

可能性が示唆されていることから、基礎 WG は、OP 及び OC のウイルス及びほ乳類ノイラミニダーゼに対する選択性の確認を求めた。

試験方法としては、PC12 細胞及びラット脳組織の膜分画由来のノイラミニダーゼ並びにサル脳組織由来ノイラミニダーゼを用い、その活性に対する OP 及び OC の阻害作用を 10mM までの濃度で検討した。

その結果、OP 及び OC ともに 1mM の濃度までラット由来 PC12 細胞及びラット脳組織ノイラミニダーゼ並びにサルノイラミニダーゼ活性に対する明らかな阻害を認めなかった。

また、追加試験としてリコンビナントヒトノイラミニダーゼを用いた選択性試験の結果が報告されたが、OP、OC ともヒトノイラミニダーゼのいずれのサブタイプ (Neu1-4) に対しても 1mM 以上の高濃度域に至るまで阻害活性を示さなかった。

3 幼若ラット等を用いた追加毒性試験結果

1) リン酸オセルタミビル申請時に添付された旧試験の結果(参考)

旧幼若ラット試験では、7、14、21 及び 42 日齢ラットに OP を 500、700、1000 mg/kg (リン酸塩換算量) 単回経口投与し、7 日齢ラットにおいて、薬物に関連した死亡例が 700 及び 1000mg/kg 群で認められた。また、幼若動物、特に 7 日齢ラットの脳中 OP 濃度が著しい高値を示した (1000mg/kg 単回経口投与時の成熟ラットとの血漿中 AUC 比が 7 日齢で 9.1、14 日齢で 10.0 に対し、脳中 AUC 比は 7 日齢で 1540、14 日齢で 649 など)。

2) 新試験の結果

今回実施された新試験では、リン酸塩換算量として 394、657、788、920、1117、1314mg/kg の用量で OP を単回経口投与し、薬物に関連した死亡が 7 日齢ラットで 657mg/kg (臨床用量の約 250 倍) 以上で認められているが、成熟ラットでは 1314mg/kg でも死亡例は無かった。7 日齢 394mg/kg 群で雄トキシコキネティクス測定用サテライト群に 48 例中 1 例認められた死亡は、本用量の他の全ての動物において関連した症状変化が見られず、単独の所見であることから、偶発的なものとされている。

新試験における OP の脳/血漿中 AUC 比は 7 日齢ラットで 0.31、成熟ラットで 0.22 であり、旧試験における同比の 243 (7 日齢)、93 (14 日齢)、1.4 (成熟) と著しい違いが認められた。このため、企業側で前回試験データの再確認を行った結果、前回試験における脳中濃度算出時の計算式にデータにより 500 倍の誤りがあったことが見いだされた。

4 脳内直接投与による薬理学的試験

OP の投与が異常行動と関連すると仮定した場合、その作用機序としては、一般的には OP、OC が脳を含む中枢神経系への移行により薬理作用を発揮することが想定されること、また旧幼若ラット試験結果では、実際に幼若ラットにおいて OP の脳内への高濃度の移行・蓄積が報告されていたが、幼若動物での行動観察は十分に行えないこと、また、経口投与や静脈内投与などの通常の投与方法によっては成熟動物の脳内濃度をそれまで高めることはできないと考えられたことから、基礎 WG では脳内直接投与の試験系による動物での行動評価の実施を求めた。

予備試験として、OP、OC とも 0.2 μ g/動物、2 μ g/動物をカニューレを用い脳室内に直接投与し、その後の薬物に起因する行動変化及び顕著な毒性徴候の有無について観察す

るとともに、血漿、脳脊髄液、嗅球(脳前方部)、海馬(脳中間部)及び小脳(脳後方部)を採取し、OP及びOCの組織内濃度を測定した。同時に経口投与(OP 200mg/kg)群を設け、比較検討した。

その結果、これらの試験において、行動に対する影響は見られなかった。しかしながら、脳室内投与では、投与部位に近い海馬において比較的高いOP又はOC濃度が認められたものの、動物個体間差が著しく大きく、また特にOPの脳内分布の均一性が低いなどの問題点が判明した。このため、以下に述べる本試験は、より高い暴露量と均質な濃度分布が得られる経口投与を用いて、行動評価が行われた。

本試験では、雄ラットにOP(500、763、1000mg/kg:フリー体換算)を経口投与し、Irwin変法による行動評価を投与1、2、4、6及び8時間後に実施した。併せて直腸温も測定した。脳への暴露については、763mg/kg群及び1000mg/kg群について血漿、脳脊髄液、脳を採取し薬剤濃度を測定した。

本試験の結果、OP経口投与後の中枢神経系機能に影響は見られず、ごくわずかな体温変化(最大0.5°Cの低下)が得られたのみであり、無毒性量(NOEL)は1000mg/kg以上であると考えられた。763mg/kg及び1000mg/kg経口投与による脳中OP及びOC濃度の最大値は、それぞれ2300ng/g、640ng/gであり、OP及びOCの脳/血漿AUC比は、それぞれ0.12及び0.01であった。

5 基礎WGにおける調査検討結果

1) OPの能動輸送過程にP-gpが関与していることについては、今回実施されたin vitroによる成績以外にin vivo試験の成績が学会等(Morimoto et al 2007, Ose et al 2008)に報告されており、それらは互いに矛盾するものではない。当該in vivo試験ではP-gpノックアウトマウスにおいて脳内濃度として野生型マウスより5-10倍弱の上昇があることが報告されている。野生型マウスにP-gp阻害剤を投与した場合も同様であると報告されている。即ち、何らかの原因でP-gpが欠損あるいは抑制されたとしても脳内濃度の上昇は10倍以下であろうと推定されるが、これらの結果では、幼若動物と成熟動物との間の脳内分布における大きな差を説明できなかった。しかし、先に述べたように、申請者よりデータの計算に500倍の過ちがあったことが示された。WGでは個別データを確認するとともに、この修正によりデータ間の大きな乖離が無くなったと思われることから、最終報告書が適正に修正されることを前提に、データの修正に同意した。

また、P-gp以外のトランスポーターに関しても、Mrp4ノックアウトマウスにおいて、OCの脳内濃度が4-6倍程度上昇するとの報告(Ose et al 2009)もなされており、Mrp4の活性を低下させる遺伝子多型は日本人で18%以上存在するとの報告(Krishnamurthy et al 2008)もある。

これらの報告によれば、トランスポーターの欠損による脳内分布の増加はOPで5-10倍程度、OCでも同程度以内と考えられる。

2) 成熟ラットにおいては、OP及びOCの脳への移行は少ないことが示された。新たに行われた幼若ラット試験において幼若ラットにおけるOPの脳への移行は成熟ラットの20-30倍、OCの移行は2-5倍であったが、血漿中濃度と比較すると、OPでは血漿中濃度以下、OCでは血漿中濃度の1/10以下であった。Ose et al (2008)も同様の報告を行っている。こ

これは、幼若動物では血中 OP 及び OC 濃度が相対的に高いこと、および一般に幼若動物では血液脳関門が未発達であることと矛盾しない結果であった。ちなみに、Ose et al (2008)はラット脳での P-gp 発現量が生後6日齢では42日齢の20%以下であること、また、ラット OP 血中濃度が幼若動物で高いことを報告している。

- 3) 脳内におけるカルボキシルエステラーゼによるオセルタミビルの代謝活性化はラット、ヒトともに低かった。また、Morimoto et al (2007)および Ose et al (2008)は P-gp 阻害剤投与や P-gp ノックアウトマウスで OP の脳内濃度が5倍程度高まっている状況でも OC の脳中濃度は有意に増加しないと報告しているが、これらは脳内での OP の活性化が低いことによると思われる。
- 4) バインディング・アッセイでは、イオンチャネル系 (Ca、Na) ターゲット及び σ 受容体 (non-selective) に対して OP が $30 \mu\text{M}$ 濃度で 30-40% の抑制効果を示していることから、また、申請時の幼若ラット分布データでは脳内濃度がきわめて高いとされていたことから、当初、より高濃度でのバインディング・アッセイでは臨床的に意味のある阻害活性が得られるかもしれないと考えた。しかしながら、新幼若ラット試験において得られた脳中濃度から推定されるヒト幼小児への臨床使用時の脳内濃度に対して $30 \mu\text{M}$ は十分な過剰量であり、これ以上の高濃度で試験を行う意義は少ないと思われた。また、臨床用量投与時に推定される OP および OC の脳中濃度ではドパミン受容体、グルタミン酸受容体、BZD 受容体を含む多くの中枢性の受容体やイオンチャネル系への作用を持たないと思われた。
- 5) これらをまとめると、OC の脳内濃度は、幼若ラットで血漿中濃度の $1/10$ 以下であり、トランスポーター欠損がある場合でも、OC の脳内濃度の上昇は最大6倍程度であることから、申請時概要にある 13-18 才に対する 2mg/kg 単回投与時の血漿中濃度 (OC の C_{max} は $1.12 \mu\text{M}$ 程度) を基に、血液脳関門が幼若ラットと同様に未成熟と仮定しても、脳内濃度の上昇は多くても血漿中濃度の60%程度、すなわち、 $0.6 \mu\text{M}$ 程度以下と計算される。さらに、これに重篤な肝障害等の代謝の阻害が加わったとしても、上昇は10倍の $6 \mu\text{M}$ 程度と想定され、受容体結合抑制濃度からみて、薬物受容体に直接作用して影響を及ぼす可能性は低いと考えられる。

OP の脳内濃度は血液脳関門の未成熟な幼若動物では血漿中濃度に近くなることがある。同様に申請時概要にある 13-18 才の OP 血漿中濃度 (OP の C_{max} は $0.233 \mu\text{M}$ 程度) を基にし、血液脳関門の未成熟な幼若ラットと同様に脳内濃度が血漿中濃度に近似すると仮定しても、そのような状況ではトランスポーターの欠損による影響は受けにくいと考えられるため、代謝の阻害による10倍程度の上昇が同時に起きたとしても、OP の脳内濃度はせいぜい $2.33 \mu\text{M}$ 程度までの上昇と推計することが適当と考えられる。一方、血液脳関門が成熟している場合については、成熟動物の結果から OP の脳・血漿中分布比は、血漿中濃度の $1/10$ 程度と考えて良いと思われる。この場合では、トランスポーターの欠損による約6倍の脳内濃度の上昇と、代謝阻害による約10倍の血漿中濃度上昇が同時に起きたとしても、脳中濃度は $1.4 \mu\text{M}$ 程度までの上昇と推計することが適当と考えられる。いずれの仮定による推計値においても、受容体結合抑制濃度からみて、薬物受容体に直接作用して影響を及ぼす可能性は低いと考えられる。

- 6) インフルエンザウイルスのノイラミニダーゼに対して OC の特異性は高く、ほ乳類のノイラミニダーゼに対してはヒトの4種のサブタイプを含め有意な抑制を示さないと考えられた。

一方 Li et al (2007)はノイラミニダーゼ 2 (NEU2)のアジア人に多い多型では酵素活性が低下するだけでなく、オセルタミビルによる抑制がかかりやすくなると報告している。しかし、この時の Ki 値は 175 μ M であり、修正された幼若ラットの脳中の濃度から推定される臨床用量時の脳中濃度(約 0.2 μ M)と比較し、また、臨床用量の2倍量を健康成人に投与した時の脳脊髄液濃度(おおよそ OC 10ng/mL、OP 1ng/mL)と比較し、十分に高いこと、また、NEU2 は骨格筋にのみ発現しているとの報告もあり(Monti et al 1999)、オセルタミビルによる NEU2 の抑制が中枢性の副作用に関与しているとは考えにくい。しかし、添付文書によれば、重篤な腎障害時の血漿中濃度は 10 μ M に近くなるとされており、そのような状況で作用を示す可能性については、今後、検討すべき問題と思われた。また、高用量(50mg/kg 以上)の OP をドパミン D2 受容体アゴニストとともに腹腔内投与したとき、異常行動を引き起こしたとの報告(Suzuki & Masuda 2008)等もあり、中枢性副作用を生じた患者において、未知のノイラミニダーゼ多型が無いかについても今後の検討課題と思われた。

このようなことから、ノイラミニダーゼに対する作用に関しては引き続き関連研究を注視すべきと考えられる。

- 7) 調査検討の最終段階で旧幼若ラット試験における計算誤りが報告されたことは基礎 WG としては極めて遺憾であった。当該報告はこれまでの調査検討内容に大きな影響を及ぼすことから、企業側報告内容の信頼性を担保するため、基礎 WG は当該試験にかかる関係書類及び生データの写しを企業側から取り寄せ、企業側の「計算誤り」の説明の裏付けとなる試験プロトコール、試料調製記録、クロマトデータ等を確認したところ、企業側の「計算誤り」の説明は確認した範囲で生データとの整合性があった。

また、WG では、新試験のプロトコールに示された抽出法に疑問があったところから、企業側にバリデーションデータを求めたところ、存在しなかった。このため、企業側から新試験と同一抽出条件でのバリデーションが実施され、そのデータが追加提出された。その結果によれば、新試験での抽出法による抽出効率は 75%程度であり、100%として計算された結果に過ちがあったことから、その事実を報告書に記載することを求めた。

また、GLP 試験として実施された旧試験の計算誤りについては、企業側から試験報告書の修正が報告されたが、その修正方法について GLP の考え方に沿っていない点がみられたため、修正を求めた。

- 8) 死亡例についての考察

788mg/kg 以上の用量を投与した幼若動物において、低覚醒、振戦、痙攣、体姿勢の変化、呼吸の異常、粘膜および皮膚の蒼白化、自発運動の減少が認められた。申請者はこのような症状の認められた動物のほとんどが、その後死亡したことから、それらが瀕死状態に関連する症状であると考えていた。しかし、中枢性や呼吸器系の作用により死んだのか判断は困難である。基礎 WG ではこれら症状と死亡との関連について考察するため、症状の時間的経過を含む、より詳細なデータを求めたが、得られなかった。ただし、これらの症状や死亡はいずれも臨床用量(オセルタミビルとして 2mg/kg)の 250 倍以上の高用量で認められたものであり、臨床での異常行動や死亡に関連づけることは困難と考えている。

- 9) 脳内投与試験に関する考察

脳内投与試験の結果では、特に、ラットの行動に大きな影響は認められなかった。脳内

直接投与後の脳内分布に均一性が乏しかったが、元々本試験の実施を要請した大きな動機であった、幼若動物での高い脳内分布に関するデータが過ちであったことから、これ以上の検討は不要と考えた。

10) 体温低下に関する考察

OP をマウスに腹腔内投与すると 30mg/kg 以上で用量依存的に体温を低下させるとの報告(Ono et al 2008)がある。一方で、臨床試験で低体温が認められたのは OP 投与した患者 6974 人で 1 人、投与しなかった患者 4187 人では 1 人と両者に有意な差がないとされている。マウス腹腔内投与 30mg/kg でみられた体温低下はわずかであるが、用量依存性があることから、他の作用との関連は不明であるが、体温に関わる脳幹等への薬理作用が示唆され、また、体表面積当たりで換算すれば、タミフルの臨床用量に近いところで発生していることから、引き続き関連研究を注視すべきと考えられる。

11) 動物実験による神経症状・異常行動等への影響について

OP がマウスに対するドパミン受容体作動薬 PPHT のジャンピング行動誘発に対し、促進的に作用したとの報告(Suzuki & Masuda 2008)や、マウス対し、ハロペリドールとクロニジン併用によるジャンピング行動誘発を OP 経口 50mg/kg 投与で増加させた(小野ら学会発表 2008)との報告、ラットに OP 腹腔内投与後、エタノール投与による正向反射消失時間が短縮し、体温も低下したとの報告(Izumi et al 2007)や、OP とエタノールの同時投与でマウスの行動抑制が起きたとの報告(Izumi et al 2008)などの学会、文献報告についても検討を加えた。しかし、いずれも本剤による直接作用ではないこと、これら現象と OP の作用機序との関連性が不明確であること、また、投与量が高いことから、ヒトでの精神神経症状・異常行動との関連性について一定の判断をうる知見とするには不十分であり、引き続き関連研究を注視すべきと考えられる。

基礎 WG では以上のような様々な角度から調査検討を行った結果、リン酸オセルタミビルの中樞神経系への作用に関し、異常行動や突然死などとの因果関係を直接的に支持するような結果は、現時点において得られていないと判断した。

第2 オセルタミビルの循環器系に対する影響について

1 循環器系に対する影響評価に関する in vitro 試験

これまで実施された循環器系の試験において、ウサギ単離プルキンエ線維試験では、低頻度電気刺激下の条件で APD₅₀ の軽度延長が認められたが、それ以外には OP、OC ともに心血管系への電気生理学的な影響は認められていない。基礎 WG では OP、OC の循環器系に対する影響についてより詳細な検討をする目的で、以下の 2 試験の実施を求めた。

1) モルモット乳頭筋活動電位の各指標に対する作用

試験標本としてモルモット乳頭筋を用い、OP 3、10、30、100 μ M、OC 10、30、100 μ M の各濃度における最大立ち上がり速度(V_{max})、活動電位時間(APD₃₀、APD₆₀、APD₉₀、APD₃₀₋₉₀)、活動電位高(APA)、静止膜電位(RMP)を刺激頻度 1Hz で測定した。陽性対照には Sotalol(30 μ M)を用いた。

その結果、OP は最高濃度の 100 μ M において、活動電位時間(APD₃₀、APD₆₀、APD₉₀)及び V_{max} を軽度減少させた。一方、OC では最高濃度の 100 μ M まで、活動電位に対し