

OP及びOCのHEK293細胞に発現した hERG チャンネル電流への影響に関する試験及びモルモット乳頭筋標本を用いた活動電位への影響に関する試験

47

背景及び目的



Roche ロシュグループ

- これまでに実施した試験では、プルキンエ線維試験の低頻度刺激下のみで、APD₅₀の軽度延長が認められたが、それ以外には、オセルタミビル (OP, RO0640796) 及び 活性代謝物 (OC, RO0640802) の心血管系への電気生理学的な影響は示されていない
- 広範囲のOP濃度を用いて、また、異なるin vitro活動電位試験系でのOP及びOCの作用を検討するため、hERG試験及びモルモット乳頭筋活動電位試験を実施した

48

方法- hERG試験

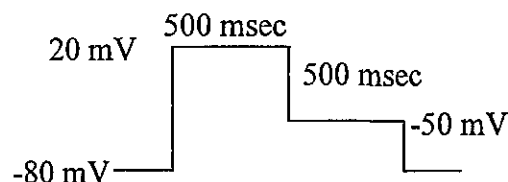


細胞: HEK293

刺激頻度: 15 秒毎 (合計40刺激)

試験パルス

- 保持電位: -80 mV
- 脱分極パルス: +20 mV (500 msec)
- 再分極パルス: -50 mV (500 msec)



灌流液温度: 37°C

測定指標: hERG テール電流のピーク

被験物質

- 対照: 0 μ M (5 細胞)
- OP: 10, 30, 100 μ M (5 細胞/各濃度)
- OC: 10, 30, 100 μ M (5 細胞/各濃度)
- E-4031(陽性対照): 100 nM (5 細胞)

49

結果 - hERG試験



OP及びOC のhERG テール電流に対する 阻害率 (%)

	Vehicle	10 μ M	30 μ M	100 μ M
OP	0.0 \pm 3.3	5.1 \pm 6.5	16.9 \pm 8.9**	37.5 \pm 4.7**
OC		2.4 \pm 8.1	1.7 \pm 5.1	5.7 \pm 6.3

Data are presented the mean \pm SD (n=5).

** p <0.01, significantly different from the vehicle group (Dunnett's test)

Positive control:

E-4031 at 100 nM: 88.0 \pm 2.0 %.

50

方法 – モルモット乳頭筋活動電位試験



- 試験標本: モルモット乳頭筋
- 刺激頻度: 1Hz
- 測定指標:
 - 最大立ち上がり速度 (V_{max})
 - 活動電位時間 (APD_{30} , APD_{60} , APD_{90} , APD_{30-90}),
 - 活動電位高 (APA)
 - 静止膜電位(RMP)
- 被験物質
 - 対照: 0 μ M (6 標本)
 - OP: 3, 10, 30, 100 μ M (6 標本/各濃度)
 - OC: 10, 30, 100 μ M (6 標本/各濃度)
 - Sotalol (陽性対照): 30 μ M (6 標本)

51

OPの結果 – モルモット乳頭筋活動電位試験



OPのモルモット乳頭筋活動電位パラメータに対する影響

Test substance	Conc. (μ M)	N	Mean percentage of pre-test value						
			RMP	APA	APD_{30}	APD_{60}	APD_{90}	APD_{30-90}	V_{max}
Vehicle	---	6	100.4 \pm 1.1	99.8 \pm 0.6	99.0 \pm 3.3	98.8 \pm 1.9	99.0 \pm 1.7	98.6 \pm 3.2	100.5 \pm 1.7
OP	3	6	100.6 \pm 0.9	99.9 \pm 1.1	96.9 \pm 3.3	98.0 \pm 2.0	98.7 \pm 1.4	101.9 \pm 2.9	97.2 \pm 5.0
	10	6	100.4 \pm 1.3	100.3 \pm 1.1	96.7 \pm 3.1	97.7 \pm 2.6	98.0 \pm 2.6	100.7 \pm 2.6	100.1 \pm 3.5
	30	6	101.5 \pm 0.6	100.8 \pm 1.0	94.5 \pm 6.2	96.2 \pm 4.0	97.1 \pm 3.3	102.7 \pm 3.5	97.4 \pm 4.2
	100	6	100.2 \pm 1.1	99.0 \pm 1.6	84.5 \pm 5.6*	88.0 \pm 4.0*	90.5 \pm 3.1*	101.9 \pm 3.5	92.6 \pm 3.6*

Data are presented as mean percentage \pm SD (n=6) of pre-test values.
 * p <0.05, significantly different from the Vehicle group (Dunnett's test).

52

OCの結果 – モルモット乳頭筋活動電位試験



OC及びsotalolのモルモット乳頭筋活動電位パラメータに対する影響

Test substance	Conc. (μM)	N	Mean percentage of pre-test value						
			RMP	APA	APD ₃₀	APD ₆₀	APD ₉₀	APD ₃₀₋₉₀	V _{max}
Vehicle	--	6	100.4 ±1.1	99.8 ±0.6	99.0 ± 3.3	98.8 ±1.9	99.0 ± 1.7	98.6 ±3.2	100.5 ± 1.7
OC	10	6	100.4 ±0.6	100.2 ±0.8	99.1 ± 1.6	99.8 ±0.9	99.5 ±0.6	100.3 ±1.8	101.7 ± 2.6
	30	6	100.9 ±0.8	100.0 ±0.9	99.6 ± 3.3	100.0 ±2.8	100.5 ±2.4	102.0 ±3.0	100.1 ± 3.1
	100	6	99.8 ±1.9	100.4 ±0.4	98.6 ± 2.4	99.2 ±1.9	99.5 ±1.4	101.1 ±0.8	101.6 ± 5.0
Sotalol	30	6	100.9 ±1.5	99.4 ±0.6	102.1 ± 6.9	115.9 ±5.0\$	117.3 ±5.0#	141.9 ±8.2\$	100.1 ± 2.0

Data are presented as mean percentage ± SD (n=6) of pre-test values

Positive control:

\$p<0.05, significantly different from the Vehicle group (Student's t test)

#p<0.05, significantly different from the Vehicle group (Aspin-Welch's test)

53

hERG 及び 活動電位試験の総括



OC:

- 最高濃度 (100 μM)までhERG 試験及び 活動電位試験のパラメータに対して、影響は認められなかった

OP:

- 30 及び100 μM で濃度依存的にhERG電流を抑制し、抑制率はそれぞれ、16.9%及び37.5%であった
 - したがって、IC₅₀ は 100 μMより高濃度である
- 100 μMでモルモット乳頭筋活動電位時間(APD₃₀, APD₆₀, APD₉₀) 及び V_{max}を軽度減少した

54

hERG及びモルモット乳頭筋活動電位試験についての考察 – OC



- OCは最高濃度である100 μ MまでhERG 電流及び 活動電位に影響を与えなかった
- 100 μ Mは臨床用量投与時の血漿中濃度に比べ 80倍以上高い

55

hERG及びモルモット乳頭筋活動電位試験についての考察 – OP



- 30 μ M以上でhERG電流を抑制し, 100 μ Mで活動電位時間及び V_{max} を減少した
これらの結果からOP は30 μ M以上で I_{Kr} チャンネルを抑制し, 100 μ MではCa及びNaチャンネルを阻害することが示唆される
- 30 μ Mは臨床用量投与時の血漿中濃度の100倍以上に相当する
- OPによるhERGの抑制が認められたが, 活動電位時間に対するOPの影響としては, 延長作用ではなく, 短縮作用が認められた

56

結論

- OCでは催不整脈を示唆する所見は認められなかった
- OP では*in vitro*試験において、臨床用量を超える高い濃度でのみ、心筋に存在する種々のイオンチャンネルに対する影響がみられた
- これらの新しいデータはタミフルの心血管系に対する安全性を更に裏付ける結果であり、心血管系への影響に関するExpert Reportに示した非臨床試験及び臨床試験の結果と一致するものである