ゾフルーザ顆粒 2%分包

第 2 部 (モジュール 2) : CTD の概要 (サマリー)

2.6 非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.2 薬理試験の概要文

塩野義製薬株式会社

目次

略号及び用語定義一覧表 4
2.6.2 薬理試験の概要文 5
2.6.2.1 まとめ 5
2.6.2.2 効力を裏付ける試験 6
2.6.2.2.1 PA/I38 変異ウイルスの増殖性 6
2.6.2.2.1.1 PA/I38 変異ウイルスの野生型ウイルス共存下における競合増殖性 6
2.6.2.2.1.2 臨床で分離された PA/I38 変異ウイルスの増殖性 8
2.6.2.2.1.3 臨床で分離された PA/I38 変異ウイルスの野生型ウイルス共存下における競合増殖性 12
2.6.2.2.2 PA/I201T が PA/I38 変異ウイルスの増殖性に与える影響 13
2.6.2.2.3 臨床試験で認められたポリメラーゼタンパク上の変異のバロキサビル マルボキシルに対する感受性評価 16
2.6.2.3 副次的薬理試験 17
2.6.2.4 安全性薬理試験 17
2.6.2.5 薬力学的薬物相互作用 17
2.6.2.6 考察及び結論 17
2.6.2.6.1 PA/I38 変異ウイルスの野生型ウイルス共存下における競合増殖性 17
2.6.2.6.2 PA/I201T が PA/I38 変異ウイルスの増殖性に与える影響 18
2.6.2.6.3 B 型インフルエンザウイルスの PA/T20K が薬剤感受性に与える影響 18
2.6.2.7 図表 18
2.6.2.8 参考文献 18

表

表 2.6.2.2-1 ヒト由来初代培養細胞における継代培養ごとの PA/I38T の存在比率 (%) 12

図

図 2.6.2.2-1 PA/I38 変異ウイルスの野生型ウイルス共存下における競合増殖性 7
図 2.6.2.2-2 ヒト鼻腔上皮由来の初代培養細胞における培養上清中のウイルス力価の推移 10
図 2.6.2.2-3 PA/I201T ウイルス，PA/I201T を導入した PA/I38T ウイルス，PA/I38T ウイルス及び野生型ウイルスの培養細胞上清中のウイルス力価の推移 14
図 2.6.2.2-4 PA/I201T ウイルス，PA/I201T を導入した PA/I38M ウイルス，PA/I38M ウイ

ルス及び野生型ウイルスの培養細胞上清中のウイルス力価の推移 15

略号及び用語定義一覧表

略号	英語	日本語
CEN	cap-dependent endonuclease	キャップ依存性エンドヌクレアーゼ
EC_{50}	50% effective concentration	50%有効濃度
PA	polymerase acidic protein	ポリメラーゼ酸性タンパク質
PA/I201T	isoleucine-to-threonine substitution at amino acid position 201 in polymerase acidic protein	PA の N 末端から 201 番目に位置するイソロイシンがスレオニンに変異
PA/I38	isoleucine at amino acid position 38 in polymerase acidic protein	PA の N 末端から 38 番目に位置するイソロイシン
PA/I38F	isoleucine-to-phenylalanine substitution at amino acid position 38 in polymerase acidic protein	PA の N 末端から 38 番目に位置するイソロイシンがフェニルアラニンに変異
PA/I38M	isoleucine-to-methionine substitution at amino acid position 38 in polymerase acidic protein	PA の N 末端から 38 番目に位置するイソロイシンがメチオニンに変異
PA/I38T	isoleucine-to-threonine substitution at amino acid position 38 in polymerase acidic protein	PA の N 末端から 38 番目に位置するイソロイシンがスレオニンに変異
PA/T20K	threonine-to-lysine substitution at amino acid position 20 in polymerase acidic protein	PA の N 末端から 20 番目に位置するスレオニンがリシンに変異
S-033447	active form of baloxavir marboxil	バロキサビル マルボキシル活性体
$TCID_{50}$	50% tissue culture infectious dose	50%組織培養感染量

2.6.2　薬理試験の概要文

2.6.2.1　まとめ

バロキサビル マルボキシルは，塩野義製薬株式会社で創製され，他の既承認薬と異なる新規作用機序を有する抗インフルエンザウイルス薬である．バロキサビル マルボキシルはプロドラッグであり，体内で代謝 (加水分解) されてバロキサビル マルボキシル活性体 (以下，S-033447) に変換される．この S-033447 が，インフルエンザウイルスに特異的な酵素であるキャップ依存性エンドヌクレアーゼ (cap-dependent endonuclease [CEN]) の活性を選択的に阻害し，ウイルスの転写反応を妨げることで，インフルエンザウイルスの増殖を抑制する．インフルエンザウイルスのポリメラーゼ酸性タンパク質 (PA) が有する CEN 活性中心において，S-033447 と直接的に相互作用する可能性が高いアミノ酸残基の 1 つとして，PA の N 末端から 38 番目に位置するイソロイシン (PA/I38) が考えられている．アミノ酸コドンの変異によって，PA の N 末端から 38 番目に位置するイソロイシンがスレオニンに変異 (PA/I38T) 又はメチオニンに変異 (PA/I38M) したインフルエンザウイルスは，S-033447 に対する感受性の低下を示すが，それらの増殖性は野生型ウイルスに比べ低かった [1.13 項 既承認医薬品に係る資料 (初回申請)，2.7.2.4.2 項，2.7.2.4.2.2 項参照].

薬剤感受性低下ウイルスがその野生型ウイルスとの共存下で野生型ウイルスと同等又はそれ以上の増殖性を示す場合，実臨床において薬剤感受性低下ウイルスが流行する可能性が考えられることから，PA/I38 変異を有する遺伝子組換えウイルス及び臨床分離株を用いて，野生型ウイルス共存下における PA/I38 変異ウイルスの競合増殖性を検討した．遺伝子組換えウイルスを用いた検討では，野生型ウイルスと PA/I38 変異ウイルスを 1:1 の混合比で MDCK 細胞 (イヌ腎臓由来株化細胞) に感染させ，48 時間後に回収した培養上清を新たに調製した MDCK 細胞に感染させる操作を 3 回繰り返し，継代ごとの培養上清に含まれる野生型ウイルスと PA/I38 変異ウイルスの存在比をサンガーシークエンス法により定性的に評価した．その結果，PA/I38 変異ウイルスの存在比は，継代培養回数に従って低下することが確認された．臨床分離株を用いた検討では，第 2 相臨床試験 (T0821 試験) で A/H1N1pdm09 型の PA/I38T ウイルスが検出された 2 患者，第 3 相臨床試験 (T0831 試験) で A/H3N2 型の PA/I38T ウイルスが検出された 3患者，及び B 型の PA/I38T ウイルスが検出された 1 患者について，バロキサビル マルボキシル投与前検体から分離した野生型ウイルス又は投与後検体から分離した PA/I38T ウイルスを，それぞれヒト鼻腔上皮由来の初代培養細胞に感染させ，経時的に培養上清を回収してウイルス力価を測定した．その結果，A/H1N1pdm09 型及び B 型患者由来の PA/I38T ウイルスについては有意な増殖性の低下を示し，A/H3N2 型については，1 患者由来の PA/I38T ウイルスは増殖性の低下を示したが，残り 2 患者由来の PA/I38T ウイルスは野生型ウイルスと同等の増殖性を示した．さらに，これら患者由来の野生型ウイルスと PA/I38T ウイルスを 1:1 又は 2:8 の混合比でヒト鼻腔上皮由来の初代培養細胞に感染させ，48 時間後に回収した培養上清を新たに調製した同細胞に感染させる操作を 3 回繰り返し，継代ごとの培養上清に含まれる野生型ウイルスと PA/I38T ウイルスの存在比率を次世代シークエンス法により定量的に解析した．その結果，いずれの条件下においても，PA/I38T ウイルスの存在比率は，継代培養回数に従って低下し，野生型ウイルスの割合が増加することが確認された．

薬剤感受性低下ウイルスの増殖性低下を相補する変異は，薬剤感受性低下ウイルス流行の懸念を高めるため，第 3 相試験でバロキサビル マルボキシル投与後に PA/I38 変異と同時に検出された PA の N 末端から 201 番目に位置するイソロイシンがスレオニンに変異 (PA/I201T) が PA/I38T ウイルス又は PA/I38M ウイルスの増殖性に与える影響を検討した．これらの変異を有する遺伝子組換えインフルエンザウイルスを作製し，MDCK 細胞又は RPMI2650 細胞 (ヒト鼻扁平上皮癌由来細胞) に感染させ，経時的に培養上清を回収してウイルス力価を測定し，その増殖性を比較した結果，本試験条件下で評価した PA/I201T は，PA/I38 変異ウイルスの増殖性に影響を与える変異ではないと考えられた．

海外で実施された小児第 3 相臨床試験 (CP40559 試験)(miniSTONE-1) では，B 型インフルエンザウイルス感染患者に対してバロキサビル マルボキシル投与後に PA の N 末端から 20 番目に位置するスレオニンがリシンに変異 (PA/T20K) が検出された．この新たな変異が薬剤感受性に与える影響を検討するため，PA/T20K を有する遺伝子組換え B 型インフルエンザウイルスを作製し，MDCK 細胞に感染させ，その薬剤感受性の変化を検討した結果，6.88 倍の薬剤感受性低下を示した．以上の結果から，PA/T20K は，B 型インフルエンザウイルスの S-033447 に対する感受性を低下させる新たなアミノ酸変異であると考えられた．

2.6.2.2　効力を裏付ける試験

2.6.2.2.1　PA/I38 変異ウイルスの増殖性

2016/2017 シーズンに実施した小児患者対象の錠剤第 3 相臨床試験 (T0822 試験) で認められた A/H3N2 型の PA/I38T ウイルスや PA/I38M ウイルスの S-033447 に対する感受性及びそれら変異ウイルスの増殖性を，リバースジェネティクス法により作製した遺伝子組換えウイルスを用いて検討した．その結果，PA/I38T ウイルスや PA/I38M ウイルスの S-033447 に対する感受性は，それらの野生型ウイルス (rgA/Victoria/3/75) と比較して低下した．また，A/H3N2 型の PA/I38T ウイルスや PA/I38M ウイルスの増殖性は，それらの野生型ウイルスと比較して低下した [1.13 項 既承認医薬品に係る資料 (初回申請)，2.7.2.4.2.2 項参照].

薬剤感受性低下ウイルスがその野生型ウイルスとの共存下で野生型ウイルスと同等又はそれ以上の増殖性を示す場合，実臨床において薬剤感受性低下ウイルスが流行する可能性が考えられることから，野生型ウイルス存在下における PA/I38 変異ウイルスの競合増殖性を評価するため，in vitro で遺伝子組換えウイルス及び臨床分離株を用いて検討した．

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

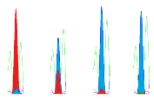
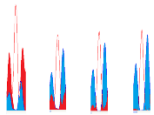
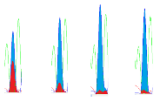
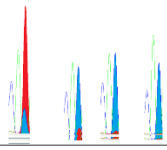
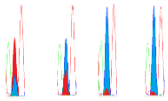
参考資料 4.2.1.1-01
概要表 2.6.3.2.1

PA/I38 変異ウイルスを野生型ウイルスと共存させることで，PA/I38 変異ウイルスの存在比がどのように推移するかについて，継代培養ごとに確認し，野生型ウイルス共存下における PA/I38 変異ウイルスの増殖性を比較した．リバースジェネティクス法により，PA/I38T を有する遺伝子組換えウイルス (rgA/WSN/33-PA/I38T [A/H1N1 型]，rgA/Victoria/3/75-PA/I38T [A/H3N2 型] 及び rgB/Maryland/1/59-PA/I38T [B 型])，PA の N 末端から 38 番目に位置するイ

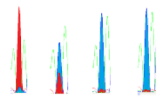
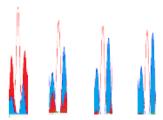
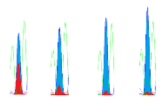
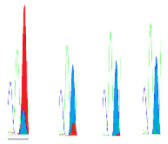
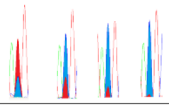
ソロイシンがフェニルアラニンに変異 (PA/I38F) を有する遺伝子組換えウイルス (rgA/WSN/33-PA/I38F [A/H1N1 型]) 及び PA/I38M を有する遺伝子組換えウイルス (rgA/Victoria/3/75-PA/I38M [A/H3N2 型]) をそれぞれ作製した．これら変異ウイルス株と対応する野生型ウイルスをそれらの感染力価を指標に 1:1 で混合し，MDCK 細胞に感染させ，48 時間後に回収した培養上清を，新たに調製した MDCK 細胞に感染させる継代培養を 3 回繰り返した．継代ごとの培養上清に含まれる野生型ウイルスと PA/I38 変異ウイルスの存在比を，サンガーシークエンス法で PA/I38 コドンを含む塩基配列を解析することにより，定性的に評価した．その結果，今回評価したいずれの PA/I38 変異ウイルスにおいても，継代培養回数に従ってその存在比が低下し，野生型ウイルスが優勢となった (図 2.6.2.2-1).

図 2.6.2.2-1　PA/I38 変異ウイルスの野生型ウイルス共存下における競合増殖性

(A) Lineage 1

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

(B) Lineage 2

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

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

2.6.2.2.1.2　臨床で分離された PA/I38 変異ウイルスの増殖性

参考資料 4.2.1.1-02, 4.2.1.1-03
概要表 2.6.3.2.2, 2.6.3.2.3

青少年及び成人患者対象第 2 相臨床試験 (以下，T0821 試験) において，A/H1N1pdm09 型の PA/I38T ウイルスが検出された 2 患者，第 3 相臨床試験 (以下，T0831 試験) において，A/H3N2 型の PA/I38T ウイルスが検出された 3 患者及び B 型の PA/I38T ウイルスが検出された 1 患者のバロキサビル マルボキシル投与前検体から分離した野生型ウイルス及び投与後検体から分離した PA/I38T ウイルスを用いて，それぞれのウイルスの増殖性を比較した．なお，これら A/H1N1pdm09 型 2 患者及び A/H3N2 型 3 患者からバロキサビル マルボキシル投与後に分離した PA/I38T ウイルスのプラーク数を 50%抑制するために必要な S-033447 の 50%有効濃度 (EC_{50}) は 36～63 ng/mL であり，投与前に分離した野生型ウイルスの EC_{50} (0.31～0.69 ng/mL) と比較して，S-033447 に対する感受性は低下していた [1].

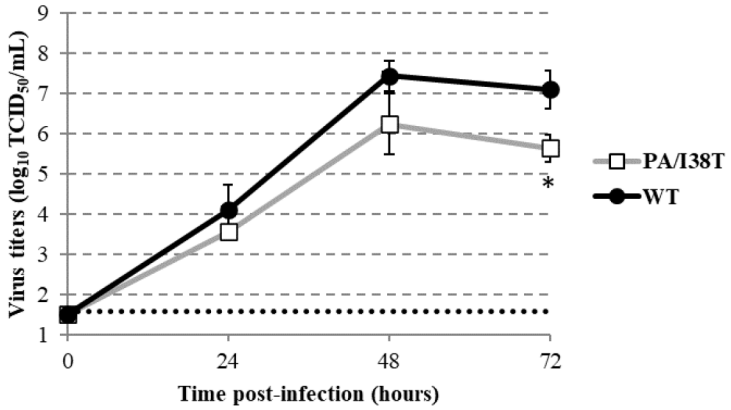
バロキサビル マルボキシル投与前検体から分離した野生型ウイルス又は投与後検体から分離した PA/I38T ウイルスを，それぞれヒト鼻腔上皮由来の初代培養細胞に感染させ，感染後 24～72 時間まで培養上清を回収してウイルス力価を測定した．その結果，A/H1N1pdm09 型及び B 型患者由来の PA/I38T ウイルスは，その野生型ウイルスと比較して増殖性が有意に低下していた．一方，A/H3N2 型患者由来の PA/I38T ウイルスについては，1 患者 (Subject No. : [redacted]) 由来の PA/I38T ウイルスは，ウイルス増殖初期である感染 24 時間後のウイルス力価

の平均値が，その野生型ウイルスと比較して 1 log_{10} $TCID_{50}$ 以上低く，増殖性の低下を示したが，その他の 2 患者 (Subject No. : [redacted] 及び [redacted]) 由来の PA/I38T ウイルスは，それぞれの野生型のウイルス力価と同等であり，野生型ウイルスと同等の増殖性を示した (図 2.6.2.2-2).

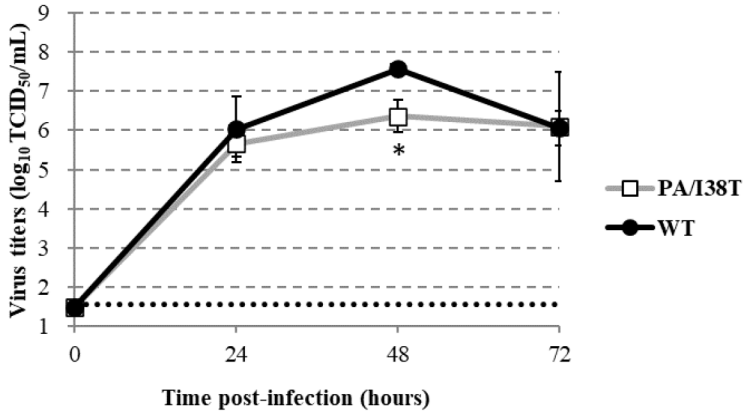
図 2.6.2.2-2　ヒト鼻腔上皮由来の初代培養細胞における培養上清中のウイルス力価の推移

1.　A/H1N1pdm09

(A) Subject No.: [redacted]

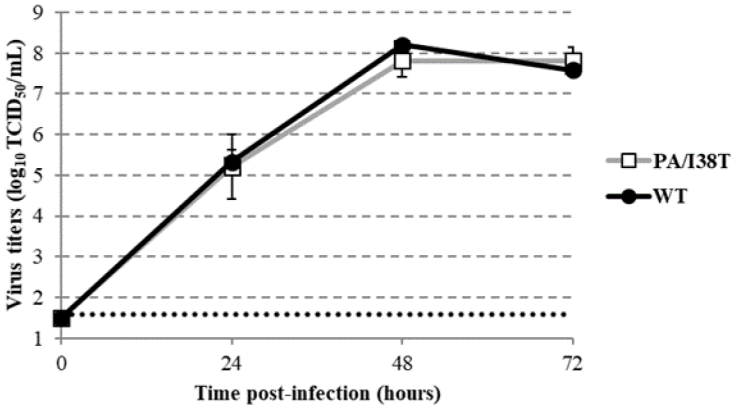


(B) Subject No.: [redacted]

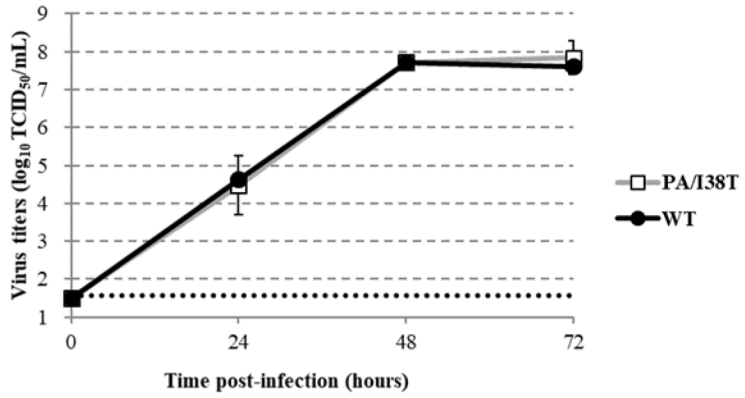


2.　A/H3N2

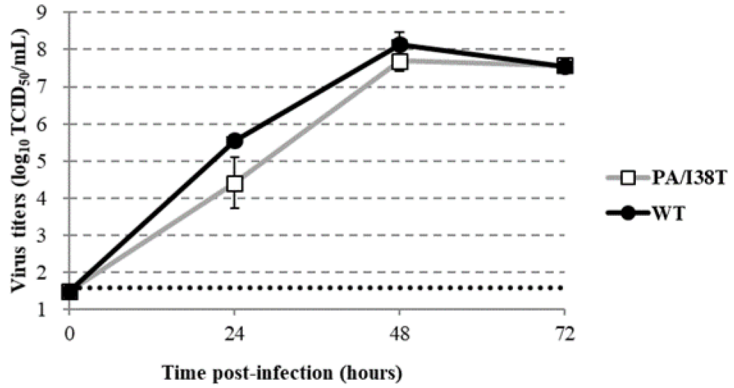
(A) Subject No.: [redacted]



(B) Subject No.: [redacted]

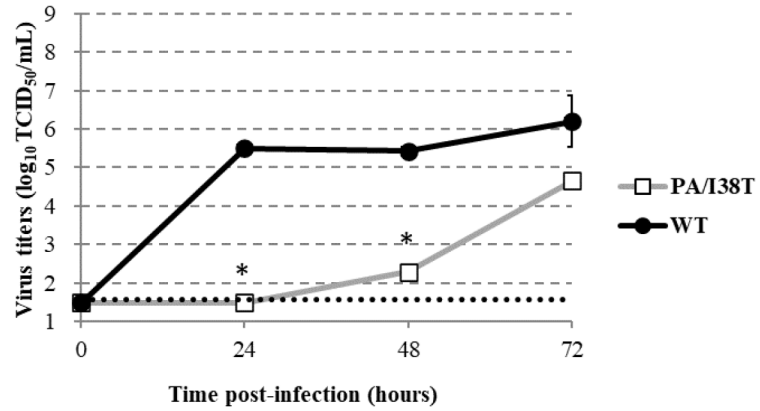


(C) Subject No.: [redacted]



3. Type-B

(A) Subject No.: [redacted]



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

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

参考資料 4.2.1.1-04, 4.2.1.1-05
概要表 2.6.3.2.4, 2.6.3.2.5

前項で増殖性を確認した A/H1N1pdm09 型 2 患者，A/H3N2 型 3 患者，B 型 1 患者由来の野生型ウイルスと PA/I38T ウイルスを用いて，それらの感染力価を指標に 1:1 又は 2:8 で混合し，ヒト鼻腔上皮由来の初代培養細胞に共感染させ，48 時間後に回収した上清を再度細胞に感染させる操作を 3 回繰り返し継代培養した．継代ごとの培養上清に含まれる野生型ウイルスと PA/I38 変異ウイルスの存在比率を，次世代シークエンス法で PA/I38 コドンを含む塩基配列を解析することにより，定量的に評価した．その結果，いずれの条件下，いずれの PA/I38T ウイルスにおいても，複数回の継代培養に従ってその存在比率が低下し，野生型ウイルスの割合が増加した (表 2.6.2.2-1 参照).

表 2.6.2.2-1　ヒト由来初代培養細胞における継代培養ごとの PA/I38T の存在比率 (%)

Type/Subtype	Subject ID	Initial ratio (WT: I38T)	Proportion of I38T (%)	Passage 0		Passage 1		Passage 2		Passage 3	
A(H1N1)pdm09	[redacted]	1:1	Mean	97.0		43.3		21.2		8.2	
			Each	96.9	97.0	66.3	20.3	35.3	7.2	13.5	3.0
		2:8	Mean	98.8		68.1		53.8		42.0	
			Each	98.8	98.8	97.0	39.3	94.0	13.6	84.0	-
	[redacted]	1:1	Mean	98.3		78.2		44.8		23.8	
			Each	98.4	98.3	86.2	70.3	54.7	34.8	41.1	6.5
		2:8	Mean	99.3		97.2		83.0		78.8	
			Each	99.3	99.3	95.3	99.0	81.6	84.4*	74.1	83.4*
A(H3N2)	[redacted]	1:1	Mean	40.6		56.2		25.5		1.6	
			Each	40.58	40.64	48.68	63.80	26.10	24.86	3.26	-
		2:8	Mean	88.4		75.0		63.2		51.4	
			Each	88.2	88.7	66.4	83.6	46.3	80.0	28.7	74.2
	[redacted]	1:1	Mean	45.1		11.5		6.1		0.8	
			Each	44.75	45.40	1.22	21.82	-	12.15	-	1.59
		2:8	Mean	76.5		44.4		31.1		21.4	
			Each	75.9	77.0	33.6	55.2	18.4	43.8	11.3	31.4
	[redacted]	1:1	Mean	35.9		18.6		15.6		1.4	
			Each	32.54	39.31	26.48	10.76	26.95	4.31	2.76	-
Type-B	[redacted]	1:1	Mean	87.5		76.6		62.2		45.3	
			Each	87.0	87.9	74.1	79.1	59.4	64.9	43.2	47.5
		2:8	Mean	96.4		93.3		87.3		78.4	
			Each	96.6	96.1	93.9	92.7	88.3	86.3	82.9	73.8

P = Passage
Mean of duplicate (2 lineages) and each value of each lineage was described.
The lower limit of quantification (LLOQ) for the proportion of PA/I38T was 1% and " - " indicated less than 1%.
The mean values were calculated with samples below LLOQ set to "0".
MucilAir human nasal epithelial cells were coinfected with clinically isolated wild type and PA/I38-substituted viruses at a ratio of 1 to 1 or 2 to 8 based on viral titers (P0). The culture supernatant was collected at 48 hours post infection, and fresh MucilAir human nasal epithelial cells were infected with the collected viruses, followed by repeating passages of the viruses in cell culture three times (P1 to P3).

* In addition to I38T, a small population of I38A virus was transiently observed at 7.7% at P2 and 3.0% at P3 in this lineage.

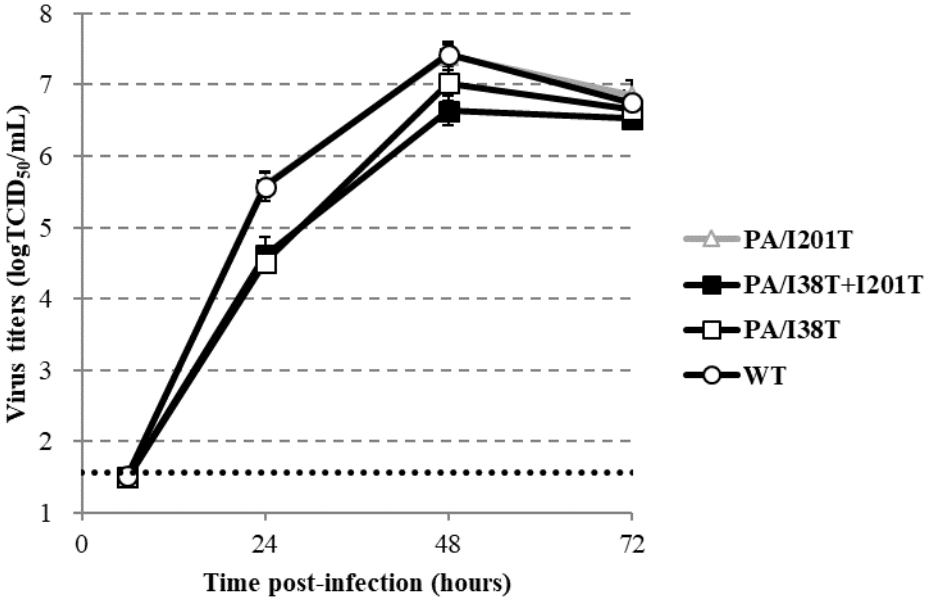
2.6.2.2.2　PA/I201T が PA/I38 変異ウイルスの増殖性に与える影響

参考資料 4.2.1.1-06
概要表 2.6.3.2.6

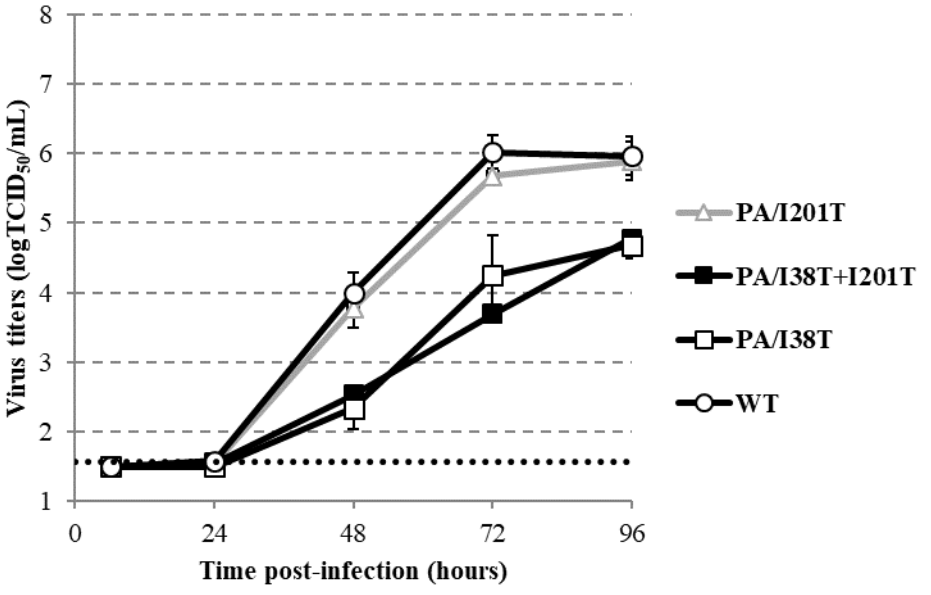
T0831 試験及び小児患者対象の顆粒剤第 3 相臨床試験 (以下，T0833 試験) の A/H3N2 型感染患者において，バロキサビル マルボキシル投与後に PA/I201T が PA/I38 変異と同時に検出されたことから，PA/I201T が PA/I38T ウイルス又は PA/I38M ウイルスの増殖性に与える影響を検討した．リバースジェネティクス法により，A/H3N2 型の rgA/Victoria/3/75 ウイルスに，PA/I38T，PA/I38M 又は PA/I201T，並びに PA/I38T と PA/I201T 又は PA/I38M と PA/I201T を導入した遺伝子組換えウイルスを作製し，MDCK 細胞又は RPMI2650 細胞に感染させ，それぞれの感染後 6 ～ 72 時間又は 96 時間までウイルス力価を測定した．その結果，MDCK 細胞及び RPMI2650 細胞培養上清中の PA/I38T ウイルス又は PA/I38M ウイルスの力価は，野生型ウイルスの力価に比べて低下傾向を示したが，PA/I201T ウイルスの力価は，野生型ウイルスの力価とほぼ同等であった (図 2.6.2.2-3 及び図 2.6.2.2-4). また, PA/I201T を導入した PA/I38T ウイルス又は PA/I38M ウイルスの力価は，PA/I201T を導入していない PA/I38 変異のみを有するウイルスの力価とほぼ同等であった．以上の結果から，本試験条件下で評価した PA/I201T は，PA/I38 変異ウイルスの増殖性に影響を与える変異ではないと考えられた．

図 2.6.2.2-3　PA/I201T ウイルス，PA/I201T を導入した PA/I38T ウイルス，PA/I38T ウイルス及び野生型ウイルスの培養細胞上清中のウイルス力価の推移

(A) MDCK cells



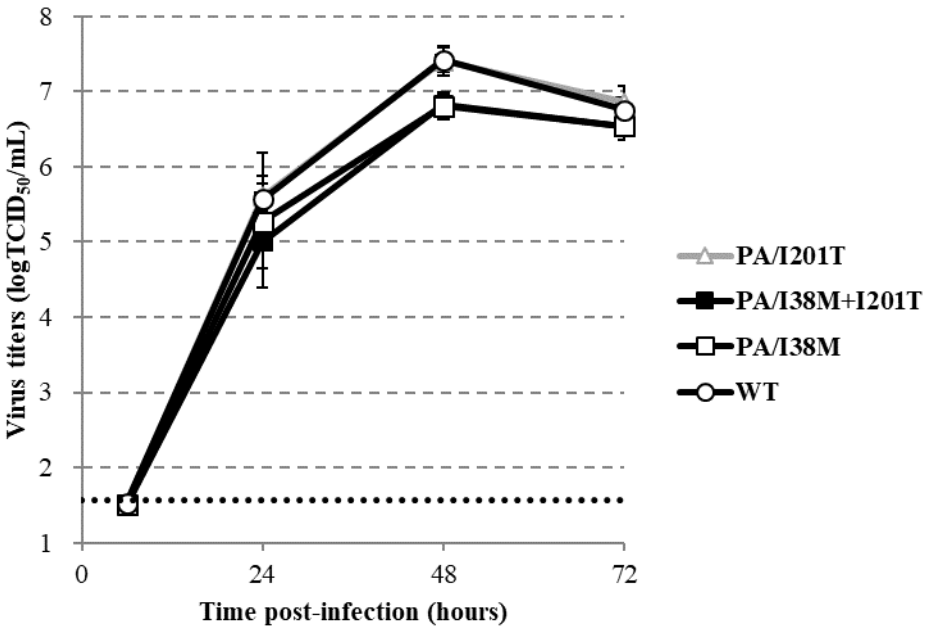
(B) RPMI2650 cells



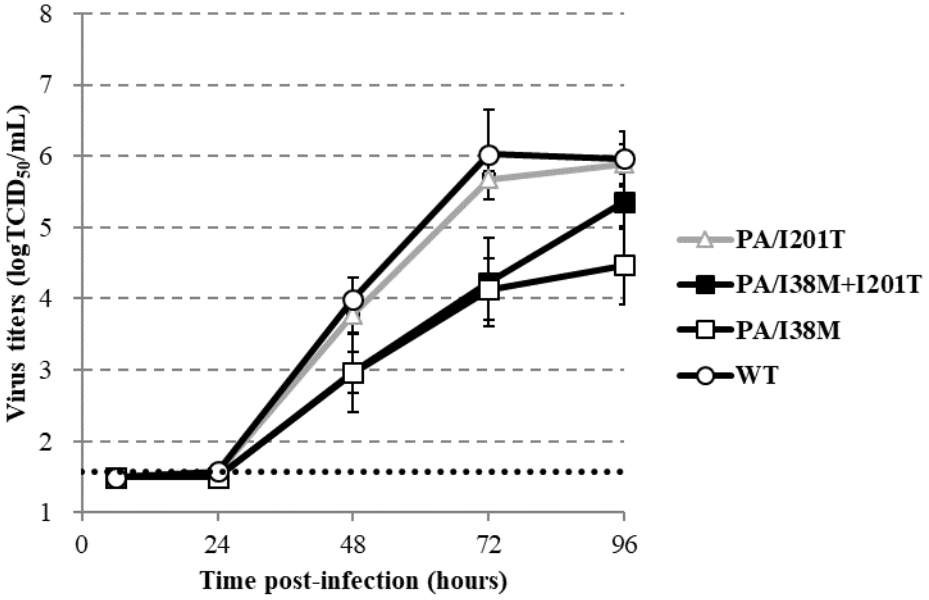
WT = wild type
Each symbol represents the mean and standard deviation of triplicate experiments.
The lower limit of quantification of the virus titers was 1.57 $\log_{10}$ $TCID_{50}$/mL and indicated by a dashed line, and undetectable virus titers were defined as 1.50 $\log_{10}$ $TCID_{50}$/mL.

図 2.6.2.2-4　PA/I201T ウイルス，PA/I201T を導入した PA/I38M ウイルス，PA/I38M ウイルス及び野生型ウイルスの培養細胞上清中のウイルス力価の推移

(A) MDCK cells



(B) RPMI2650 cells



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

2.6.2.2.3　臨床試験で認められたポリメラーゼタンパク上の変異のバロキサビル マルボキシルに対する感受性評価

参考資料 4.2.1.1-07
概要表 2.6.3.2.7

小児患者対象の顆粒剤海外第 3 相臨床試験 (CP40559 試験)(miniSTONE-1) で認められた B 型インフルエンザウイルスの PA/T20K が，B 型インフルエンザウイルスの S-033447 に対する感受性に及ぼす影響を検討するため，リバースジェネティクス法により PA/T20K を有する遺伝子組換えウイルス (rgB/Washington/02/2019-PA/T20K) を作製し，[redacted]の ViraDot アッセイにて薬剤感受性の変化を測定した．ウイルスを MDCK 細胞に感染させ，種々の濃度の化合物 (S-033447 又はファビピラビル) 存在下で 20～24 時間培養し，ウイルス由来核タンパク質を発現する感染細胞数を測定した．化合物非存在下の条件に比べ，ウイルス由来核タンパク質発現感染細胞数を 50%抑制するために必要な S-033447 及びファビピラビルの濃度を EC_{50} として算出し，それらの野生型インフルエンザウイルスと比較した．rgB/Washington/02/2019-PA/T20K に対する S-033447 の EC_{50} は 23.92 nmol/L であり，野生型に比べて 6.88 倍の薬剤感受性低下を示した．一方， rgB/Washington/02/2019-PA/T20K のファビピラビルに対する薬剤感受性は，野生株とほぼ同等であった．

以上の結果から，PA/T20K は，B 型インフルエンザウイルスの S-033447 に対する感受性を低下させるアミノ酸変異であると考えられた．

2.6.2.3　副次的薬理試験

本申請に際して新たな試験は実施していない.

2.6.2.4　安全性薬理試験

本申請に際して新たな試験は実施していない.

2.6.2.5　薬力学的薬物相互作用

本申請に際して新たな試験は実施していない.

2.6.2.6　考察及び結論

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

アミノ酸変異により薬剤感受性が低下したインフルエンザウイルスが流行する可能性を推察する非臨床研究として，その変異ウイルスと野生型ウイルスを培養細胞に共感染させ，ウイルス増殖に伴う変異ウイルスの存在比率の推移をモニターする方法が知られている [2]．例えば，ウイルス増殖に伴って変異ウイルスの存在比率が顕著に低下すれば，その変異ウイルスが広く流行する可能性は低いことが推察される．今回，PA/I38T を有する臨床分離株を，その野生型ウイルスと混合し，ヒト由来細胞に感染させて，複数回の継代培養後に変異ウイルスと野生型ウイルスの存在比率を評価した．その結果，PA/I38T 変異ウイルスの存在比率は，継代培養に従って徐々に低下し，野生型ウイルスの割合の増加が確認された．この傾向は，単一感染条件で示す増殖性がその野生型と同等である PA/I38T ウイルスにおいても同様であり，複数回の継代培養で継代ごとに野生型ウイルスの割合が増加した．このように，今回試験した PA/I38 変異ウイルスのそれぞれに対応する野生型ウイルスとの競合増殖性は，低いことが明らかとなった．また，米国 Centers for Disease Control and Prevention の報告でも，PA/I38 変異ウイルスは，培養細胞やフェレットモデルにおいて増殖性又は競合増殖性が劣ることが確認されており [3]，2018/19 シーズンに実施されたバロキサビル マルボキシルの予防投与試験 (T0834 試験) においても，プラセボ投与群で PA/I38 変異ウイルスの伝播は認められなかった．一方で，国立感染症研究所，東京大学医科学研究所及びカナダケベック大学の非臨床研究によれば，PA/I38 変異ウイルスは培養細胞において野生型と同等の増殖性を示すこと，マウスやモルモットを用いた動物モデルにおいて野生型と同等の増殖性や病原性を示すこと，フェレットにおいては，飛沫を介して PA/I38 変異ウイルスが伝播することも確認されている [4, 5, 6, 7]．しかしながら，低感受性ウイルスを有する患者において，国内臨床試験及び特定使用成績調査の結果から，明らかな症状の再燃や遷延も確認されておらず，現時点では散発的な報告として，低感受性ウイルスがヒトからヒトへ伝播した可能性が示唆されているが [8]，低感受性ウイルスが野生型ウイルスの増殖性を上回るという報告はなく，広範なヒトからヒトへの伝播は確認されていない．ただし，流行するインフルエンザウイルスの特性はシーズンにより異なるため，今後も引き続き PA/I38 アミノ酸変異の出現動向を注意深くモニターする必要があると考えられる．

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

変異ウイルスの増殖性に関する特性に変化を及ぼすアミノ酸変異は相補変異と呼ばれ，この変異がウイルスに導入されると，そのウイルスは野生型と同等もしくはそれ以上の増殖性を有することが報告されている [9, 10]．これまで，リバースジェネティクス法により作製した遺伝子組換えウイルスを用いた検討により，A/H3N2 型の PA/I38T ウイルス及び PA/I38M ウイルスの増殖性は，それらの野生型ウイルスと比較して低下することを確認している [1.13 項 既承認医薬品に係る資料 (初回申請), 2.7.2.4.2.2 項参照]．今回，T0831 試験及び T0833 試験の A/H3N2 型感染患者において，バロキサビル マルボキシル投与後に PA/I201T が PA/I38 変異と同時に検出されたことから，PA/I201T が PA/I38T や PAI38M の相補変異であるか否か，遺伝子組換えウイルスを用いて検証した．その結果，A/H3N2 型の PA/I38T ウイルス又は PA/I38M ウイルスに PA/I201T を導入したウイルスの増殖性は，PA/I201T を導入していない PA/I38T ウイルス及び PA/I38M ウイルスの増殖性とほぼ同等であった. したがって, 本試験条件下で評価した PA/I201T は，ウイルスの増殖性を低下させる PA/I38 変異を相補し，PA/I38 変異ウイルスの増殖性に影響を与える変異ではないと考えられる.

2.6.2.6.3　B 型インフルエンザウイルスの PA/T20K が薬剤感受性に与える影響

S-033447 は PA タンパク質の N 末端にある CEN 活性中心に結合することで同酵素の活性を選択的に阻害し，ウイルスの転写反応を妨げることで，インフルエンザウイルスの増殖を抑制する. S-033447 と B 型インフルエンザウイルス PA タンパク質の共結晶構造において, S-033447 と PA/T20 は近接していることから[11], PA/T20 の変異が S-033447 の標的への結合性に影響し，薬剤感受性の減弱に繋がる可能性が考えられる．PA/T20K を有する遺伝子組換えウイルスを用いた試験結果から，B 型インフルエンザウイルスの PA/T20K は S-033447 に対する感受性の減弱につながると考えられる．インフルエンザウイルスのアミノ酸配列データベースにおいて，PA/T20K を有するウイルスは極めて稀であることから [12], 流行株において PA/T20K が本薬の有効性に懸念を及ぼす可能性は低いと考えられた.

2.6.2.7　図表

図表は，本文中の適切な場所に記載した.

2.6.2.8　参考文献

1. Uehara T, Hayden FG, Kawaguchi K, et al. Treatment-emergent influenza variant viruses with reduced baloxavir susceptibility: Impact on clinical and virologic outcomes in uncomplicated influenza. J Infect Dis Published online Jul 16, 2019.
2. Takashita E, Kiso M, Fujisaki S et al. Characterization of a large cluster of influenza A(H1N1)pdm09 viruses cross-resistant to oseltamivir and peramivir during the 2013-2014 influenza season in Japan. Antimicrob Agents Chemother 2015;59(5):2607-17.
3. Chesnokov A, Patel MC, Mishin VP, et al. Replicative fitness of seasonal influenza A viruses with decreased susceptibility to baloxavir. J Infect Dis Published online Sep 21, 2019.

4. Takashita E, Kawakami C, Ogawa R, et al. Influenza A (H3N2) virus exhibiting reduced susceptibility to baloxavir due to a polymerase acidic subunit I38T substitution detected from a hospitalised child without prior baloxavir treatment, Japan, January 2019. Euro Surveill 2019;24(12):9-12.
5. Takashita E, Ichikawa M, Morita H, et al. Human-to-human transmission of influenza A(H3N2) virus with reduced susceptibility to baloxavir, Japan, February 2019.
Emerg Infect Dis 2019;25(11):2108-11.
6. Imai M, Yamashita M, Sakai-Tagawa Y, et al. Influenza A variants with reduced susceptibility to baloxavir isolated from Japanese patients are fit and transmit through respiratory droplets.
Nat Microbiol 2020;5:27-33.
7. Checkmahomed L, M'hamdi Z, Carbonneau J, et al. Impact of the baloxavir-resistant polymerase acid I38T substitution on the fitness of contemporary influenza A(H1N1)pdm09 and A(H3N2) strains.
J Infect Dis 2020;221(1):63-70.
8. 国立感染症研究所．バロキサビル耐性変異ウイルスのヒトからヒトへの感染伝播．2019 年 10 月 11 日．https://id-info.jihs.go.jp/niid/ja/flu-m/flu-iasrs/9150-477p01.html．Accessed on 7 Apr 2025.
9. Goldhill DH, te Velthuis AJW, Fletcher RA, et al. The mechanism of resistance to favipiravir in influenza. Proc Natl Acad Sci USA 2018;115(45):11613-8.
10. Wu NC, Young AP, Dandekar S, et al. Systematic identification of H274Y compensatory mutations in influenza A virus neuraminidase by high-throughput screening. J Virol 2013;87(2):1193-9.
11. Omoto S, Speranzini V, Hashimoto T, et al. Characterization of influenza virus variants induced by treatment with the endonuclease inhibitor baloxavir marboxil.
Sci Rep 2018;25(8):9633.
12. Wildum S. Xofluza® (baloxavir marboxil) resistance update 2024-2. Regulatory document (Report No.1133295). F. Hoffmann-La Roche Ltd.; 2024.