ゾコーバ錠 125mg

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

2.6.6 毒性試験の概要文

塩野義製薬株式会社

目次

略号及び用語定義一覧表 4
2.6.6 毒性試験の概要文 5
2.6.6.1 まとめ 5
2.6.6.2 単回投与毒性試験 9
2.6.6.3 反復投与毒性試験 9
2.6.6.3.1 ラット 2 週間反復経口投与毒性試験 9
2.6.6.3.2 ラット 4 週間反復経口投与毒性試験 11
2.6.6.3.3 サル 2 週間反復経口投与毒性試験 12
2.6.6.3.4 サル 4 週間反復経口投与毒性試験 21
2.6.6.4 遺伝毒性試験 24
2.6.6.4.1 細菌を用いる復帰突然変異試験 24
2.6.6.4.2 ほ乳類の培養細胞を用いる小核試験 25
2.6.6.4.3 ラットを用いる小核試験 25
2.6.6.5 がん原性試験 26
2.6.6.6 生殖発生毒性試験 26
2.6.6.6.1 ラット受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験 26
2.6.6.6.2 ラット胚・胎児発生に関する試験 27
2.6.6.6.3 ウサギ胚・胎児発生に関する試験 28
2.6.6.6.4 ウサギ胚・胎児発生に関する追加試験 30
2.6.6.6.5 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 33
2.6.6.7 局所刺激性試験 34
2.6.6.8 その他の毒性試験 35
2.6.6.8.1 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 35
2.6.6.8.2 HDL コレステロール減少機序解明のための試験 35
2.6.6.8.2.1 血漿中レシチンコレステロールアシルトランスフェラーゼ活性に対する作用 36
2.6.6.8.2.2 THP-1 細胞からのコレステロール流出に対する作用 37
2.6.6.8.2.3 ヒト血漿における脂質解析 37
2.6.6.8.2.4 サルにおけるコレステロール排泄への作用 39
2.6.6.8.3 不純物の細菌を用いる復帰突然変異試験 40
2.6.6.9 考察及び結論 41
2.6.6.9.1 急性毒性 41
2.6.6.9.2 反復投与毒性 41
2.6.6.9.3 遺伝毒性 47
2.6.6.9.4 がん原生 47

2.6.6.9.5 生殖発生毒性 47
2.6.6.9.6 その他の毒性試験 51
2.6.6.10 図表 52
2.6.6.11 参考文献 52

表

表 2.6.6.1-1 主要なエンシトレルビルフマル酸の毒性試験一覧 5
表 2.6.6.1-2 エンシトレルビルフマル酸不純物の毒性試験一覧 5
表 2.6.6.3-1 ラット 2 週間反復経口投与毒性試験における血漿中エンシトレルビルの TK パラメータ 11
表 2.6.6.3-2 ラット 4 週間反復経口投与毒性試験における血漿中エンシトレルビルの TK パラメータ 12
表 2.6.6.3-3 サル 2 週間反復経口投与毒性試験の死亡/瀕死例で認められたエンシトレルビルフマル酸投与に起因する変化の概要 16
表 2.6.6.3-4 サル 2 週間反復経口投与毒性試験における血漿中エンシトレルビルの TK パラメータ 21
表 2.6.6.3-5 サル 4 週間反復経口投与毒性試験における血漿中エンシトレルビルの TK パラメータ 24
表 2.6.6.6-1 ラット胚・胎児発生に関する試験における血漿中エンシトレルビルの TK パラメータ 28
表 2.6.6.6-2 ウサギ胚・胎児発生に関する試験における血漿中エンシトレルビルの TK パラメータ 30
表 2.6.6.6-3 ウサギ胚・胎児発生に関する追加試験における血漿中エンシトレルビルの TK パラメータ 33
表 2.6.6.9-1 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 46
表 2.6.6.9-2 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 47
表 2.6.6.9-3 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 50
表 2.6.6.9-4 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 51

図

図 2.6.6.8-1 コレステロールの生体内における輸送経路 36

略号及び用語定義一覧表

略号	英語	日本語
APTT	activated partial thromboplastin time	活性化部分トロンボプラスチン時間
AST	aspartate aminotransferase	アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ
$AUC_{0\text{-}24hr}$	area under the plasma concentration-time curve from time 0 to 24 hours post-dose	時間 0 から投与後 24 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
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
CRP	C-reactive protein	C 反応性タンパク
D.Bil	direct bilirubin	直接ビリルビン
DMSO	dimethyl sulfoxide	ジメチルスルホキシド
Fbg	fibrinogen	フィブリノゲン
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)
HDL	high density lipoprotein	高比重リポタンパク質
I.Bil	indirect bilirubin	間接ビリルビン
IC_{50}	50% inhibitory concentration	50%阻害濃度
LCAT	lecithin:cholesterol acyltransferase	レシチンコレステロールアシルトランスフェラーゼ
LD	lactate dehydrogenase	乳酸脱水素酵素
LDL	low density lipoprotein	低比重リポタンパク質
MC	methylcellulose aqueous solution	メチルセルロース水溶液
MPE	mean photo effect	平均光作用
OATP	organic anion transporting polypeptide	有機アニオントランスポーター
OECD	Organisation for Economic Co-operation and Development	経済協力開発機構
PDE	phosphodiesterase	ホスホジエステラーゼ
PIF	photo irritation factor	光毒性係数
PT	prothrombin time	プロトロンビン時間
QTc	corrected QT interval	補正 QT 間隔
S9 mix	metabolic activation system	代謝活性化系
T.Bil	total bilirubin	総ビリルビン
TCR	T cell receptor	T 細胞受容体
TK	toxicokinetic(s)	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質

2.6.6 毒性試験の概要文

2.6.6.1 まとめ

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) の安全性評価に関し，下表に示すラット及びサルを用いた探索単回投与毒性試験, 反復投与毒性試験, 遺伝毒性試験, ラット及びウサギを用いた生殖発生毒性試験，並びにその他の毒性試験を実施した．特に明記しない限り，試験は Good Laboratory Practice (GLP) 適用下で実施し，エンシトレルビルフマル酸の投与量はエンシトレルビル遊離塩基の量で示した．

表 2.6.6.1-1 主要なエンシトレルビルフマル酸の毒性試験一覧

試験の種類及び期間	動物種等	投与 (処置) 経路	GLP 適用
単回投与毒性試験 [a]	ラット，サル	経口	非適
反復投与毒性試験			
2 週間	ラット，サル	経口	適
4 週間	ラット，サル	経口	適
遺伝毒性試験			
細菌を用いる復帰突然変異試験	ネズミチフス菌，大腸菌	In vitro	適
ほ乳類培養細胞を用いる小核試験	ヒトリンパ球由来培養細胞	In vitro	適
ラットを用いる小核試験	ラット	経口	適
生殖発生毒性試験			
受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験	ラット	経口	適
胚・胎児発生に関する試験	ラット，ウサギ	経口	適
胚・胎児発生に関する追加試験	ウサギ	経口	適
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	ラット	経口	適
その他の毒性試験			
光毒性試験	3T3 マウス線維芽細胞	In vitro	適
HDL コレステロール減少機序解明のための試験	ラット血漿，ヒト単球由来細胞，ヒト血清	In vitro	非適 [b]
	サル	In vivo	非適 [b]
	ヒト血漿 [c]	N/A	非適 [b]

N/A = not applicable
a 探索単回トキシコキネティクス試験として実施
b 信頼性基準 (医薬品，医療機器等の品質，有効性及び安全性の確保等に関する法律施行規則第 43 条) を適用
c 第 1 相試験 (T1211 試験) コホート G のヒト血漿サンプルを用いた試験

表 2.6.6.1-2 エンシトレルビルフマル酸不純物の毒性試験一覧

試験の種類及び期間	動物種等	投与 (処置) 経路	GLP 適用
その他の不純物の毒性試験			
細菌を用いる復帰突然変異試験	ネズミチフス菌，大腸菌	In vitro	適/非適

単回投与毒性試験

急性毒性を評価するための独立したエンシトレルビルフマル酸の単回投与毒性試験は実施せ

ず，ラット及びサル探索単回トキシコキネティクス (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る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．

反復投与毒性試験

ラット 2 週間反復経口投与毒性試験 (投与量：20，100 及び 1000 mg/kg/日) 及びラット 4 週間反復経口投与毒性試験 (投与量：20，50 及び 1000 mg/kg/日) において，雌雄共に最高用量である 1000 mg/kg/日までエンシトレルビルフマル酸投与に起因する毒性変化は認められず，無毒性量は 1000 mg/kg/日であると判断した．

サル 2 週間反復経口投与毒性試験 (雄投与量：10，50 及び 1000/300/100 mg/kg/日 [投与 3 日目及び 8 日目に減量]，雌投与量：10，50 及び 300/100 mg/kg/日 [投与 9 日目に減量]) では，300 mg/kg/日以上の用量を反復投与時に嘔吐，全身状態の悪化が認められ，死亡又は瀕死が発生した．50 mg/kg/日以上の用量で脾臓及びリンパ節における組織球及び形質細胞の増加，肺及び精巣上体における単核炎症細胞の血管周囲浸潤，食道，涙腺，眼球 (結膜) 及び胆嚢における単核炎症細胞の浸潤，摂餌量及び体重減少，赤血球パラメータ (赤血球数，ヘモグロビン濃度及びヘマトクリット値) と血小板数の減少が認められた．全ての毒性変化は，2 週間の休薬期間により回復性を示した．以上の結果から，サル 2 週間反復経口投与毒性試験における無毒性量は，10 mg/kg/日であると判断した．

サル 4 週間反復経口投与毒性試験 (投与量：3，10 及び 30 mg/kg/日) では，30 mg/kg/日投与群の雌で赤血球パラメータの減少並びに摂餌量及び体重減少，胆嚢及び子宮における炎症性細胞浸潤が認められた．サル 4 週間反復経口投与毒性試験における無毒性量は 10 mg/kg/日であると判断した．

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．

がん原性試験

臨床でのエンシトレルビルフマル酸使用期間が最大で 5 日間と短いこと及びエンシトレルビルフマル酸の遺伝毒性試験の結果が全て陰性であったことから，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．

生殖発生毒性試験

ラット受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験 (投与量：20，60 及び 1000 mg/kg/日)

では，エンシトレルビルフマル酸投与に起因する毒性変化は，雌雄共に最高用量である1000 mg/kg/日まで認められず，雌雄親動物の一般毒性，雌雄親動物の生殖機能及び初期胚発生に関する無毒性量は1000 mg/kg/日と判断した.

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/日投与群において，母動物で投与期間中に体重増加抑制及び投与初期に摂餌量減少が認められた. 胚・胎児では，1000 mg/kg/日投与群で軽度の胎児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. 無毒性量は，母動物の一般毒性及び胚・胎児の発生に関して60 mg/kg/日，母動物の生殖機能に関して1000 mg/kg/日と判断した.

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/日以上の投与群において，強い母体毒性と共に，胚・胎児の致死又は形態異常が認められた．100又は300 mg/kg/日投与群で認められた変化は，軸骨格の形態異常及び変異，並びに短尾であった．また，100 mg/kg/日投与群の1例では母体毒性に起因した流産が認められた．以上の結果より，母動物の一般毒性及び生殖機能並びに胚・胎児の発生に関する無毒性量は30 mg/kg/日と判断した. 短期間の投与 (3～4日) による影響を確認したウサギ胚・胎児発生に関する追加試験 (投与量：300 mg/kg/日) においても胚・胎児の致死及び骨格異常等が認められ，その影響は器官形成期の初期段階でより顕著であった.

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/日投与群の母動物で体重の増加抑制及び低値傾向並びに摂餌抑制が認められ，5/20例で母体毒性に起因すると考えられる哺育初期の全児死亡が認められた. F1出生児では，1000 mg/kg/日投与群で母体毒性に伴う出生児数，生存率の低値及び体重低値，並びに眼瞼開裂及び雌雄の性成熟の遅延が認められた．以上の結果より，母動物の一般毒性及び生殖機能並びに次世代の発生に関する無毒性量はいずれも60 mg/kg/日と判断した.

局所刺激性試験

予定臨床適用経路が経口であるため，局所刺激性試験は実施しなかった.

その他の毒性試験

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によりヒトで光毒性を生じる懸念は非常に低いと判断した.

エンシトレルビルフマル酸製剤 (本剤) の第1相試験 (T1211試験) において認められた高比重リポタンパク質 (HDL) コレステロールの減少の発現機序を検討する目的で，HDLのコレステロール回収能及びHDLによるコレステロールの内部取り込みに関与する酵素である血漿中レシチンコレステロールアシルトランスフェラーゼ (LCAT) 活性に対するエンシトレルビルフマル酸の作用をin vitroで検証した．その結果，エンシトレルビルフマル酸がHDLによるコレステロール回収能及びラット血漿中LCAT活性に影響を及ぼす可能性は低いと考えられた．また，本剤の第1相試験 (T1211試験) のコホートG (750 mgを初日に投与し，2日目以降に250 mgを4日間反復投与した群) の血漿を用いた脂質解析より，エンシトレルビルフマル酸による主なHDLコレステロールへの影響は，コレステロールを回収し比較的粒子のサイズが大きくなっ

た HDL のコレステロール減少であると考えられた．また，コレステロールの体外排泄が促進されているか確認する目的で，サルでの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評価したが，エンシトレルビルフマル酸によるコレステロールの排泄促進は認められなかった．

2.6.6.2 単回投与毒性試験

参考資料 4.2.3.1-01，4.2.3.1-02
評価資料 4.3.2.3-01，4.2.3.2-03，4.2.3.3-05
概要表 2.6.7.5，2.6.7.6.1，2.6.7.6.3

エンシトレルビルフマル酸の独立した単回投与毒性試験は実施せず，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る小核試験の投与初日の成績を基に急性毒性を評価した.

ラット及びサルの探索単回 TK 試験 (投与量：100，300 及び 1000 mg/kg) ではラット，サル共にいずれの用量においても投与初日に死亡又は瀕死例は発生しなかった．サルでは，1000 mg/kg の用量で，嘔吐，摂餌量減少並びに投与前値と比較してクレアチニン及び尿素窒素の高値が認められた．また，いずれの用量においても総ビリルビン (T. Bil) 及び直接ビリルビン (D. Bil) の高値が認められた (2.6.7.5 項参照).

ラット 2 週間反復経口投与毒性試験 (投与量：20，100 及び 1000 mg/kg/日) 及びサル 2 週間反復経口投与毒性試験 (投与量：10，50 及び 1000 mg/kg/日 [雄]，10，50 及び 300 mg/kg/日 [雌]) において，いずれの用量においても投与初日に死亡又は瀕死例は発生しなかったが，サルでは 1000 mg/kg/日投与群の雄で嘔吐及び摂餌量減少が認められた.

ラットを用いた小核試験 (投与量：250，500，1000 及び 2000 mg/kg/日 [雄のみ]) では，いずれの用量においても投与初日に死亡及び瀕死は発生せず，一般状態及び体重に影響は認められなかった.

以上の成績より，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.

2.6.6.3 反復投与毒性試験

2.6.6.3.1 ラット 2 週間反復経口投与毒性試験

評価資料 4.2.3.2-01
参考資料 4.2.3.1-01
概要表 2.6.7.5，2.6.7.6.1

(1) 用量設定根拠

Sprague Dawley 系ラットにおける探索単回 TK 試験 (投与量：100，300 及び 1000 mg/kg) では，エンシトレルビルフマル酸を単回経口投与し，TK 測定と共に一般状態観察，体重測定，血液化学的検査，肉眼検査及び病理組織学的検査を実施した (2.6.7.5 項参照). 本試験は GLP 非適用下で実施した.

投与期間を通じてエンシトレルビルフマル酸投与に起因する死亡又は瀕死は発生しなかった．いずれの用量においてもエンシトレルビルフマル酸の投与に起因した変化は認められなかった.

以上の結果から，ラット 2 週間反復経口投与毒性試験の高用量として ICH M3 (R2) ガイドラインで投与限界量として推奨されている 1000 mg/kg/日を設定した．また，毒性の用量反応関係を確認するため，低用量及び中間用量として，それぞれ 20 及び 100 mg/kg/日を設定した.

(2) 試験方法及び成績

Sprague Dawley 系ラット (各群雌雄各 10 例) に 0 (対照群)，20，100 又は 1000 mg/kg/日のエンシトレルビルフマル酸を 1 日 1 回 2 週間反復経口投与し，一般毒性を評価した．対照群には媒体 (0.5%メチルセルロース水溶液 [MC]) を投与した．また，回復性を評価するため，対照群及び 1000 mg/kg/日投与群には，投与期間終了後に 2 週間の休薬期間を設けた動物を追加した (各群雌雄各 5 例)．一般状態観察，体重測定，摂餌量測定，眼科学的検査，尿検査，血液学的検査，血液化学的検査，器官重量測定，肉眼検査及び病理組織学的検査を行った．また，エンシトレルビルの TK 評価のため，サテライト群 (各群雌雄各 4 例) に同じ条件でエンシトレルビルフマル酸を投与し，投与 1 及び 14 日目に採取した血漿試料を用いて血漿中エンシトレルビル濃度を測定した．

投与期間を通じてエンシトレルビルフマル酸投与に起因する死亡又は瀕死は発生しなかった．いずれの用量においても毒性変化は認められなかった．

エンシトレルビルフマル酸投与に起因すると考えられるが，軽度，一過性又は関連する組織学的変化を伴わない等の理由により毒性と判断しなかった変化を以下に示す．

- 軽度な体重増加抑制 (投与 14 日目時点で対照群比 −5%) (雄 1000 mg/kg/日)
- 投与期間初期に軽度な摂餌量の減少 (対照群比 −10%～ −11%) (雌雄 1000 mg/kg/日)
- グルコースの減少 (雄 1000 mg/kg/日)

いずれの用量においても，一般状態，尿検査，眼科学的検査，肉眼検査及び病理組織学的検査ではエンシトレルビルフマル酸投与に起因する変化は認められなかった．

エンシトレルビルの最高血漿中濃度 (C_{max}) 及び時間 0 から投与後 24 時間までの血漿中濃度－時間曲線下面積（$AUC_{0\text{-}24hr}$) の値を表 2.6.6.3-1 に示す．血漿中エンシトレルビルの C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24hr}$ は，20～100 mg/kg/日投与群の間で用量比で増加し，100～1000 mg/kg/日投与群の間で用量比未満で増加した．また，いずれの用量においても C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24hr}$ に性差は認められなかった．20 又は 100 mg/kg/日投与群において，投与 14 日目における血漿中エンシトレルビルの C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24hr}$ は，投与 1 日目に比べて高値を示したが，1000 mg/kg/日投与群のみ低値を示した．

本試験では，エンシトレルビルフマル酸投与に起因する毒性変化は，雌雄共に最高用量である 1000 mg/kg/日まで認められなかった．以上の結果から，ラット 2 週間反復経口投与毒性試験における無毒性量は，1000 mg/kg/日であると判断した．

表 2.6.6.3-1 ラット 2 週間反復経口投与毒性試験における血漿中エンシトレルビルの TK パラメータ

TK parameters of ensitrelvir		Dose (mg/kg/day)					
		20		100		1000	
		Male	Female	Male	Female	Male	Female
C_{max} (μg/mL)	Day 1	22.1	38.0	133	214	294	375
	Day 14	37.9	38.8	178	206	269	319
$AUC_{0\text{-}24hr}$ (μg·hr/mL)	Day 1	227	330	1930	2750	5400	6720
	Day 14	370	344	2510	2890	3850	3940

$AUC_{0\text{-}24hr}$ = area under the plasma concentration-time curve from time 0 to 24 hours post-dose;
C_{max} = maximum plasma concentration; TK = toxicokinetics
Data are expressed as the mean values of 4 rats.

2.6.6.3.2 ラット 4 週間反復経口投与毒性試験

評価資料 4.2.3.2-02

概要表 2.6.7.6.2

(1) 用量設定根拠

前項のラット 2 週間反復経口投与毒性試験 (投与量 : 20，100 及び 1000 mg/kg/日) では，毒性変化は認められなかった．このことから，ラット 4 週間反復経口投与毒性試験の高用量として ICH M3 (R2) ガイドラインに記載された適切な限界量である 1000 mg/kg/日を設定した．また，毒性の用量反応関係を確認するため，低用量及び中間用量として，それぞれ 20 及び 50 mg/kg/日を設定した．

(2) 試験方法及び成績

Sprague Dawley 系ラット (各群雌雄各 12 例) に 0 (対照群)，20，50 又は 1000 mg/kg/日のエンシトレルビルフマル酸を 1 日 1 回 4 週間反復経口投与し，一般毒性を評価した．対照群には媒体 (0.5% MC) を投与した．また，対照群及び 1000 mg/kg/日投与群には，投与期間終了後に 4週間の休薬期間を設けた動物を追加し (各群雌雄各 6 例)，毒性変化の回復性を検討した．一般状態観察，体重測定，摂餌量測定，眼科学的検査，尿検査，血液学的検査，血液化学的検査，器官重量測定，肉眼検査及び病理組織学的検査を行った．また，エンシトレルビルの TK 評価のため，サテライト群 (各群雌雄各 6 例) に同じ条件でエンシトレルビルフマル酸を投与し，投与 1 及び 28 日目に採取した血漿試料を用いて血漿中エンシトレルビル濃度を測定した．

試験期間を通じて死亡及び瀕死は発生しなかった．いずれの用量においても毒性変化は認められなかった．

エンシトレルビルフマル酸投与に起因すると考えられるが，軽度であり，関連する組織学的変化を伴わないことから毒性とは判断しなかった変化を以下に示す．いずれの変化も 4 週間の休薬期間後には認められなかった．

- リンパ球数の増加 (雄 1000 mg/kg/日)

- D.Bil 及び T.Bil の減少 (雌雄 1000 mg/kg/日)

いずれの用量においても，一般状態，体重，摂餌量，尿検査，眼科学的検査，器官重量，肉眼検査及び病理組織学的検査ではエンシトレルビルフマル酸投与に起因する変化は認められなかった.

TK 解析では，血漿中エンシトレルビルの C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24hr}$ は，20～50 mg/kg/日投与群の間で用量比で増加し，50～1000 mg/kg/日投与群の間で用量比未満で増加した (表 2.6.6.3-2). また，いずれの用量においても C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24hr}$ に性差は認められなかった．20 又は 50 mg/kg/日投与群において，投与 28 日目における血漿中エンシトレルビルの C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24hr}$ は，投与 1 日目に比べて高値傾向を示した.

エンシトレルビルフマル酸投与に起因する毒性変化は，雌雄共に最高用量である 1000 mg/kg/日まで認められなかった．以上の結果から，ラット 4 週間反復経口投与毒性試験における無毒性量は，1000 mg/kg/日であると判断した.

表 2.6.6.3-2 ラット 4 週間反復経口投与毒性試験における血漿中エンシトレルビルの TK パラメータ

TK parameters of ensitrelvir		Dose (mg/kg/day)					
		20		50		1000	
		Male	Female	Male	Female	Male	Female
C_{max} (μg/mL)	Day 1	26.0	44.1	68.4	114	272	381
	Day 28	39.6	51.6	114	142	263	359
$AUC_{0\text{-}24hr}$ (μg·hr/mL)	Day 1	214	327	758	1110	4420	6060
	Day 28	388	500	1700	1780	4270	5380

Data are expressed as the mean values of 6 rats.

2.6.6.3.3 サル 2 週間反復経口投与毒性試験

評価資料 4.2.3.2-03

参考資料 4.2.3.1-02

概要表 2.6.7.5，2.6.7.6.3

(1) 用量設定根拠

カニクイザルにおける単回 TK 試験 (投与量：100，300 及び 1000 mg/kg/日) では，エンシトレルビルフマル酸を単回経口投与し，TK 測定と共に一般状態，体重測定及び血液化学的検査を実施した (2.6.7.5 項参照). 本試験は GLP 非適用下で実施した.

いずれの用量においても投与初日に死亡又は瀕死例は発生しなかった．いずれの用量においても T.Bil 及び D.Bil の高値が認められ，1000 mg/kg では嘔吐及び摂餌量減少が認められたが，1000 mg/kg は耐容量であると判断した.

以上の結果から，サル 2 週間反復経口投与毒性試験の高用量として ICH M3 (R2) ガイドラインに記載された適切な限界量である 1000 mg/kg/日を設定した．毒性の用量反応関係を確認するため，低用量及び中間用量として，それぞれ 10 及び 50 mg/kg/日を設定した．なお，後述する

ように雄の 1000 mg/kg/日投与群において投与 3 日目に瀕死が発生した．このことから 1000 mg/kg/日は 2 週間の投与に耐容しないと判断し，投与開始前であった雌の高用量は 300 mg/kg/日を設定した．

(2) 試験方法及び成績

カニクイザル (各群雌雄各 3 例) に，雄は 0 (対照群)，10，50 又は 1000 mg/kg/日，雌は 0 (対照群), 10, 50 又は 300 mg/kg/日のエンシトレルビルフマル酸を 1日 1 回 2 週間反復経口投与し，毒性を評価した (対照群及び高用量群は雌雄各 5 例，低用量及び中間用量群は雌雄各 3 例)．対照群には媒体 (0.5% MC) を投与した．雄では 1000 mg/kg/日投与群で投与 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 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 (以下，1000/300/100 mg/kg/日と記載)．雌では高用量群として設定した 300 mg/kg/日投与群で投与 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 100 mg/kg/日に減量した (以下 300/100 mg/kg/日と記載). 投与期間終了後 2 週間の回復性を評価するため, 対照群の雌雄各 2 例, 並びに高用量群の雄 1 例及び雌 2 例を割り当て，高用量群の投与期間終了時解剖には雄 2 例及び雌 2 例を割り当てた．一般状態観察，体重測定，摂餌量測定，眼科学的検査，心電図検査，尿検査，血液学的検査，血液化学的検査，器官重量測定，肉眼検査，及び病理組織学的検査を行った．また，投与 1 日目及び 14 日目に採取した血漿試料を用い，血漿中エンシトレルビル濃度を測定した．

<u>死亡・瀕死例</u>

死亡及び瀕死例で認められたエンシトレルビルフマル酸投与による毒性変化を表 2.6.6.3-3 に示す．毒性所見の詳細並びに死亡又は瀕死に至った原因は以下の通りであった．エンシトレルビルの血漿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 [1]．エンシトレルビルフマル酸を 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，本試験の馴化期間中の血清中アルブミン濃度 (3.5～4.5 g/dL [530～682 µmol/L]) を超えている．さらに，本試験における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 (血清中アルブミン濃度 : 2.8 又は 3.0 g/dL [424 又は 455 µmol/L]) を呈していたため，これら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．

1000 mg/kg/日の用量を 2 日間投与した雄 1 例が投与 3 日目の投与前に横臥位，体温低下及び接触に対する反応性低下を示し瀕死と判断した．また，1000 mg/kg/日を 2 日間，その後 300 mg/kg/日の用量を 5 日間投与した雄 1 例が投与 8 日目の投与前に自発運動の減少を示した後に死亡した．さらに，300 mg/kg/日の用量を 8 日間投与した雌 1 例が投与 8 日目の投与後に坐位及び脱水兆候を示し，瀕死と判断した．なお，投与 8 日目に死亡した雄及び瀕死と判断した雌では，いずれも投与 6 日目より獣医学的ケアとして補液及び補助食を与えた．

投与 3 日目の投与前に瀕死と判断された雄では，投与 1 日目 (投与 6 時間後) に嘔吐，投与 1 及び 2 日目に摂餌量の減少，投与 3 日目の投与前に横臥位，体温低下及び接触に対する反応性低下のため瀕死と判断した．また，本個体が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・肺における血管内の炎症性細胞の集簇) が認められた．後述する通り，生存例においても免疫抑制性の変化は副腎の変化が認められた用量においてのみ認められており，免疫抑制性の変化はストレスに伴う二次的な変化であると考えられた．これより，本個体はストレスによる免疫抑制状態となり，日和見感染に至ったと推測された．また，各器官の炎症性変化は感染に関連した変化と考えられた．全身性の感染が認められた際は，糖新生の抑制や末梢組織における糖消費の亢進が起こり低血糖をきたすことが報告されており [2～4]，本個体でも血中グルコース量の顕著な低値が認められた．本個体が瀕死と判断された際の臨床兆候 (横臥位，体温低下及び接触に対する反応性低下) は低血糖に起因していると考えられた．複数臓器において出血が認められたが，全て新鮮な出血像であり，いずれの臓器においても実質細胞の障害は認められず，感染及びプロトロンビン時間 (PT) 延長等の影響があったと考えられた．

投与 8 日目の投与前に死後発見された雄では，投与 1，3，5 及び 6 日目に嘔吐，投与 3～7 日目に摂餌量の減少，投与 6～7 日目に自発運動の減少が認められ，投与 8 日目に死亡した．ストレスを示唆する変化 (副腎皮質の肥大，胸腺の萎縮) に加えて，肺胞内に多量の線維素性滲出液が認められ，死因は肺水腫であると考えられた．肺胞壁血管内に菌体を貪食するマクロファージ及び好中球集簇が認められたことから，本個体も，ストレスによる二次的な免疫抑制により日和見感染に至ったと推測された．死因となった肺水腫は，肺胞血管の炎症性細胞浸潤及び血管透過性亢進により誘発されたと考えられる．複数臓器に出血が認められたが，新鮮な出血像であり，実質組織に障害は認められなかったため，死戦期の変化又は感染による二次的変化であると考えられた．

投与 8 日目の投与後に瀕死と判断された雌では，投与 2～7 日目に摂餌量の減少又は廃絶，投与 8 日目の午後に坐位，脱水兆候を呈し瀕死となった．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 (投与前値比約 −25%) が認められ，溶血を示唆する脾臓のうっ血を伴っていた. 複数臓器に出血が認められたものの, いずれも細胞反応を伴わない新鮮な出血であった. また，実質細胞の障害は伴っていなかったことから，出血は死戦期の変化に本個体で認められた活性化部分トロンボプラスチン時間 (APTT) 及び PT の延長の影響が加わったと考えられた. その他，ストレスに伴う二次的変化 (副腎皮質の肥大，胸腺の萎縮) とそれに続発すると考えられる末梢血中及びリンパ節のリンパ球減少が認められたものの，状態悪化の原因となりうる組織学的変化は認められなかった．以上より，本個体では，摂餌量の減少及び貧血により状態悪化し瀕死に至ったと考えられた．

瀕死例のいずれにおいても血中 T.Bil 及び D.Bil の増加が認められたが，血液化学的検査及び病理組織学的検査において，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. サルの探索単回 TK 試験において単回投与時に間接ビリルビン (I.Bil) を主体とする T.Bil の増

加が認められており, I.Bil の代謝又は排泄に関与する因子の阻害に起因している可能性がある．なお，後述する通り，雌の瀕死例に加えて，生存例においても赤血球系パラメータの減少が認められており，血管外溶血が示唆されるため，T.Bil の増加には血管外溶血も寄与したと考えられる．

表 2.6.6.3-3 サル 2 週間反復経口投与毒性試験の死亡/瀕死例で認められたエンシトレルビルフマル酸投与に起因する変化の概要

	雄瀕死例	雄死亡例	雌瀕死例
投与量 (mg/kg/日)	1000	1000 (Day 1～2) 300 (Day 3～7)	300
死亡・ 瀕死発生日	Day 3 の投与前に瀕死のため安楽殺	Day 8 の投与前に死後発見	Day 8 の投与後に瀕死のため安楽殺
一般状態	• 嘔吐 (Day 1) • 横臥位, 体温低下及び接触に対する反応性低下 (Day 3 投与前)	• 嘔吐 (Day 1, 3, 5, 6) • 軽度の自発運動の減少 (Day 6 及び 7)	• 坐位及び脱水兆候 (Day 8)
摂餌量	減少 (Day 1 及び 2)	減少又は無摂餌 (Day 3～7)	減少又は無摂餌 (Day 2～7)
体重	変化なし	変化なし	変化なし
ストレスに伴う二次的変化	• 副腎皮質の肥大，出血 • 胸腺皮質の単細胞壊死，tingible body マクロファージの増加 • リンパ球減少 (腸間膜リンパ節，顎下リンパ節，パイエル板，白脾髄) • 末梢血中リンパ球数減少	• 副腎皮質の肥大，肉眼的な副腎の腫大 (左右，暗調) • 胸腺の萎縮 • リンパ球減少 (白脾髄)	• 副腎皮質の肥大，副腎重量の増加 • 胸腺の萎縮 • リンパ球減少 (腸間膜リンパ節，顎下リンパ節，パイエル板，白脾髄) • 末梢血中リンパ球減少
日和見感染及びそれに伴う二次的変化	• 炎症性細胞浸潤 (骨髄，肝臓類洞，肺/心臓血管内，顎下リンパ節，下垂体，顎下腺) • マクロファージ/好中球中に細菌様粒子 (顎下リンパ節，骨髄，肺) • 肉眼的に，顎下腺に白色巣 (左右)，顎下リンパ節に周辺組織の硬結 (左右) • 水腫 (顎下リンパ節，顎下腺) • 顕著な血中 Glu 減少 • 動脈壁の変性 (胆嚢動脈，心臓)	• 炎症性細胞浸潤 (肺血管内) • 肉眼的に肺の水腫 (全葉), 気管～気管支に白色泡沫液の貯留 • 肺重量の高値 • マクロファージ/好中球中に細菌様粒子 (肺) • 肺浮腫，肺胞滲出液 • 動脈壁の変性 (結腸)	変化なし
炎症性マーカー変動 (日和見感染による変化を含む)	• Fbg 増加 • T.Pro，Alb 減少	NE	• Fbg 増加 • T.Pro，Alb，A/G 比減少
免疫系への影響	変化なし	変化なし	• 組織球の増加 (顎下リンパ節)

	雄瀕死例	雄死亡例	雌瀕死例
状態悪化による二次的変化 (死戦期の変化を含む)	• 出血 (副腎皮質，胆嚢，心内膜/心外膜，下垂体，十二指腸漿膜下) • 肉眼的に心臓の赤色巣 (左心室及び右心室心外膜面，左心室～中隔心内膜面) • PT 延長 • 血中 BUN/Crea 増加 • 骨格筋の萎縮 • 角膜上皮の萎縮	• 出血 (心臓脂肪組織/心内膜/心外膜，肺胞，顎下リンパ節，胸腺) • 肉眼的に心臓の赤色巣 (右心房心内膜面) • 肉眼的に盲腸～結腸の拡張 (大量のガスが貯留) • 骨格筋の萎縮	• 出血 (心内膜/心外膜，膵臓膵島，白脾髄，子宮内膜下) • 肉眼的に心臓の赤色巣 (右心房心外膜面，左心室心外膜面) • 肉眼的に盲腸～結腸の拡張 (大量のガスが貯留) • PT/APTT 延長 • 骨格筋の萎縮/変性，CK/LD 増加 • 血中 BUN/Crea 増加 • 動脈壁の変性 (肝臓)
摂餌量減少による変化	• 脂肪組織の萎縮 (大動脈，心臓，皮下) • 骨髄造血細胞の減少 • 膵臓の腺房細胞の分泌低下 • 十二指腸のブルンネル腺萎縮 • 舌粘膜上皮の萎縮	• 骨髄造血細胞の減少	• 骨髄造血細胞の減少 • 腎臓遠位尿細管の拡張/腎臓重量の高値 • 膵臓の腺房細胞の分泌低下 • 十二指腸のブルンネル腺萎縮 • 増加：血中 TG，Glu
肝臓	• 肝細胞肥大	• 肝細胞肥大，肝臓重量の高値 • 限局性の肝細胞壊死	• 門脈周囲の肝細胞肥大，肝臓重量の高値
ビリルビン上昇	• 増加：T.Bil，D.Bil	NE	• 増加：T.Bil，D.Bil
溶血	変化なし	• 脾臓のうっ血	• RBC，HGB，HCT 減少 • 脾臓のうっ血
その他	• 減少：血中 Ca，Na • 骨髄巨核球の増加	• 腎臓重量の高値	• 増加：血中 K • 減少：血中 Ca，Na，Cl

Day: 投与開始日を Day 1 とする．
PT: プロトロンビン時間，NE: 検査せず，APTT: 活性化部分トロンボプラスチン時間，Fbg: フィブリノゲン，RBC: 赤血球数，HGB: ヘモグロビン濃度，HCT: ヘマトクリット値，T.Bil: 総ビリルビン，D.Bil: 直接ビリルビン，CK: クレアチンキナーゼ，LD: 乳酸脱水素酵素，BUN: 尿素窒素，Crea: クレアチニン，
TG: トリグリセリド，Glu: グルコース，Alb: アルブミン，Ca: カルシウム，K: カリウム，Na: ナトリウム，T.Pro: 総タンパク，A/G 比: アルブミン/グロブリン比，Cl: クロール

生存例

主な毒性変化は炎症性変化，貧血，血小板減少，嘔吐及び摂餌量減少並びにストレスに伴う二次的変化であった．また状態悪化を示した 1000/300/100 mg/kg/日投与群の雄 1 例において，他の生存例と異なる所見が認められた．いずれの用量においても，眼科学的検査及び心電図検査ではエンシトレルビルフマル酸投与に起因する変化は認められなかった．なお，1000/300/100 mg/kg/日投与群の雄 2 例では投与 5 又は 8 日目より，300/100 mg/kg/日投与群の雌 1 例では，投与 6 日目より獣医学的ケアとして補液及び補助食を与えた．主な毒性変化の詳細を以下に示す.

- 炎症性変化

50 mg/kg/日投与群の雌雄，1000/300/100 mg/kg/日投与群の雄及び 300/100 mg/kg/日投与群の雌で，脾臓及びリンパ節において組織球及び形質細胞の増加が認められた．さらに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．これらの変化は，エンシトレルビルフマル酸により免疫機能が亢進され，外来異物に触れる器官において炎症性細胞が誘導されたと考えられる．なお，肺及び精巣上体の血管周囲に炎症性細胞浸潤が認められたが，これらの個体では死亡/瀕死例で認められた血管壁の変性は認められず，死亡/瀕死例で認められた動脈壁の変性と生存例で認められた血管周囲の炎症性細胞浸潤の発現機序は異なると考えられた.

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ゲン (Fbg) の増加が認められており，特に雄 50 mg/kg/日投与群では病理組織学的検査において多臓器における炎症性変化は認められていないことから，Fbg の増加はこれら炎症性変化に関連した変化であると考えられた.

上述したいずれの器官においても，実質細胞の障害は伴っておらず，2 週間の休薬により回復した．また，Fbg を始めとした炎症性マーカー変動は 2 週間の休薬により回復した.

- 貧血

50 mg/kg/日投与群の雄 1/3 例，1000/300/100 mg/kg/日投与群の雄 2/3 例及び 300/100 mg/kg/日投与群の雌 2/4 例において赤血球数，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．1000/300/100 mg/kg/日投与群の雄及び 300/100 mg/kg/日投与群の雌では網状赤血球数の増加及び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アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST)，乳酸脱水素酵素 (LD) 等の変動やヘモグロビン尿症を示唆する尿の色調変化を伴わなかったこと，出血性変化の認められない個体においても貧血が認められたこと，脾臓でうっ血が認められたことから，50 mg/kg/日以上の投与群で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.

赤血球パラメータ及び網状赤血球数の変化，脾臓のうっ血は，2 週間の休薬後に認められず，回復性を示した.

- 血小板数の減少

50 mg/kg/日投与群の雌 1/3 例及び 1000/300/100 mg/kg/日投与群の状態悪化例の雄 1/3 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認め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における巨核球の増加及び減少は認められず，出血性変化も認められない軽度な変化と考えられた．

休薬解剖例では血小板数に変化は認められなかった．

- 嘔吐，摂餌量及び体重の減少

1000/300/100 mg/kg/日投与群の雄 5/5 例及び 300/100 mg/kg/日投与群の雌 2/5 例において，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，発現頻度は投与量増加に伴い増える傾向にあった．50 mg/kg/日投与群の雄 2/3 例，1000/300/100 mg/kg/日投与群の雄 4/5 例及び 300/100 mg/kg/日投与群の雌 2/5 例において摂餌量の減少が認められた．50 mg/kg/日投与群の雄 1/3 例では体重減少が認められた．1000/300/100 mg/kg/日投与群の雄及び 300/100 mg/kg/日投与群の雌で認められた脱水兆候は，摂餌量の減少及び嘔吐に起因すると考えられた．

嘔吐，摂餌量の減少及び脱水兆候については，2 週間の休薬期間中に回復した．

- ストレスに伴う二次的変化

50 mg/kg/日投与群の雌雄，1000/300/100 mg/kg/日投与群の雄及び 300/100 mg/kg/日投与群の雌で，副腎皮質の肥大や胸腺の萎縮等が認められ，これらの変化は上述した炎症性変化，貧血，嘔吐，摂餌量の減少等のストレスに伴う二次的変化であると考えられた．

50 mg/kg/日投与群の雌雄，1000/300/100 mg/kg/日投与群の雄及び 300/100 mg/kg/日投与群の雌で，腸間膜リンパ節，顎下リンパ節，パイエル板及び白脾髄におけるリンパ球減少が認められた．リンパ節や脾臓におけるリンパ球減少はストレスによる二次的な変化であると考えられた．いずれの群においても，末梢血中のリンパ球数への影響はなかった．

上述したいずれの変化も，2 週間の休薬により回復又は回復傾向を示した．

- 状態悪化を示した 1000/300/100 mg/kg/日投与群の雄 1 例で認められた毒性変化

1000/300/100 mg/kg/日投与群の雄 1 例は，他の生存例と比較して著しい状態悪化が認められ，以下のような変化を示した．投与 2 及び 6 日目に嘔吐，投与 2～14 日目に著しい摂餌量の減少，投与 10～13 日目に下痢及び投与 10～15 日目に脱水兆候が認められ，投与期間終了時の剖検時に腹腔に腹水貯留が認められた．本個体では多臓器において出血が認められたが，いずれも新鮮な出血であり，実質組織に障害は認められなかった．本個体では血小板数の顕著な減少が認められ，出血は血小板減少を背景として死戦期の変化が加わったと考えられた．血小板減少が起きた原因は不明であるが，骨髄において巨核球の増加が認められており，骨髄抑制ではないと考えられた．本個体では，状態悪化によると考えられる消化管障害，胸腺の萎縮並びに脾臓及びリンパ節におけるリンパ球の減少，多臓器における炎症性細胞浸潤が認められた．本個体

で認められた嘔吐，摂餌量の減少及び脱水兆候については，同様の変化を示した他個体で 2 週間の休薬期間中に回復することを確認した．血小板減少についても骨髄において巨核球の増加を伴っており，回復性を示した．

エンシトレルビルの血漿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 [1]. エンシトレルビルフマル酸を 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，本試験の馴化期間中の血清中アルブミン濃度 (3.5～4.5 g/dL [530～682 µmol/L]) を超えている．さらに，本個体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 (血清中アルブミン濃度：2.2 g/dL [333 µmol/L]) を呈していたため，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．

非毒性と判断した変化

以下の所見は，エンシトレルビルフマル酸投与に起因すると考えられるが，軽度，一過性又は組織学的変化を伴わない等の理由により毒性ではないと判断した．

- 尿タンパクの高値, 尿電解質総排泄量の低値, 尿 pH の低値, ウロビリノーゲンの高値 (雄 50 及び 1000/300/100 mg/kg/日)
- T.Bil 及び D.Bil の増加 (雌雄 50 mg/kg/日，雄 1000/300/100 mg/kg/日，雌 300/100 mg/kg/日)
- 無機リン，カルシウム又はナトリウムの減少 (雄 50 及び 1000/300/100 mg/kg/日，雌 300/100 mg/kg/)
- 総コレステロールの増加 (雌 50 及び 300/100 mg/kg/日)
- 血小板数の増加 (雌 300/100 mg/kg/日)
- 門脈周囲における肝細胞肥大 (雄 50 及び 1000/300/100 mg/kg/日，雌 300/100 mg/kg/日) 及び肝臓重量の高値 (雄 50 及び 1000/300/100 mg/kg/日)
- 膵臓重量の高値 (雄 1000/300/100 mg/kg/日)
- 心臓又は皮下組織における脂肪組織の萎縮 (雄 50 及び 1000/300/100 mg/kg/日，雌 300/100 mg/kg/)
- 顎下線重量の高値 (雄 50 mg/kg/日)

トキシコキネティクス

エンシトレルビルの C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24hr}$ の値を表 2.6.6.3-4 に示す．血漿中エンシトレルビルの C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24hr}$ は，投与 1 日目及び投与 14日目共に 10～50 mg/kg/日投与群の間で用量比で増加し, 投与 1 日目において 50～1000 mg/kg/日投与群 (雄) 及び 50～300 mg/kg/日投与群 (雌) の間で用量比以下で増加した．また，いずれの用量においても C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24hr}$ に性差は認められなかった．10 又は 50 mg/kg/日投与群において，投与 14 日目における血漿中エンシトレルビルの C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24hr}$ は, 投与 1 日目に比べて高値を示した. 最終投与日の曝露は 50 mg/kg/日投与群と高用量群 (雄 : 1000/300/100 mg/kg/日，雌 : 300/100 mg/kg/日) で同等であったが，高用量群は 50 mg/kg/日投与群と比較し明らかに毒性が強かった．これは，高用量群では投与期間

初期～中期に投与量を減量したため，同群の反復投与による累積曝露量は 50 mg/kg/日投与群の曝露量よりも相対的に高かったことに起因すると考えられた．

結論として，50 mg/kg/日以上の用量で脾臓及びリンパ節における組織球及び形質細胞の増加，肺及び精巣上体における単核炎症細胞の血管周囲浸潤，食道，涙腺，眼球 (結膜) 及び胆嚢における単核炎症細胞の浸潤，貧血と血小板数の減少が認められ，50 mg/kg/日の用量で体重及び摂餌量減少が認められた．雄の 1000/300/100 mg/kg/日，雌の 300/100 mg/kg/日の用量で嘔吐，摂餌量の減少，全身状態の悪化が認められ，死亡又は瀕死が発生した．全ての毒性変化は，2 週間の休薬期間により回復性示した．

以上の結果から，サル 2 週間反復経口投与毒性試験における無毒性量は，10 mg/kg/日であると判断した．

表 2.6.6.3-4 サル 2 週間反復経口投与毒性試験における血漿中エンシトレルビルの TK パラメータ

TK parameters of ensitrelvir		Dose (mg/kg/day)					
		10		50		1000/300/100 [a]	300/100 [a]
		Male	Female	Male	Female	Male	Female
C_{max} (μg/mL)	Day 1	37.1	36.1	142	174	520	433
	Day 14	77.6	75.2	404	378	409 [b]	430 [c]
$AUC_{0\text{-}24hr}$ (μg·hr/mL)	Day 1	550	503	2940	2980	10700	8920
	Day 14	1220	1170	7810	7390	7840 [b]	8170 [c]

Data are expressed as the mean values of 3 (10 and 50 mg/kg/day) or 5 (1000/300/100 mg/kg/day [male], and 300/100 mg/kg/day [female]) monkeys.

a Reduced from 1000 mg/kg/day to 300 mg/kg/day from Days 3 (males) and 1 (females) of dosing and from 300 mg/kg/day to 100 mg/kg/day from Days 8 (males) and 9 (females) of dosing.

b Since 2 males were dead or sacrificed, data are expressed as the mean value of 3 males.

c Since 1 female was sacrificed, data are expressed as the mean value of 4 females.

2.6.6.3.4 サル 4 週間反復経口投与毒性試験

評価資料 4.2.3.2-04

概要表 2.6.7.6.4

(1) 用量設定根拠

前項のサル 2 週間反復経口投与毒性試験では，50 mg/kg/日以上の投与群の雌雄で死亡・瀕死例，脾臓及びリンパ節の組織球及び形質細胞の増加，肺・精巣上体における単核炎症細胞の血管周囲浸潤，食道，涙腺，眼球 (結膜) 及び胆嚢における単核炎症細胞浸潤，貧血，血小板数の減少，嘔吐又は体重及び摂餌量の減少並びにストレスに伴う二次的変化が認められたことから，50 mg/kg/日以上の投与は忍容性が無いと判断した．したがって，サル 4 週間反復経口投与毒性試験の高用量は最大耐容量である 30 mg/kg/日を設定した．また，毒性の用量反応関係を確認するため，低及び中間用量として 3 及び 10 mg/kg/日を設定した．

(2) 試験方法及び成績

カニクイザル (各群雌雄各 4 例) に 0 (対照群)，3，10 又は 30 mg/kg/日のエンシトレルビルフ

マル酸を 1 日 1 回 4 週間反復経口投与し，毒性を評価した．また対照群及び 30 mg/kg/日投与群では，投与期間終了後に 4 週間の休薬期間を設けた動物を追加し (各群雌雄各 2 例)，毒性変化の回復性を検討した．対照群には媒体 (0.5% MC) を投与した．一般状態観察，体重測定，摂餌量測定，眼科学的検査，心電図検査，尿検査，血液学的検査，血液化学的検査，イムノフェノタイピング解析，サイトカイン測定，骨髄検査，器官重量測定，肉眼検査及び病理組織学的検査を行った．また，投与 1 及び 28 日目に採取した血漿試料を用い，血漿中エンシトレルビル濃度を測定した．なお，30 mg/kg/日投与群の雌 2 例では投与 14 又は 18 日目以降に獣医学的ケアとして補液及び補助食を与えた．

試験期間を通じて死亡及び瀕死は発生しなかった．

本試験では，30 mg/kg/日投与群の雌 2/6 例において摂餌量及び体重減少，その内 1 例で胆嚢及び子宮の筋層における炎症性細胞浸潤，この 2 例を含む雌 3/6 例において赤血球系パラメータの減少が認められた．持続的な摂餌量減少を示した雌 2/6 例では，同群の他の個体と比較して曝露が高く，C_{max} は 308～310 µg/mL [579～583 µmol/L] であり，本試験の馴化期間中の血清中アルブミン濃度 (3.6～4.7 g/dL [545～712 µmol/L]) と同程度であった．さらに，これら雌 2 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 (血清中アルブミン濃度：2.2 又は 3.0 g/dL [333 又は 455 µmol/L]) を呈していたため，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．

主な毒性変化の詳細を以下に示す．

- 摂餌量減少及び炎症性変化

30 mg/kg/日投与群の雌 2 例で投与 10 日目から摂餌量減少，投与 28 日目には体重減少が認められた．特に摂餌量減少が顕著であった雌 1 例において，胆嚢及び子宮の筋層に炎症性細胞浸潤が認められた．本変化は，血中における炎症性マーカーの変動 (Fbg, C 反応性タンパク [CRP] 及び白血球の増加，アルブミンの減少) を伴っていた．

- 赤血球系パラメータの減少

30 mg/kg/日投与群の雌 3 例において，投与 27 日目に赤血球数，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．これらの変化は，投与 10 日目には認められず，投与 11 日目から 27 日目の間に発現したと推測された．これらの赤血球系パラメータの減少は前項のサル 2週間反復経口投与毒性試験でも認められており，4 週間まで投与しても変化の程度は同等であった．赤血球系パラメータの減少が認められた雌 3 例のうち，1 例では網状赤血球数の増加，2 例で脾臓におけるうっ血，肝臓，脾臓又は骨髄における造血反応又は肝臓におけるクッパー細胞による赤血球貪食像を伴っており，サル 2 週間反復経口投与毒性試験と同様に，血管外溶血に起因する変化と判断した．

投与期間中に継続的な摂餌量減少が認められた 30 mg/kg/日投与群の雌 2 例において，肝臓の門脈周囲における肝細胞の空胞化，膵臓の腺房細胞の拡張，及び/又は脂肪組織の炎症性変化が認められた．体重の大きなサルに短期間で体重減少が起こった際に Fatal Fasting Syndrome と呼

ばれる現象が報告されており [5,6]，これら雌 2 例で認められた上記所見と類似していた．これら雌 2 例は比較的体重の大きな個体であり，持続的な摂餌量減少が起きたことで Fatal Fasting Syndrome 様の変化が発現したものと考えられ，上述した組織変化はエンシトレルビルフマル酸による直接的な毒性変化ではないと判断した．また，当該雌 2 例では血中における炎症性マーカーの変動 (Fbg，CRP 及び白血球の増加，アルブミンの減少) を伴っていた．これら雌 2 例では，フローサイトメーターを用いたイムノフェノタイピング解析において投与 28 日目に CD3 陽性及び/又は CD3 陰性 CD20 陽性細胞の比率減少が認められたが, いずれのリンパ球マーカーにも染色されない非リンパ球の割合が増加しており，測定時にこの非リンパ球がリンパ球ゲートに漏れこんだことで各リンパ球比率が見かけ上減少したと考えられ，エンシトレルビルフマル酸による直接作用ではないと考えられた．これら雌 2 例ではその他以下に示す摂餌量減少による二次的変化と考えられる変化が認められた．

- 血清中カルシウム，ナトリウム及びグルコースの低値
- 低カルシウム/カリウム血症に起因する補正 QT 間隔 (QTc) 延長
- 顎下リンパ節におけるリンパ球数減少
- 心臓における心嚢液の貯留
- 膵臓及び耳下腺の腺房細胞における分泌減少

10 及び 30 mg/kg/日投与群において，投与 10 及び 27 日目に HDL コレステロール及び低比重リポタンパク質 (LDL) コレステロールの減少が認められ，10 mg/kg/日投与群では総コレステロールの減少，30 mg/kg/日投与群においてはトリグリセリドの増加及び総コレステロールの増加が認められた．これらの変化は，関連する組織病理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．

30 mg/kg/日投与群の雄 1 例の末梢血イムノフェノタイピングにおいて，CD3 陽性 CD8 陽性細胞数及び比率の減少が認められた．CD3 陽性 T 細胞は CD4 陽性 T 細胞 (ヘルパーT 細胞) 及び CD8 陽性 T 細胞 (細胞傷害性 T 細胞) に分類される．当該個体では CD3 陽性及び CD3 陽性 CD4 陽性細胞数及び比率への影響がなかったため，細胞傷害性 T 細胞を特異的に傷害している可能性は低い．また，1 例でのみ認められた変化であるため何らかの偶発的な要因で CD8 染色試薬に反応しなかった可能性もあるが, 本個体でのみ T 細胞における CD8 の発現が抑制された可能性は否定できない．CD8 は樹状細胞の MHC クラス I を認識し，T 細胞の T 細胞受容体 (TCR) と樹状細胞の MHC クラス I が提示した抗原の結合を強固にする分子であり，抗原を認識する感度が高まる．CD8 の発現抑制は抗原認識能の低下につながる可能性がある．しかし，本個体において一般状態に影響はなく，感染性変化を示唆する変化も認められていない．組織学的検査においても胸腺，脾臓，骨髄及びリンパ節においてリンパ球の壊死性変化は認められなかったため，毒性変化ではないと判断した．なお，本個体の曝露量は他の個体とほぼ同等であり，他の個体では CD8 陽性 T 細胞数及び比率への影響は認められなかった．上述した通り，細胞傷害性 T 細胞を直接傷害している可能性は低く，休薬により回復すると考えられた．

30 mg/kg/日投与群において認められた以下の所見は，エンシトレルビルフマル酸投与に起因すると考えられるが，軽度，一過性又は組織学的変化を伴わない等の理由により毒性ではない

と判断した.

- 尿 pH の低値，尿中タンパク，ケトン体，グルコース，ビリルビン，ウロビリノーゲン又は白血球の高値
- T.Bil 及び D.Bil の増加
- 血清中アルカリホスファターゼ (ALP) 及び LD の増加
- 腸間膜及び腸骨リンパ節の腫大
- 副腎の束状帯細胞の脂質減少
- 肝臓重量の増加，門脈周囲における肝細胞肥大，並びに肝臓門脈における単核炎症細胞浸潤

上述した変化は全て休薬期間中に回復性を示した.

一般状態観察，眼科学的検査及びサイトカイン測定で，エンシトレルビルフマル酸投与に起因する変化は認められなかった.

TK 解析では，3～30 mg/kg/日投与群において，血漿中エンシトレルビルの C_{max} は用量の増加と共に増加し，$AUC_{0\text{-}24hr}$ は用量比以上の増加を示した．また，いずれの用量においても C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24hr}$ に性差は認められなかった．投与 28 日目における血漿中エンシトレルビルの C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24hr}$ は，投与 1 日目に比べて高値を示した (表 2.6.6.3-5).

本試験では, 30 mg/kg/日投与群の雌で胆嚢及び子宮における炎症性細胞浸潤, 赤血球パラメータの減少並びに摂餌量及び体重減少が認められた．これらを毒性変化と考えサル 4 週間反復経口投与毒性試験における無毒性量は 10 mg/kg/日であると判断した.

表 2.6.6.3-5 サル 4 週間反復経口投与毒性試験における血漿中エンシトレルビルの TK パラメータ

TK parameters of ensitrelvir		Dose (mg/kg/day)					
		3		10		30	
		Male	Female	Male	Female	Male	Female
C_{max} (μg/mL)	Day 1	8.92	9.67	34.9	40.0	83.0	89.8
	Day 28	16.4	19.9	76.8	95.9	241	211
$AUC_{0\text{-}24hr}$ (μg·hr/mL)	Day 1	118	139	508	656	1540	1710
	Day 28	242	333	1170	1850	4170	4490

Data are expressed as the mean values of 4 (3 and 10 mg/kg/day) or 6 (30 mg/kg/day) monkeys.

2.6.6.4 遺伝毒性試験

2.6.6.4.1 細菌を用いる復帰突然変異試験

評価資料 4.2.3.3-01

参考資料 4.2.3.3-02

概要表 2.6.7.7.1，2.6.7.7.2

エンシトレルビルフマル酸の復帰突然変異誘発性を評価するため，ネズミチフス菌 (TA98,

TA100, TA1535 及び TA1537) 並びに大腸菌 (WP2*uvrA*) の 5 菌株を用い, 代謝活性化系 (S9 mix: フェノバルビタール及び 5,6-ベンゾフラボンで誘導した Sprague Dawley 系ラット肝臓由来) の有無の条件下でプレインキュベーション法により試験を実施した．陰性対照としてジメチルスルホキシド (DMSO) を用いた.

探索試験の結果 (2.6.7.7.1 項参照) 及び ICH S2(R1) ガイドラインに基づき, 5000 μg/プレートを最高濃度に設定した．TA98，TA100，TA1535 及び WP2*uvr*A の S9 mix 非存在下並びに存在下条件では，156，313，625，1250，2500 又は 5000 μg/プレートの濃度に，TA1537 の S9 mix 非存在下並びに存在下条件では，39.1，78.1，156，313，625，1250，2500 又は 5000 μg/プレートの濃度に設定し，試験を実施した.

全ての菌株において，S9 mix の有無に関わらず，いずれの処理用量でもエンシトレルビルフマル酸群の復帰突然変異コロニー数は陰性対照群の 2 倍以上を示さなかった.

以上の結果より，エンシトレルビルフマル酸の細菌を用いる復帰突然変異試験は陰性と判断した.

2.6.6.4.2 ほ乳類の培養細胞を用いる小核試験

評価資料 4.2.3.3-03

参考資料 4.2.3.3-04

概要表 2.6.7.7.1，2.6.7.7.3

エンシトレルビルフマル酸の染色体異常誘発性を評価するため，ヒトリンパ芽球由来 TK6 培養細胞を用いる in vitro 小核試験を，S9 mix 非存在及び存在下での 3 時間処理 (処理後 21 時間再培養) 及び S9 mix 非存在下での 24 時間連続処理で実施した．陰性対照として DMSO を用いた.

探索試験の結果 (2.6.7.7.1 項参照) を基に, 細胞増殖抑制率が 50%付近を示す濃度を最高濃度に設定した. S9 mix 存在下及び非存在下の 3 時間処理 (150, 200 及び 250 μg/mL), 並びに S9 mix 非存在下の 24 時間連続処理 (75，100 及び 125 μg/mL) において，いずれの処理用量のエンシトレルビルフマル酸曝露群でも陰性対照群と比較して小核保有細胞の出現頻度に上昇は認められなかった.

以上の結果より, エンシトレルビルフマル酸の TK6 細胞を用いる小核試験は陰性と判断した.

2.6.6.4.3 ラットを用いる小核試験

評価資料 4.2.3.3-05

概要表 2.6.7.8.1

エンシトレルビルフマル酸の in vivo における染色体異常誘発性を評価するため，Sprague Dawley 系ラットを用いて小核試験を実施した．各群 5 例の雄ラットに 0 (陰性対照群)，250，500，1000 又は 2000 mg/kg/日のエンシトレルビルフマル酸を初回投与後 24 及び 45 時間後にそれぞれ経口投与した．高用量は ICH S2(R1) ガイドラインに記載された最高用量を設定し，以降公比 2 で 3用量を設定した．陰性対照群には媒体 (0.5% MC) を投与した．最終投与 3 時間後に骨髄細胞を採取した.

投与期間を通じて，いずれの用量においても一般状態及び体重に影響は認められなかったことから，500，1000 及び 2000 mg/kg/日投与群を評価対象群とした．

幼若赤血球中の小核を有する細胞数は，いずれのエンシトレルビルフマル酸投与群においても陰性対照群と比較して有意な増加は認められなかった．また，全赤血球中の幼若赤血球比は，いずれのエンシトレルビルフマル酸投与群においても陰性対照群と比較して有意差はなく，骨髄細胞の増殖抑制は認められなかった．

以上の結果より，エンシトレルビルフマル酸のラット小核試験は陰性と判断した．

2.6.6.5 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エンシトレルビルフマル酸の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．

2.6.6.6 生殖発生毒性試験

2.6.6.6.1 ラット受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験

評価資料 4.2.3.5-01

概要表 2.6.7.11.1

(1) 用量設定根拠

ラット 2 週間反復経口投与毒性試験 (投与量 : 20，100 及び 1000 mg/kg/日) では，最高用量である 1000 mg/kg/日の用量まで一般状態に変化は認められなかった．投与 14 日目における血漿中エンシトレルビルの C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24hr}$ は，20～100 mg/kg/日投与群の間では用量比で増加し，100～1000 mg/kg/日投与群の間では用量比未満で増加した (2.6.6.3.1 項参照)．以上の結果から，本試験の高用量として ICH S5 (R3) ガイドラインに記載された 1 日限界用量である 1000 mg/kg/日を設定した．また，毒性の用量反応関係を確認するため，低用量及び中間用量として，それぞれ 20 及び 60 mg/kg/日を設定した．

(2) 試験方法及び成績

Sprague Dawley 系ラット (各群雌雄 20 例) に 0 (対照群)，20，60 又は 1000 mg/kg/日のエンシトレルビルフマル酸を 1 日 1 回反復経口投与し，雌雄の受胎能及び初期胚発生への影響を評価した．対照群には媒体 (0.5% MC) を投与した．雄動物には交配の 28 日前から，交配期間を経て剖検の前日まで (57～58 日間) 投与した．雌動物には交配の約 14 日前から，交配期間を経て妊娠 7日まで投与し，妊娠 15 日目に帝王切開した．

試験期間を通じて死亡及び瀕死は発生しなかった．

摂餌量の減少が 1000 mg/kg/日投与群の雄で投与 1 日目，1000 mg/kg/日投与群の雌で投与 1 及び 4 日目，60 mg/kg/日投与群の雌では投与 4 日目に認められた．しかし，これらの変化は一過性であり，軽度な変化であること (雄で対照群と比較して−14%，1000 mg/kg/日投与群の雌で対照群と比較して−11%～−14%，60 mg/kg/日投与群の雌で対照群と比較して−14%) 及び体重に変化が認められなかったことから毒性ではないと判断した．

雄では，1000 mg/kg/日投与群で，精巣上体尾部の重量，精子活力，運動精子率及び精巣上体総精子数の低値が認められた．しかし，異常精子率に変化は認められなかった．また，1000 mg/kg/日投与群の雄生殖器 (前立腺，精巣，精巣上体) の病理組織学的検査では，被験物質投与による影響は認められなかった．精子検査で認められた変化はいずれもごく軽度であり (対照群と比較して−6%～−15%) ほぼ背景値の範囲内の変化であること，及び受胎率や初期胚発生に影響がないため毒性ではないと判断した．60 及び 20 mg/kg/日投与群では，精巣上体尾部の重量，精子活力，運動精子率，精子数及び異常精子率に変化は認められなかった．

いずれの雄及び雌親動物においても一般状態，体重及び肉眼検査にエンシトレルビルフマル酸投与による影響は認められなかった．

親動物の生殖機能に関しては，いずれの投与群においても性周期，交配期間，交尾率及び受胎率にエンシトレルビルフマル酸投与による影響は認められなかった．また，いずれの投与群においても黄体数，着床数，着床率，着床前死亡率，着床後死亡数，着床後死亡率，生存胚数及び胚生存率にエンシトレルビルフマル酸投与による影響は認められなかった．

以上の結果より，雄及び雌親動物の一般毒性，雄及び雌親動物の生殖機能及び初期胚発生に関する無毒性量は 1000 mg/kg/日と判断した．

2.6.6.6.2 ラット胚・胎児発生に関する試験

評価資料 4.2.3.5-02

概要表 2.6.7.12.1

(1) 用量設定根拠

ラット 2 週間反復経口投与毒性試験 (投与量 : 20，100 及び 1000 mg/kg/日) では，最高用量である 1000 mg/kg/日の用量まで一般状態に変化は認められなかった．投与 14 日目における血漿中エンシトレルビルの C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24hr}$ は，20～100 mg/kg/日投与群の間では用量比で増加し，100～1000 mg/kg/日投与群の間では用量比未満で増加した (2.6.6.3.1 項参照)．以上の結果より，本試験の高用量として，ICH S5 (R3) ガイドラインに記載された 1 日限界用量である 1000 mg/kg/日を設定した．また，毒性の用量反応関係を確認するため，低用量及び中間用量としてそれぞれ 20 及び 60 mg/kg/日を設定した．

(2) 試験方法及び成績

Sprague Dawley 系雌ラット (各群 20 例) を交配させ，0 (対照群)，20，60 又は 1000 mg/kg/日のエンシトレルビルフマル酸を，胚・胎児の着床から硬口蓋閉鎖までの期間 (妊娠 6 日目から妊娠 17 日目)，1 日 1 回反復経口投与して，妊娠 20 日目に帝王切開し，母動物及び胚・胎児発生への影響を評価した．対照群には媒体 (0.5% MC) を投与した．母動物の検査として，一般状態観察，体重測定及び摂餌量測定を実施した．妊娠 20 日目に剖検及び帝王切開を行い，黄体数，着床数，生存胎児数，胚・胎児死亡数，性比，胎児体重及び胎盤重量の測定，胎児及び胎盤の外表検査並びに胎児の内臓及び骨格検査を実施した．また，エンシトレルビルの TK 評価のため，別の妊娠ラット (各群 5 例) に同じ条件でエンシトレルビルフマル酸を投与し，妊娠 6 日目及び 17 日目に採取した血漿試料を用い，エンシトレルビル血漿中濃度を測定した．

試験期間を通じて母動物に死亡及び瀕死は発生しなかった．1000 mg/kg/日投与群で，投与初期に摂餌量の減少が認められた．また，投与初期及び投与期間末期に体重増加抑制が認められた．20 及び 60 mg/kg/日投与群では体重及び摂餌量に変化は認められなかった．またいずれの投与群においても，母動物の一般状態，肉眼検査，黄体数，着床数，着床率及び着床前死亡率に変化は認められなかった．

胚・胎児への影響評価では，1000 mg/kg/日投与群において，胎児体重の低値，胸骨分節の骨化数減少及び短小過剰肋骨の増加が認められた．胎児体重の低値及び胸骨分節の骨化数減少は胎児の軽度の発育遅延を示唆する変化と考えられた．生存胎児数，生存率，胚・胎児死亡数，着床後死亡率，性比，胎盤重量，胎児及び胎盤の外表検査並びに生存胎児の内臓検査にエンシトレルビルフマル酸投与による影響は認められなかった．また，20 及び 60 mg/kg/日投与群では胚・胎児に対する影響は認められなかった．

TK 解析では，妊娠 6 日目及び 17 日目における血漿中エンシトレルビルの C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24hr}$ は，20 及び 60 mg/kg/日投与群の間はおおむね用量に比例して増加し，60 及び 1000 mg/kg/日投与群の間は用量比未満で増加した (表 2.6.6.6-1)．妊娠 17 日目における 20 mg/kg/日投与群の $AUC_{0\text{-}24hr}$ は，妊娠 6 日目に比べて高値傾向を示した．

本試験では，いずれの投与群においても胚・胎児の形態異常及び致死は認められなかった．1000 mg/kg/日投与群において，母動物で体重増加抑制及び摂餌量減少が認められた．また，胚・胎児では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．以上の結果より，母動物の一般毒性及び胚・胎児の発生に関する無毒性量は，60 mg/kg/日，母動物の生殖機能に関する無毒性量は，1000 mg/kg/日と判断した．

表 2.6.6.6-1　ラット胚・胎児発生に関する試験における血漿中エンシトレルビルの TK パラメータ

TK parameters of ensitrelvir		Dose (mg/kg/day)		
		20	60	1000
C_{max} (μg/mL)	G6	36.9	125	266
	G17	46.1	134	240
$AUC_{0\text{-}24hr}$ (μg·hr/mL)	G6	368	1590	4070
	G17	618	1990	3400

G = Gestation Day
Data are expressed as the mean values of 5 pregnant females.

2.6.6.6.3　ウサギ胚・胎児発生に関する試験

評価資料 4.2.3.5-03
参考資料 4.2.3.5-04
概要表 2.6.7.10，2.6.7.12.2

(1) 用量設定根拠

妊娠ウサギにおける用量設定試験 (投与量 : 30，300 又は 1000 mg/kg/日) では，エンシトレルビルフマル酸を妊娠 6 日から妊娠 19 日に 1 日 1 回反復経口投与し，胚・胎児発生への影響を予

備的に評価した (2.6.7.10 項参照). 300 及び 1000 g/kg/日投与群において，摂餌量減少及び体重減少が全例で認められ，1000 mg/kg/日投与群では，流産が 1 例で認められた．以上の結果から，胚・胎児発生に関する試験の高用量として，300 mg/kg/日を設定した．また，毒性の用量反応関係を確認するため，100 及び 30 mg/kg/日を設定した．

(2) 試験方法及び成績

ニュージーランドホワイト種妊娠ウサギ (各群 17～18 例) に 0 (対照群)，30，100 又は 300 mg/kg/日のエンシトレルビルフマル酸を，胚・胎児の着床から硬口蓋閉鎖までの期間 (妊娠 6日目から妊娠 19 日目)，1 日 1 回反復経口投与して，妊娠 28 日目に帝王切開し，母動物及び胚・胎児発生への影響を評価した．また，エンシトレルビルの TK 評価のため，妊娠 6 日目及び 19 日目に採取した血漿試料を用い，血漿中エンシトレルビル濃度を測定した．対照群には媒体 (0.5% MC) を投与した．

試験期間を通じて母動物に死亡及び瀕死は発生しなかった．

100 及び 300 mg/kg/日投与群において，投与期間を通じて母動物の体重及び摂餌量の低値が認められ，体重増加抑制は解剖日まで継続した．体重及び摂餌量の低値は 100 mg/kg/日投与群よりも 300 mg/kg/日投与群で顕著であった．また，100 及び 300 mg/kg/日投与群では糞量の減少及び/又は無排便，100 mg/kg/日投与群の 1 例では妊娠 22 日目に流産が認められた．流産した母動物では重度の体重減少と摂餌量の低値が継続的に認められたことから，流産は強い母体毒性による二次的な変化と考えられた．一方，100 及び 300 mg/kg/日投与群では投与期間終了後に摂餌量の高値が認められた．この変化は投与期間中の摂餌抑制による変化と考えられ，毒性とは判断しなかった．

30 mg/kg/日投与群では母動物の一般状態，体重及び摂餌量にエンシトレルビルフマル酸投与による影響は認められなかった．また，いずれの投与群においても，母動物の肉眼検査，黄体数，着床数，着床率及び着床前死亡率に影響は認められなかった．

胚・胎児への影響評価では，300 mg/kg/日投与群で胎児生存率が低値を示し，強い母体毒性による二次的な影響であると考えられた．同群では，骨格異常を有する胎児発現率及び骨格異常胎児を有する母動物発現率の高値が認められた. 認められた変化は, 軸骨格の形態異常に加え，胸椎体の骨格変異や短尾等の椎骨の形態異常に関連するものであった. 100 mg/kg/日投与群でも，骨格異常胎児を有する母動物発現率が高値を示した．なお，同群で認められた骨格異常所見並びに外表異常所見は 300 mg/kg/日投与群で生じた所見と類似していたが, その頻度は 300 mg/kg/日投与群よりも低かった．以上より，エンシトレルビルフマル酸はウサギ器官形成期における 100 及び 300 mg/kg/日の継続的な投与により，強い母体毒性と共に，胚・胎児の致死性又は形態異常を誘発した．上述した変化のほか，骨格変異所見として 100 及び 300 mg/kg/日投与群で完全過剰肋骨，300 mg/kg/日投与群で腰椎過剰が高頻度に認められた．胎盤重量の高値が 100 及び 300 mg/kg/日投与群に認められたが，胎児体重に変化は認められず，ほぼ背景値の範囲内であったことから毒性学的意義はないと判断した．なお，300 mg/kg/日投与群の胎児体重，性比及び胎盤の外表検査，100 mg/kg/日投与群の生存胎児数，胎児生存率，胚・胎児の死亡数，着床後死亡率，胎児体重，性比及び胎盤の外表検査にエンシトレルビルフマル酸投与による影響は認めら

れなかった，30 mg/kg/日投与群では，胚・胎児のいずれの検査項目においても影響は認められなかった．

TK 解析では，血漿中エンシトレルビルの C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24hr}$ は，30 及び 100 mg/kg/日投与群の間はおおむね用量に比例して増加し，100 及び 300 mg/kg/日投与群の間は用量比未満で増加した．また，30 mg/kg/日投与群において，妊娠 19 日目における血漿中エンシトレルビルの C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24hr}$ は，妊娠 6 日目に比べて高値傾向を示したが，300 mg/kg/日投与群では妊娠 6 日目に比べて低値傾向を示した (表 2.6.6.6-2).

本試験において，エンシトレルビルフマル酸はウサギ器官形成期における 100 及び 300 mg/kg/日の継続的な投与により，強い母体毒性と共に，胚・胎児の致死性又は形態異常を誘発した．100 又は 300 mg/kg/日投与群で認められた変化は，軸骨格の形態異常，胸椎体の骨格変異や短尾等椎骨の形態異常に関連する変化，並びに完全過剰肋骨や腰椎過剰の骨格変異であった．また，100 mg/kg/日投与群の 1 例では母体毒性に起因した流産が認められた．以上の結果より，母動物の一般毒性及び生殖機能並びに胚・胎児の発生に関する無毒性量は 30 mg/kg/日と判断した．

表 2.6.6.6-2 ウサギ胚・胎児発生に関する試験における血漿中エンシトレルビルの TK パラメータ

TK parameters of ensitrelvir		Dose (mg/kg/day)		
		30	100	300
C_{max} (μg/mL)	GD6	36.6	123	307
	GD19	68.8	167	220
$AUC_{0\text{-}24hr}$ (μg·hr/mL)	GD6	450	2010	6010
	GD19	1260	2580	3840

Data are expressed as the mean values of 3 to 5 pregnant females.

2.6.6.6.4 ウサギ胚・胎児発生に関する追加試験

評価資料 4.2.3.5-07，4.2.3.5-08

参考資料 4.2.3.5-06

概要表 2.6.7.10，2.6.7.12.3，2.6.7.12.4

ウサギ胚・胎児発生に関する試験 (2.6.6.6.3 項参照) において，100 及び 300 mg/kg/日投与群で強い母体毒性と共に，胚・胎児の致死及び胎児の軸骨格の形態異常が認められたことから，これらの変化に対する母体毒性の関与，並びにより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，ウサギ胚・胎児発生に関する追加試験を行った．

(1)短期間投与の母体毒性予備評価

ニュージーランドホワイト種妊娠ウサギ (各群 3～4 例) に 0 (対照群)，300，500，750 及び 1000 mg/kg/日のエンシトレルビルフマル酸を，妊娠 6日目から妊娠 9 日目の 4 日間，1 日 1 回反復経口投与し，TK 測定と共に一般状態観察，体重測定，摂餌量測定，血液学的検査，血液化学

的検査及び肉眼検査を行った．本試験はGLP非適用下で実施した．

試験期間を通じて母動物に死亡及び瀕死は発生しなかった．

全エンシトレルビルフマル酸投与群において，投与期間を通じて母動物の体重及び摂餌量の低下が認められた．さらに，全エンシトレルビルフマル酸投与群において糞量の減少が認められ，1000 mg/kg/日投与群においては被験物質様の異常色便が投与期間後半に認められた．網状赤血球比、アルブミン及び総蛋白の減少，トリグリセリドの増加，フィブリノーゲンの増加に起因すると考えられる血液凝固時間の減少傾向 (PT及び活性化部分トロンボプラスチン時間の減少) が全エンシトレルビルフマル酸投与群において認められた．本試験で認められた全ての所見の程度は全エンシトレルビルフマル酸用量群で同程度であった．

肉眼検査では，全ての母動物において変化は認められなかった．

TK解析では，血漿中エンシトレルビルの$AUC_{0\text{-}24hr}$及びC_{max}は300～1000 mg/kg/日で同等であった．以上の結果から、妊娠ウサギに対する 300 mg/kg/日以上の短期 (4 日間) の投与では、血漿中エンシトレルビル濃度は同等で、母体毒性も同程度であった．このため，胚・胎児発生への影響の検討は300 mg/kg/日で評価することとした．

(2) 2週間反復投与の母体毒性評価

母動物の血液系への影響を評価する目的で，ニュージーランドホワイト種妊娠ウサギ (各群5例) に0 (対照群)，100 又は300 mg/kg/日のエンシトレルビルフマル酸を，胚・胎児の着床から硬口蓋閉鎖までの期間 (妊娠6日目から妊娠19日目)，1日1回反復経口投与し，母動物の一般状態観察，体重測定及び摂餌量測定に加え，血液学的検査，血液化学的検査及び肉眼検査を行った．

試験期間を通じて母動物に死亡及び瀕死は発生しなかった．

100及び300 mg/kg/日投与群において，投与期間を通じて母動物の体重，体重増加量及び摂餌量の低値が認められた．摂餌量の減少は投与初期が特に顕著であったが，投与後半では回復傾向が認められた．また，両群全例に糞量の減少が認められた．

血液学的検査及び血液化学的検査では，妊娠19日目に100及び300 mg/kg/日投与群で対照群と比較して赤血球数の減少，ヘモグロビン濃度の低下及びヘマトクリット値の低値を示し，これらは毒性と判断した．100及び300 mg/kg/日投与群において網状赤血球比の減少が妊娠12日目に認められた．一方で妊娠19日目には回復性を示したことから，網状赤血球比の変化は顕著な摂餌抑制に起因すると考えられた．また，100及び300 mg/kg/日投与群においてトリグリセリド及びクレアチニンの高値並びに活性化部分トロンボプラスチン時間の減少が認められたが，これらの変化は軽度かつ一過性であることから毒性ではないと判断した．

肉眼検査では，全ての母動物において変化は認められなかった．

本試験では，100及び300 mg/kg/日投与群において母動物の体重，体重増加量及び摂餌量の低値と共に，赤血球系パラメータの減少が認められた．

(3) 短期間投与の胚・胎児発生への影響の評価

ニュージーランドホワイト種妊娠ウサギ (各群18～20例) を胚・胎児の着床から硬口蓋閉鎖

までの期間 (妊娠 6日目から妊娠 19 日目) を元に 4 つの期間 (妊娠 6日目から妊娠 9 日目，妊娠 10 日目から妊娠 12 日目，妊娠 13 日目から妊娠 15 日目及び妊娠 16日目から妊娠 19 日目) の 4 群 (それぞれ群 2，群 3，群 4 及び群 5 とする) に分割して，短期間の投与が胚・胎児発生に与える影響を追加評価した．それぞれの期間において，300 mg/kg/日のエンシトレルビルフマル酸を 1 日 1 回反復経口投与し，母動物及び胚・胎児発生への影響を評価した．母動物は，一般状態観察，体重測定及び摂餌量測定に加え，血液学的検査，血液化学的検査及び肉眼検査を行った．妊娠 28 日目に剖検及び帝王切開を行い，黄体数，着床数，生存胎児数，胚・胎児死亡数，性比，胎児体重及び胎盤重量の測定，胎児及び胎盤の外表検査並びに胎児の骨格検査を実施した．また，エンシトレルビルの TK 評価のため，各群初回投与日及び最終投与日に採取した血漿試料を用い，血漿中エンシトレルビル濃度を測定した．対照群 (群 1 とする) には妊娠 6日目から妊娠 19 日目の期間に媒体 (0.5% MC) を投与した．

試験期間を通じて母動物に死亡及び瀕死は発生しなかった．

全エンシトレルビルフマル酸投与群において，投与初日から母動物の体重減少及び摂餌量の低下が認められたが，投与終了後からそれぞれ増加又は回復傾向が認められた．また，全エンシトレルビルフマル酸投与群で糞量の減少及び/又は無排便が認められ，群 4 及び群 5 のそれぞれ 1 例に妊娠 26 日又は 25 日に流産が認められた．

全エンシトレルビルフマル酸投与群において，白血球数，リンパ球数，好中球数，単球数，及び/又は好塩基球数の減少が，群 2 及び群 5 で，網状赤血球比の減少が投与最終日に認められた．これらの変化は摂餌量の減少に伴う変化と考えられた．全エンシトレルビルフマル酸投与群において，トリグリセリドの高値，クレアチニンの高値及び活性化部分トロンボプラスチン時間の減少が認められたが，トロンボプラスチン時間の変化は軽度かつ一過性であること，クレアチニン及びトリグリセリドの変化は他の関連するパラメータに変化は認められないことから，毒性ではないと判断した．

肉眼検査では，全ての母動物において変化は認められなかった．

胚・胎児への影響評価では，母体毒性と共に胎児生存率の低値が群 2 で認められた．同群では，骨格異常を有する胎児発現率及び骨格異常胎児を有する母動物発現率が高かった．胎児の外表異常として，短尾及び二分脊椎が認められた．また，関連する骨格異常として軸骨格の形態異常，変異所見として胸椎体のダンベル化が認められた．群 3 及び群 4 においても軸骨格形態異常が認められた．骨格異常の発現率は群 2 で最も高く，群 3 及び群 4 における発現率は群 2 より低頻度であり、群 5 ではエンシトレルビルフマル酸投与に起因した骨格異常は認められなかった．

群 2，群 4 及び群 5 で胎児体重が小さく，群 5 で胸骨分節骨化数の減少が認められたが，これらの変化は母体毒性に伴う胎児の発育遅延を示唆する変化と考えられた．

TK 解析では，投与初日の $AUC_{0\text{-}24hr}$ は群 2～群 5 でそれぞれ 6710, 6980, 5280 及び 4860 μg·hr/mL であり，投与最終日の $AUC_{0\text{-}24hr}$ (それぞれ 4620，7890，7600 及び 3200 μg·hr/mL) に比べて顕著な変化は認められず，反復投与による曝露の変化は認められなかった．(表 2.6.6.6-3)

以上，エンシトレルビルフマル酸の投与により，器官形成期の初期 (妊娠 6～9 日) から中期 (妊娠 10～15 日) の投与群で胚致死，胎児の外表異常及び軸骨格の形態異常が認められ，器官形

成期初期の投与群でその発現頻度は明らかに高かった．また，4 つの分割投与のほぼ全期間で母体毒性に伴う胎児発育遅延が発現した．

表 2.6.6.6-3 ウサギ胚・胎児発生に関する追加試験における血漿中エンシトレルビルの TK パラメータ

TK parameters of ensitrelvir		Dosing period			
		GD6 to 9	GD10 to 12	GD13 to 15	GD16 to 19
C_{max} (μg/mL)	FD	311	323	254	226
	LD	332	427	376	196
$AUC_{0\text{-}24hr}$ (μg·hr/mL)	FD	6710	6980	5280	4860
	LD	4620	7890	7600	3200

FD: First-dosing day, LD: Last-dosing day
Data are expressed as the mean values of 3 to 5 pregnant females.

2.6.6.6.5 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

評価資料 4.2.3.5-05

概要表 2.6.7.13.1

(1) 用量設定根拠

ラット 2 週間反復経口投与毒性試験 (投与量 : 20，100 及び 1000 mg/kg/日) では，最高用量である 1000 mg/kg/日の用量まで一般状態に変化は認められなかった．投与 14 日目における血漿中エンシトレルビルの C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24hr}$ は，20～100 mg/kg/日投与群の間で用量比で増加し，100～1000 mg/kg/日投与群の間で用量比未満で増加した (2.6.6.3.1 項参照)．以上の結果から，本試験の高用量として ICH S5 (R3) ガイドラインに記載された 1 日限界用量である 1000 mg/kg/日を設定した．また，毒性の用量反応関係を確認するため，低用量及び中間用量として，それぞれ 20 及び 60 mg/kg/日を設定した．

(2) 試験方法及び成績

Sprague Dawley 系妊娠ラット (各群 18～20 例) に 0 (対照群)，20，60 又は 1000 mg/kg/日のエンシトレルビルフマル酸を，妊娠 6 日から分娩を経て哺育 20 日まで，1 日 1 回反復経口投与し，出生前及び出生後の発生並びに母体の機能への影響を評価した．対照群には媒体 (0.5% MC) を投与した．母動物については一般状態観察，体重測定，摂餌量測定を実施し，哺育 21 日に剖検して着床数を調べた．出生児については生存性評価，一般状態観察，体重測定，生後発育検査，反射・感覚機能検査，オープンフィールド試験，水迷路試験，性成熟観察，性周期観察，交尾能及び受胎能検査，肉眼検査，F1 母動物の妊娠 15 日における着床及び F2 胚の生存性の評価を行った．

試験期間を通じて母動物に死亡及び瀕死は発生しなかった．1000 mg/kg/日投与群の母動物において，体重の増加抑制及び低値傾向が投与期間を通じて認められ，投与初期及び授乳期間中に摂餌抑制が認められた．1000 mg/kg/日投与群の 5 例の母動物において哺育 3 日までに全児死亡が認められ，うち 4 例は分娩直後に著しい体重減少を伴っていた．20 及び 60 mg/kg/日投与群では母動物の体重及び摂餌量にエンシトレルビルフマル酸投与による影響は認められず，全児

死亡も認められなかった．また，いずれの投与群においても，母動物の一般状態，妊娠期間，分娩率，肉眼検査及び着床数に影響は認められなかった．

F1 出生児では，1000 mg/kg/日投与群で出生児数並びに出生時及び生後 4 日における生存率の低値が認められた．着床数には変化が認められず，胚・胎児発生に関する試験において器官形成期のエンシトレルビルフマル酸投与がラット胎児の生存率に影響を与えなかったことから(2.6.6.6.2 項参照)，妊娠後期の子宮内での死亡又は出生以降の F1 出生児の死亡が生じていると考えられた．死亡した F1 出生児から死因を特定する情報は得られず，F1 出生児の離乳時肉眼検査で変化は認めらなかったこと，また全児死亡が認められた母動物において分娩直後に著しい体重減少が認められていたことから，児生存性の低下は母体毒性に起因すると考えられた．

また，1000 mg/kg/日投与群の F1 出生児において，離乳まで継続した体重の低値が認められた．F1 出生児の体重低値は離乳時点で最も影響が大きく (出生時は対照群比 −7%に対し，離乳時は対照群比 −25%～−24%)，離乳後には回復傾向が認められた．また，哺育期間中の母動物にも体重低値と摂餌抑制が認められていたことから，F1 出生児の体重低値は母体毒性の影響を受けていることが示唆された．同群の雌雄 F1 出生児において生後 14 日における眼瞼開裂の完了率の低値が認められ，上述した F1 出生児の低体重と関連した成長の遅れと考えられた．なお，生後 16日にはほぼ全例の眼瞼開裂が確認された．耳介展開や切歯萌出等のその他の生後発育検査にはエンシトレルビルフマル酸投与による影響は認められなかった．1000 mg/kg/日投与群の F1 出生児は，離乳後も継続して体重の低値が認められたが，日齢が進むにつれて回復傾向を示した．体重の低値に伴って，雌雄とも性成熟の遅れが認められたが，この変化は一時的であり，全例における性成熟の完了時期は対照群と同程度であった．

60 及び 20 mg/kg/日投与群では出生児数，生存率，体重，生後発育検査及び性成熟観察にエンシトレルビルフマル酸投与による影響は認められなかった．また，いずれの投与群においても，出生児の性比，一般状態，反射・感覚機能検査，オープンフィールド試験，水迷路試験，性周期観察，交尾能及び受胎能検査，肉眼検査並びに F1 母動物の着床数及び F2 胚の生存性にエンシトレルビルフマル酸投与による影響は認められなかった．

本試験では，1000 mg/kg/日投与群において母動物の体重の増加抑制及び低値傾向，摂餌抑制，並びに全児死亡が認められた．F1 出生児では，1000 mg/kg/日投与群で，母体毒性に伴う出生児数，生存率及び体重の低値並びに眼瞼開裂及び雌雄の性成熟の遅延が認められた．これらを毒性変化と考え，母動物の一般毒性及び生殖機能並びに次世代の発生に関する無毒性量は，いずれも 60 mg/kg/日と判断した．

2.6.6.7 局所刺激性試験

予定臨床適用経路が経口であるため，局所刺激性試験は実施しなかった．

2.6.6.8 その他の毒性試験

2.6.6.8.1 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

評価資料 4.2.3.7-01，4.2.3.7-02

概要表 2.6.7.16.1

エンシトレルビルフマル酸は波長 400～700 nm の範囲では光吸収を示さなかったが, 波長 290～700 nm の範囲において光吸収を示した (2.6.7.16.1 項参照). このことから ICH S10 ガイドラインに従い，エンシトレルビルフマル酸の光毒性を評価するため，マウス線維芽細胞である BALB/c 3T3 細胞に，エンシトレルビルフマル酸を 0.781，1.56，3.13，6.25，12.5，25，50 又は 100 μg/mL の濃度で適用した．適用 1 時間後から，5 J/cm^2 の UV-A 及び 68.7 mJ/cm^2 の UV-B を含む疑似太陽光の照射下又は非照射下で 50 分間静置し，その後，細胞へのニュートラルレッドの取り込みを指標に 50%阻害濃度 (IC_{50})，光毒性係数 (PIF) 及び平均光作用 (MPE) を算出した．陰性対照として DMSO を用いた.

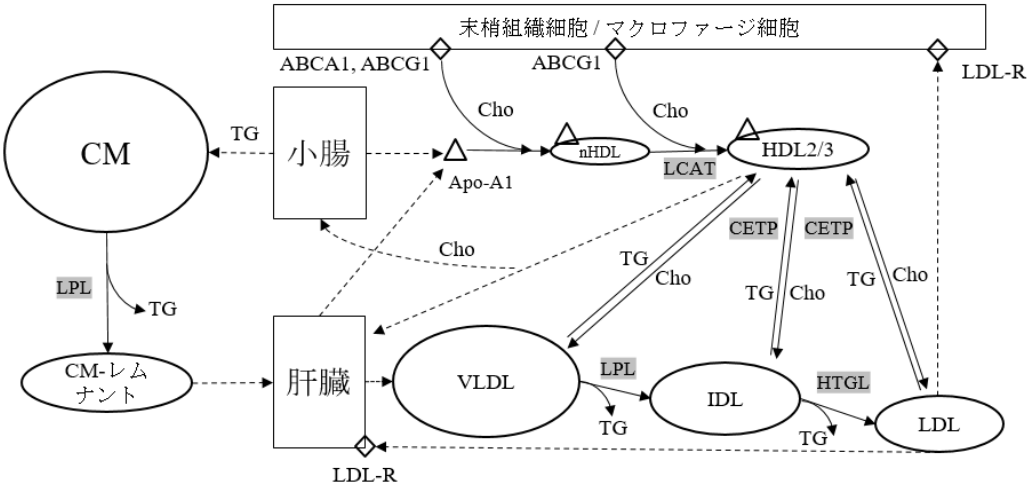
細胞の生存率は，陰性対照と同等であり，疑似太陽光照射の有無に関わらずいずれの濃度においても，IC_{50} を求めることができなかった．また，IC_{50} を用いて算出する PIF も算出できなかった. MPE は 0.022 であり, 経済開発協力機構 (OECD) のガイドライン (Test Guideline No. 432 In Vitro 3T3 NRU Phototoxicity Test) に定められた光毒性の判断基準である 0.15 より低い値であった.

以上の結果より，BALB/c 3T3 細胞に対してエンシトレルビルフマル酸は光毒性は陰性であり，ヒトで光毒性を生じる懸念は非常に低いと判断した.

2.6.6.8.2 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するための試験を実施した．コレステロールの生体内における輸送経路は，図 2.6.6.8-1 に示すとおりである．コレステロールは肝臓で合成され，リポタンパク質である超低比重リポタンパク質 (VLDL) や LDL に含有されて肝臓以外の末梢組織に運搬され，細胞膜等を作る材料となる．肝臓や小腸で合成される Apo-A1 を主要タンパク質として含むリポタンパク質である 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 によりエステル化され HDL の内部に取り込まれる．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 [7～11].

図 2.6.6.8-1　　コレステロールの生体内における輸送経路



ABCA1 = ATP-binding cassette subfamily A member 1; ABCG1 = ATP-binding cassette subfamily G member 1; CETP = cholesteryl ester transfer protein; Cho = cholesterol; CM = chylomicron; HDL = high density lipoprotein; HTGL = hepatic triglyceride lipase; IDL = intermediate density lipoprotein; LCAT = lecithin:cholesterol acyltransferase; LDL = low density lipoprotein; LDL-R = LDL-receptor; LPL = lipoprotein lipase; nHDL = nascent HDL; TG = triglyceride; VLDL = very low density lipoprotein

エンシトレルビルフマル酸による HDL コレステロール減少の発現機序を検討するため, HDL のコレステロール回収能及び LCAT 活性に対するエンシトレルビルフマル酸の作用を in vitro で検証した．また，本剤の第 1 相試験 (T1211 試験) の 750/250 mg 投与時の各リポタンパク質 (HDL，LDL，VLDL 及び CM [カイロミクロン]) をさらに詳細に分画し，各画分中の脂質解析を行った.

2.6.6.8.2.1　　血漿中レシチンコレステロールアシルトランスフェラーゼ活性に対する作用

評価資料 4.2.3.7-03

概要表 2.6.7.16.2

ラット血漿を用いて HDL によるコレステロールの内部取り込みに関与する酵素である血漿中 LCAT 活性に対するエンシトレルビルフマル酸の作用を検証した．本試験は信頼性基準下で実施した．LCAT は HDL と結合して血中に存在し，末梢組織細胞やマクロファージ細胞等から引き抜いた遊離コレステロールを HDL に取り込む際に，レシチンの脂肪酸を転移してコレステロールエステルを生成する酵素であり [8～10]，LCAT 活性阻害は血中 HDL コレステロール減少に繋がり得る [12].

ラット血漿にエンシトレルビルフマル酸を 0.206，0.617，1.85，5.56，16.7，50.0，150 又は 450 µg/mL の濃度で調製，4%の割合で反応試薬 (Roar LCAT Activity Assay Kit，Roar Biomedical 社) と混合し，37°C で 2.5 時間インキュベーションした後に LCAT 活性を測定した (反応液中終濃度 0.00824，0.0247，0.0740，0.222，0.668，2.00，6.00，18.0 µg/mL)．陰性対照として DMSO を用い，陽性対照として sodium iodoacetate を 3.2 mmol/L (反応液中終濃度) の濃度で用いた．陰性対照群及び陽性対照群の LCAT 活性阻害率をそれぞれ 0%及び 100%としてエンシトレルビルフマル酸添加群の LCAT 活性阻害率を算出した.

エンシトレルビルフマル酸は 0.00824～18.0 μg/mL の濃度において−5.63%～18.22%の LCAT 活性阻害率を示した．以上の結果より，本試験条件下においてエンシトレルビルフマル酸の LCAT 活性に対する IC_{50} は 18.0 μg/mL を超える濃度と推定された．

2.6.6.8.2.2 THP-1 細胞からのコレステロール流出に対する作用

評価資料 5.3.2.3-01

概要表 2.6.7.16.3

ヒト単球系白血病由来細胞株である THP-1 細胞を用いて，HDL のコレステロール回収能に対するエンシトレルビルフマル酸の作用を検証した．本試験は信頼性基準下で実施した．HDL は余剰となった遊離コレステロールを末梢組織細胞やマクロファージ細胞等から引き抜くことにより，血中に HDL コレステロールを生成する [12]．HDL によるコレステロール回収の阻害は血中 HDL コレステロール減少に繋がり得る [13]．

コレステロール流出に対する作用は，Cholesterol Efflux Assay Kit (abcam 社) を用いて評価した．THP-1 細胞をコレステロール流出トランスポーターである ABCA1 発現誘導剤 (9-*cis*-retinoic acid) 及びマクロファージ様細胞への分化誘導剤 (phorbol 12-myristate 13-acetate) により分化誘導後，蛍光標識コレステロールと細胞を 37°C，5% CO_2 環境下で約 1 時間，無血清培地で培養し，蛍光標識コレステロールを細胞内に取り込ませた．その後，エンシトレルビルフマル酸を 6.25，12.5，25.0，50.0，100 又は 200 μg/mL の濃度で適用し，37°C，5% CO_2 環境下で約 4 時間，ヒト血清添加培地で培養後に細胞内及び培養液上清におけるコレステロール量を蛍光強度を指標に測定した．対照群には DMSO を用いた．比較対照群としてコレステロール流出阻害活性を有する cyclosporine A [14] を 1.25，2.50，5.00，10.0，20.0 又は 40.0 μmol/L の濃度で適用した．

エンシトレルビルフマル酸は 200 μg/mL の濃度までコレステロール流出に対する阻害活性を示さなかった．Cyclosporine A は濃度依存的にコレステロール流出に対する阻害活性を示した．以上の結果より，本試験条件下においてエンシトレルビルフマル酸のコレステロール流出に対する IC_{50} は 200 μg/mL を超える濃度と推定された．

2.6.6.8.2.3 ヒト血漿における脂質解析

評価資料 5.3.2.3-02

概要表 2.6.7.16.4

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及びトリグリセリドの増加に関して詳細な脂質解析を実施した．本試験は信頼性基準下で実施した．本剤の第 1 相試験 (T1211 試験) のコホート G (750 mg を初日に投与し，250 mg を 4 日間反復投与した群 [750/250 mg]) のプラセボ投与群 2 例及びエンシトレルビルフマル酸投与群 4 例について，投与前，初日投与後 2，4，8 及び 24時間，5 日目投与後 24 時間の血漿を用いた脂質解析を実施した．解析は，ゲルろ過高速液体クロマトグラフィー法により，リポタンパク質を主要 4画分 (CM，VLDL，LDL 及び HDL) 又は詳細 20 画分 (CM: 2 画分，VLDL: 5 画分，LDL: 6 画分，HDL: 7 画分) に分画し，各画分中のコレステロール含有量，トリグリセリド含有量及び粒子数を測定し，さらに主要 4 画分については粒子サイズも測定した．また，各測定時点における血

中総コレステロール量，トリグリセリド量及び遊離グリセロール量も測定した．いずれのデータも各測定時点における投与前値からの変化率をプラセボ投与例とエンシトレルビルフマル酸投与例で比較し，エンシトレルビルフマル酸投与による影響を解析した．

血中総コレステロール量については，初回投与後 24 時間以降に減少した．血中総トリグリセリド量及び遊離グリセロール量には，いずれの時点でも変動は認められなかった．

主要 4 画分

- CM：
  初日投与後 8 時間以降にコレステロール増加が認められた．また，初日投与後 24 時間以降に粒子数の増加が認められた．いずれの時点でもトリグリセリド及び粒子サイズに変動は認められなかった．
- VLDL：
  初日投与後 4 及び 8 時間にコレステロール増加が認められた．また，初日投与後 4 時間以降に粒子数の増加，初日投与後 8 時間に粒子サイズの増加が認められた．いずれの時点でもトリグリセリドに変動は認められなかった．
- LDL：
  初日投与後 24 時間にコレステロール減少，初日投与後 24 時間以降にトリグリセリド増加が認められた．また，初日投与後 4，8 及び 24 時間に粒子数の減少，初日投与後 4 時間以降に粒子サイズの増加が認められた．
- HDL：
  初日投与後 8 時間以降にコレステロール減少，初日投与後 8 及び 24 時間にトリグリセリド増加が認められた．また，初日投与後 24 時間以降に粒子数及び粒子サイズの減少が認められた．

詳細 20 画分

- CM (大きいサイズの画分より G01 及び G02 として記載)：
  初日投与後 8 時間以降に G01 及び G02 のコレステロール増加が認められ，5 日目投与後 24 時間に G01 のトリグリセリド増加が認められた．また，初日投与後 24 時間以降に G01 及び G02 の粒子数増加が認められた．
- VLDL (大きいサイズの画分より G03，G04，G05，G06 及び G07 として記載)：
  初日投与後 4 時間以降に G07，初日投与後 4 及び 8 時間に G04，初日投与後 8 時間後に G03 のコレステロール増加が認められ，初日投与後 24 時間以降に G07 のトリグリセリド増加が認められた．また，初日投与後 4 時間以降に G07 の粒子数増加が認められた．
- LDL (大きいサイズの画分より G08，G09，G10，G11，G12 及び G13 として記載)：
  初日投与後 4 時間以降に G10 及び G11，初日投与後 8 時間以降に G09 のコレステロール減少が認められ，初日投与後 8 時間以降に G08，初日投与後 24 時間以降に G09，5 日目投与後 24 時間に G10 のトリグリセリド増加が認められた．また，初日投与後 4 時間以降に G08 の粒子数増加，初日投与後 4 時間以降に G11，初日投与後 4，8 及び 24 時間に G09 及び G10 の粒子数減少

が認められた.

なお，G12 及び G13 画分中のコレステロールにも影響は認められたが，これらの画分におけるコレステロール含有量は他の画分と比較してごくわずかであり，LDL のコレステロール量を解析するにあたって，影響は軽微であると考えられた.

- HDL (大きいサイズの画分より G14，G15，G16，G17，G18，G19 及び G20 として記載) :

初日投与後 4 時間以降に G17，初日投与後 8 時間以降に G18，初日投与後 24 時間以降に G16 のコレステロール減少が認められ，初日投与後 8 及び 24 時間に G18 のトリグリセリド増加，5 日目投与後 24 時間に G16 のトリグリセリド減少が認められた．また，初日投与後 4 時間以降に G17，初日投与後 24 時間以降に G16，5 日目投与後 24 時間に G18 の粒子数減少が認められた.

なお，G14，G15，G19 及び G20 画分中においても影響は認められたが，これらの画分におけるコレステロール及びトリグリセリド含有量は他の画分と比較してごくわずかであり，HDL のコレステロール及びトリグリセリド量を解析するにあたって，影響は軽微であると考えられた.

詳細 20 画分の脂質解析結果から，HDL コレステロールに関して，エンシトレルビルフマル酸投与による主な初発変動は初日投与後 4 時間の粒子数減少を伴う中型 HDL (G17) のコレステロール減少であった．同測定時点において，小型 LDL (G10，G11) のコレステロール減少を伴っており，その後，5 日目投与後 24 時間までに多くの画分で粒子数変動を伴い HDL 及び LDL のコレステロールが減少し VLDL 及び CM のコレステロールが増加した．トリグリセリドに関して，エンシトレルビルフマル酸投与による主な初発変動は初日投与後 8 時間又は 24 時間の粒子数増加を伴う大型 LDL (G08) 及び小型 VLDL (G07) のトリグリセリド増加であった．CM 及び HDL のトリグリセリドの変動は軽微であった.

以上の結果から，本剤の第 1 相試験 (T1211 試験) における 750/250 mg 投与時の主な HDL コレステロールへの影響は，中型 HDL のコレステロール減少であった．その他の主な変化として小型 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が認められた.

2.6.6.8.2.4 サルにおけるコレステロール排泄への作用

評価資料 4.2.3.7-18，4.2.3.7-19

概要表 2.6.7.16.5

エンシトレルビルフマル酸投与によりコレステロールの体外排泄が促進されるか確認する目的で，カニクイザルを用いて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評価した．エンシトレルビルフマル酸のサル 4 週間反復経口毒性試験では，無毒性量は 10 mg/kg/日であったが，10 及び 30 mg/kg/日において，投与 10 日目から HDL 及び LDL コレステロールの減少が認められた．従って他の毒性の影響を受けることなく，コレステロール排泄に及ぼす影響を評価出来ると考えられる 10 mg/kg/日の投与量で評価を実施した.

雄性カニクイザル 7 例に 10 mg/kg/日のエンシトレルビルフマル酸を 10 日間反復経口投与し，投与前後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を経時的に

測定した．評価に用いた7例のうち3例は，投与7日前または12日前に胆管カニュレーションを施した．胆管カニュレーション処置群では糞便及び胆汁，無処置群では糞便を，投与2日前から投与10日後まで採取し，試料中の総コレステロール並びに総胆汁酸量を測定した．加えて血液化学的検査 (総コレステロール，総胆汁酸，HDL及びLDLコレステロールのみ) を投与1日前から投与10日後まで，血漿中薬物濃度測定を投与1日目及び10日目に実施した．

胆管カニュレーション処置群の血漿中エンシトレルビル濃度プロファイルは無処置群と同等であった．試験期間を通じて血中総胆汁酸に影響は認められなかったが，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両群で認められた．一方で，試験期間を通じて糞中及び胆汁中の総コレステロール量並びに総胆汁酸量にエンシトレルビルフマル酸投与の影響は認められなかった．

従ってカニクイザルにおいて，本試験条件ではエンシトレルビルフマル酸投与による糞中及び胆汁中へのコレステロール排泄に影響は認められなかった．

2.6.6.8.3　不純物の細菌を用いる復帰突然変異試験

参考資料 4.2.3.7-04～17

概要表 2.6.7.16.6

ICH M7ガイドラインに基づき，エンシトレルビルフマル酸原薬及び製剤に存在する，又はその製造工程中や保管中に発生する可能性がある不純物のうち，以下に示す化合物について細菌を用いる復帰突然変異試験を実施した．

復帰突然変異試験の結果は以下の通りであった．

陰性：不純物A*，不純物B*，不純物C*，不純物D*，不純物E*，不純物F*及び不純物M*

陽性：不純物G*，不純物H*，不純物I*，不純物J*，不純物K*，不純物L*及び不純物Z*

＊新薬承認情報提供時に置換

2.6.6.9 考察及び結論

エンシトレルビルフマル酸の安全性を評価するため，反復投与毒性試験，遺伝毒性試験及び生殖発生毒性試験を実施した．また，その他の試験として，光毒性試験，不純物の変異原性評価のための復帰突然変異試験及び本剤の第 1 相試験 (T1211 試験) において認められた HDL コレステロール減少の機序解明を目的とした脂質系への影響に関する試験を実施した．

2.6.6.9.1 急性毒性

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る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．

ラット 2 週間反復毒性試験において 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 をヒトに投与した時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 参照)．また，サル 2 週間反復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 参照)．

2.6.6.9.2 反復投与毒性

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 2.6.6.9-1，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 2.6.6.9-2 に示す．ラット 2 及び 4 週間反復経口投与毒性試験では，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．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．

サル 2 及び 4 週間反復経口投与毒性試験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 2.6.6.9-1)．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 $AUC_{0-\tau}$ (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 2.6.6.9-2).

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．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．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 [1]. 重篤な毒性が認められた個体の C_{max} は 211 µg/mL (397 µmol/L) 以上であり，血清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 I.Bil の増加を主体とする T.Bil の増加，並びに HDL 及び 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．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，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 2.6.6.9.6 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．2.6.6.3.3 項に記載した通り，雄 2 例の死亡/瀕死例は，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状態悪化し瀕死に至ったと考えられた.

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_{0-24hr} (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 $AUC_{0-\tau}$ (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清中アルブミン濃度 (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 (血清中アルブミン濃度：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] [15]) 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 2.6.6.9-2 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．

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ホスホジエステラーゼ (PDE) 4 阻害による嘔吐作用が報告されている [16～19]．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] 及びサル血清中タンパク結合率 [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アルブミン結合の飽和が起こり非結合型の血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] 及びヒト血清中タンパク結合率 [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 $AUC_{0\text{-}24hr}$: 2.3～3.6 倍) にあり (表 2.6.6.9-2)，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．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 2.6.6.9-2)，本剤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 (AST, LD, 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.

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 2.6.6.9-2)，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 (2.5.5.2 項参照) ことから，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に変化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.

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．

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 2.6.6.9-2)，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．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．これより，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等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で認められた [20,21]．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では 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，Fbg 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 2.6.6.9-2)，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 T.Bil 及び 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．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有機アニオントランスポーター (OATP) 1B1 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 [22]. 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] 及びサル血清中タンパク結合率 [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) に近く，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 2.6.6.9-1　　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 2.6.6.9-2　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.

2.6.6.9.3　遺伝毒性

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.

2.6.6.9.4　がん原生

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.

2.6.6.9.5　生殖発生毒性

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 2.6.6.9-3，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との比を表 2.6.6.9-4 に示す.

ラット受胎能及び初期胚発生に関する試験では，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．また，ラット胚・胎児発生に関する試験では，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 [23,24]. 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，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.

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 2.6.6.9-4).

ウサギ胚・胎児発生に関する試験では，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．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 [25]，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無毒性量の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 2.6.6.9-4).

今回実施したウサギ胚・胎児発生に関する試験の投与期間 (妊娠 6～19 日) は着床から硬口蓋閉鎖までの主要な器官形成期を網羅している．今回認められた変化が長期間の投与に起因している可能性がある一方で，エンシトレルビルフマル酸の用法用量は 5 日間と短いことから，より短期間投与での影響を確認する目的で, 器官形成期を 4 分割した時の影響を追加評価した．さらに，ウサギ胎児の軸骨格の形態異常は母動物の貧血に起因するという報告があり [26]、母動物の毒性と胎児の軸骨格形態異常の関連を詳細に調べる目的で，追加試験では母動物の評価項目として血液学的検査及び血液化学的検査を行った.

妊娠ウサギの 2 週間反復経口投与試験及び 3 又は 4 日間反復投与試験ともに，エンシトレルビルフマル酸投与による体重減少や摂餌抑制が認められ，その影響は短期投与時の方が軽度であった．ウサギの胚・胎児発生に関する試験で認められた軸骨格の形態異常と同様の変化が，3 又は 4 日間反復投与時にも認められた．軸骨格の形態異常は器官形成期の初期から中期 (妊娠 6～15 日) の投与時に認められ，その発現頻度は器官形成期の初期 (妊娠 6～9 日) で明らかに高かった．一方，器官形成期の後期 (妊娠 16～19 日) の投与時には，エンシトレルビルフマル酸投与に起因した骨格異常は認められなかった．妊娠ウサギの 2 週間反復経口投与試験では，妊娠 19 日目に 100 及び 300 mg/kg/日投与群で赤血球系パラメータの減少が認められた．一方，3 又は 4 日間反復投与時には上述した赤血球系パラメータへの影響は認められなかった．以上より, エンシトレルビルフマル酸の胎児骨格発生への影響は短期間の投与によっても認められ，器官形成期の初期段階で顕著であると考えられた．また，赤血球系パラメータに変化がない短期間投与条件においても軸骨格の形態異常が認められたことから，本変化の母体毒性との関連は明らかにならなかった.

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では，1000 mg/kg/日投与群の母動物で，体重の増加抑制及び低値傾向，摂餌抑制，並びに哺育初期に 5/20 例における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，哺育期間を通じた体重の低値，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一般毒性及び生殖機能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．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 2.6.6.9-4).

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 2.6.6.9-3　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胸骨分節の骨化数減少，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)，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 2.6.6.9-4　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.

2.6.6.9.6　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.

- 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．コレステロールの生体内における輸送経路 (図 2.6.6.8-1) に示す通り，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 [7～11].

  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 及び CM) を詳細に分画し，各画分中の脂質解析を行った結果，HDL コレステロール減少の初発変動は中型 HDL のコレステロール減少であった．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 [27]．また in vitro 試験結果から，エンシトレルビルが HDL の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．また，糞中及び胆汁中へのコレステロール排泄に影響を及ぼすか確認する目的で，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．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 (T1211 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 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 画分のトリグリセリドと交換される [28]．エンシトレルビルフマル酸の投与により中型 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 のコレステロールと 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/日以上の用量から HDL 及び LDL コレステロールの減少が認められた．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，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考えられる．

2.6.6.10 図表

図表は本文中の適切な場所に記載した．

2.6.6.11 参考文献

1. Koch-Weser J, Sellers EM. Binding of drugs to serum albumin (first of two parts). New Engl J Med 1976;294:311-6.
2. Goto M, Zeller WP, Lichtenberg RC. Decreased gluconeogenesis and increased glucose disposal without hyperinsulinemia in 10-day-old rats with endotoxic shock. Metabolism 1994;43:1248-54.
3. Lang CH, Dobrescu C. Sepsis-induced increases in glucose uptake by macrophage-rich tissues persist during hypoglycemia. Metabolism 1991;40:585-93.
4. Deutschman CS, Andrejko KM, Haber BA, et al. Sepsis-induced depression of rat glucose-6-phosphatase gene expression and activity. Am J Physiol 1997;273:R1709-18.
5. Gliatto, JM, Bronson, RT. Fatal fasting syndrome of obese macaques. In: Jones TC, Mohr U, Hunt RD, editors, Nonhuman Primates. Springer-Verlag; 1993, p.198-202.
6. Donnelly TM. Diagnosis: fatal fasting syndrome of obese macaques. Lab Anim 2003;32:24-5.
7. Ouimet M, Barrett TJ, Fisher EA. HDL and reverse cholesterol transport. Circ Res 2019;124:1505-18.

8. Glomset JA. The Plasma Lecithin:cholesterol Acyltransferase Reaction. J Lipid Res 1968;9(2):155-67.
9. 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.
10. 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.
11. 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.
12. Tobar HE, Cataldo LR, González T et al. Identification and functional analysis of missense mutations in the lecithin cholesterol acyltransferase gene in a chilean patient with hypoalphalipoproteinemia. Lipids Health Dis 2019;18:132.
13. Soro-Paavonen A, Naukkarinen J, Lee-Rueckert M et al. Common ABCA1 variants, HDL levels, and cellular cholesterol efflux in subjects with familial low HDL. J Lipid Res 2007;48(6):1409-16.
14. Nagao K, Maeda M, Manucat NB, Ueda K. Cyclosporine A and PSC833 inhibit ABCA1 function via direct binding. Biochim Biophys Acta 2013;1831:398-406.
15. 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.
16. 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.
17. Heaslip RJ, Evans DY Emetic, central nervous system and pulmonary activities of rolipram in the dog. Eur J Pharmacol 1995;286:281-90.
18. 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.
19. 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;41:950-8.
20. 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.
21. 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.
22. Keppler D. The Roles of MRP2, MRP3, OATP1B1, and OATP1B3 in conjugated hyperbilirubinemia. Drug Metab Dispos 2014;42:561-5.
23. Wickramaratne GAS. The post-natal fate of supernumerary ribs in rat teratogenicity studies. Appl Toxicol 1988;8(2):91-4.
24. Chernoff N, Rogers JM, Turner CI, Francis BM. Significance of supernumerary ribs in rodent developmental toxicity studies: postnatal persistence in rats and mice. Fund Appl Toxicol 1991;17:448-53.

25. Matsuzawa T, Nakata M, Goto I, Tsushima M. Dietary deprivation induces fetal loss and abortion in rabbits. Toxicology 1981;22:255-9.
26. Clark RL, Robertson RT, Minsker DH et al. Diflunisal-induced maternal anemia as a cause of teratogenicity in rabbits. Teratology 1984;30(3):319-32.
27. 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.
28. 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.