

## 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

 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、APD<sub>50</sub>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

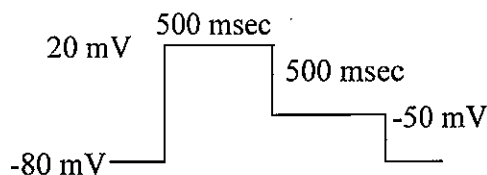


細胞: HEK293

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 μM (5 細胞)
- OP: 10, 30, 100 μM (5 細胞/各濃度)
- OC: 10, 30, 100 μM (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 μM	30 μM	100 μM
OP	0.0 ± 3.3	5.1 ± 6.5	16.9 ± 8.9**	37.5 ± 4.7**
OC		2.4 ± 8.1	1.7 ± 5.1	5.7 ± 6.3

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

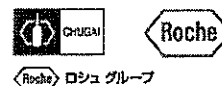
\*\* $p < 0.01$ , significantly different from the vehicle group (Dunnett's test)

Positive control:

E-4031 at 100 nM: 88.0 ± 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  $\mu$ M (6 標本)
  - OP: 3, 10, 30, 100  $\mu$ M (6 標本/各濃度)
  - OC: 10, 30, 100  $\mu$ M (6 標本/各濃度)
  - Sotalol (陽性対照): 30  $\mu$ 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. ( $\mu$ 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 <sub>30</sub>	APD <sub>60</sub>	APD <sub>90</sub>	APD <sub>30-90</sub>	V <sub>max</sub>
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)

## hERG 及び 活動電位試験の総括

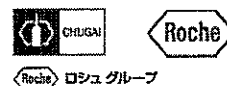
### OC:

- 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、IC<sub>50</sub> 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(APD<sub>30</sub>, APD<sub>60</sub>, APD<sub>90</sub>) 及び V<sub>max</sub>を軽度減少した

## 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  $\mu\text{M}$ までhERG 電流及び 活動電位に影響を与えなかった
- 100  $\mu\text{M}$ 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  $\mu\text{M}$ 以上でhERG電流を抑制し, 100  $\mu\text{M}$ で活動電位時間及び $V_{\text{max}}$ を減少した  
これらの結果からOP は30  $\mu\text{M}$ 以上で  $I_{\text{Kr}}$  チャンネルを抑制し, 100  $\mu\text{M}$ 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  $\mu\text{M}$ 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

- 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



## オセルタミビル幼若ラット試験成績における脳中濃度について

中外製薬株式会社  
安全管理責任者 横山俊二

今回新たに実施された幼若ラットを用いたリン酸オセルタミビル単回投与毒性試験におけるオセルタミビルの脳中濃度は、2001年に実施された幼若ラット試験での結果に比べ非常に低いものでした。このため、中外製薬およびロシュ社は直ちに試験成績を改めて確認したところ、以前に行われた試験では測定値の計算に誤りがあり、特に幼若ラットにおけるオセルタミビルの脳中濃度は、実際よりも高い濃度で算出されていたことが確認されました。この試験は試験計画書に沿って行われたもので、その元となるデータは問題のないものです。その元となるデータからの計算の誤りを正した場合には、新しい試験の成績とほぼ矛盾はないと考えられます。ロシュ社は、以前に行われた試験の血漿中および脳中の薬物濃度の測定を実施した CRO に対し、誤りを正した報告書の提出を求めています。

**経緯**

2001年に外部CRO 2社に委託して幼若ラットを用いたリン酸オセルタミビル単回投与毒性試験(以下、旧試験)が実施された(1社は動物実験を担当、他の1社が血漿中および脳中の薬物濃度測定を担当)。この試験において、オセルタミビル1000mg/kg単回投与時の脳中オセルタミビル未変化体AUCは、42日齢のラットと比較して7日齢ラットでは1500倍、14日齢ラットでは650倍になるとの結果を得た。中外製薬・ロシュ社はこの試験成績を既に報告している(カプセル剤予防承認時参考資料二-1;2004年7月9日承認)。

ロシュ社は、米国NIHが実施する2歳未満の乳幼児におけるタミフルの安全性と薬物動態試験をサポートするため、新たな幼若ラット試験(以下、新試験)を計画した。新試験は、旧試験とは別のCRO 2社に委託して本年4月に開始された。タミフルの基礎ワーキンググループ(WG)からも、本試験成績提出の指示を受けた。

新試験については、10月にロシュ社より、旧試験で認められたような高い脳中濃度を示す成績が得られていないようだとの報告を受けた。このため、直ちに両社で協議し、両試験データのレビューを実施して不整合の原因を探った。10月末までに、旧試験において脳中濃度の計算における問題点が見出され、ロシュ社は直ちに担当CROに測定結果の再確認を指示した。一方、新試験については、10月30日に血漿中・脳中薬物濃度測定の報告書が作成され、ロシュ社はデータのレビューを行い問題のないことを確認した。11月14日に中外製薬もこの報告書を受け取り、内容を確認した。

これを受け、11月16日に新旧試験成績の不整合、推定される原因および今後の対応をまとめたカバーレターを添え、新しい幼若ラット毒性試験の報告書(草案)を厚生労働省医薬食品局安全対策課に提出した。同日、ロシュ社はEMAとFDAに同じ内容の報告を行った。

**旧試験における脳中濃度計算における問題点**

- 1) 全ての脳組織サンプルについて検量線を誤って使用したため、オセルタミビルおよびオセルタミビルカルボキシレート(活性代謝物)の濃度が実際よりも10倍高く算出されていた。
- 2) 幼若ラットの脳組織サンプル中のオセルタミビルの濃度の計算において、希釈倍率の適用を誤ったため、実際よりも50倍高く算出されていたものがあつた。

上記1)2)の誤りが重なったサンプルについては、脳中のオセルタミビル濃度は、実際よりも500倍高い濃度に算出されていた。

以上の問題点は、中外製薬・ロシュ社の確認を通じて見出されたものです。ロシュ社が旧試験を委託したCROは、ロシュ社からこの問題点の指摘を受け、現在データの詳細について改めて確認を進めており、報告書が再提出される予定です。

新試験では、幼若ラットにおけるタミフルの血漿中濃度に対する脳中濃度の比は低い結果が得られています。中外製薬・ロシュ社では、旧試験での問題点を是正した場合、新試験と旧試験の脳中濃度の結果に大きな矛盾がないことを確認しています。

なお、他の試験成績の信頼性についても、改めて確認を進めております。

以上