (2.6.4.7.2 項参照)．血中で生成された I.Bil は，OATP1B1 及び OATP1B3 を介して肝臓中に取り込まれ，グルクロン酸抱合された後に排泄される [25]．サル反復経口投与毒性試験において I.Bil 増加が認められた 30 mg/kg/日以上の用量を投与した際のエンシトレルビルの非結合型 C_{max} は 7 µmol/L (総薬物濃度 [211 µg/mL]，分子量 [531.88] 及びサル血漿中タンパク結合率 [98.3%] を基に算出) 以上であり (2.6.6.3.4 項及び 2.6.4.4.1.1 項参照)，この値はエンシトレルビルフマル酸による OATP1B1 阻害作用の IC_{50} 値 (13.2 µmol/L) に近似し，OATP1B3 阻害作用の IC_{50} 値 (3.51 µmol/L) よりも

高かった．このことから，サル反復経口投与毒性試験で認められた血清中ビリルビン値の増加は主に OATP 阻害が関与していることが示唆された．なお，上述したようにサル 2 週間反復経口投与毒性試験の 50 mg/kg/日以上の投与群及び 4 週間反復経口投与毒性試験の 30 mg/kg/日投与群では血管外溶血が示唆されており，赤血球系パラメータの減少を伴っている個体においては血清中ビリルビンの増加の要因として血管外溶血も寄与した可能性も考えられる．

本剤の第 1 相試験においては，高ビリルビン血症及びビリルビン値の増加は認められていない (2.7.6.1 項，2.7.6.2.2.3 項及び 2.7.6.3.2.3 項参照)．第 2/3 相試験 (T1221 試験) では，本剤の投与に関連した副作用として血中ビリルビン増加が，申請用法用量である 375/125 mg 投与により 2.4% (18/763 例)，750/250 mg 投与により 4.7% (36/759 例) で認められたが，本剤の投薬終了後，ベースラインまで戻ったことから，軽度かつ一時的な変動であると考えられた (2.5.5.2 項参照)．

申請用法用量 (375/125 mg) における非結合型 C_{max} (1.2 µmol/L) 値は OATP 阻害の IC_{50} 値 (3.51 及び 13.2 µmol/L) よりも低値であり，OATP 阻害が起こる可能性は低く，申請用法用量では，OATP 阻害に起因した肝障害を引き起こす可能性は低いと考えられる．

表 2.4.4-1　　エンシトレルビルフマル酸の反復経口投与毒性試験における主な毒性所見

動物種	投与期間	投与量[a] (mg/kg/日)	主な毒性所見
ラット	2 週間	20，100，<u>1000</u>	毒性変化なし
	4 週間	20，50，<u>1000</u>	毒性変化なし
サル	2 週間	<u>10</u>，50， [雄]1000/300/100[b]， [雌]300/100[c]	[雄] 1000/300/100 mg/kg/日，[雌] 300/100 mg/kg/日：死亡/瀕死及び嘔吐 ≥ 50 mg/kg/日：赤血球系パラメータの減少，血中炎症性マーカーの変動を伴う多臓器における炎症性変化，摂餌量減少を伴う体重減少及び血小板減少
	4 週間	3，<u>10</u>，30	30 mg/kg/日：赤血球系パラメータの減少，摂餌量減少を伴う体重減少，血中炎症性マーカーの変動を伴う子宮及び胆嚢筋層における炎症性変化

a　下線は無毒性量を示す．
b　投与 3 日目の投与前に瀕死が発生したため，投与 3 日目から投与量を 1000 mg/kg/日から 300 mg/kg/日に減量し，さらに，投与 8 日目の投与前に死亡が発生したため，投与 8 日目から投与量を 100 mg/kg/日に減量した．
c　投与 8 日目の投与後に瀕死が発生したため，投与 9 日目から投与量を 300 mg/kg/日から 100 mg/kg/日に減量した．

表 2.4.4-2　エンシトレルビルフマル酸の反復経口投与毒性試験における無毒性量とエンシトレルビルの血漿中曝露量及び臨床との曝露比

動物種 (投与期間)	投与量 (mg/kg/日)	性別	C_{max} (μg/mL)	$AUC_{0\text{-}24hr}$ (μg·hr/mL)	曝露比	
					C_{max} [a]	$AUC_{0\text{-}24hr}$ [b]
ラット (2 週間)	1000	雄	269	3850	9.6	7.4
		雌	319	3940	11	7.6
ラット (4 週間)	1000	雄	263	4270	9.4	8.2
		雌	359	5380	13	10
サル (2 週間)	10	雄	77.6	1220	2.8	2.4
		雌	75.2	1170	2.7	2.3
サル (4 週間)	10	雄	76.8	1170	2.7	2.3
		雌	95.9	1850	3.4	3.6
ヒト (5 日間)	375/125 mg	女性	28.1	518.3	N/A	N/A

N/A = 適用せず
a　健康成人対象第 1 相試験 (T1211 試験) の 375/125 mg (投与 1 日目のみ 375 mg，その後投与 2～5 日目に 125 mg 投与の 1 日 1 回反復投与) 投与 5 日目の C_{max} (28.1 μg/mL) (2.7.2.2.1.1 項参照) に対する各毒性試験における投与最終日の C_{max} の比.
b　健康成人対象第 1 相試験 (T1211 試験) の 375/125 mg 投与 5 日目の $AUC_{0\text{-}\tau}$ (518.3 μg·hr/mL) (2.7.2.2.1.1 項参照) に対する各毒性試験における投与最終日の $AUC_{0\text{-}24hr}$ の比.

2.4.4.3　遺伝毒性試験

細菌を用いる復帰突然変異試験，ほ乳類培養細胞を用いる小核試験及びげっ歯類を用いる小核試験のいずれにおいても，エンシトレルビルフマル酸の遺伝毒性は認められなかった (2.6.6.4 項参照).

2.4.4.4　がん原性試験

エンシトレルビルフマル酸は臨床での使用期間が最大で 5 日間と短いこと及び実施した遺伝毒性試験の結果が全て陰性であったことより (2.6.6.4 項参照), がん原性の懸念は低いと判断し，がん原性試験は実施しなかった.

2.4.4.5　生殖発生毒性試験

生殖発生毒性試験で認められた主な毒性所見及び無毒性量を表 2.4.4-3，各試験における血漿中曝露量 (C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24hr}$) 並びに申請用法用量における血漿中曝露量 (C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}\tau}$) との比を表 2.4.4-4 に示す.

ラット受胎能及び初期胚発生に関する試験 (投与量：20，60 及び 1000 mg/kg/日) では，1000 mg/kg/日までの用量で，雌雄の一般状態，交尾能及び受胎能，並びに初期胚発生に対して影響は認められなかった (2.6.6.6.1 項参照). また，ラット胚・胎児発生に関する試験 (投与量：20, 60 及び 1000 mg/kg/日) では，1000 mg/kg/日まで胚・胎児の形態異常及び致死は認められず，母動物の生殖機能に影響は認められなかった．1000 mg/kg/日投与群において，母動物で投与期間を通じた体重増加抑制及び投与初期における摂餌量減少が認められた．胚・胎児では 1000 mg/kg/日投与群で軽度の発育遅延及び骨格変異所見として短小過剰肋骨の増加が認められ

たが，この変化は成長に伴い消失する変化として知られている [26, 27]．以上の結果から，雌雄の生殖機能，初期胚発生に関する無毒性量は 1000 mg/kg/日，胚・胎児発生，雄及び母動物の一般毒性に関する無毒性量は 60 mg/kg/日と判断した (2.6.6.6.2 項参照)．受胎能及び初期胚発生に関する試験における血漿中曝露量は測定していないが，ラット 4 週間反復経口投与毒性試験の 1000 mg/kg/日における C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24hr}$ は，申請用法用量 (375/125 mg) における曝露量のそれぞれ 9～13 倍及び 8～10 倍であった (表 2.4.4-2)．

ウサギ胚・胎児発生に関する試験 (投与量：30，100 及び 300 mg/kg/日) では，100 mg/kg/日以上の用量で，母動物において摂餌抑制を伴う体重減少が認められ，胎児の骨格異常 (椎骨・肋骨・胸骨分節等の軸骨格形態異常) 及び短尾が認められた．また，300 mg/kg/日の用量では胚・胎児生存率の低値が認められた．さらに，顕著な摂餌量減少を示した 100 mg/kg/日の 1 例において流産が認められた (2.6.6.6.3 項参照)．妊娠ウサギでは顕著な摂餌抑制による流産及び早産が報告されていることから [28]，本試験で認められた流産はエンシトレルビルフマル酸投与による摂餌量減少に起因していると推察された．これらの結果から，本試験における母動物の一般毒性，母動物の生殖毒性及び胚・胎児発生に関する無毒性量はいずれも 30 mg/kg/日と判断した．妊娠ウサギにおける血漿中エンシトレルビルの曝露量 (C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24hr}$) は，それぞれ 68.8 µg/mL 及び 1260 µg·hr/mL であり，申請用法用量 (375/125 mg) における曝露量のいずれも 2.4 倍であった (表 2.4.4-4)．胎児の軸骨格の形態異常に対する母体毒性の関与，並びに短期間のエンシトレルビルフマル酸の投与が胚・胎児発生に与える影響を検討する目的で，短期間投与 (3～4 日) のウサギ胚・胎児発生に関する追加試験 (投与量：300 mg/kg/日) を実施した．その結果，短期間の投与においても胚・胎児の致死及び軸骨格の形態異常等が認められ，その発現頻度は器官形成期の初期段階でより顕著であった．よって，胎児の軸骨格の形態異常と母体毒性との関連は明らかにならなかった (2.6.6.6.4 項参照)．

ラット出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験 (投与量：20，60 及び 1000 mg/kg/日) では，1000 mg/kg/日の母動物で，体重の増加抑制及び低値傾向，摂餌抑制，並びに 5/20 例において哺育初期に全児死亡が認められた．また，1000 mg/kg/日投与群の F1 出生児で，母体毒性に起因したと考えられる出生児数，生後 0 日及び生後 4日生存率及び哺育期間を通じた出生児体重の低値，また，眼瞼開裂及び雌雄の性成熟の遅延が認められた．以上の結果から，本試験における母動物の生殖機能及び一般毒性並びに次世代の発生に関する無毒性量は 60 mg/kg/日と判断した (2.6.6.6.5 項参照)．本試験において血漿中曝露量は測定していないが，本試験の無毒性量における妊娠ラットの曝露量 (C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24hr}$) は，ラット胚・胎児発生に関する試験の曝露量を参照すると，それぞれ 134 µg/mL 及び 1990 µg·hr/mL であり，申請用法用量 (375/125 mg) における血漿中曝露量のそれぞれ 4.8 倍及び 3.8 倍であった (表 2.4.4-4)．

以上のように，生殖発生毒性試験において，ウサギで母動物に毒性が認められた用量 (臨床曝露量の 5.0 倍相当) で胎児の椎骨・肋骨・胸骨分節等の軸骨格形態異常及び短尾が認められたことから，エンシトレルビルフマル酸は妊婦又は妊娠している可能性のある女性には，投与すべきでないと考える．出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験において，ラットで母動物に毒性が認められた用量 (臨床曝露量の 6.6 倍相当) で妊娠後期及び哺育期間中の投与により児の発生並びに発育に影響が認められた．エンシトレルビルはラットの胎盤を通じ

て胎児に移行すると共に授乳ラットの乳汁に移行することが知られているが，ヒトの乳汁への移行は不明である (2.6.4.4.2.2 項及び 2.6.4.6.1.2 項参照)．また，一般毒性試験の安全域を踏まえるとヒトで哺乳中の児における影響は否定できない．以上より，授乳婦については，エンシトレルビルフマル酸は投与期間中及び投与終了後一定期間は授乳しないことが望ましいと考える．

表 2.4.4-3　　エンシトレルビルフマル酸の生殖発生毒性試験における主な毒性所見及び無毒性量

動物種	試験種	投与経路	投与量 (mg/kg/日)	主な毒性所見と無毒性量
ラット	受胎能及び着床までの初期胚発生	経口	20，60，1000	毒性変化なし 無毒性量 雄一般毒性，雄生殖機能，雌一般毒性，雌生殖機能及び初期胚発生：1000 mg/kg/日
	出生前・出生後の発生並びに母体の機能	経口	20，60，1000	母動物 1000 mg/kg/日：体重の増加抑制及び低値傾向，摂餌抑制，全児死亡 F1 出生児 1000 mg/kg/日：出生児数低値，生後 0 日及び生後 4 日の生存率低下，体重低値，眼瞼開裂及び雌雄性成熟の遅延 無毒性量 母動物一般毒性，母動物生殖機能，次世代の発生：60 mg/kg/日
	胚・胎児発生	経口	20，60，1000	母動物 1000 mg/kg/日：体重増加量及び摂餌量の減少 胚・胎児 1000 mg/kg/日：胎児体重の低値及び骨化遅延，並びに短小過剰肋骨の発現頻度上昇 無毒性量 母動物一般毒性，胚・胎児発生：60 mg/kg/日 母動物生殖機能：1000 mg/kg/日
ウサギ	胚・胎児発生	経口	30，100，300	母動物 100 mg/kg/日：流産 ≥100 mg/kg/日：体重の低値及び摂餌量減少 胚・胎児 ≥100 mg/kg/日：骨格の形態異常 (胸骨分節/肋骨の癒合，肋骨の異常，椎骨の配列異常等)，短尾 300 mg/kg/日：胚・胎児生存率の低値 無毒性量 母動物一般毒性，母動物生殖機能，胚･胎児発生：30 mg/kg/日

表 2.4.4-4　エンシトレルビルフマル酸の生殖発生毒性試験におけるエンシトレルビルの血漿中曝露量と臨床との曝露比

動物種 (投与期間)	投与量 (mg/kg/日)	C_{max} (μg/mL)	$AUC_{0\text{-}24hr}$ (μg·hr/mL)	曝露比	
				C_{max} [a]	$AUC_{0\text{-}24hr}$ [b]
妊娠ラット	20	46.1	618	1.6	1.2
	60 (無毒性量)	134	1990	4.8	3.8
	1000	240	3400	8.5	6.6
妊娠ウサギ	30 (無毒性量)	68.8	1260	2.4	2.4
	100	167	2580	5.9	5.0
	300	220	3840	7.8	7.4
ヒト (5 日間)	375/125 mg	28.1	518.3	N/A	N/A

N/A = 適用せず
a　健康成人対象第 1 相試験 (T1211 試験) の 375/125 mg (投与 1 日目のみ 375 mg，その後投与 2～5 日目に 125 mg 投与の 1 日 1 回反復投与) 投与 5 日目の C_{max} (28.1 μg/mL) (2.7.2.2.1.1 項参照) に対する各毒性試験における投与最終日の C_{max} の比.
b　健康成人対象第 1 相試験 (T1211 試験) の 375/125 mg 投与 5 日目の $AUC_{0\text{-}\tau}$ (518.3 μg·hr/mL) (2.7.2.2.1.1 項参照) に対する各毒性試験における投与最終日の $AUC_{0\text{-}24hr}$ の比.

2.4.4.6　局所刺激性試験

該当する試験なし.

2.4.4.7　その他の毒性試験

- 光毒性試験

3T3 マウス線維芽細胞を用いるニュートラルレッド取込み光毒性試験は陰性であり，エンシトレルビルフマル酸がヒトで光毒性を生じる懸念は非常に低いと判断した (2.6.6.8.1 項参照).

- HDL コレステロール減少機序解明のための試験

本剤の第 1 相試験 (T1211 試験) において認められた HDL コレステロールの減少の発現機序を検討した．Apo-A1 を主要タンパク質として含むリポタンパク質 (HDL) は，末梢組織で余剰となったコレステロールを末梢組織細胞やマクロファージ細胞より回収する．回収されたコレステロールは LCAT によりコレステロールはエステル化され HDL の内部に取り込まれる．これらコレステロール回収及びエステル化の過程において粒子サイズが大きくなった HDL2/3 コレステロールが形成され，その後コレステロールは肝臓等に取り込まれ体外に排泄される [29～33].

本剤の第 1 相試験の 750/250 mg 投与時の各リポタンパク質 (HDL，LDL，VLDL [超低比重リポタンパク] 及びカイロミクロン [CM]) を粒子サイズによりさらに詳細に分画し，各画分中の脂質解析を行った結果，初発の脂質変動は中型 HDL 中のコレステロール減少であった (2.6.6.8.2.3 項参照)．中型 HDL は，HDL が末梢組織等から遊離コレステロールを回収し，サイズの大きくなった画分であると考えられる [34]．そこで，HDL によるコレステロール回収への影響に関する in vitro 試験を実施した結果，エンシトレルビルが HDL によるコレステロール回

収能及び LCAT を直接的に阻害する可能性は低いと考えられた (2.6.6.8.2.1 項及び 2.6.6.8.2.2 項参照). また，糞中及び胆汁中へのコレステロール排泄に及ぼす影響を確認する目的で，エンシトレルビルフマル酸をカニクイザルに 10 日間反復経口投与した結果 (投与量：10 mg/kg/日), 投与 2 日目から HDL コレステロール及び LDL コレステロール減少を伴う血中総コレステロール減少が認められたものの，糞中及び胆汁中の総コレステロール及びその代謝産物である総胆汁酸量に変化は認められなかった (2.6.6.8.2.4 項参照). 以上より，本剤の第 1 相試験において認められた HDL コレステロールの減少は中型 HDL のコレステロール減少が初動であったが，その詳細な機序は不明であった.

本剤の第 1 相試験の 750/250 mg 投与時の脂質解析の結果，HDL コレステロール減少の他に認められた主な変化は小型 LDL のコレステロール減少，並びに大型 LDL 及び小型 VLDL のトリグリセリドの増加であった．HDL 中のコレステロールは，LCAT によりエステル化された後に，コレステリルエステル転送タンパク (CETP) によって LDL 及び VLDL 分画のトリグリセリドと交換される [35]. エンシトレルビルの投与により中型 HDL のコレステロール減少が起こり，その二次的変化として CETP による HDL コレステロールと LDL 及び VLDL のトリグリセリドの交換が減少し，小型 LDL のコレステロール減少や，小型 VLDL 及び大型 LDL のトリグリセリド増加等の変化が生じたと考えられた．エンシトレルビルフマル酸のサル 4 週間反復経口投与毒性試験において，投与 10 及び 27 日目に 10 mg/kg/日以上の用量で HDL 及び LDL コレステロール減少が認められた．10 mg/kg/日の用量では総コレステロールの減少，並びに 30 mg/kg/日の用量では総コレステロールの増加及びトリグリセリドの増加を伴っていた．また病理組織学的検査では，門脈周囲における肝細胞肥大が認められた (2.6.6.3.4 項参照). サルで認められた脂質の変動に関連する病理組織学的な変化は，血中コレステロール減少に伴う肝臓でのリポタンパク質又はコレステロールの合成亢進による変化と推察される門脈周囲における肝細胞肥大のみであったこと，本剤の臨床試験で著明なトリグリセリド増加に至っていないこと，認められた脂質の変動は本剤の第 1 相試験及び第 2/3 相試験において投与終了後速やかに回復したことから (2.5.5.3 項及び 2.7.4.7 項参照), 総じて脂質への影響が更なる有害事象に繋がる懸念は低いと判断した.

2.4.5 総括及び結論

本剤の薬理学的，薬物動態学的及び毒性学的プロファイルを明らかにするために適切な用量を設定して非臨床試験を実施した．非臨床試験の成績から，ヒトで注意すべき本剤の毒性所見として，摂餌量の減少，赤血球系パラメータの減少，多臓器における炎症性変化，血小板数の減少及び嘔吐が認められた．上記所見が認められた曝露量と申請用法用量におけるヒト曝露量の間に 2～3倍の乖離があり，嘔吐を除き，毒性試験で認められた所見は臨床試験では認められていない．生殖発生毒性試験では，ウサギで胚致死並びに胎児の椎骨・肋骨・胸骨分節等の軸骨格形態異常及び短尾が認められたことから，エンシトレルビルフマル酸は妊婦又は妊娠している可能性のある女性には，投与すべきでないと考える．また，出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験において，妊娠後期及び哺育期間中の投与により児の発生並びに発育に影響を示す可能性が示唆された．エンシトレルビルフマル酸はラットの胎盤を通じて胎児

に移行すると共に授乳ラットの乳汁に移行するが，ヒトの乳汁への移行は不明である．また，一般毒性試験の安全域を踏まえるとヒトで哺乳中の児における影響は否定できない．以上より，授乳婦については，エンシトレルビルフマル酸は投与期間中及び投与終了後一定期間は授乳しないことが望ましいと考える．

In vitro 薬物動態学的相互作用試験の結果，エンシトレルビルは P-gp 及び BCRP 基質であるため，これらの阻害剤及び誘導剤によりエンシトレルビルの血漿中濃度が変動する可能性が示された．また，各極のガイドライン及びガイダンス [7～9] に従い申請用法用量においてエンシトレルビルが各基質薬の PK に与える影響を考察したところ，CYP3A 阻害作用，CYP2B6 の誘導作用並びに P-gp，BCRP，OATP1B1，OATP1B3 及び OAT3 の阻害作用を示し，これらの基質薬の血漿中濃度を変動させる可能性が示唆された．

エンシトレルビルフマル酸におけるヒトで注意すべき安全性は評価できており，非臨床評価として充足していると考える．

2.4.6 参考文献一覧

1. Helmy YA, Fawzy M, Elaswad A, Sobieh A, Kenney SP, Shehata AA. The COVID-19 pandemic: A comprehensive review of taxonomy, genetics, epidemiology, diagnosis, treatment, and control. J Clin Med 2020;9(4):1225.
2. Hamming I, Timens W, Bulthuis ML, Lely AT, Navis G, van Goor H. Tissue distribution of ACE2 protein, the functional receptor for SARS coronavirus. A first step in understanding SARS pathogenesis. J Pathol 2004;203:631-7.
3. World Health Organization. Tracking SARS-CoV-2 variants (who.int). https://www.who.int/en/activities/tracking-SARS-CoV-2-variants/
4. World Health Organization. Classification of Omicron (B.1.1.529): SARS-CoV-2 Variant of Concern. https://www.who.int/news/item/26-11-2021-classification-of-omicron-(b.1.1.529)-sars-cov-2-variant-of-concern
5. Boras B, Jones RM, Anson BJ, et al. Preclinical characterization of an intravenous coronavirus 3CL protease inhibitor for the potential treatment of COVID19. Nature Communications 2021;12:6055:https://doi.org/10.1038/s41467-021-26239-2.
6. Borea PA, Stefania G, Stefania M, Fabrizio V, Katia V. Pharmacology of adenosine receptors: The state of the Art. Physiol Rev 2018;98(3):1591-625.
7. 厚生労働省医薬・生活衛生局医薬品審査管理課．医薬品開発と適正な情報提供のための薬物相互作用ガイドライン．平成 30 年 7 月．
8. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research. Guidance for Industry. In vitro Drug Interaction Studies—Cytochrome P450 Enzyme- and Transporter-Mediated Drug Interactions. January 2020.
9. European Medicines Agency. Committee for Human Medicinal Products. Guideline on the Investigation of Drug Interactions. January 2013.
10. Banks NF. Genetic polymorphisms in ADORA2A and CYP1A2 influence caffeine's effect on

postprandial glycaemia. Sci Rep 2019;9(1):10532.
11. Ke AB, Barter Z, Rowland-Yeo K. Evaluation of CYP2B6 induction and prediction of clinical DDI using PBPK modeling. ASCPT Annual Meeting, March 15-18, 2017, Washington DC. https://www.certara.com/app/uploads/Resources/Posters/Ke_2017_ASCPT_CYP2B6.pdf
12. Fowler S, Morcos P, Cleary Y, et al. Progress in prediction and interpretation of clinically relevant metabolic drug-drug interactions: A minireview illustrating recent developments and current opportunities. Curr Pharmacol Rep 2017;3(1):36-49.
13. Chiba K, Shimizu K, Kato M, et al. Estimation of interindividual variability of pharmacokinetics of CYP2C9 substrates in humans. J Pharm Sci 2017;106(9):2695-703.
14. Cuypers ML, Chanteux H, Gillent E, et al. (-)- N-3-benzylphenobarbital is superior to omeprazole and (+)- N-3-benzylnirvanol as a CYP2C19 inhibitor in suspended human hepatocytes. Drug Metab Dispos 2020;48(11):1121-8.
15. VandenBrink BM, Foti RS, Rock DA, Wienkers LC, Wahlstrom JL. Prediction of CYP2D6 drug interactions from in vitro data: evidence for substrate-dependent inhibition. Drug Metab Dispos 2012;40(1):47-53.
16. Obach RS, Walsky RL, Venkatakrishnan K, Gaman EA, Houston JB, Tremaine LM. The utility of in vitro cytochrome P450 inhibition data in the prediction of drug-drug interactions. J Pharmaco Exp Ther 2006;316(1):336-48.
17. Koch-Weser J, Sellers EM. Binding of drugs to serum albumin (first of two parts). N Engl J Med 1976;294:311-6.
18. 検査値アプローチ 3. 基準範囲・臨床判断値. In：一般社団法人 日本臨床検査医学会. 臨床検査のガイドライン JSLM2018 検査値アプローチ/症候/疾患. 宇宙堂八木書店; 2018. p14.
19. Robichaud A, Tattersall FD, Choudhury I, Rodger IW. Emesis induced by inhibitors of type IV cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE IV) in the ferret. Neuropharmacology 1999;38:289-97.
20. Heaslip RJ, Evans DY. Emetic, central nervous system, and pulmonary activities of rolipram in the dog. Eur J Pharmacol 1995;286:281-90.
21. Losco PE, Evans EW, Barat SA, et al. The toxicity of SCH 351591, a novel phosphodiesterase-4 inhibitor, in cynomolgus monkeys. Toxicol Pathol 2004;32:295-308.
22. Zussman BD, Benincosa LJ, Webber DM, et al. An overview of the pharmacokinetics of cilomilast (Ariflo®), a new, orally active phosphodiesterase 4 inhibitor, in healthy young and elderly volunteers. J Clin Pharmacol 2001;41:950-58.
23. Chamanza R, Marxfeld HA, Blanco AI, Naylor SW, Bradley AE. Incidences and range of spontaneous findings in control cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*) used in toxicity studies. Toxicol Pathol 2010;38:642-57.
24. Colman K, Andrews RN, Atkins H, et al. International harmonization of nomenclature and diagnostic criteria (INHAND): Non-proliferative and proliferative lesions of the non-human primate (*M. fascicularis*). J Toxicol Pathol 2021;34(3 Suppl):1S-182S.
25. Keppler D. The roles of MRP2, MRP3, OATP1B1, and OATP1B3 in conjugated hyperbilirubinemia.

Drug Metab Dispos 2014;42:561–5.
26. Wickramaratne GAS. The post-natal fate of supernumerary ribs in rat teratogenicity studies. J Appl Toxicol 1988;8(2):91-4.
27. Chernoff N, Rogers JM, Turner CI, Francis BM. Significance of supernumerary ribs in rodent developmental toxicity studies: postnatal persistence in rats and mice. Fundam Appl Toxicol 1991;17;448–53.
28. Matsuzawa T, Nakata M, Goto I, Tsushima M. Dietary deprivation induces fetal loss and abortion in rabbits. Toxicology 1981;22:255-9.
29. Ouimet M, Barrett TJ, Fisher EA. HDL and reverse cholesterol transport. Circ Res 2019;124:1505-18.
30. Glomset JA. The Plasma Lecithin:cholesterol Acyltransferase Reaction. J Lipid Res 1968;9(2):155-67.
31. Remaley AT, Amar M, Sviridov D. HDL-replacement therapy: Mechanism of action, types of agents and potential clinical indications. Expert Rev Cardiovasc Ther 2008;6(9):1203-15.
32. Rousset X, Vaisman B, Amar M, Sethi AA, Remaley AT. Lecithin:cholesterol acyltransferase: from biochemistry to role in cardiovascular disease. Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes 2009;16(2):163-71.
33. Yamamoto S, Narita I, Kotani K. The Macrophage and its related cholesterol efflux as a HDL function index in atherosclerosis. Clin Chim Acta 2016;457:117-22.
34. Furusyo N, Ai M, Okazaki M, et al. Serum cholesterol and triglyceride reference ranges of twenty lipoprotein subclasses for healthy Japanese men and women. Atherosclerosis 2013;231: 238-45.
35. Barter PJ, Brewer HB, Chapman MJ, et al. Cholesteryl ester transfer protein: A novel target for raising HDL and inhibiting atherosclerosis. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2003;23:160-7.