
基礎WGの指示に基づき実施した非臨床試験及び自主的に実施した試験・解析の結果について
(その3)

2008年6月19日

中外製薬株式会社

F.Hoffmann-La Roche Ltd.

発表の目的

オセルタミビル(OP)及び活性代謝物(OC)の中
枢神経系の安全性を評価するために、現在実施
している非臨床試験及び分析結果を厚生労働省
及び基礎的調査検討のためのワーキンググルー
プ(基礎WG)に提供する

- 基礎WG指示に基づき実施・報告した試験
 - 1-1. 脳内での曝露に関連する能動輸送過程(トランスポーター)に関するin vitro試験
 - 1-2. 脳内のカルボキシエステラーゼ1(hCES1)による未変化体の代謝(エステル加水分解)に関するin vitro試験及び代謝物の脳への透過を検討するための静脈内投与による薬物動態試験(リコンビナントhCES1を用いた試験については今回報告)
 - 1-3. ラットにおける脳、脳脊髄液及び血漿中濃度の測定
 - 2-1. 中枢作用に関連する受容体とのバインディングアッセイ
 - 2-2. 非ウイルスシアリダーゼに対するOP、OCの選択性確認
 - 3. 幼若ラット及び成熟ラットを用いた毒性試験
 - 4. 脳内に投与した際の被験動物の行動への影響等に関する評価(今回報告)
 - 5. 循環器系に対する影響に関するIn vitro試験(活動電位持続及びhERG 電流)

3

本日の報告内容

- 脳内濃度に対する脳灌流の影響
 - 自主報告/新規報告
- 幼若ラット及び成熟ラットを用いた毒性試験
 - 自主報告/2007年12月10日基礎WG会議報告内容の補足
- 脳内のカルボキシエステラーゼ1(hCE1)による未変化体の代謝(エステル加水分解)に関するin vitro試験(リコンビナント)
 - WG指示/2007年10月24日基礎WG会議報告内容の補足
- 非ウイルス・シアリダーゼ(特にニューロン組織由来シアリダーゼ)のOP、OC選択性の確認
 - 自主報告/2007年12月10日基礎WG会議報告内容の補足
- 脳内に投与した際の被験動物の行動への影響等に関する評価
 - WG指示/新規報告
- ◆ 基礎WGに提出した試験報告書のデータレビュー報告
- 中枢神経系に関する非臨床試験及び精神神経系有害事象の臨床的意義に関する総括

4

ラットにおけるOP及びOC単回静脈内投与後の 薬物動態: 脳灌流の役割



Roche ロシュ グループ

背景及び目的

- げっ歯類の試験において、OP経口及び静脈内投与後の脳組織ホモジネート中には低レベルのOPと、より少量の活性代謝物OCが認められた。
- 薬物濃度の脳/血漿比が比較的小さいため(特にOC)、脳血管中に残存している血液により、脳中OP及びOCの曝露が過大評価されていた可能性がある。
- 本試験でOPおよびOCの薬物動態をラットを用いて評価した。

方法

- 30mg/kg* のOPあるいはOCをラット尾静脈より単回静脈内投与する。
- 試料採取時間に動物を安楽死させ、全ての動物から血漿及び脳脊髄液(CSF)を採取する。
- 半数の動物は脳採取前に残存する血液を除去するため脳灌流を行った。残りの半数の動物は灌流せずに脳を採取した。
- 血漿, CSF及び脳組織中OP及びOC濃度測定はLC-MS/MS法で行った。

*用量はフリー体換算

7

結果

- OP投与試験
 - OPのAUCに関して、脳/血漿比は、脳灌流を実施することによって0.22から0.21に減少した。
 - OCについては、脳中濃度が低すぎるため精度の高いAUCを算出することができなかった。
- OC投与試験
 - OCのAUCに関して、脳/血漿比は、脳灌流を実施することによって約0.02から約0.01に減少した。

8

結論

- 脳血管容積から予想されたとおり、特にOCでは脳/血漿比は脳灌流によって減少した。
 - この結果は、これまでに報告した脳中濃度が、実際よりも高く見積もられていることを示している。
- 脳を摘出する前に脳血管中に残存する血液を灌流により除去することは、OCのような脳への透過性が非常に低い化合物の脳内濃度測定には特に重要である。

(参考) 脳中濃度測定試験の一覧

試験名	脳灌流の有無	報告した基礎WG会議日
幼若ラットおよび成熟ラットを用いた毒性試験(行動、脳内移行性等について検索)	非灌流	2007年12月10日 2008年6月19日(補足)
ラットにおける脳、脳脊髄液及び血漿中濃度の測定、代謝物の脳への透過性を検討するための静脈内投与による薬物動態試験	非灌流	2007年12月10日
脳内濃度に対する脳灌流の影響	灌流・非灌流の比較	2008年6月19日
脳内に投与した際の被験動物の行動への影響等に関する評価	灌流	2008年6月19日
成熟ラットにおけるオセルタミビル経口投与後の脳への曝露と行動評価	灌流	2008年6月19日

承認申請時に実施した幼若ラットにおけるOP経口投与毒性試験における曝露データ

背景及び目的



- 2つの幼若ラット試験で脳中濃度を評価した。
 - 2007年に実施
 - 7日齢ラットの脳ホモジネート中OP濃度は低かった。
 - 2001年に実施
 - 幼若ラット、特に7日齢ラットの脳ホモジネート中に非常に高濃度のOPが認められた。
- 2001年に実施した試験結果を再評価したところ計算ミスが見出され、幼若ラットの脳中OP及びOC濃度は過大評価されていた。
- 2001年に実施した試験報告書の生データに問題はなく、該当CROは、曝露データ(脳中濃度)を再計算し、報告書の修正を行った。

方法

- 2007年に実施した試験結果を基に脳/血漿比を算出した。
 - 2施設で実施した単回経口投与GLP試験(7及び42日齢ラットにOPを394~1314 mg/kg*経口投与)
- 2001年に実施した試験の生データから正しい方法で算出した値を基に脳/血漿比を再算出した。
 - 上記と異なる2施設で実施した単回経口投与GLP試験(7, 14, 24及び42日齢ラットにOPを500~1000 mg/kg*経口投与)

*用量はリン酸塩換算

13

結果

- 再計算の結果、OP及びOCの脳/血漿比はいずれも1未満であった。

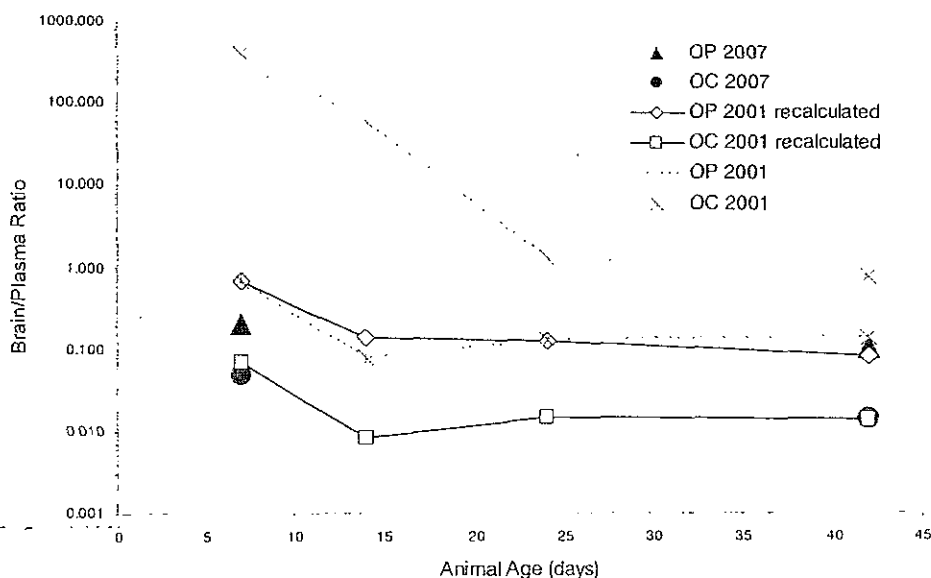


Figure: OP1000 mg/kg 投与後(2007年データは 920 mg/kg投与時のCmaxから外挿)の幼若ラットの各日齢及び成熟ラットにおけるOP及びOCの脳/血漿比 (Cmax)

14

結論

- 2001年実施試験の再計算結果と、2007年実施試験の結果はほぼ一致しており、幼若ラットにおけるOP及びOC曝露量の脳/血漿比は低いことが確認された。

WG指示試験名：脳内のカルボキシエステラーゼ1(hCE1)による
未変化体の代謝(エステル加水分解)に関する*in vitro*試験(リコンビナント)

ヒトリコンビナントカルボキシルエステラーゼ1及びカルボキシルエステラーゼ2発現系を用いた、OPからOCへの変換についての*In vitro*試験

背景及び目的



- カルボキシルエステラーゼは末梢及び低レベルながら脳で発現しており、全身及び脳内のOP及びOC濃度に影響を及ぼす可能性がある。
- いくつかのサブタイプが存在し、Shiら(2006)はヒトリコンビナントカルボキシルエステラーゼ 2 (rHCE 2)ではなく rHCE1がOPの変換に関与していることを報告している。
- これらの2つのサブタイプのどちらがOPの変換に関与しているかについて、さらに検討した。

17

方法

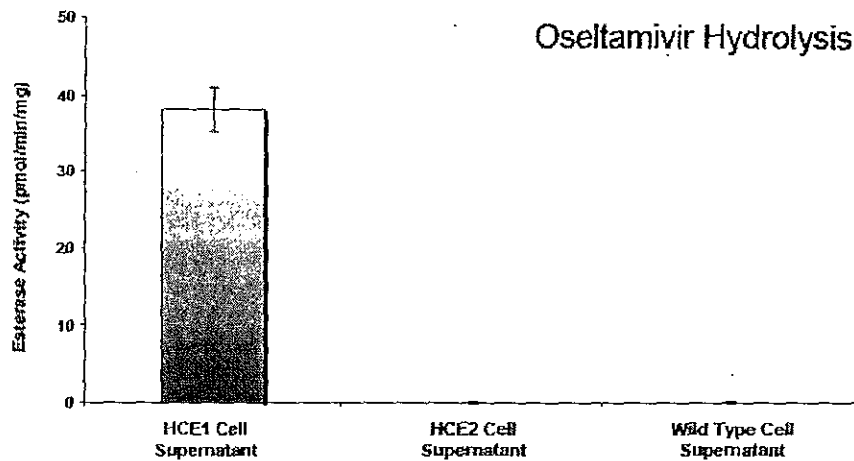


- オセルタミビルエステラーゼ活性は以下の *in vitro* 系を用いて評価した:
 - Sf9 (昆虫細胞)で発現させた組換えHCE1及びHCE2
 - 対照群は野生株バキュロウイルスを感染させたSf9細胞
- HCE1 及び HCE2 エステラーゼ活性は、methyl anthranilate (HCE1選択的)及びprocaine (HCE2選択的)加水分解活性により測定した
- OPの最終濃度は10 μ M ; 反応時間は 30分

18

結果

- HCE1を発現させた細胞の培養上清はオセルタミビルの加水分解活性を示した。
- HCE2を発現させた細胞の培養上清は、野生株を感染させた細胞の培養上清と同様にオセルタミビルの加水分解活性を示さなかった。



- 陽性対照薬物は、それぞれの細胞培養上清画分で、HCE1あるいはHCE2選択性を示すことを確認した。

19

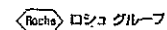
結論

- オセルタミビルはヒトカルボキシエステラーゼ2(HCE2)ではなく、ヒトカルボキシエステラーゼ1(HCE1)によって加水分解される。
 - Shi et al (2006) 及び Sugiyama et al (2008) によって公表された結果と同じであった。
 - CNSとの関連性: 脳におけるHCEの発現が少ないことから、脳内局所で代謝レベルはごく僅かと考えられる。この結果は、先に報告した我々の非臨床試験結果*と一致する。

*2007年10月24日基礎WGで報告: 脳内のカルボキシルエステラーゼ1(hCES1)による未変化体の代謝に関するin vitro試験(脳組織)

OP及びOCのウイルス及び ヒトノイラミニダーゼ1 - 4(Neu 1 - 4)に 対するin vitro選択性の比較

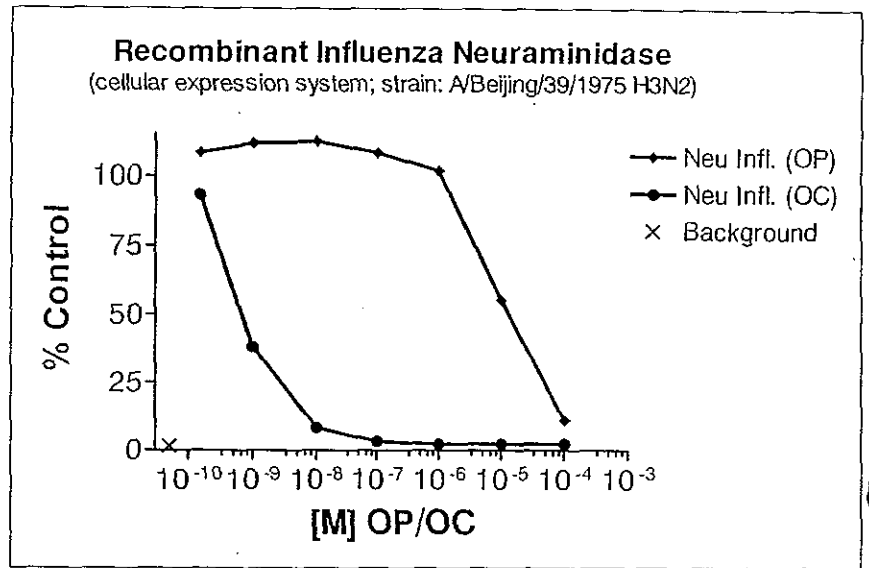
方法



- 薬物: OP/OC
- cDNAs: 配列確認済の市販標品又は自社合成品
- リコンビナントノイラミニダーゼ発現系
 - ✓ ウイルスノイラミニダーゼ; 細胞発現系
 - ✓ ヒト Neu1 & 2; 細胞発現系
 - ✓ ヒト Neu3 & 4; in vitro 転写系
 - ✓ Neu1の転写発現対照としてGPCR(V1b受容体)遺伝子を導入した細胞を用いた
- アッセイ方法: グリコシド基質(4-MU-NANA)を用いた蛍光測定法 (Potier et al. (1979)の方法の変法)。

結果 - ウイルスノイラミニダーゼ

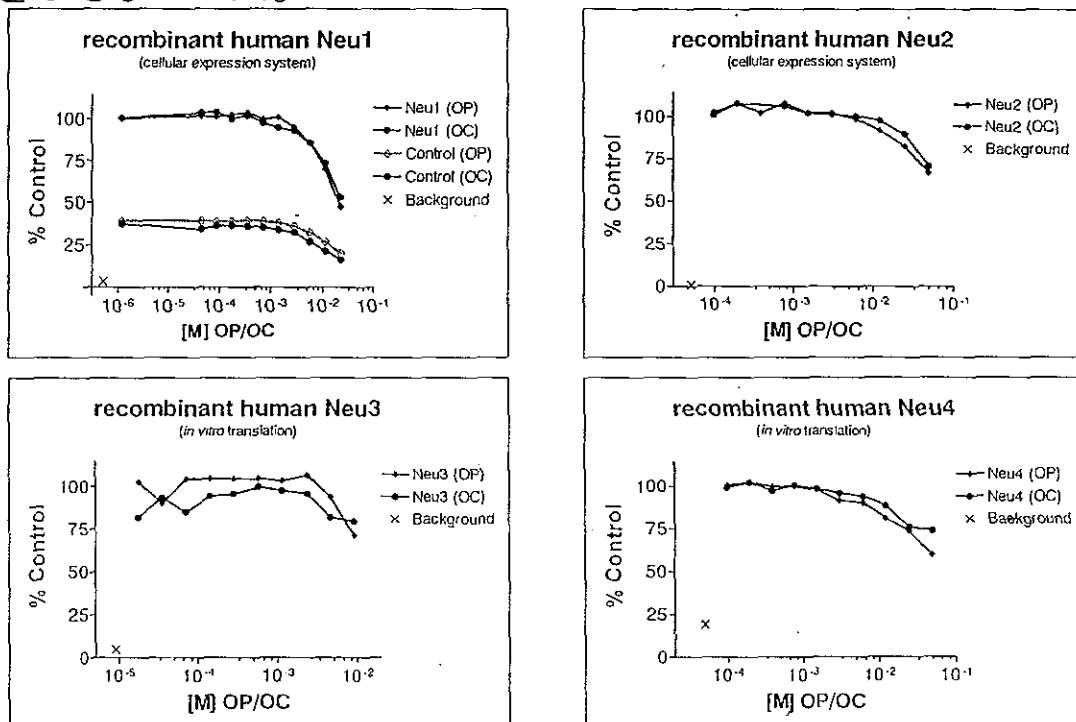
- ウイルスリコンビナントノイラミニダーゼに対するOP及びOCの効果は以下の通り
OC: IC₅₀ ~ 0.3 nM
OP: IC₅₀ ~ 10 μM



- このデータは、すでに確認されたインフルエンザウイルスのノイラミニダーゼ活性に対する作用とよく一致する (e.g. Mendel et al. 1998)

結果 - ヒトノイラミニダーゼ

- OP及びOCはヒトリコンビナント Neu1-4に対し、1 mMまで阻害活性を示さなかった。



結果 一 臨床濃度との乖離

臨床用量投与時のOP及びOCの血漿中及び外挿したヒト脳内濃度と、いずれのヒトノイラミナーゼに対しても阻害活性を示さなかった濃度(1mM)との間には大きな乖離がみられた

	Plasma		Brain	
	Cmax	Margins	Cmax ²	Margins
OP	~190 nM (~58 ng/ml)	~5,000-fold	~6.7 nM (~2.1 ng/g)	~150,000-fold
OC	~1,300 nM (~370 ng/ml)	~800-fold	~77 nM (~22 ng/g)	~13,000-fold

1: 75 mg bid投与時の定常状態における血漿中濃度

2: 上記1および脳脊髄液中濃度より外挿した値

25

結論

- OP 及びOC は、非常に高い濃度においてもヒトノイラミナーゼ Neu1-4のいずれに対しても阻害活性を示さなかった。


—この結果は、我々が先に報告した非臨床試験結果*と一致する。

- 臨床濃度と大きな乖離(800 – 150,000倍)が認められた。

*2007年12月10日基礎WGで報告: 非ウイルス・シアリダーゼ(特にニューロン組織由来シアリダーゼ)のOP,OC選択性の確認

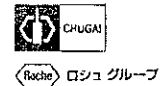
成熟ラットにおけるオセルタミビル脳室内及び経口投与後の行動評価とCNS曝露量

背景及び目的

 ロシュ グループ

- 厚生労働省/基礎ワーキンググループの指示の下に脳室内投与を行い、OP及びOCの脳への高濃度曝露条件下で行動評価を行うことを目標とする。
- OP及びOC脳室内投与後の曝露の均一性について、OP経口投与と比較検討した。
 - 脳室内投与の忍容性についてもあわせて検討した。

方法 - 脳室内投与予備試験



- 雄性ラットへの投与量(フリー体換算)
 - 脳室内投与: OP, OCともに0.2, 2 $\mu\text{g}/\text{animal}$
 - 経口投与: OP 200 mg/kg
- 観察項目
 - 投与後の適切な時間に薬物に起因した行動変化及び顕著な毒性徴候観察、および瀕死状態あるいは死亡について、1日に2回確認。
- 測定試料採取
 - 血漿, 脳脊髄液(CSF), 嗅索を含む嗅球(脳前方部), 海馬(脳中間部)及び小脳(脳後方部)を採取。脳組織は、灌流後に採取。

29

結果 - 脳室内投与予備試験



行動及びTK

- OPおよびOCの脳室内投与において、行動への影響は認められなかった。
- 脳室内投与後の脳曝露:
 - OP投与後のOP脳中濃度は、脳部位によって~30倍の差がみられたが、OC濃度は比較的その差が小さかった(10倍以下)。
 - OC投与後の脳中濃度は、脳部位によって~6倍の差がみられた。
- 経口投与後の脳曝露:
 - OP投与後のOP脳中濃度は、脳部位によって~5倍の差がみられたが、OC濃度はその差が2倍以下であった。

30