

平成21年度第1回 薬事・食品衛生審議会
医薬品等安全対策部会 安全対策調査会

日時：平成21年6月16日（火）

18：00～20：00

場所：厚生労働省専用第18～20会議室（17階）

議事次第：

1. リン酸オセルタミビル（タミフル）について
2. その他

平成21年度第1回薬事・食品衛生審議会

医薬品等安全対策部会安全対策調査会 委員等名簿

【 委 員 】

大野 泰雄 国立医薬品食品衛生研究所副所長
土屋 文人 東京医科歯科大学歯学部附属病院薬剤部長
松本 和則 獨協医科大学特任教授

【 参 考 人 】

安達 知子 総合母子保健センター愛育病院産婦人科部長
飯沼 雅朗 社団法人日本医師会常任理事
一瀬 邦弘 東京都立豊島病院長
猪熊 茂子 日本赤十字社医療センターアレルギー・リウマチ科リウマチセンター長
内山 真 日本大学医学部精神医学系教授
浦田 重治郎 前国立精神・神経センター国府台病院院長
生出 泉太郎 社団法人日本薬剤師会副会長
岡部 信彦 国立感染症研究所感染症情報センター長
鴨下 重彦 国立国際医療センター名誉総長
工藤 宏一郎 国立国際医療センター国際疾病センター長
倉田 雅子 納得して医療を選ぶ会事務局長
新見 伸吾 国立医薬品食品衛生研究所生物薬品部第三室長
日野 治子 関東中央病院皮膚科部長
廣田 良夫 大阪市立大学大学院医学研究科教授
広津 千尋 明星大学理工学部教授
榎田 浩史 東京医科歯科大学大学院心肺統御麻醉学教授
水口 雅 東京大学医学部大学院医学系研究科国際生物医科学講座教授
三田村 秀雄 東京都済生会中央病院副院長
宮坂 勝之 長野県立こども病院長
宮村 達男 国立感染症研究所長
桃井 真里子 自治医科大学小児科学教授
柳川 洋 自治医科大学名誉教授
吉村 功 東京理科大学名誉教授

(敬称略、五十音順)

下線は新任参考人

平成21年度第1回 薬事・食品衛生審議会
医薬品等安全対策部会 安全対策調査会
配布資料一覧

当日配布資料1 リン酸オセルタミビルの基礎的調査検討のためのワーキンググループ（基礎WG）における調査検討の結果について

当日配布資料2 リン酸オセルタミビルの臨床的調査検討のためのワーキンググループ（臨床WG）における調査検討の結果について

資料1 タミフルの安全対策の経緯等について

<資料2 基礎WG関係資料>

資料2-1 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）（中外製薬株式会社作成資料）（平成20年6月19日第5回基礎WG資料）

資料2-2 リン酸オセルタミビルの基礎的調査検討のための主要な文献等（平成21年2月6日第6回基礎WG資料）

資料2-3 リン酸オセルタミビルの基礎的調査検討に関連するその他の文献等（平成21年2月6日第6回基礎WG参考資料）

<資料3 臨床WG関係資料（疫学調査）>（平成21年6月3日第8回臨床WG資料）

資料3-1 インフルエンザに伴う随伴症状の発現状況に関する調査研究（平成19・20年度分担研究報告書）（研究分担者：廣田良夫 大阪市立大学大学院医学研究科公衆衛生学教室教授）

資料3-2 インフルエンザ様疾患罹患時の異常行動の情報収集に関する研究（2008/2009 シーズン報告）（研究代表者：岡部信彦 国立感染症研究所感染症情報センター長）

<資料4 臨床WG関係資料（臨床試験）>（平成20年6月17日第6回臨床WG資料）

資料4 リン酸オセルタミビルの健康成人男子を対象とした睡眠に関する製造販売後臨床試験及びリン酸オセルタミビルの健康成人男子を対象とした夜間の心電図に関する製造販売後臨床試験（中外製薬株式会社作成資料）

<<資料5～資料9 臨床WG関係資料（副作用等報告関係）>>（平成21年6月3日第8回臨床WG資料）

資料5 タミフルの副作用報告の精査について（その6）

<資料6～8 「異常な行動」関係資料>

[資料6 リン酸オセルタミビル（タミフル）の「異常な行動が記録されている事例」について：販売開始（平成13年2月）から平成21年3月31日まで]

資料6-1 異常な行動が記録されている事例の概要（年齢順）

資料6-2 異常な行動が記録されている事例の追加調査結果（年齢順）
（中外製薬株式会社作成資料）

資料6-3 異常な行動が記録されている事例の集計（中外製薬株式会社作成資料）

資料6-4 異常な行動が記録されている事例の副作用症例票（原本）（報告順）
（平成20年4月1日から平成21年3月31日）^注

[資料7 リン酸オセルタミビル（タミフル）の「異常な行動が記録されている事例以外の精神神経症状事例」について：販売開始（平成13年2月）から平成21年3月31日まで]

資料7-1 異常な行動が記録されている事例以外の精神神経症状事例の概要
（年齢順）

資料7-2 異常な行動が記録されている事例以外の精神神経症状事例の追加調査結果（年齢順）（中外製薬株式会社作成資料）

資料7-3 異常な行動が記録されている事例以外の精神神経症状事例の副作用症例票（原本）（報告順）（平成20年4月1日から平成21年3月31日）^注

[資料8 タミフル非使用例等の「異常な行動」等の概要]

（資料8-1 ザナミビル水和物に係る異常な行動等について：販売開始（平成12年12月）から平成21年3月31日まで）

資料8-1-1 異常な行動が記録されている事例の概要（年齢順）

資料8-1-2 異常な行動が記録されている事例の追加調査結果（年齢順）
（グラクソ・スミスクライン株式会社作成資料）

資料8-1-3 異常な行動が記録されている事例の集計（グラクソ・スミスクライン株式会社作成資料）

資料8-1-4 異常な行動が記録されている事例の副作用症例票（原本）（報告順）（平成20年4月1日から平成21年3月31日）^注

資料8-1-5 異常な行動が記録されている事例以外の精神神経症状事例の概要（年齢順）

資料8-1-6 異常な行動が記録されている事例以外の精神神経症状事例の追加調査結果（年齢順）（グラクソ・スミスクライン株式会社作成資料）

資料8-1-7 異常な行動が記録されている事例以外の精神神経症状事例の副作用症例票（原本）（報告順）（平成20年4月1日から平成21年3月31日）^注

(資料8-2 塩酸アマンタジンに係る異常な行動等について：インフルエンザの効能追加（平成10年11月）から平成21年3月31日まで）

資料8-2-1 異常な行動が記録されている事例の概要（年齢順）

資料8-2-2 異常な行動が記録されている事例の追加調査結果（年齢順）（ノバルティスファーマ株式会社作成資料）

資料8-2-3 異常な行動が記録されている事例の集計（ノバルティスファーマ株式会社作成資料）

資料8-2-4 異常な行動が記録されている事例の副作用症例票（原本）（報告順）（平成20年4月1日から平成21年3月31日）^注

資料8-2-5 異常な行動が記録されている事例以外の精神神経症状事例の概要（年齢順）

資料8-2-6 異常な行動が記録されている事例以外の精神神経症状事例の追加調査結果（年齢順）（ノバルティスファーマ株式会社作成資料）

資料8-2-7 異常な行動が記録されている事例以外の精神神経症状事例の副作用症例票（原本）（報告順）（平成20年4月1日から平成21年3月31日）^注

(資料8-3 タミフル非使用例の「異常な行動」について；平成19年3月23日から平成21年3月31日までに入手できたもの)

資料8-3-1 異常な行動が記録されている事例の概要（年齢順）

資料8-3-2 異常な行動が記録されている事例の追加調査結果（年齢順）

資料8-3-3 異常な行動が記録されている事例の集計

※ 平成20年4月1日から平成21年3月31日までに異常な行動が記録されている事例については、報告がなかったことから、当該事例の原本はない。

<資料9 リン酸オセルタミビル（タミフル）の「死亡症例」について；販売開始（平成13年2月）から平成21年3月31日まで>

資料9-1 死亡症例の概要（年齢順）

資料9-2 死亡症例の追加調査結果（年齢順）（中外製薬株式会社作成資料）

資料9-3 死亡症例の集計（中外製薬株式会社作成資料）

資料9-4 死亡症例の副作用症例票（原本）（報告順）

（平成20年4月1日から平成21年3月31日）^注

資料10 要望書・意見書の写し

【参考資料】

参考資料1-1 リン酸オセルタミビル（タミフル）の副作用報告等を踏まえた当面の対応に関する意見（平成19年4月4日、薬事・食品衛生審議会医薬品等安全対策部会安全対策調査会）

参考資料1-2 リン酸オセルタミビル（タミフル）について（平成19年12月25

日、薬事・食品衛生審議会医薬品等安全対策部会安全対策調査会)

- 参考資料1-3 平成19年度第5回薬事・食品衛生審議会医薬品等安全対策部会安全対策調査会における検討結果に基づく対応について(平成19年12月26日付け医薬食品局安全対策課長通知)
- 参考資料1-4 ザナミビル水和物の使用上の注意に関する注意喚起の徹底について等(平成21年1月29日付け医薬食品局安全対策課長通知)
- 参考資料2-1 タミフルカプセル75、同ドライシロップ3%の添付文書
- 参考資料2-2 緊急安全性情報(タミフル服用後の異常行動について)
- 参考資料2-3 タミフルの欧米における添付文書(精神神経症状の抜粋;仮訳付き)(中外製薬株式会社作成資料)
- 参考資料3 リレンザの添付文書
- 参考資料4 シンメトレル錠50mg、同錠100mg、同細粒10%の添付文書
- 参考資料5 インフルエンザ随伴症状の発現状況に関する調査研究(平成20年7月10日第7回臨床WG資料)
- 参考資料6 インフルエンザ様疾患罹患時の異常行動情報収集に関する研究(平成20年7月10日第7回臨床WG資料)
- 参考資料7 インフルエンザの基礎知識

注) 資料大部のため、配布は省略

平成21年6月16日

薬事・食品衛生審議会

医薬品等安全対策部会

安全対策調査会

リン酸オセルタミビル（タミフル）について

当調査会は、リン酸オセルタミビル（タミフル）の服用と異常な行動及び突然死との関係について検討を行うため、平成19年4月4日、6月16日、11月11日及び12月25日に会議を行った。

平成19年6月16日にはタミフルの安全性について希望団体等からの意見陳述の聴取を行った。また、平成19年6月16日、11月11日及び12月25日にはリン酸オセルタミビルの基礎的調査検討のためのワーキンググループ（基礎WG）及びリン酸オセルタミビルの臨床的調査検討のためのワーキンググループ（臨床WG）から調査検討の状況について報告を受け、検討を進めてきた（注1）。

（注1）タミフルの安全対策の経緯等については、別添「参考資料」参照

本日、当調査会は、基礎WG及び臨床WGにおける調査検討の結果について、それぞれ別添1及び別添2のとおり報告を受け、検討を行った。タミフルの服用と異常な行動及び突然死との関係についての当調査会の検討結果等は、下記のとおりである。

記

- 本日、当調査会は、基礎WG及び臨床WGから非臨床試験（動物実験等）、臨床試験、疫学調査等の調査検討の結果について報告を受けた。
- タミフルがインフルエンザに伴う異常行動のリスクを高めるかどうかについては、廣田班疫学調査の解析においては、重篤な異常行動（事故につながったりする可能性がある異常行動等）を起こした10代の患者に限定して解析すると、タミフル服用者と非服用者の間に統計的な有意差はないが、非服用者に比べリスク（オッズ比）は1.54倍になるとの数値が示された。また、解析方法の妥当性に関して疫学及び統計学それぞれの専門家から異なる意見があり、データの収集、分析に関わるさまざまな調査の限界を踏まえると廣田班疫学調査の解析結果のみで、タミフルと異常な行動の因果関係に明確な結論を出すことは困難であると判断された。
- 報告を受けた2つの疫学調査（岡部班疫学調査及び廣田班疫学調査）の解析により、タミフル服用の有無にかかわらず、異常行動はインフルエンザ自体に伴い発現する可能性があることが、より明確となった。
当調査会は、このようなことや、平成19年3月以降の予防的な安全対策（注2）により、それ以後、タミフルの副作用報告において10代の転落・飛び降りによる死亡等の重篤な事例が報告されていないことから、安全対策については一定の効果が認められる一方、これまでに得られた調査結果において10代の予防的な安全対策を変更する積極的な根拠が得られているという認識ではないため、現在の安全対策を継続することが適当と判断した。

- 以上を踏まえ、タミフルについて現在講じられている措置(注2)は、現在も妥当であり、引き続き医療関係者、患者・家族等に対し注意喚起を図ることが適当であると同時に、他の抗インフルエンザウイルス薬についても、同様に異常行動等に関する注意喚起を継続することが適当であると考え。

なお、現在のタミフルの使用上の注意においても、10代のインフルエンザ患者のうち、合併症、既往歴等からインフルエンザ重症化リスクの高い患者に対し、タミフルを慎重に投与することを妨げるものではない趣旨であることが理解されるよう、国は平易に説明するよう努めるべきである。また、新型インフルエンザ対策において、リスク・ベネフィットを考慮して、どのような状況でタミフル等が使用されるべきかについては、関係学会において専門的な立場から助言等をお願いしたい。

(注2)平成19年3月20日の緊急安全性情報：

10歳以上の未成年の患者においては、因果関係は不明であるものの、本剤の服用後に異常行動を発現し、転落等の事故に至った例が報告されている。このため、この年代の患者には、合併症、既往歴等からハイリスク患者と判断される場合を除いては、原則として本剤の使用を差し控えること。

また、小児・未成年者については、万が一の事故を防止するための予防的な対応として、本剤による治療が開始された後は、①異常行動の発現のおそれがあること、②自宅において療養を行う場合、少なくとも2日間、保護者等は小児・未成年者が一人にならないよう配慮することについて患者・家族に対し説明を行うこと。

なお、インフルエンザ脳症等によっても、同様の症状が現れるとの報告があるので、上記と同様の説明を行うこと。

- タミフルの服用と突然死との因果関係については、非臨床試験（動物実験等）、臨床試験（いわゆる夜間心電図試験）等の結果からみて、それを肯定する根拠は示されていないと考えられた。

【非臨床試験（動物実験等）の概要】

バインディング・アッセイの結果については、臨床用量投与時に推定されるタミフルの未変化体(OP)及び活性代謝物(OC)の脳中濃度では、トランスポーターの欠損や代謝阻害があったとしても、多くの中枢性の受容体やイオンチャンネル系への影響を及ぼす可能性は低いとされた。

マウスのジャンピング行動の誘発に関する報告については、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し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とされた。

マウスへの腹腔内投与による体温低下の報告については、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、引き続き関連研究を注視すべきと考えられるとされた。ただし、ウサギプルキンエ線維活動電位試験結果の再解析等からは、オセルタミビルが突然死に結びつくような循環器系への影響を有することを示唆する結果は得られなかった。

【臨床試験（いわゆる夜間心電図試験）の概要】

いわゆる夜間心電図試験において、タミフルの投与により心電図上問題となる影響は認められなかった。

- 厚生労働省等は、引き続き、タミフルの服用と異常な行動等との因果関係についての情報収集に努め、必要な対応を行うべきである。

平成21年6月16日

リン酸オセルタミビルの基礎的調査検討のためのワーキンググループ (基礎WG)における調査検討の結果について

リン酸オセルタミビルの基礎的調査検討のためのワーキンググループ（以下「基礎WG」という。）は、平成19年5月2日、同月30日、10月24日、12月10日、平成20年6月19日及び平成21年2月6日に会議を開催し、リン酸オセルタミビルの安全性について、基礎的な側面から調査検討を行った。

非臨床試験成績を中心とした基礎WGにおける調査検討の結果は、下記のとおりである。

記

第1 オセルタミビルの中樞神経系に対する影響について

1 脳における薬物動態・代謝研究における試験結果

1) 脳内での暴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

リン酸オセルタミビル(OP)の7日齢の幼若ラットへの経口投与による脳内分布が42日齢ラットより約3000倍高いとの結果が申請時に示されていたことから、その機構について明らかにする必要がある。中樞神経系への薬物移行性は、血液脳関門における受動拡散及び能動輸送機構によって影響されることから、基礎WGでは、OP及びその活性代謝物(OC)の脳内移行性に関し、能動輸送機構が果たす役割の検討を求めた。

試験方法としては、マウス及びヒト脳に発現している排泄トランスポーターであるMdr1a/MDR1(P-gp)、Bcrp1/BCRP及びMRP2について、OP及びOCの能動輸送能をtranscellular assay systemを用いた*in vitro*モデルで検討した。その結果、OPは、マウス及びヒトP-糖蛋白(Mdr1a/MDR1; P-gp)の良好な基質であり、基底膜側から管腔側への輸送比は約10倍程度であった。一方OCに対しては、マウス及びヒトMdr1a/MDR1(P-gp)、Bcrp1/BCRP及びMRP2のいずれのトランスポーターも輸送活性を示さなかった。

2) 脳内のカルボキシルエステラーゼ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

OPを高用量投与された幼若及び成熟ラットの脳中にはOPと同時にOCが検出されている知見があることから、基礎WGは脳内で検出されたOCが脳内での代謝による産物であるかどうかを検討するため、また、ヒト脳での存在形態を推定するため、ラット(幼若及び成熟)及びヒト脳及び肝におけるオセルタミビル代謝酵素活性の評価を求めた。

試験方法としては、7日齢(幼若)及び42日齢(成熟)ラット(雌雄)由来の脳及び肝S9画分のオセルタミビル代謝酵素活性を*in vitro*で評価した。その結果、幼若ラット脳S9画分のオセルタミビルエステラーゼ活性は0.2 pmol/min/mg proteinと非常に低かった。また成熟ラット脳S9画分の同酵素活性は0.6 pmol/min/mg proteinであった。ヒト脳S9画分において、オセルタミビルから活性代謝物への加水分解は速やかではなく、ヒト肝S9画分

の 1/300 程度であった。

また、追加試験としてリコンビナントヒトカルボキシエステラーゼ (rHCE1 及び rHCE2) を用いた試験が実施され、OP は HCE1 により加水分解されることが確認された。なお、HCE1 は肝臓以外にも存在するが、その量は肝臓よりかなり少ない (Xie et al 2002)。

3) ラットにおける脳、脳脊髄液及び血漿中濃度の測定

ヒト脳中の OP 及び OC 濃度を予測する目的で、基礎 WG は成熟ラットを用いた血漿、脳脊髄液 (CSF) 及び脳中の OP 及び OC 濃度測定の実施を求めた。

試験方法としては、成熟ラットに OP10 及び 100mg/kg (フリーベース換算、リン酸塩として 13.1 及び 131mg/kg) を尾静脈内投与し、投与後 5、15、30 分、1、2、6 及び 8 時間 (各時点 2 匹) の血漿、CSF 及び脳ホモジネート試料を採取し、LC-MS/MS 法により濃度を測定した。なお、OP 投与試験では採取後の血漿に dichlorvos を添加し、OP から OC への分解を防止した。

ラットに OP100mg/kg を静脈内投与したときの脳ホモジネート/血漿の AUC 比は約 19% であり、OC100mg/kg を静脈内投与したときの脳ホモジネート/血漿の AUC 比は 1.3% であった。

この結果は当初の申請資料に示された経口投与後の体内分布の結果に対応するものである。なお、Ose et al (2008) もマウスに OP を静脈内投与した時の脳中分布量は血漿の 10% 以下であるとしている。

4) ヒトにおける脳脊髄液濃度の測定

健康成人 (白人 4 名、日本人 4 名) に OP を臨床用量の 2 倍に相当する用量 (150mg) を投与したとき OP、OC の血漿中 C_{max} はそれぞれ 120ng/mL、500ng/mL 程度であったのに対し、脳脊髄液中濃度はそれぞれ血漿中濃度の約 2% と 3.5% であった。

2 脳内におけるウイルス以外の内因性標的に対する活性の有無の検証に関する試験結果

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

OP 又は OC が中枢神経系のなんらかの受容体に作用することにより、異常行動などが惹起される可能性があることを考慮し、基礎 WG は中枢作用に関連する受容体と OP 及び OC とのバインディング・アッセイの実施を求めた。

試験方法としては、ドパミン、NMDA 受容体などの情動、行動関連分子を含む 155 のターゲットへの選択性を *in vitro* 放射性リガンドとの結合活性又は酵素反応にて評価した。その結果、5 種のグルタミン酸受容体 (NMDA, AMPA, Kinate, mGlu2, mGlu5)、BZD 受容体 (central 及び peripheral) 等を含む全てのターゲットについて OP、OC とも 30 μ M までの濃度において 50% 以上の阻害活性を認めなかったが、 σ 受容体、Na チャネル、Ca チャネルにおいては、OP によりそれぞれ 34%、38%、41% の結合抑制が認められた。しかし、3 μ M ではそれら 3 受容体への結合抑制についていずれも 20% 以下であった。OC では A1(h) 受容体の抑制が 30 μ M で 27% 認められたが、3 μ M では 20% 以下であった。

2) 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) への OP、OC 選択性の確認

OC はインフルエンザノイラミニダーゼを阻害することにより薬効を発揮するノイラミニダーゼ阻害剤であることから、また、ノイラミニダーゼの変異は様々な疾患に関与している

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

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 の脳内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内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 の脳内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 $2\text{mg}/\text{kg}$ 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、脳内濃度は $1.4 \mu\text{M}$ 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 K_i 値は $175 \mu\text{M}$ 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 $0.2 \mu\text{M}$)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 $10 \mu\text{M}$ 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 D_2 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しよう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枢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、ウサギ単離ブルキン線維試験では、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 μM、OC 10、30、100 μM 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 μM)を用いた。

その結果、OP は最高濃度の 100 μM 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 μM まで、活動電位に対し

て影響を認めなかった。

2) HEK-293 細胞に発現した hERG チャネル電流に対する作用に関する試験

試験には HEK-293 細胞を用い、OP、OC とも 10、30、100 μ M の 3 濃度における hERG テール電流のピークを測定した。試験パルスは保持電位 -80mV、脱分極パルス +20mV(500msec)、再分極パルス -50mV(500msec)とし、15 秒毎に合計 40 刺激を行った。陽性対照には E-4031 100nM を用いた。

その結果、OP は 30 μ M 及び 100 μ M 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。一方、OC では最高濃度の 100 μ M まで、hERG 試験のパラメータに対して影響を認めなかった。

2 基礎 WG の調査検討結果

以上の試験結果から、OP は 30 μ M 以上の高濃度で Na、Ca 及び K チャネルをいずれも抑制する多チャネル阻害作用を有し、これらの効果を総合した結果、表現形としての活動電位では若干の短縮が観察されたものと思われた。しかしながら、この作用が見られた濃度はヒトの臨床血漿中濃度の 100 倍以上であり、安全域は十分確保されているものと判断した。

その他、企業が自主的に実施したウサギプルキンエ線維活動電位試験結果の再解析、未変化体の代謝障害時を想定した PK シミュレーション解析および循環器系の基礎および臨床試験成績に関するエキスパートレポートについても調査検討したが、これら提出された資料においても、オセルタミビルが突然死に結びつくような循環器系への影響を有することを示唆する結果は得られなかった。

第3 意見陳述等に対する基礎 WG の見解まとめ

平成 19 年 6 月 16 日の安全対策調査会において行われた意見陳述等に対する現時点での基礎 WG の見解は以下のとおりである。

- 1) オセルタミビル及びその活性代謝物の脳への移行については、これまでに提出された動物試験成績により明らかになったと考える。また、ヒトの肝エステラーゼの阻害時の挙動についても体内動態シミュレーションの結果からは安全域が保たれていると考えられる。
- 2) 人為的インフルエンザ感染動物のモデルは必ずしも確立しておらず、感染動物を用いた試験の実施は現時点で容易ではないこともあり、現時点では実現していない。
- 3) オセルタミビルが脳浮腫・肺水腫との関係で水チャネルに直接影響を及ぼす可能性については、成熟動物及び幼若動物における反復投与毒性試験において脳浮腫の所見が認められていないこと、肺水腫については、これまで 2 試験で認められているが、いずれも非常に高い用量が投与された動物のみに認められており、また、肺水腫については、アクアポリンが肺胞液の消失過程で重要な役割を果たすわけではないとの報告があることなど、これまで得られたデータからみて否定的である。
- 4) インフルエンザの急性期に血液脳関門機能の低下が認められることについては、脂肪酸代謝異常マウスで示されている(木戸ら 2003)。しかし、タミフル投与後のインフルエンザ脳症患者における脳脊髄液及び脳中の OP 及び OC 濃度は血漿中濃度をはるかに下回る事例 (Straumanis et al 2002) が確認されているが、インフルエンザ患者で脳脊髄液中

濃度が高まることは報告されていない。

- 5) これまでの安全性試験における OP 及び OC の中枢神経系に対する特異的作用は認められていない。死亡例にみられた中枢抑制を非特異的作用と言えるかどうかは、高い用量で現れたものであることから、当該試験結果からは判断できず、臨床的意義は少ないものと思われるが、体温に及ぼす影響に関する試験結果等から、臨床用量との関連については引き続き検討を行う必要がある。
- 6) 現在知られているターゲット(ドパミン、NMDA 受容体、代謝調節型グルタミン酸受容体、BZD 受容体を含む)に対する結合性はいずれも弱く、OP 投与時の脳中濃度から考えると中枢神経系に対して影響を及ぼすとは思われない。
- 7) オセルタミビル活性代謝物がアジア人に一定割合で認められるとされるヒトノイラミニダーゼ NEU2 の変異体を抑制する可能性については、NEU2 のヒトでの分布が筋肉に限定されたとの報告もあり、現段階では突然死や異常行動との関係ははっきりしない。

以上

平成21年6月16日

リン酸オセルタミビルの臨床的調査検討のためのワーキンググループ
(臨床WG)における調査検討の結果について

リン酸オセルタミビルの臨床的調査検討のためのワーキンググループ(以下「臨床WG」という。)は、平成19年5月14日、同年6月4日、同年11月21日、同年12月16日、同月25日、平成20年6月17日、同年7月10日及び平成21年6月3日に会議を開催し、リン酸オセルタミビル(タミフル)等の安全性について、臨床的な側面から調査検討を行った。

疫学調査、臨床試験及び異常な行動、突然死等の副作用報告等の追加調査の結果等(概要等は下記参照)についての臨床WGにおける調査検討の結果は、次のとおりである。

【臨床WGにおける調査検討の結果】

臨床WGにおいて、「インフルエンザに伴う随伴症状の発現状況に関する調査研究」(研究分担者:廣田良夫)(以下「廣田班」という。)の報告、「インフルエンザ様疾患罹患時の異常行動の情報収集に関する研究」(研究代表者:岡部信彦)(以下「岡部班」という。)の報告並びに平成21年3月31日までに報告された異常な行動、突然死等の副作用報告等の追加調査の結果等について、調査検討を行った。

廣田班報告における2006/2007シーズンの調査の解析及び岡部班報告における2006/2007から2008/2009シーズンまでの調査の解析において、異常行動はインフルエンザ自体に伴い発現する可能性があることが明らかに示された。なお、岡部班報告の調査の解析においては、平成19年3月の安全対策措置以前とそれ以降で異常行動の発現率全般に有意な差はなく、2007/2008及び2008/2009シーズンでは異常行動を発現した10代のほとんどがタミフルを服用していないことから、服用の有無にかかわらず、異常行動はインフルエンザ自体に伴い発現する可能性があることが、より明確となった。

さらに、タミフルがインフルエンザに伴う異常行動のリスクを高めるかどうかについては、廣田班報告の調査の解析においては、特に重篤な異常行動(事故につながったりする可能性がある異常行動等)を起こした10代の患者に限定して解析すると、タミフル服用者と非服用者の間に統計的な有意差はないが、非服用者に比べリスク(オッズ比)は1.54倍になるとの数値が示された。また、解析方法の妥当性に関して疫学及び統計学それぞれの専門家から異なる意見があり、データの収集、分析に関わるさまざまな調査の限界を踏まえると廣田班報告の解析結果のみで、タミフルと異常な行動の因果関係に明確な結論を出すことは困難であると判断された。

また、平成19年3月以降の予防的な安全対策(10代に対する原則使用差控え及び異常行動に対する観察等の注意喚起)により、それ以後、タミフルの副作用報告において10代の転落・飛び降りによる死亡等の重篤な事例が報告されていないことから、安全対策については一定の効果が認められる一方、これまでに得られた調査結果において10代の予防的な安全対策を変更する積極的な根拠が得られているという認識ではないため、現在の安全対策を継続することが適当と判断した。

特に、臨床WGの中では、抗インフルエンザウイルス薬を服用しなくても異常行動が発現する可能性があることが明らかになったことから、注意深く患者を観察する等の注意喚起は必要であり、現在の安全対策を継続すべきであるとして意見の一致をみた。今後も、タミフル等の抗インフルエンザウイルス薬と異常行動の発現の推移を含め、引き続き、関係者は情報収集に努め、臨床現場に対しても情報提供を行い、現在の安全対策について適時・適切に必要な対応を検討すべきである。

その他、現在のタミフルの使用上の注意においても、10代のインフルエンザ患者のうち、合併症、既往歴等からインフルエンザ重症化リスクの高い患者に対し、タミフルを慎重に投与することを妨げるものではない趣旨であることが理解されるよう、国は平易に説明するよう努めるべきであること、新型インフルエンザ対策において、リスク・ベネフィットを考慮して、どのような状況でタミフル等が使用されるべきかについては、関係学会において専門的な立場から助言等をお願いしたいこと等の意見があった。

また、タミフルの服用と突然死との因果関係については、臨床試験（いわゆる夜間心電図試験）等の結果からみて、それを肯定する根拠は示されていないと考えられた。

今後とも、異常な行動、突然死等の副作用報告等の状況及び岡部班疫学調査（2009/2010シーズンの調査）の結果等についてフォローアップすべきと考えられる。

第1 疫学調査について

1 「インフルエンザ様疾患罹患時の異常行動の情報収集に関する研究」について

(1) 目的等

○研究名

平成19年度及び平成20年度厚生労働科学研究「インフルエンザ様疾患罹患時の異常行動の情報収集に関する研究」(以下「岡部班疫学調査」という。)

○主任研究者(研究代表者)

岡部信彦(国立感染症研究所感染症情報センター長)

○目的

インフルエンザ様疾患罹患時に発現する異常行動の背景に関する実態把握

○内容

① 2006/2007シーズン(平成18年9月～平成19年7月)の後向き調査

重度調査

- ・対象施設: すべての医療機関
- ・報告対象: インフルエンザ様疾患と診断され、かつ、重度の異常な行動(注1)を示した患者

(注1) 飛び降り、急に走り出すなど、制止しなければ生命に影響が及ぶ可能性のある行動

② 2007/2008シーズン(平成19年8月～平成20年3月)及び2008/2009シーズン(平成20年11月～平成21年3月)の前向き調査

重度調査

- ・対象施設: すべての医療機関
- ・報告対象: インフルエンザ様疾患と診断され、かつ、重度の異常な行動(注1)を示した患者

(注1) 飛び降り、急に走り出すなど、制止しなければ生命に影響が及ぶ可能性のある行動

軽度調査

- ・対象施設: インフルエンザ定点医療機関
- ・報告対象: インフルエンザ様疾患と診断され、かつ、軽度の異常な行動(注2)を示した患者

(注2) 何かにおびえて手をばたばたさせるなど、その行動自体が生命に影響を及ぼすことは考えられないものの、普段は見られない行動

(2) 報告された結果(概要)

《2006/2007シーズンの重度調査の結果(概要)》

- 重度の異常な行動は164例報告され、2006/2007シーズン前のものなど27例を除外し、137例について分析が行われた。
- 重度の異常な行動137例の年齢は、10歳未満58例(42%)、10歳代76例(55%)、20歳以上3例(2%) (平均10.11歳)であった。また、性別は、男性101例(74%)、女性36例(26%)であり、男性が多かった。

	例数 (%)
10歳未満	58 (42)
10歳代	76 (55)
20歳以上	3 (2)
合計	137

	例数 (%)
男性	101 (74)
女性	36 (26)
合計	137

- また、重度の異常な行動 137 例のうち、タミフル服用の有無は、有り 82 例 (60%)、無し 52 例 (38%)、不明 3 例 (2%) であった。

同様に、シンメトレル服用の有無は、有り 5 例 (4%)、無し 110 例 (80%)、不明 22 例 (16%)、リレンザ使用の有無は、有り 9 例 (7%)、無し 105 例 (76%)、不明 23 例 (17%) であった。

	例数 (%)		例数 (%)		例数 (%)
タミフル服用有り	82 (60)	シンメトレル服用有り	5 (4)	リレンザ使用有り	9 (7)
タミフル服用無し	52 (38)	シンメトレル服用無し	110 (80)	リレンザ使用無し	105 (76)
不明	3 (2)	不明	22 (16)	不明	23 (17)
合計	137	合計	137	合計	137

- 異常行動と睡眠の関係については、重度の異常な行動 137 例のうち、「異常行動は覚醒していて徐々に起こった」30 例 (22%)、「異常行動は眠りから覚めて直ぐに起こった」71 例 (52%)、不明・その他 36 例 (26%) であった。タミフルの服用の有無でみると、タミフル服用有り群 82 例で前者が 20 例 (24%)、後者が 42 例 (52%)、不明・その他 20 例 (24%)、タミフル服用無し群 52 例で前者が 10 例 (19%)、後者が 26 例 (50%)、不明・その他 16 例 (31%) であり、タミフル服用の有無で差はなかった。

	タミフル服用有り群 (%)	タミフル服用無し群 (%)	不明	合計 (%)
異常行動は覚醒していて徐々に起こった	20 (24)	10 (19)	0	30 (22)
異常行動は眠りから覚めて直ぐに起こった	42 (52)	26 (50)	3	71 (52)
不明・その他	20 (24)	16 (31)	0	36 (26)
合計	82	52	3	137

- 下表のとおり、10 歳代での異常な行動と 10 歳未満での異常な行動との比率は、平成 19 年 3 月 20 日の通知 (注) 前後で有意な差はなかった。

(注) 10歳以上の未成年の患者においては原則としてタミフルの使用を差し控えること等を内容とする緊急安全性情報発出の指示通知 (平成19年3月20日付け)

【年齢別の報告数】

	10 歳未満	10 歳代	計	確率値
平成19年3月20日以前	39	51	90	0.690
平成19年3月21日以後	17	18	35	
計	56	69	125	

- 通知後は、タミフルの処方率は相当程度減少したと思われるが、10 歳代での異常な行動が有意に減少したとは言えなかった。
- 重度の異常な行動の内容を突然の走り出し・飛び降り (72 例) のみに限定しても、上記の結果は変わらなかった。
- この調査の限界と課題は、以下のとおりである。
- ・ 本調査は、後向き調査で行われたので、バイアスが生じている可能性がある。
 - ・ タミフルの処方率が正確には分からないので、異常な行動の発現率の厳密な推定、タミフル服用の有無別の比較は難しい。

《2007/2008 シーズン及び 2008/2009 シーズンの重度調査及び軽度調査の結果（概要）》
 〈2007/2008 シーズン及び 2008/2009 シーズンの重度調査〉

- 2007/2008 シーズン及び 2008/2009 シーズンの重度の異常な行動は、それぞれ、88 例及び 185 例報告され、日時不明のものなど 11 例及び 6 例を除外し、77 例及び 179 例について分析が行われた。
- 重度の異常な行動 77 例(2007/2008 シーズン)及び 179 例(2008/2009 シーズン)の年齢は、それぞれ、10 歳未満 49 例(64 %)及び 112 例(63 %)、10 歳代 26 例(34 %)及び 62 例(35 %)、20 歳以上 2 例(3 %)及び 5 例(3 %)、平均 8.66 歳及び 8.89 歳であった。また、性別は、男性 55 例(71 %)及び 118 例(66 %)、女性 22 例(29 %)及び 61 例(34 %)であり、男性が多かった。

	例数 (%)	
	2007/2008	2008/2009
10 歳未満	49 (64)	112 (63)
10 歳代	26 (34)	62 (35)
20 歳以上	2 (3)	5 (3)
合計	77	179

	例数 (%)	
	2007/2008	2008/2009
男性	55 (71)	118 (66)
女性	22 (29)	61 (34)
合計	77	179

- 発熱から異常行動発現までの日数については、重度の異常な行動 77 例(2007/2008 シーズン)及び 179 例(2008/2009 シーズン)のうち、それぞれ、不明な 2 例及び 5 例を除くと、発熱後 1 日以内が 25 例(33 %)及び 47 例(27 %)、2 日目が 37 例(49 %)及び 87 例(51 %)、3 日目が 11 例(15 %)及び 22 例(13 %)、4 日目以降が 2 例(3 %)及び 17 例(10 %)であった。

	例数 (%)	
	2007/2008	2008/2009
発熱後 1 日以内	25 (33)	47 (27)
2 日目	37 (49)	87 (51)
3 日目	11 (15)	22 (13)
4 日目	2 (3)	17 (10)
合計	75	174

- また、重度の異常な行動 77 例(2007/2008 シーズン)及び 179 例(2008/2009 シーズン)のうち、タミフル服用の有無は、それぞれ、有り 24 例(31 %)及び 76 例(42 %)、無し 50 例(65 %)及び 81 例(46 %)、不明 3 例(4 %)及び 22 例(12 %)であった。
 同様に、シンメトレル服用の有無は、有り 0 例(0 %)及び 0 例(0 %)、無し 62 例(81 %)及び 134 例(75 %)、不明 15 例(19 %)及び 45 例(25 %)、リレンザ使用の有無は、有り 11 例(14 %)及び 43 例(24 %)、無し 53 例(69 %)及び 108 例(60 %)、不明 13 例(17 %)及び 28 例(16 %)、アセトアミノフェン服用の有無は、有り 33 例(43 %)及び 65 例(36 %)、無し 34 例(44 %)及び 77 例(43 %)、不明 10 例(13 %)及び 37 例(21 %)であった。

タミフル	例数 (%)	
	2007/2008	2008/2009
服用有り	24 (31)	76 (42)
服用無し	50 (65)	81 (46)
不明	3 (4)	22 (12)
合計	77	179

シメトレル	例数 (%)	
	2007/2008	2008/2009
服用有り	0 (0)	0 (0)
服用無し	62 (81)	134 (75)
不明	15 (19)	45 (25)
合計	77	179

リレンザ	例数 (%)	
	2007/2008	2008/2009
使用有り	11 (14)	43 (24)
使用無し	53 (69)	108 (60)
不明	13 (17)	28 (16)
合計	77	179

アセトアミノフェン	例数 (%)	
	2007/2008	2008/2009
服用有り	33 (43)	65 (36)
服用無し	34 (44)	77 (43)
不明	10 (13)	37 (21)
合計	77	179

- 異常行動と睡眠の関係については、重度の異常な行動 77 例 (2007/2008 シーズン) 及び 179 例 (2008/2009 シーズン) のうち、それぞれ、「異常行動は覚醒していて徐々に起こった」11 例 (14 %) 及び 40 例 (22 %)、「異常行動は眠りから覚めて直ぐに起こった」48 例 (63 %) 及び 111 例 (62 %)、不明 18 例 (23 %) 及び 7 例 (4 %)、その他 0 例 (0 %) 及び 21 例 (12 %) であった。タミフルの服用の有無でみると、タミフル服用有り群 24 例及び 76 例で、前者が 1 例 (4 %) 及び 21 例 (28 %)、後者が 17 例 (71 %) 及び 43 例 (56 %)、不明 6 例 (25 %) 及び 2 例 (3 %)、その他 0 例 (0 %) 及び 10 例 (13 %)、タミフル服用無し群 50 例及び 81 例で、前者が 9 例 (18 %) 及び 16 例 (20 %)、後者が 30 例 (60 %) 及び 53 例 (65 %)、不明 11 例 (22 %) 及び 3 例 (4 %)、その他 0 例 (0 %) 及び 9 例 (11 %) であり、タミフル服用の有無で大きな差はなかった。

2007/2008 シーズン	タミフル服用有り群 (%)	タミフル服用無し群 (%)	不明	合計 (%)
異常行動は覚醒していて徐々に起こった	1 (4)	9 (18)	1	11 (14)
異常行動は眠りから覚めて直ぐに起こった	17 (71)	30 (60)	1	48 (63)
不明	6 (25)	11 (22)	1	18 (23)
その他	0 (0)	0 (0)	0	0 (0)
合計	24	50	3	77

2008/2009 シーズン	タミフル服用有り群 (%)	タミフル服用無し群 (%)	不明	合計 (%)
異常行動は覚醒していて徐々に起こった	21 (28)	16 (20)	3	40 (22)
異常行動は眠りから覚めて直ぐに起こった	43 (56)	53 (65)	15	111 (62)
不明	2 (3)	3 (4)	2	7 (4)
その他	10 (13)	9 (11)	2	21 (12)
合計	76	81	22	179

- 重度の異常な行動 77 例 (2007/2008 シーズン) 及び 179 例 (2008/2009 シーズン) の分類 (複数回答) については、それぞれ、突然走り出す 35 例及び 86 例、おびえ・恐慌状態 22 例及び 70 例、わめく・泣きやまない 20 例及び 57 例、激しいうわごと・寝言 24 例及び 48 例の順に多く、2006/2007 シーズンと同様の傾向であった。

- 重度の異常な行動の内容を突然の走り出し・飛び降り（41例及び87例）のみに限定しても、上記の結果は変わらなかった。

〈2007/2008シーズンの軽度調査〉

注) 2008/2009シーズンの軽度調査の結果は、現在取りまとめ中

- 軽度の異常な行動は 532 例報告され、日時不明のものなど 12 例を除外し、520 例について分析が行われた。
- 軽度の異常な行動 520 例の年齢は、10 歳未満 432 例（83 %）、10 歳代 74 例（14 %）、不明 14 例（3 %）（平均 6.6 歳）であった。また、性別は、男性 307 例（59 %）、女性 210 例（40 %）、不明 3 例（1 %）であり、男性が多かった。

	例数 (%)
10 歳未満	432 (83)
10 歳代	74 (14)
20 歳以上	0 (0)
不明	14 (3)
合計	520

	例数 (%)
男性	307 (59)
女性	210 (40)
不明	3 (1)
合計	520

- また、軽度の異常な行動 520 例のうち、タミフル服用の有無は、有り 211 例（41 %）、無し 274 例（52 %）、不明 35 例（7 %）であった。

同様に、シンメトレル服用の有無は、有り 4 例（1 %）、無し 404 例（77 %）、不明 112 例（22 %）、リレンザ使用の有無は、有り 72 例（14 %）、無し 351 例（67 %）、不明 97 例（19 %）であった。

	例数 (%)
タミフル服用有り	211 (41)
タミフル服用無し	274 (52)
不明	35 (7)
合計	520

	例数 (%)
シンメトレル服用有り	4 (1)
シンメトレル服用無し	404 (77)
不明	112 (22)
合計	520

	例数 (%)
リレンザ使用有り	72 (14)
リレンザ使用無し	351 (67)
不明	97 (19)
合計	520

- 異常行動と睡眠の関係については、軽度の異常な行動 520 例のうち、「異常行動は覚醒していて徐々に起こった」122 例（24 %）、「異常行動は眠りから覚めて直ぐに起こった」270 例（52 %）、その他・不明 128 例（25 %）であった。タミフルの服用の有無でみると、タミフル服用有り群 211 例で前者が 41 例（19 %）、後者が 106 例（51 %）、その他・不明 64 例（30 %）、タミフル服用無し群 274 例で前者が 73 例（27 %）、後者が 148 例（54 %）、その他・不明 53 例（19 %）であり、タミフル服用の有無で大きな差はなかった。

	タミフル服用有り群 (%)	タミフル服用無し群 (%)	不明	合計 (%)
異常行動は覚醒していて徐々に起こった	41 (19)	73 (27)	8	122 (24)
異常行動は眠りから覚めて直ぐに起こった	106 (51)	148 (54)	16	270 (52)
その他・不明	64 (30)	53 (19)	11	128 (25)
合計	211	274	35	520

〈2007/2008 シーズン及び 2008/2009 シーズンの重度調査のまとめ〉

- 2007/2008 は、2006/2007 シーズンに比べ、発生動向調査によるインフルエンザ様疾患患者報告数が少なかった（2006/2007 シーズンに比べ、患者の年齢別にみると、0 - 4 歳、5 - 9 歳の割合が多かった。）。また、2008/2009 シーズンは、2007/2008 シーズンに比べ、発生動向調査によるインフルエンザ様疾患患者報告数は多かった。
- 重度の異常行動は、2007/2008 シーズン及び 2008/2009 シーズンともに、平均 8 歳、男性に多く、発熱後 2 日以内の発現が多かった。
- 重度の異常行動における薬剤服用の割合は、2007/2008 シーズン及び 2008/2009 シーズンにおいて、それぞれ、タミフルの服用は 31 %及び 42 %、リレンザの使用は 14 %及び 24 %、アセトアミノフェンの服用は 43 %及び 36 %だった。
- 睡眠との関係は、2007/2008 シーズン及び 2008/2009 シーズンともに、眠りから覚めて直ぐに起こったものが多かった。
- 2006/2007 シーズンと 2007/2008 シーズンを比べると、薬剤服用の割合に違いが見られたが、性別や異常行動の分類別の割合では、殆ど違いは見られなかった。2007/2008 シーズンと 2008/2009 シーズンを比べた場合も同様であった。

〈参考：年齢群別異常行動発現率の経年比較〉

※ 発現率の分母は、年齢区分別の発生動向調査からの推定患者数

(2006/2007 シーズンの通知前との比較 (重度の異常行動))

発現率(%)	2007年3月 20日以前	2007/2008シーズン 2008/2009シーズン	発現率の比	95%信頼区間	
				下限	上限
10歳未満	0.0000126	0.0000187	.6725543	.4738345	.9546145
10歳代	0.000022	0.0000216	1.016379	.7182737	1.438207

(2006/2007 シーズンの通知後との比較 (重度の異常行動))

発現率(%)	2007年3月 20日以後	2007/2008シーズン 2008/2009シーズン	発現率の比	95%信頼区間	
				下限	上限
10歳未満	0.0000157	0.0000187	.8414886	.5103252	1.387553
10歳代	0.0000346	0.0000216	1.600432	.9624689	2.661262

(2006/2007 シーズンの通知前との比較 (走り出し、飛び降りのみ))

発現率(%)	2007年3月 20日以前	2007/2008シーズン 2008/2009シーズン	発現率の比	95%信頼区間	
				下限	上限
10歳未満	0.00000742	0.00000847	.875897	.5477455	1.400642
10歳代	0.0000129	0.0000125	1.037121	.6584207	1.633637

(2006/2007 シーズンの通知後との比較 (走り出し、飛び降りのみ))

発現率(%)	2007年3月 20日以後	2007/2008シーズン 2008/2009シーズン	発現率の比	95%信頼区間	
				下限	上限
10歳未満	0.00000556	0.00000847	.6558661	.285184	1.508361
10歳代	0.0000115	0.0000125	.9254326	.3964459	2.160258

(5 歳刻みでの比較 (重度の異常行動))

		発現率の比	95 %信頼区間	
			下限	上限
2007 年 3 月 20 日 以前と 2007/2008 シーズン及び 2008/2009 シーズンとの比較	5 歳未満	.5840734	.2594405	1.314913
	5 - 9 歳	.6980793	.4728271	1.030641
	10 - 14 歳	1.024899	.7063877	1.487027
	15 - 19 歳	2.184836	.6934387	6.883822
2007 年 3 月 20 日 以後と 2007/2008 シーズン及び 2008/2009 シーズンとの比較	5 歳未満	.3697504	.0889327	1.537289
	5 - 9 歳	1.130923	.661351	1.9339
	10 - 14 歳	1.995648	1.163287	3.423584
	15 - 19 歳	1.961896	.3806383	10.11205

(5 歳刻みでの比較 (走り出し、飛び降りのみ))

		発現率の比	95 %信頼区間	
			下限	上限
2007 年 3 月 20 日 以前と 2007/2008 シーズン及び 2008/2009 シーズンとの比較	5 歳未満	.8112103	.3011832	2.184923
	5 - 9 歳	.9137064	.5345999	1.561653
	10 - 14 歳	.9874282	.6104609	1.597178
	15 - 19 歳	1.248483	.3352594	4.649267
2007 年 3 月 20 日 以後と 2007/2008 シーズン及び 2008/2009 シーズンとの比較	5 歳未満	.7189554	.1668227	3.098481
	5 - 9 歳	.7017565	.2538173	1.940223
	10 - 14 歳	1.220192	.5211484	2.8569
	15 - 19 歳	0	N.A.	N.A.

- 通知の対象である 10 歳代の重度の異常行動、あるいは走り出し・飛び降りに関しては、2006/2007 シーズンの通知前と 2007/2008 シーズン及び 2008/2009 シーズンでは発現率に有意な差はない。10 - 14 歳においては、2006/2007 シーズン通知後よりも 2007/2008 シーズン及び 2008/2009 シーズンの方が重度の異常行動の発現率が有意に低い (走り出し・飛び降りに限定すれば有意差はない。)
- タミフルの使用差し控えによって大幅に異常行動が減ったわけではない。ただし、2006/2007 シーズンは後向き調査、2007/2008 シーズン及び 2008/2009 シーズンは前向き調査であることに留意する必要がある (2006/2007 シーズンの調査は、後向き調査で、また、10 歳代のタミフル服用患者の転落・飛び降りが社会問題化していたことが影響したため、10 歳代を中心とした重度事例の報告が相対的に多くなされ、他方、10 歳未満の重度事例については患者・家族からの情報が得られず報告がなされにくい環境であった可能性がある。2007/2008 シーズン及び 2008/2009 シーズンは、前向き調査であり、また、事前にタミフルの服用の有無を問わず小児・未成年者全般において重度の異常行動のおそれがあることの注意喚起が徹底されたため、2006/2007 シーズンに比べ 10 歳未満の重度事例の報告が多くなされる環境になった可能性がある。)

(3) 臨床WGの意見・考察

岡部班疫学調査 (2006/2007 シーズン、2007/2008 シーズン及び 2008/2009 シーズンの重度調査等) の結果についての当臨床WGの意見・考察は、以下のとおりである。

- 2006/2007 シーズンの重度調査により、インフルエンザ様疾患と診断され、かつ、重度の異常行動発現例のうち、タミフルを服用していない例が 38 %を占めるということが明らかとなり、更に 2007/2008 シーズン及び 2008/2009 シーズンの重度調査においてもタミフルを服用していない例が 65 %及び 46 %を占めていた。このようなことから、異常行動はインフルエンザ自体に伴い発生する可能性があることが明らかに示された。
- 平成 19 年 3 月の安全対策措置以前とそれ以降で異常行動の発現率全般に有意な差はなく、2007/2008 及び 2008/2009 シーズンでは異常行動を発現した 10 代のほとんどがタミフルを服用していないことから、服用の有無にかかわらず、異常行動はインフルエンザ自体に伴い発現する可能性があることが、より明確となった。
インフルエンザ様疾患と診断された小児・未成年者は、重度の異常行動の発現のおそれがあることについて、引き続き注意喚起が必要と考えられた。
- 2009/2010 シーズンにおいても、前向き調査（重度調査及び軽度調査）を実施する予定とされており、引き続き、その結果等についてフォローアップすべきと考えられる。

2 「インフルエンザに伴う随伴症状の発現状況に関する調査研究」について

(1) 目的等

○研究名

平成 19 年度及び平成 20 年度厚生労働科学研究「インフルエンザに伴う随伴症状の発現状況に関する調査研究」（以下「廣田班疫学調査」という。）

○分担研究者（研究分担者）

廣田良夫（大阪市立大学大学院医学研究科公衆衛生学教授）

○目的

インフルエンザを発症した 18 歳未満の者における臨床症状と治療薬剤との関連の調査

廣田班疫学調査は、平成 17 年度厚生労働科学研究「インフルエンザに伴う随伴症状の発現状況に関する調査研究」（主任研究者：横田俊平（横浜市立大学大学院医学研究科発生生育小児医療学教授））の結果（注）を踏まえ、平成 18 年度において調査対象人数の拡大、調査対象年齢の引上げ（18 歳未満）、臨床症状発現と薬剤使用との時間的関係の検討を可能とすること等を図った上で、平成 17 年度の調査と同様の方法により収集された調査票を基に、データベースを作成し、解析を行ったものである。

（注）平成17年度分担研究報告書（抜粋）

薬剤使用状況と臨床症状との関連性について検討したところ、タミフルと異常言動との関連性はタミフル未使用での発現頻度は10.6%であったのに対し、タミフル使用では11.9%と有意差を認めなかった。なお、同じ期間に異常言動発現とタミフル使用があった場合に、異常言動発現前にタミフルを使用したと仮定した場合のハザード比は1.16で、 p 値0.259で有意差はなく、一方、異常言動発現後にタミフルを使用したと仮定した場合のハザード比は0.90であり、 p 値0.463でやはり有意差は認められなかった。

○内容

① 経過観察調査

- ・ 2006/2007 シーズンにインフルエンザ感染を最初に確認した患者について、参加医師が定めた特定の日（調査開始日）から連続した10例以上を調査。
- ・ 参加医師は、「医師用調査票」に患者基本情報（注1）を記入し、患者・家族に「患者家族用調査票」を渡し、必要事項（注2）の記入等を依頼。再診時又は返送にて「患者家族用調査票」を回収し、その内容を基に「医師用調査票」に臨床症状、治療薬剤等（注3）を記入。「医師用調査票」、「患者家族用調査票」等をまとめて研究班に送付。

（注1）性別、生年月日、初診日時、今シーズンのワクチン接種回数、迅速診断キットによる診断の有無、インフルエンザの診断（A型、B型、型不明）、既往歴の有無等、最初の発熱（度）、発熱の測定日時等

（注2）生年月日、性別、初診日時、最初に発熱した日時、その時の体温、受診までに使用した薬剤（市販薬など）、薬の使用・体温・症状の経過（時間軸に具体的に記載）、異常行動・異常言動の有無等、異常行動・異常言動の具体的な内容等

（注3）臨床症状（意識障害、無熱性けいれん、熱性けいれん、異常行動・異常言動、肺炎・気管支炎の併発、中耳炎の併発、筋炎の併発）の発現の有無、有りの場合、最初の発現日時～その消失日時、治療薬剤の種類（シメトレル、タミフル、リレンザ、アセトアミノフェン、非ステロイド性抗炎症薬、抗菌薬、その他の薬剤）等

② 事例調査

- ・ 2006/2007 シーズンにインフルエンザ罹患後の重篤な精神神経症状（意識障害、けいれん、異常行動など）事例を診察した場合に報告。ただし、上記①の経過観察調査で報告した事例については不要。
- ・ 参加医師は、医師用の「事例調査票」に必要事項（注4）を記入し、研究班に送付。

（注4）性別、生年月日、初診日時、今シーズンのワクチン接種回数、迅速診断キットによる診断の有無、インフルエンザの診断（A型、B型、型不明）、既往歴の有無等、最初の発熱（度）、発熱の測定日時、重篤な精神神経

症状（意識障害、無熱性けいれん、熱性けいれん、異常行動・異常言動）の有無、有りの場合、最初の発現日時～その消失日時、治療薬剤の種類（シンメトレル、タミフル、リレンザ、アセトアミノフェン、非ステロイド性抗炎症薬、抗菌薬、その他の薬剤）等

③ その他

- ・ 上記①経過観察調査及び②事例調査に当たり、異常行動・異常言動については、以下の5つの分類で報告。
 - A群： 事故につながったり、他人に危害を与えたりする可能性がある異常な行動
 - B群： 幻視・幻覚・感覚の混乱
 - C群： うわごと・歌を唱う・無意味な動き
 - D群： おびえ・恐怖・怒る・泣き出す・笑う・無表情・無反応
 - E群： 何でも口に入れてしまう
- ・ 研究班に送付された調査票について、CRO（医薬品開発業務受託機関）に委託し、データベースを作成。また、薬剤師による点検等を実施。

(2) 報告された結果（概要）

報告された廣田班疫学調査の結果の概要は、以下のとおりである。

- 協力機関は 697 施設（医師用調査票提出 664、患者家族用調査票提出 690、両方提出 656）、提出された症例数は 10,745 人であった（医師用調査票 10,316、患者家族用調査票 10,103、両方あり 9,674）。医師用調査票の提出があった 10,316 人のうち、最終的に 9,666 人を解析対象とした（除外理由：登録時年齢が 18 歳以上 21、受診前に異常行動・異常言動発現 351、「異常行動・異常言動の有無」と「異常行動・異常言動 A-E」の両方が欠損 278）。
- 異常行動・異常言動の発現頻度は、「全異常行動・異常言動」12 %、「異常行動・異常言動 A」0.4 %、「異常行動・異常言動 B-E」11 %であった。「異常行動・異常言動 A」は「事故につながったり、他人に危害を与えたりする可能性がある異常な行動」であり、最も重篤な異常行動・異常言動である。

（性別の異常行動・異常言動発現頻度）

	異常行動・異常言動発現頻度 n / N (%)		
	全異常行動・異常言動	異常行動・異常言動 A	異常行動・異常言動 B-E
性			
男	656 / 5,106 (13)	26 / 5,096 (0.5)	620 / 5,070 (12)
女	470 / 4,560 (10)	9 / 4,552 (0.2)	453 / 4,543 (10)
計	1,126 / 9,666 (12)	35 / 9,648 ^{注1)} (0.4)	1,073 / 9,613 ^{注2)} (11)

注1) 解析対象 9,666 人のうち、異常行動・異常言動の有無に「あり」と回答したが A-E の分類が欠損値であった者(18 人)を除外。なお、異常行動・異常言動 B-E を発現した者は「異常行動・異常言動 A なし」と扱った。

注2) 解析対象 9,666 人のうち、異常行動・異常言動の有無に「あり」と回答したが A-E の分類が欠損値であった者(18 人)、異常行動・異常言動 A を発現した者(35 人)を除外。

(特性比較；性・年齢)

特性		オセルタミビル服薬あり (N=7,438)	オセルタミビル服薬なし (N=2,228)	P 値 ^{注)}	不明	
					オセルタミビル服薬あり	オセルタミビル服薬なし
男 年齢	n (%)	3,924 (53)	1,182 (53)	0.806	0	0
	平均±標準偏差	7.5 ± 3.9	8.4 ± 4.0	<0.0001	1	1
	中央値(範囲)	7 (0-17)	9 (0-17)	<0.0001		
< 10 歳	n (%)	5,117 (69)	1,284 (58)			
≥ 10 歳	n (%)	2,320 (31)	943 (42)	<0.0001		

注) 連続変数のうち、「平均±標準偏差」表記については Student の t 検定、「中央値 (範囲)」表記については Wilcoxon の順位和検定。カテゴリ変数についてはカイ 2 乗検定。

(特性比較；異常行動・異常言動発現頻度)

特性		オセルタミビル服薬あり	オセルタミビル服薬なし	P 値*
全異常行動・異常言動 あり ^{注1)}	n (%)	N=7,438 ^{注2)} 840 (11)	N=2,228 ^{注2)} 286 (13)	0.046
	うち、オセルタミビル服薬後に発現したことが明確な者 n (%)	777 (93)	—	—
異常行動・異常言動 A あり ^{注1)}	n (%)	N=7,527 ^{注3)} 28 (0.4)	N=2,121 ^{注3)} 7 (0.3)	0.777
	うち、オセルタミビル服薬後に発現したことが明確な者 n (%)	25 (89)	—	—
異常行動・異常言動 B-E あり ^{注1)}	n (%)	N=7,394 ^{注4)} 796 (11)	N=2,219 ^{注4)} 277 (12)	0.024
	うち、オセルタミビル服薬後に発現したことが明確な者 n (%)	742 (93)	—	—

*カイ 2 乗検定。

注 1) 「あり」と「うち、オセルタミビル服薬後に発現したことが明確な者」の差は、オセルタミビル服薬と異常行動・異常言動発現の時間的前後関係が不明の者。

注 2) 解析対象 9,666 人 (オセルタミビル服薬あり 7,545 人、オセルタミビル服薬なし 2,121 人) のうち、異常行動・異常言動発現後にオセルタミビルを服薬した者 107 人を「服薬なし」として取り扱ったため、オセルタミビル服薬あり 7,438 人、オセルタミビル服薬なし 2,228 人となった。

注 3) 解析対象 9,666 人のうち、異常行動・異常言動の有無に「あり」と回答したが A-E の分類が欠損値であった者 (18 人) を除外 (9,648 人：うち、オセルタミビル服薬あり 7,529 人、オセルタミビル服薬なし 2,119 人)。なお、異常行動・異常言動 B-E を発現した者は「異常行動・異常言動 A なし」として取り扱った。さらに、異常行動・異常言動 A 発現後にオセルタミビルを服薬した者 2 人を「服薬なし」として取り扱ったため、オセルタミビル服薬あり 7,527 人、オセルタミビル服薬なし 2,121 人となった。

注 4) 解析対象 9,666 人のうち、異常行動・異常言動の有無に「あり」と回答したが A-E の分類が欠損値であった者 (18 人)、異常行動・異常言動 A を発現した者 (35 人) を除外 (9,613 人：うち、オセルタミビル服薬あり 7,499 人、オセルタミビル服薬なし 2,114 人)。さらに、異常行動・異常言動 B-E 発現後にオセルタミビルを服薬した者 105 人を「服薬なし」として取り扱ったため、オセルタミビル服薬あり 7,394 人、オセルタミビル服薬なし 2,219 人となった。

(特性比較；インフルエンザワクチン接種、インフルエンザの診断型)

特性		オセルタミビル服薬あり (N=7,438)	オセルタミビル服薬なし (N=2,228)	P 値 ^{注)}	不明	
					オセルタミビル服薬あり	オセルタミビル服薬なし
当該シーズンのインフルエンザワクチン接種回数					150	53
0回	n(%)	4,466 (61)	1,410 (65)	0.011		
1回	n(%)	580 (8)	157 (7)			
2回	n(%)	2,242 (31)	608 (28)			
迅速診断キットによるインフルエンザの診断型					3	1
A型	n(%)	4,017 (54.0)	973 (43.7)	<0.0001		
B型	n(%)	3,293 (44.5)	1,223 (54.9)			
A・B型両方	n(%)	24 (0.3)	7 (0.3)			
型識別不能	n(%)	67 (0.9)	18 (0.8)			

* カイ 2 乗検定。

(特性比較；治療薬剤)

特性		オセルタミビル服薬あり (N=7,438)	オセルタミビル服薬なし (N=2,228)	P 値*
アマンタジン (あり)	n(%)	3 (0.04)	18 (0.8)	<0.0001
オセルタミビル (あり)	n(%)	7,438 (100)	107 (4.8) ^{注)}	—
ザナミビル (あり)	n(%)	26 (0.3)	846 (38.0)	<0.0001
アセトアミノフェン (あり)	n(%)	3,959 (53.2)	1,114 (50.0)	0.008
非ステロイド性抗炎症薬 (あり)	n(%)	267 (3.6)	105 (4.7)	0.016
抗菌薬 (あり)	n(%)	1,265 (17.0)	463 (20.8)	<0.0001
その他 (あり)	n(%)	3,952 (53.1)	1,469 (65.9)	<0.0001

* カイ 2 乗検定。

注) 異常行動・異常言動発現後にオセルタミビルを服薬した者。

- 施設差を考慮した conditional logistic model による解析の結果、オセルタミビル服薬の multivariate odds ratio (OR) は、「全異常行動・異常言動」に対して 0.62 (95% CI : 0.51-0.76)、「異常行動・異常言動 A」に対して 1.25 (0.37-4.23)、「異常行動・異常言動 B-E」に対して 0.60 (0.49-0.74) であった。同様の OR は、10 歳未満に限定すると 0.60 (0.47-0.76)、0.91 (0.17-4.95)、0.59 (0.46-0.75)、10 歳以上に限定すると 0.89 (0.53-1.49)、1.54 (0.09-26.2)、0.82 (0.48-1.41) となった (下表参照)。
- その他、男、異常行動・異常言動の既往、報告期間中の最高体温、などが異常行動・異常言動に対する OR の上昇と関連した。
- オセルタミビル服薬と異常行動・異常言動の間に、有意な正の関連を認めるには至らなかった。オセルタミビル服薬の OR は、最も重篤な「異常行動・異常言動 A」に対し 1 を超えたが、有意には至らなかった。但し、これらの所見は、直ちに「オセルタミビル使用と異常行動・異常言動の間に関連がない」ことを意味するものではない。

【単変量・多変量解析】

(「全異常行動・異常言動」に対する「オセルタミビル服薬 (あり)」のオッズ比および 95 %信頼区間)

	全異常行動・異常言動あり	Unconditional (OR (95%CI), P 値)		Conditional (OR (95%CI), P 値)	
	n / N (%)	Univariate	Multivariate	Univariate	Multivariate
オセルタミビル服薬 なし	286/2,228 (13)	1	1	1	1
あり	840/7,438 (11)	0.86 (0.75-0.99) 0.047	0.69 (0.59-0.81) <0.0001	0.82 (0.68-0.98) 0.030	0.62 (0.51-0.76) <0.0001

(「異常行動・異常言動 A」に対する「オセルタミビル服薬 (あり)」のオッズ比および 95 %信頼区間)

	全異常行動・異常言動あり	Unconditional (OR (95%CI), P 値)		Conditional (OR (95%CI), P 値)	
	n / N (%)	Univariate	Multivariate	Univariate	Multivariate
オセルタミビル服薬 なし	7/2,121 (0.3)	1	1	1	1
あり	28/7,527 (0.4)	1.13 (0.49-2.59) 0.777	1.14 (0.47-2.81) 0.771	1.32 (0.47-3.66) 0.599	1.25 (0.37-4.23) 0.719

(「異常行動・異常言動 B-E」に対する「オセルタミビル服薬 (あり)」のオッズ比および 95 %信頼区間)

	全異常行動・異常言動あり	Unconditional (OR (95%CI), P 値)		Conditional (OR (95%CI), P 値)	
	n / N (%)	Univariate	Multivariate	Univariate	Multivariate
オセルタミビル服薬 なし	277/2,219 (12)	1	1	1	1
あり	796/7,394 (11)	0.85 (0.73-0.98) 0.024	0.67 (0.57-0.79) <0.0001	0.79 (0.66-0.96) 0.015	0.60 (0.49-0.74) <0.0001

(10 歳未満に限定した場合の、各異常行動・異常言動に対するオッズ比および 95 %信頼区間 (unconditional))

	全異常行動・異常言動		異常行動・異常言動 A		異常行動・異常言動 B-E	
	Univariate	Multivariate	Univariate	Multivariate	Univariate	Multivariate
オセルタミビル服薬 (あり)	0.74 (0.63-0.88)	0.65 (0.55-0.78)	0.87 (0.32-2.34)	0.95 (0.32-2.85)	0.73 (0.62-0.87)	0.64 (0.54-0.77)

(10 歳未満に限定した場合の、各異常行動・異常言動に対するオッズ比および 95 %信頼区間 (conditional))

	全異常行動・異常言動		異常行動・異常言動 A		異常行動・異常言動 B-E	
	Univariate	Multivariate	Univariate	Multivariate	Univariate	Multivariate
オセルタミビル服薬 (あり)	0.71 (0.58-0.89)	0.60 (0.47-0.76)	1.15 (0.32-4.08)	0.91 (0.17-4.95)	0.70 (0.56-0.87)	0.59 (0.46-0.75)

(10 歳以上に限定した場合の、各異常行動・異常言動に対するオッズ比および 95 %信頼区間 (unconditional))

	全異常行動・異常言動		異常行動・異常言動 A		異常行動・異常言動 B-E	
	Univariate	Multivariate	Univariate	Multivariate	Univariate	Multivariate
オセルタミビル服薬 (あり)	0.97 (0.72-1.31)	0.80 (0.58-1.10)	1.80 (0.39-8.34)	1.41 (0.30-6.78)	0.91 (0.67-1.23)	0.75 (0.54-1.03)

(10歳以上に限定した場合の、各異常行動・異常言動に対するオッズ比および95%信頼区間 (conditional))

	全異常行動・異常言動		異常行動・異常言動 A		異常行動・異常言動 B-E	
	Univariate	Multivariate	Univariate	Multivariate	Univariate	Multivariate
オセルタミビル服薬 (あり)	0.97 (0.62-1.52)	0.89 (0.53-1.49)	0.91 (0.15-5.68)	1.54 (0.09-26.2)	0.95 (0.59-1.51)	0.82 (0.48-1.41)

- 本調査においては、解析の段階で克服できない選択バイアス (selection bias)、適応 (適用) による交絡 (confounding by indication)、時間性情報の不整合などが、結果の妥当性と信頼性に大きな影響を及ぼしている。堅固な結論を得るためには「異常行動・異常言動 A」を発現した患者を症例とした、症例対照研究を実施すべきである。そして研究の計画段階から、疫学者が参画する研究班を組織すべきである。

(3) 臨床WGの意見・考察

廣田班疫学調査の結果についての当臨床WGの意見・考察は、以下のとおりである。

- 異常行動はインフルエンザ自体に伴い発現する場合があることが明らかに示された。さらに、タミフルがインフルエンザに伴う異常行動のリスクを高めるかどうかについては、特に重篤な異常な行動 (事故につながったりする可能性がある異常な行動等) を起こした 10 代の患者に限定して解析すると、タミフル服用者と非服用者の間に統計的な有意差はないが、非服用者に比べリスク (オッズ比) は 1.54 倍になるとの数値が示された。また、解析方法の妥当性に関して疫学及び統計学それぞれの専門家から異なる意見があり、データの収集、分析に関わるさまざまな調査の限界を踏まえると廣田班疫学調査の解析結果のみで、タミフルと異常行動の因果関係関係に明確な結論を出すことは困難であると判断された。
- タミフル服用者、タミフル非服用者ともに、10 %程度の患者に異常行動がみられていることから、インフルエンザ様疾患と診断された小児・未成年者は、重度の異常行動の発現のおそれがあることについて、引き続き注意喚起が必要と考えられた。

第2 臨床試験について

1 いわゆる睡眠検査室試験について

(1) 目的等

- タミフル服用後に異常な行動等を発現した副作用症例の症状、経過等が睡眠障害に類似しているものがあるとの指摘があったことを踏まえ、当臨床WGは、製薬企業に対し、タミフルの服薬時における睡眠への影響を検討することを目的とした「リン酸オセルタミビルの健康成人男子を対象とした睡眠に関する製造販売後臨床試験」(以下「睡眠検査室試験」という。)の実施を指示した。
- 睡眠検査室試験のデザイン等は、以下のとおりである。
 - ・試験デザイン： 反復投与による多施設二重盲検無作為割付クロスオーバー試験
 - ・対象者： 20歳以上25歳未満の健康成人男子
 - ・施設数： 3施設(国内)
 - ・実施例数： 31例
 - ・主要評価項目： 定性的な睡眠時異常脳波の確認、入眠潜時、睡眠開始後の夜間覚醒回数、早朝覚醒、睡眠開始後の覚醒時間、全睡眠時間、睡眠効率、睡眠段階に関連した変化 等

(2) 報告された結果(概要)

当臨床WGは、睡眠検査室試験の結果について報告を受けた。その結果の概要は、以下のとおりである。

- 睡眠時の異常な行動と関連すると考えられる深睡眠やレム睡眠について、タミフルによる変化は認められず、他の睡眠パラメータ(入眠潜時、夜間覚醒回数、早朝覚醒、覚醒時間、全睡眠時間、睡眠効率、睡眠段階に関連した変化)についても明らかな変化は認められなかった。
- 全症例において脳波上の異常な所見は認められず、夜間の睡眠検査(ビデオ監視)の全期間(8時間)においても異常と考えられる行動は認められなかった。
- 睡眠時呼吸数の推移において、タミフルによる明らかな変化は認められず、また、覚醒時の心電図(標準12誘導)においても、特に影響は認められなかった。
- 有害事象の発現頻度は、31例中15例25件で、いずれも軽度であった。
- 被験者1例において、タミフル投与期間中に被験者より中途覚醒の訴えがあり、タミフルとの因果関係は可能性ありと評価されたが、脳波上の異常所見、ビデオ監視による異常と考えられる行動、呼吸数の推移に明らかな変化は認められなかった。
- 薬物動態パラメータは、これまでに得られている国内健康成人男子の成績と同様であった。

(3) 臨床WGの意見・考察

睡眠検査室試験の結果についての当臨床WGの意見・考察は、以下のとおりである。

- 当臨床WGは、製薬企業から睡眠検査室試験の結果について報告を受け、主要評価項目である睡眠時異常脳波、睡眠段階に関連した変化、心電図検査の結果などを評価した結果、タミフルについて、睡眠異常を起こさないこと、睡眠を妨げる作用が認められないこと、心電図検査において著明な変化が認められないことなどが確認された。

2 いわゆる夜間心電図試験について

(1) 目的等

- 当臨床WGは、製薬企業に対し、タミフルの服薬時における夜間の心電図への影響をホルター 12 誘導心電計により検討することを目的として「健康成人男子を対象とした夜間の心電図に関する製造販売後臨床試験」（以下「夜間心電図試験」という。）の実施を指示した。
- 夜間心電図試験のデザイン等は、以下のとおりである。
 - ・試験デザイン： 反復投与による単施設二重盲検無作為割付クロスオーバー試験
 - ・対象者： 20 歳以上 60 歳未満の健康成人男子
 - ・施設数： 1 施設（国内）
 - ・実施例数： 12 例
 - ・主要評価項目： Fridericia による補正 QTc (QTcF)、Bazett による補正 QTc (QTcB) 《以上、ホルター 12 誘導心電計で規定された時間のスナップショットにより評価》
 - ・副次的評価項目： RR 間隔、PR 間隔、QRS 間隔、QT 間隔（補正なし）《以上、ホルター 12 誘導心電計で規定された時間のスナップショットにより評価》、心室頻拍、心室性期外収縮《以上、ホルター 12 誘導心電計で継続的に観察》 等

(2) 報告された結果（概要）

当臨床WGは、夜間心電図試験の結果について報告を受けた。その結果の概要は、以下のとおりである。

- QTcF 及び QTcB における変化量、経時的推移は、タミフル投与時とプラセボ投与時で同様であった。RR 間隔、PR 間隔、QRS 間隔、QT 間隔（補正なし）において、タミフル投与により临床上問題となる影響は認められなかった（測定機器の問題で 1 例の被験者で、試験 11 日目の心電図を記録できなかったことから、本症例を除く 11 例を心電図評価対象症例とした。）。
- 試験期間中に、心室性頻拍及び临床上問題となる心室性期外収縮は観察されなかった。
- 有害事象の発現頻度は、12 例中 7 例 12 件で、多くは心電図電極を装着するために使用されたテーピングで惹き起こされた局所の皮膚症状に関連したものであり、いずれも軽度であった。
- 薬物動態パラメータは、これまでに得られている国内健康成人男子の成績と同様であった。

(3) 臨床WGの意見・考察

夜間心電図試験の結果についての当臨床WGの意見・考察は、以下のとおりである。

- 当臨床WGは、製薬企業から夜間心電図試験の結果について報告を受け、主要評価項目である QTcF 及び QTcB における変化量などを評価した結果、タミフルについて、その投与により心電図上問題となる影響は認められないことが確認された。

第3 異常な行動、突然死等の副作用報告等の追加調査について

(1) 目的等

●タミフル

- タミフル服用後に異常な行動等を発現した副作用症例について、その症状、経過等が、睡眠障害に類似しているものがあることから、その詳細な検討を目的として、異常な行動が就寝中又は覚醒直後に発現したか否か、異常な行動の回復に要した時間、異常な行動に関する記憶の有無、睡眠障害の既往歴・家族歴の有無等について追加調査を行うよう、当臨床WGは製薬企業に対し指示した。

また、タミフル服用後の突然死を含む死亡症例について、その詳細な検討を目的として、心電図、剖検等の結果、心疾患等の既往歴・家族歴の有無等について追加調査を行うことについても、併せて指示した。

●リレンザ及びシンメトレル等

- ザナミビル水和物（リレンザ）及び塩酸アマンタジン（シンメトレル等）についても異常な行動等の副作用が報告されていることから、上記の当臨床WGの指示を踏まえ、厚生労働省が、各製薬企業に対し、同様の追加調査を指示した。

●タミフル等非使用例

- タミフル等の抗インフルエンザウイルス薬が使用されていないインフルエンザ患者（以下「タミフル等非使用例」という。）においても異常な行動を発現した症例が、医療機関から厚生労働省に直接報告されたことから、これらの症例について厚生労働省が同様の追加調査を行った。

(2) 報告された結果（概要）

当臨床WGは、タミフル、リレンザ及びシンメトレル等服用後の異常な行動等症例、タミフル等非使用例の異常な行動症例並びにタミフル服用後の死亡症例に係る追加調査の結果について報告を受けた。その結果の概要は、以下のとおり。

ア 全般的な状況

●タミフル

- 販売開始（平成13年2月）から平成21年3月31日までに、薬事法の規定に基づき製薬企業から1,625症例が報告され、そのうち転落・飛び降り又はこれらにつながるような「異常な行動」は、353症例であった。また、「異常な行動」以外の精神神経症状は、428症例であった。
- さらに、1,625症例のうち死亡症例は、76症例であった。このうち「突然死」という用語により医療機関から製薬企業に報告された症例は14症例であった。

●リレンザ

- 販売開始（平成12年12月）から平成21年3月31日までに、薬事法の規定に基づき製薬企業から報告された転落・飛び降り又はこれらにつながるような「異常な行動」の副作用は、167症例であった。また、「異常な行動」以外の精神神経症状は、144症例であった。

●シンメトレル等

- 「A型インフルエンザウイルス感染症」の効能追加（平成10年11月）から平成21年3月31日までに、薬事法の規定に基づき製薬企業から報告された転落・飛び降り又はこれらにつながるような「異常な行動」の副作用は、10症例であった。また、「異常な行動」以外の精神神経症状は、64症例であった。

●タミフル等非使用例

- 平成 19 年 3 月 23 日から平成 21 年 3 月 31 日までに、医療機関から報告された転落・飛び降り又はこれらにつながるような「異常な行動」のあったタミフル等非使用例のインフルエンザ患者は、24 症例であった。

イ 異常な行動の副作用報告等

(ア) 発現時期《表 1 参照》

●タミフル

- 2006/2007 シーズンの発現が 49 % (170 症例) で最も多く、次いで 2005/2006 シーズンの発現が 23 % (78 症例)、2008/2009 シーズンの発現が 8 % (27 症例)、2007/2008 シーズンの発現が 7 % (25 症例) であった。

●リレンザ

- 2008/2009 シーズンの発現が 59 % (97 症例) で最も多く、次いで 2007/2008 シーズンの発現が 35 % (58 症例)、2006/2007 シーズンの発現が 6 % (10 症例) であった。

●シンメトレル等

- A 型インフルエンザウイルス感染症の効能追加があった 1998/1999 シーズンから 2007/2008 シーズンまで、各シーズンの発現は 0 ~ 3 症例である。

●タミフル等非使用例

- 2006/2007 シーズンの発現が 92 % (22 症例) を占めた。

(イ) 患者背景 (年齢及び性別)《表 2 及び表 3 参照》

●タミフル

- 20 歳未満の小児・未成年者が 86 % (299/349 症例) を占め、うち 10 歳代は 46 % (161/349 症例) であった。その他の年代 (20 ~ 90 歳代) については 1 ~ 2 % (4 ~ 8/349 症例) であった。
- また、性別については、男性が 72 % (251/348 症例) を占め、女性は 28 % (97/348 症例) であった。

●リレンザ

- 20 歳未満の小児・未成年者が 98 % (162/165 症例) を占め、うち 10 歳代は 70 % (115/165 症例) であった。
- また、性別については、男性が 73 % (119/162 症例) を占め、女性は 27 % (43/162 症例) であった。

●シンメトレル等

- 20 歳未満の小児・未成年者が 70 % (7/10 症例) を占め、うち 10 歳代は 50 % (5/10 症例) であった。
- また、性別については、男性が 70 % (7/10 症例) を占め、女性は 30 % (3/10 症例) であった。

●タミフル等非使用例

- 20 歳未満の小児・未成年者が 96 % (23/24 症例) を占め、うち 10 歳代は 88 % (21/24 症例) であった。
- また、性別については、男性が 79 % (19/24 症例) を占め、女性は 21 % (5/24 症例) であった。

(ウ) インフルエンザ発症からの病日、薬剤投与からの時間等《表 4 ~ 表 6 参照》

●タミフル

- インフルエンザ発症から異常な行動発現までの病日は、第1病日及び第2病日で73% (207/282 症例) を占め、第1病日の発現が40% (114/282 症例) で最も多かった。
- 最初の投与から発現までの時間は、1時間以上6時間未満が51% (77/152 症例) を占め、24時間未満で90% (137/152 症例) であった。また、直前の投与から発現までの時間は、1時間以上6時間未満が67% (109/162 症例) を占め、12時間未満が96% (155/162 症例) であった。
- リレンザ
 - インフルエンザ発症から異常な行動発現までの病日は、第1病日及び第2病日で81% (119/147 症例) を占め、第1病日の発現が27% (40/147 症例) であった。
 - 最初の投与から発現までの時間は、1時間以上6時間未満が43% (47/110 症例) を占め、24時間未満が93% (102/110 症例) であった。また、直前の投与から発現までの時間は、1時間以上6時間未満が65% (68/105 症例) を占め、12時間未満が98% (103/105 症例) であった。
- シンメトレル等
 - インフルエンザ発症から異常な行動発現までの病日は、第1病日から第5病日までの各病日で13%~38% (1~3/8 症例) であり、その他の病日はなかった。
 - 最初の投与から発現までの時間は、1時間以上6時間未満が25% (2/8 症例) であり、48時間以上が38% (3/8 症例) であった。また、直前の投与から発現までの時間は、1時間以上6時間未満が63% (5/8 症例) を占め、12時間未満が75% (6/8 症例) であった。
- タミフル等非使用例
 - インフルエンザ発症から異常な行動発現までの病日は、第1病日及び第2病日で62% (13/21 症例) を占め、第1病日の発現が29% (6/21 症例) であった。

(エ) 睡眠(就寝)等との関係《表7~表14参照》

- タミフル
 - 就寝中又は覚醒直後に異常な行動が発現した症例(重複あり)が、それぞれ63% (133/212 症例)、59% (112/191 症例) を占めた。
 - 就寝からの異常な行動の発現までの時間は、3時間未満が70% (43/61 症例) を占めた。
また、一眠り後に異常な行動が回復した症例が75% (169/225 症例)、異常な行動に関する患者の記憶のない症例が76% (151/198 症例)、光に対する反応がない症例が98% (122/125 症例) であった。
 - 睡眠時驚愕症・睡眠時遊行症の既往歴又は家族歴がある症例は、それぞれ9% (17/192 症例)、1% (2/153 症例) であった。
- リレンザ
 - 就寝中又は覚醒直後に異常な行動が発現した症例(重複あり)が、それぞれ34% (40/116 症例)、43% (50/116 症例) であった。
 - 就寝からの異常な行動の発現までの時間は、2時間未満が60% (9/15 症例) を占めた。
また、一眠り後に異常な行動が回復した症例が70% (85/122 症例)、異常な行動に関する患者の記憶のない症例が80% (94/117 症例)、光に対する反応がない症例が96% (43/45 症例) であった。

- 睡眠時驚愕症・睡眠時遊行症の既往歴又は家族歴がある症例は、それぞれ 11 % (12/110 症例)、3 % (3/88 症例) であった。
- シンメトレル等
 - 就寝中又は覚醒直後に異常な行動が発現した症例（重複あり）が、それぞれ 33 % (2/6 症例)、25 % (1/4 症例) であった。
 - 就寝からの異常な行動の発現までの時間は、時間のわかったものが 1 症例のみで、3 時間以上 4 時間未満であった。
また、一眠り後に異常な行動が回復した症例が 67 % (2/3 症例)、異常な行動に関する患者の記憶のない症例が 75 % (3/4 症例) であり、情報のある 2 症例すべてが光に対する反応がない症例であった。
 - 睡眠時驚愕症・睡眠時遊行症の既往歴又は家族歴がある症例は、いずれも 33 % (1/3 症例) であった。
- タミフル等非使用例
 - 就寝中又は覚醒直後に異常な行動が発現した症例（重複あり）が、それぞれ 58 % (11/19 症例)、100 % (2/2 症例) であった。
 - 就寝からの異常な行動の発現までの時間は、3 時間未満が 57 % (4/7 症例) を占めた。
また、一眠り後に異常な行動が回復した症例が 100 % (15/15 症例)、異常な行動に関する患者の記憶のない症例が 57 % (12/21 症例) であり、情報のある 15 症例すべてが光に対する反応がない症例であった。
 - 睡眠時驚愕症・睡眠時遊行症の既往歴又は家族歴がある症例は、それぞれ 25 % (4/16 症例)、14 % (2/14 症例) であった。

(オ) 発熱との関係《表 1 5 及び表 1 6 参照》

- タミフル
 - 発熱持続時の異常な行動の発現が 65 % (132/203 症例)、解熱過程時の発現が 32 % (64/203 症例) であった。
また、異常な行動の直前（発現前 6 時間以内）の体温は、38 度台が 39 % (42/109 症例) で最も多く、次いで 39 度台が 36 % (39/109 症例)、40 度台が 13 % (14/109 症例) であった。
- リレンザ
 - 発熱持続時の異常な行動の発現が 78 % (67/86 症例)、解熱過程時の発現が 14 % (12/86 症例) であった。
また、異常な行動の直前（発現前 6 時間以内）の体温は、39 度台が 36 % (28/78 症例) で最も多く、次いで 38 度台が 35 % (27/78 症例)、37 度台が 17 % (13/78 症例) であった。
- シンメトレル等
 - 発熱持続時の異常な行動の発現が 25 % (1/4 症例)、解熱過程時の発現が 50 % (2/4 症例) であった。
また、異常な行動の直前（発現前 6 時間以内）の体温は、情報のある 4 症例すべてが 37 度台から 39 度台の症例であった。
- タミフル等非使用例
 - 発熱持続時の異常な行動の発現が 89 % (17/19 症例)、解熱過程時の発現が 11 % (2/19 症例) であった。
また、異常な行動の直前（発現前 6 時間以内）の体温は、39 度台が 53 % (10/19

症例)で最も多く、次いで38度台が21%(4/19症例)であった。

(カ) 異常な行動発現後の継続投与(表17参照)

●タミフル

○ 「異常な行動」の発現後にタミフルを継続投与した事例が35%(123/353症例)あった。このうち、継続投与後に異常な行動を含む精神神経症状を発現した事例が25%(31/123症例)ある一方、精神神経症状を発現しなかった事例が75%(92/123症例)あった。継続投与後に精神神経症状を発現した事例については、男性が68%(21/31症例)、女性が32%(10/31症例)であり、異常な行動症例全体における男女比とほぼ同様であった。

●リレンザ

○ 「異常な行動」の発現後にリレンザを継続投与した事例が46%(77/167症例)あった。このうち、継続投与後に異常な行動を含む精神神経症状を発現した事例が38%(29/77症例)ある一方、精神神経症状を発現しなかった事例が62%(48/77症例)あった。継続投与後に精神神経症状を発現した事例については、男性が76%(22/29症例)、女性が24%(7/29症例)であり、異常な行動症例全体における男女比とほぼ同様であった。

●シンメトレル等

○ 「異常な行動」の発現後にシンメトレル等を継続投与した事例が40%(4/10症例)あった。このうち、継続投与後に異常な行動を含む精神神経症状を発現した事例が25%(1/4症例)ある一方、精神神経症状を発現しなかった事例が75%(3/4症例)あった。

ウ 死亡症例について

(ア) 発現時期《表18参照》

●タミフル

○ 死亡症例については、74症例のうち、2004/2005シーズンが19症例で最も多く、次いで2006/2007シーズンが17症例、2005/2006シーズンが15症例であった。

(イ) 患者背景(年齢及び性別)《表19及び表20参照》

●タミフル

○ 20歳未満の小児・未成年者が21%(16/76症例)であり、20歳代から90歳代までの各年代については5~13%(4~10/76症例)であった。
○ また、性別については、男性が66%(50/76症例)を占め、女性は34%(26/76症例)であった。

(ウ) 心電図、剖検等の結果

●タミフル

○ 心電図が4症例、剖検等の結果が11症例について追加提出された。

(エ) 既往歴、家族歴等

●タミフル

○ 既往歴としては、慢性膵炎、心室性不整脈・房室ブロック・虚血性心疾患、不整脈、中等度の三尖弁閉鎖不全等、気管支喘息、脳梗塞(小脳変性症)が、各1

症例あった。

また、家族歴としては、高血圧症（父）、突然死（祖父）が各 1 症例あった。

(3) 臨床WGの意見・考察

異常な行動、突然死等の副作用報告等の追加調査についての当臨床WGの意見・考察は、以下のとおりである。

- 異常な行動の患者背景をみると、年齢については、タミフル、リレンザ、シンメトレル等及びタミフル等非使用例のいずれも 20 歳未満の小児・未成年者が 7 割～9 割強を占め、特に 10 歳代が多い傾向がある。また、性別については、いずれも男性が多い傾向（いずれも 7 割台）にある。これらの結果は、岡部班疫学調査の結果と同様のものであり、岡部班疫学調査の結果を支持するものと考えられる。
- 異常な行動と睡眠（就寝）等との関係をみると、タミフルについては、就寝中又は覚醒直後に異常な行動が発現した症例（重複あり）が、それぞれ 63 %（133/212 症例）、59 %（112/191 症例）を占めている。この結果は、岡部班疫学調査の結果とほぼ同様のものであり、岡部班疫学調査の結果を支持するものと考えられる。
就寝中又は覚醒直後に異常な行動が発現した症例について、タミフルとそれ以外（リレンザ、シンメトレル等及びタミフル等非使用例）の比較をしたところ、異常な行動の症状や発現の状況に大きな差異は認められず、ほぼ同様のものと考えられる。
- 平成 19 年 3 月以降の予防的な安全対策により、それ以後、タミフルの副作用報告において、10 代の転落・飛び降りによる死亡等の重篤な事例が報告されていないことから、安全対策については一定の効果が認められる。また、2008/2009 シーズンにおいて、リレンザに係る異常な行動によると疑われる転落・飛び降り事例の副作用報告が 3 症例（うち死亡 1 症例）あったことから、タミフルの服用の有無にかかわらず、インフルエンザ様疾患と診断された小児・未成年者は、重度の異常行動発現のおそれがあることについて、引き続き注意喚起が必要と考えられた。
- 今後とも、異常な行動、突然死等の副作用報告等の状況についてフォローアップすべきと考える。

(表1)【発現時期別：シーズン別】(異常な行動症例)

	タミフル	リレンザ	シメトリル等	タミフル等非使用例
	症例数 (%)			
1998/1999シーズン	—	—	1 (10)	1 (4)
1999/2000シーズン	—	—	3 (30)	0 (0)
2000/2001シーズン	2 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
2001/2002シーズン	5 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
2002/2003シーズン	11 (3)	0 (0)	1 (10)	0 (0)
2003/2004シーズン	11 (3)	0 (0)	1 (10)	0 (0)
2004/2005シーズン	17 (5)	0 (0)	1 (10)	1 (4)
2005/2006シーズン	78 (23)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
2006/2007シーズン	170 (49)	10 (6)	2 (20)	22 (92)
2007/2008シーズン	25 (7)	58 (35)	1 (10)	0 (0)
2008/2009シーズン	27 (8)	97 (59)	0 (0)	0 (0)
小計	346	165	10	24
不明	7	2	0	0
総計	353	167	10	24

注) シーズン：8月から翌年7月まで

(表2)【年齢別】(異常な行動症例)

	タミフル	リレンザ	シメトリル等	タミフル等非使用例
	症例数 (%)			
10歳未満	138 (40)	47 (28)	2 (20)	2 (8)
10歳代	161 (46)	115 (70)	5 (50)	21 (88)
20歳代	8 (2)	2 (1)	0 (0)	0 (0)
30歳代	6 (2)	1 (1)	1 (10)	0 (0)
40歳代	5 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
50歳代	8 (2)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
60歳代	7 (2)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
70歳代	7 (2)	0 (0)	0 (0)	1 (4)
80歳代	5 (1)	0 (0)	1 (10)	0 (0)
90歳代	4 (1)	0 (0)	1 (10)	0 (0)
小計	349	165	10	24
不明	4	2	0	0
総計	353	167	10	24

(表3)【性別】(異常な行動症例)

	タミフル	リレンザ	シメトリル等	タミフル等非使用例
	症例数 (%)			
男性	251 (72)	119 (73)	7 (70)	19 (79)
女性	97 (28)	43 (27)	3 (30)	5 (21)
小計	348	162	10	24
不明	5	5	0	0
総計	353	167	10	24

(表4)【インフルエンザ発症から異常な行動発現までの病日】(異常な行動症例)

	タミフル	リレンザ	シシトール等	タミフル等非使用例
	症例数 (%)			
第1病日	114(40)	40(27)	1(13)	6(29)
第2病日	93(33)	79(54)	3(38)	7(33)
第3病日	39(14)	24(16)	2(25)	6(29)
第4病日	15(5)	3(2)	1(13)	1(5)
第5病日	11(4)	0(0)	1(13)	0(0)
第6病日以上	10(4)	1(1)	0(0)	1(5)
小計	282	147	8	21
不明	71	20	2	3
総計	353	167	10	24

(表5)【最初の投与から異常な行動の発現までの時間】(異常な行動症例)

	タミフル	リレンザ	シシトール等	タミフル等非使用例
	症例数 (%)			
1時間未満	11(7)	7(6)	0(0)	—
1時間以上2時間未満	17(11)	16(15)	0(0)	—
2時間以上3時間未満	23(15)	11(10)	0(0)	—
3時間以上4時間未満	20(13)	9(8)	0(0)	—
4時間以上5時間未満	8(5)	4(4)	1(13)	—
5時間以上6時間未満	9(6)	7(6)	1(13)	—
6時間以上12時間未満	28(18)	19(17)	2(25)	—
12時間以上24時間未満	21(14)	29(26)	1(13)	—
24時間以上48時間未満	6(4)	4(4)	0(0)	—
48時間以上	9(6)	4(4)	3(38)	—
小計	152	110	8	—
不明	201	57	2	—
総計	353	167	10	24

(表6)【直前の投与から異常な行動の発現までの時間】(異常な行動症例)

	タミフル	リレンザ	シシトール等	タミフル等非使用例
	症例数 (%)			
1時間未満	17(10)	8(8)	0(0)	—
1時間以上2時間未満	25(15)	20(19)	2(25)	—
2時間以上3時間未満	34(21)	16(15)	0(0)	—
3時間以上4時間未満	30(19)	13(12)	0(0)	—
4時間以上5時間未満	10(6)	10(10)	1(13)	—
5時間以上6時間未満	10(6)	9(9)	2(25)	—
6時間以上12時間未満	29(18)	27(26)	1(13)	—
12時間以上	7(4)	2(2)	2(25)	—
小計	162	105	8	—
不明	191	62	2	—
総計	353	167	10	24

(表7)【異常な行動の発現が就寝中か否か】(異常な行動症例)

	タミフル	リレンザ	シメトル等	タミル等非使用例
	症例数 (%)			
Yes	133 (63)	40 (34)	2 (33)	11 (58)
No	79 (37)	76 (66)	4 (67)	8 (42)
小計	212	116	6	19
不明	141	51	4	5
総計	353	167	10	24

(表8)【異常な行動の発現が覚醒直後か否か】(異常な行動症例)

	タミフル	リレンザ	シメトル等	タミル等非使用例
	症例数 (%)			
Yes	112 (59)	50 (43)	1 (25)	2 (100)
No	79 (41)	66 (57)	3 (75)	0 (0)
小計	191	116	4	2
不明	162	51	6	22
総計	353	167	10	24

(表9)【就寝から異常な行動の発現までの時間】(異常な行動症例)

	タミフル	リレンザ	シメトル等	タミル等非使用例
	症例数 (%)			
1 時間未満	18 (30)	4 (27)	0 (0)	1 (14)
1 時間以上 2 時間未満	11 (18)	5 (33)	0 (0)	2 (29)
2 時間以上 3 時間未満	14 (23)	1 (7)	0 (0)	1 (14)
3 時間以上 4 時間未満	4 (7)	1 (7)	1 (100)	1 (14)
4 時間以上 5 時間未満	3 (5)	0 (0)	0 (0)	2 (29)
5 時間以上	11 (18)	4 (27)	0 (0)	0 (0)
小計	61	15	1	7
不明/就寝中でない	292	152	9	17
総計	353	167	10	24

(表10)【異常な行動が一眠りして回復したか否か】(異常な行動症例)

	タミフル	リレンザ	シメトル等	タミル等非使用例
	症例数 (%)			
Yes	169 (75)	85 (70)	2 (67)	15 (100)
No	56 (25)	37 (30)	1 (33)	0 (0)
小計	225	122	3	15
不明	128	45	7	9
総計	353	167	10	24

(表 1 1) 【異常な行動に関する患者の記憶の有無】(異常な行動症例)

	タミフル	リレンザ	シメトル等	タミフル等非使用例
	症例数 (%)			
有	47(24)	23(20)	1(25)	9(43)
無	151(76)	94(80)	3(75)	12(57)
小計	198	117	4	21
不明	155	50	6	3
総計	353	167	10	24

(表 1 2) 【光に対する反応の有無】(異常な行動症例)

	タミフル	リレンザ	シメトル等	タミフル等非使用例
	症例数 (%)			
有	3(2)	2(4)	0(0)	0(0)
無	122(98)	43(96)	2(100)	15(100)
小計	125	45	2	15
不明	228	122	8	9
総計	353	167	10	24

(表 1 3) 【睡眠時驚愕症又は睡眠時遊行症の既往歴の有無】(異常な行動症例)

	タミフル	リレンザ	シメトル等	タミフル等非使用例
	症例数 (%)			
有	17(9)	12(11)	1(33)	4(25)
無	175(91)	98(89)	2(67)	12(75)
小計	192	110	3	16
不明	161	57	7	8
総計	353	167	10	24

(表 1 4) 【睡眠時驚愕症又は睡眠時遊行症の家族歴の有無】(異常な行動症例)

	タミフル	リレンザ	シメトル等	タミフル等非使用例
	症例数 (%)			
有	2(1)	3(3)	1(33)	2(14)
無	151(99)	85(97)	2(67)	12(86)
小計	153	88	3	14
不明	200	79	7	10
総計	353	167	10	24

(表 1 5) 【異常な行動の発現時の体温の経過】(異常な行動症例)

	タミフル	リレンザ	シメトル等	タミフル等非使用例
	症例数 (%)			
発熱持続	132(65)	67(78)	1(25)	17(89)
解熱過程	64(32)	12(14)	2(50)	2(11)
解熱後	7(3)	7(8)	1(25)	0(0)
小計	203	86	4	19
不明	150	81	6	5
総計	353	167	10	24

(表16) 【異常な行動の直前(発現前6時間以内)の体温】(異常な行動症例)

	タミフル	リレンザ	シメトル等	タミフル等非使用例
	症例数 (%)			
34度台	1(1)	0(0)	0(0)	0(0)
35度台	2(2)	0(0)	0(0)	0(0)
36度台	1(1)	3(4)	0(0)	1(5)
37度台	9(8)	13(17)	1(25)	1(5)
38度台	42(39)	27(35)	2(50)	4(21)
39度台	39(36)	28(36)	1(25)	10(53)
40度台	14(13)	5(6)	0(0)	3(16)
41度以上	1(1)	2(3)	0(0)	0(0)
小計	109	78	4	19
不明	244	89	6	5
総計	353	167	10	24

(表17) 【異常な行動発現後の継続投与】(異常な行動症例)

	タミフル	リレンザ	シメトル等	タミフル等非使用例
	症例数 (%)			
異常な行動全症例	353	167	10	24
うち継続投与した事例	123(35)	77(46)	4(40)	—
うち継続投与後精神神経症状発現なし	92(75)	48(62)	3(75)	—
うち継続投与後精神神経症状発現あり	31(25)	29(38)	1(25)	—
うち男性	21(68)	22(76)	0(0)	—
うち女性	10(32)	7(24)	1(100)	—

(表18)【発現時期別：シーズン別】(死亡症例)

	タミフル 症例数(%)
2000/2001シーズン	3(4)
2001/2002シーズン	4(5)
2002/2003シーズン	4(5)
2003/2004シーズン	8(11)
2004/2005シーズン	19(26)
2005/2006シーズン	15(20)
2006/2007シーズン	17(23)
2007/2008シーズン	2(3)
2008/2009シーズン	2(3)
小計	74
不明	2
総計	76

注) シーズン：8月から翌年7月まで

(表19)【年齢別】(死亡症例)

	タミフル 症例数(%)
10歳未満	11(14)
10歳代	5(7)
20歳代	6(8)
30歳代	10(13)
40歳代	4(5)
50歳代	10(13)
60歳代	8(11)
70歳代	9(12)
80歳代	9(12)
90歳代	4(5)
総計	76

(表20)【性別】(死亡症例)

	タミフル 症例数(%)
男性	50(66)
女性	26(34)
総計	76

タミフルの安全対策の経緯等について

- リン酸オセルタミビル（タミフル）は、A型又はB型インフルエンザウイルス感染症（カプセル剤については、その予防を含む。）の適応を有する経口薬である。我が国では、平成13年2月から販売されている。
（参考：タミフルの承認年月）
 - ・平成12年12月 カプセル剤（治療効能）
 - ・平成13年12月 カプセル剤（小児用量追加）
 - ・平成14年 1月 ドライシロップ剤（治療効能）
 - ・平成16年 7月 カプセル剤（予防効能）
- タミフルによる「精神・神経症状」については、因果関係は明確ではないものの、医薬関係者に注意喚起を図る観点から、平成16年5月、添付文書の「重大な副作用」欄に「精神・神経症状（意識障害、異常行動、譫妄、幻覚、妄想、痙攣等）があらわれることがあるので、異常が認められた場合には投与を中止し、観察を十分に行い、症状に応じて適切な処置を行うこと。」と追記された。
- 平成19年2月に入り、タミフルを服用したとみられる中学生が自宅で療養中、自宅マンションから転落死するという痛ましい事例が2例報道された。このことなどを受け、万が一の事故を防止するための予防的な対応として、特に小児・未成年者については、インフルエンザと診断され治療が開始された後は、タミフルの処方の有無を問わず、異常行動発現のおそれがあることから、自宅において療養を行う場合、(1)異常行動の発現のおそれについて説明すること、(2)少なくとも2日間、保護者等は小児・未成年者が一人にならないよう配慮することが適切と考え、平成19年2月28日、その旨を患者・家族に対し説明するよう、インフルエンザ治療に携わる医療関係者に注意喚起された。
- 上記のような予防的な対応が行われてきたが、平成19年3月20日、タミフルの服用後に12歳の患者が2階から転落して骨折したとする症例が1例報告された。また、同日、2月上旬にタミフルの服用後に12歳の患者が2階から転落して骨折したとする症例についても報告がなされた。これらの報告を受け、同日、以下のとおり、添付文書を改訂するとともに、「緊急安全性情報」を医療機関等に配布し、タミフル服用後の異常行動について、更に医療関係者の注意を喚起するよう、製薬企業に指示された。

警告（抜粋）

10歳以上の未成年の患者においては、因果関係は不明であるものの、本剤の服用後に異常行動を発現し、転落等の事故に至った例が報告されている。このため、この年代の患者には、合併症、既往歴等からハイリスク患者と判断される場合を除いては、原則として本剤の使用を差し控えること。また、小児・未成年者については、万が一の事故を防止するための予防的な対応として、本剤による治療が開始された後は、(1)異常行動の発現のおそれがあること、(2)自宅において療養を行う場合、少なくとも2日間、保護者等は小児・未成年者が一人にならないよう配慮することについて患者・家族に対し説明を行うこと。

なお、インフルエンザ脳症等によっても、同様の症状が現れるとの報告があるので、上記と同様の説明を行うこと。

- 平成19年4月4日、薬事・食品衛生審議会医薬品等安全対策部会安全対策調査会（以下単に「安全対策調査会」という。）が開催され、タミフルの副作用について、販売開始（平成13年2月）から平成19年3月20日までに製薬企業から報告された全ての副作用報告（1,079症例）等について検討が行われた。その検討では、タミフルの服用と転落・飛び降り又はこれらにつながるような異常な行動（以下単に「異常な行動」という。）や突然死などの副作用との関係について、結論は得られなかった。

また、当面の措置として、上記の平成19年3月20日の緊急安全性情報の配布等に係る措置を継続することは妥当とされた。

さらに、タミフルの服用と異常な行動や突然死との因果関係などタミフルの安全性について臨床的な側面及び基礎的な側面から詳細な調査検討を行うため、安全対策調査会の下に、①タミフルの臨床的調査検討のためのワーキンググループ（臨床WG）及び②タミフルの基礎的調査検討のためのワーキンググループ（以下「基礎WG」という。）が設けられ、その結果を安全対策調査会に報告することとされた。

（参考：臨床WG及び基礎WGの主な検討事項）

①臨床WG

- ・ 異常な行動、突然死等の副作用についての詳細な検討
- ・ 今後の臨床研究（臨床試験）の計画、結果等の検討
- ・ 平成18年度厚生労働科学研究費補助金「インフルエンザに伴う随伴症状の発現状況に関する調査研究」の結果等についての検討

②基礎WG

- ・ 今後の基礎的研究（動物実験等）の計画、結果等についての検討

- 基礎WGは、平成19年5月2日及び同月30日に会議を開催し、タミフルの安全性について基礎的な側面から調査検討を行い、製薬企業に対し、以下のような非臨床試験（動物実験等）を実施し、その結果を報告するよう指示することとされた。なお、この点については、同年6月16日の安全対策調査会に報告された。

① 脳における薬物動態・代謝研究

- ・ 脳内での暴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
- ・ 脳内のカルボシキエステラーゼ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
- ・ ラットにおける脳、脳脊髄液及び血漿中濃度の測定

② 脳内におけるウイルス以外の内因性標的に対する活性の有無の検証

- ・ 中枢性作用に関連する受容体とのバインディング・アッセイ

③ 幼若ラット等を用いた追加毒性試験

- ・ 幼若ラット及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）

④ 脳内直接投与による薬理学的試験

- ・ 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

⑤ 循環器系に対する影響評価に関する *in vitro* 試験

- ・ モルモット乳頭筋活動電位の各指標に対する作用を評価し、陽性対照薬と比較
- ・ HEK-293細胞に発現したHERGチャネル電流に対する作用を評価し、細胞系のHERGチャネル電流が陽性対照薬で抑制されることを確認

- 臨床WGは、平成19年5月14日及び同年6月4日に会議を開催し、タミフルの安全性について臨床的な側面から調査検討を行い、製薬企業に対し、以下のような調査等を実施し、その結果を報告するよう指示することとされた。なお、この点については、同年6月16日の安全対策調査会に報告された。
 - ① リン酸オセルタミビルの服用と「異常な行動」との関係について
 - (1) 「異常な行動」の副作用についての詳細な調査検討
 - 「異常な行動」の副作用症例について、その症状、経過等が、睡眠障害に類似しているものがあることから、詳細な調査検討を行うため、以下の点について追加調査を実施
 - ・ 「異常な行動」が就寝中又は覚醒直後に発現したか否か
 - ・ 「異常な行動」の回復に要した時間
 - ・ 「異常な行動」に関する記憶の有無
 - ・ 睡眠障害の既往歴・家族歴の有無 等
 - (2) 今後の臨床研究の計画等についての検討
 - リン酸オセルタミビルの服用が睡眠に及ぼす影響を検討するため、「リン酸オセルタミビルの健康成人男子を対象とした睡眠に関する製造販売後臨床試験」(いわゆる睡眠検査室試験)を実施
 - ② リン酸オセルタミビルの服用と「突然死」との関係について
 - (1) 「突然死」の副作用についての詳細な調査検討
 - 「突然死」の副作用症例について、詳細な調査検討を行うため、以下の点について、追加調査を実施
 - ・ 心電図
 - ・ 剖検等の結果
 - ・ 心疾患の既往歴・家族歴の有無 等
 - (2) 今後の臨床研究の計画等についての検討
 - リン酸オセルタミビルの服用が心機能に及ぼす影響を検討するため、上記①(2)の「いわゆる睡眠検査室試験」に心電図検査を含めるよう指示
 - 平成19年6月16日の安全対策調査会においては、リン酸オセルタミビルの安全性に関し、陳述等を希望する団体等(計7団体等)から意見の聴取が行われた。
 - 上記の基礎WGが指示した調査等の結果については、平成19年10月24日及び同年12月10日に開催された基礎WGに報告され、調査検討が行われた。
 - また、上記の臨床WGが指示した調査等の結果については、平成19年11月21日、同年12月16日及び同月25日に開催された臨床WGに報告され、調査検討が行われた。
 - 以上の両WGにおける調査検討の結果については、平成19年12月25日に開催された安全対策調査会に報告(一部の結果については、同年11月11日に開催された同調査会に報告)され、検討が行われた。この時点における同調査会の検討結果は、以下のとおりとされた。

- 本日、当調査会は、基礎WG及び臨床WGから非臨床試験(動物実験等)、臨床試験、疫学調査(現時点では、明確な結論を得るために必要な解析には至っていない)等の結果について報告を受けた。現時点において、直ちにタミフルの服用と異常な行動及び突然死との因果関係を示唆するような結果は得られていないが、特に、疫学調査及び臨床試験については、十分かつ慎重な検討や分析を進め、可及的速やかに臨床WG及び当調査会に報告することが適当である。
 - (1) 非臨床試験

バインディング・アッセイの結果、臨床用量投与時に推定されるタミフルの未変化体及び活性代謝物の脳中濃度では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されたこと 等

(2) 臨床試験

睡眠検査室試験の中間解析によると、タミフルについて、睡眠異常を起こさないこと、心電図検査において著明な変化が認められないことなどが確認されたこと 等

- このようなことから、当調査会としては、引き続き基礎WG及び臨床WGにおいて、現在実施中又は解析中の非臨床試験、臨床試験及び疫学調査等の結果を含めた更なる調査検討を進め、できるだけ早期に最終的な結論の取りまとめを行うこととする。
- インフルエンザによって異常行動が起こり得ることに対し、改めて医療関係者及び国民の注意を喚起する必要がある。
- 以上を踏まえ、タミフルについて現在講じられている措置（注）は、現在も妥当であり、引き続き医療関係者、患者・家族等に対し注意喚起を図ることが適当である。

（注）平成19年3月20日の緊急安全性情報：

- さらに、ザナミビル水和物（リレンザ）及び塩酸アマンタジン（シンメトレル等）について、次の点を添付文書の使用上の注意に記載し、インフルエンザに罹患した小児・未成年者の異常行動発現のおそれについて改めて医療関係者、患者・家族等に対し注意喚起を図ることが適当である。
 - ・ 因果関係は不明であるものの、本剤の使用後に異常行動等の精神神経症状を発現した例が報告されている。小児・未成年者については、異常行動による転落等の方が一の事故を防止するための予防的な対応として、本剤による治療が開始された後は、(1)異常行動の発現のおそれがあること、(2)自宅において療養を行う場合、少なくとも2日間、保護者等は小児・未成年者が一人にならないよう配慮することについて患者・家族に対し説明を行うこと。なお、インフルエンザ脳症等によっても、同様の症状が現れるとの報告があるので、上記と同様の説明を行うこと。

- 上記の安全対策調査会の検討結果を受け、平成19年12月26日、ザナミビル水和物及び塩酸アマンタジンの製薬企業に対し、添付文書を改訂し、服用・使用後の異常行動等について、医療関係者の注意を喚起するよう指示が行われた。
- その後、基礎WGが指示した調査等の結果（上記の実施中の非臨床試験等の結果）については、平成20年6月19日及び平成21年2月6日に開催された基礎WGに報告され、調査検討が行われた。

また、臨床WGが指示した調査等の結果（上記の実施中又は解析中の臨床試験及び疫学調査等の結果）については、平成20年6月17日、同年7月10日及び平成21年6月3日に開催された臨床WGに報告され、調査検討が行われた。
- 両WGにおける具体的な調査検討の経過（概要）は、次頁の表のとおりである。

基礎WG及び臨床WGにおける調査検討の経過（概要）について

<基礎WG>

1. 脳における薬物動態・代謝研究	
脳内での曝露に関連する能動輸送過程に関する in vitro 試験	第3回基礎WGに報告
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	第3回及び第4回基礎WGに報告。rhCE1を用いた in vitro 試験は第5回基礎WGに報告
ラットにおける脳、脳脊髄液及び血漿中濃度の測定	第3回及び第4回基礎WGに報告
2. 脳内におけるウイルス以外の内因性標的に対する活性の有無の検証	
中枢性作用に関連する受容体とのバインディング・アッセイ（企業が自主的に実施した試験である「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」の結果を含む。）	第3回基礎WGに報告
3. 幼若ラット等を用いた追加毒性試験	
幼若ラット及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）	第4回基礎WGに報告
4. 脳内直接投与による薬理的試験	
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	第5回基礎WGに報告
5. 循環器系に対する影響評価に関する in vitro 試験	
モルモット乳頭筋活動電位の各指標に対する作用を評価し、陽性対照薬と比較	第4回基礎WGに報告
HEK-293細胞に発現したHERGチャネル電流に対する作用を評価し、細胞系のHERGチャネル電流が陽性対照薬で抑制されることを確認	第4回基礎WGに報告
企業が自主的に実施した試験	
ウサギPurkinje繊維活動電位試験結果の再解析	第3回基礎WGに報告
未変化体の代謝障害時を想定したPKシミュレーション解析	第3回基礎WGに報告
循環器系の基礎及び臨床試験成績に関するエキスパートレポート	第3回基礎WGに報告
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 [ヒト脳S9画分]	第4回基礎WGに報告
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	第4回基礎WGに報告
健常ボランティア（日本人と白色人種）脳脊髄液のOP、OC濃度の評価	第4回基礎WGに報告

第3回基礎WG：平成19年10月24日開催

- 第4回基礎WG：平成19年12月10日開催
 第5回基礎WG：平成20年 6月19日開催
 第6回基礎WG：平成21年 2月 6日開催

<臨床WG>

1. 臨床試験	
健康成人男子を対象とした睡眠に関する製造販売後臨床試験（いわゆる睡眠検査室試験）	中間解析を第3回臨床WGに報告。最終解析を第6回臨床WGに報告
健康成人男子を対象とした夜間の心電図に関する製造販売後臨床試験	第6回臨床WGに報告
2. 疫学調査等	
インフルエンザ様疾患罹患時の異常行動情報収集に関する研究（主任研究者（研究代表者）：岡部信彦 国立感染症研究所感染症情報センター長）	2006/2007シーズンの調査について第4回及び第5回臨床WGに報告 2007/2008シーズンの調査について第7回臨床WGに報告 2008/2009シーズンの調査について第8回臨床WGに報告
インフルエンザ随伴症状の発現状況に関する調査研究（分担研究者（研究分担者）：廣田良夫 大阪大学大学院医学研究科公衆衛生学教室教授）	第一次予備解析を第5回臨床WGに報告 解析結果中間報告を第7回臨床WGに報告 分担研究報告書を第8回臨床WGに報告
3. 副作用症例についての詳細な調査検討	
「異常な行動」及び「突然死」の副作用についての詳細な調査検討	平成19年9月30日までの報告について第4回臨床WGに報告 平成20年3月31日までの報告について第7回臨床WGに報告 平成21年3月31日までの報告について第8回臨床WGに報告

- 第3回臨床WG：平成19年11月21日開催
 第4回臨床WG：平成19年12月16日開催
 第5回臨床WG：平成19年12月25日開催
 第6回臨床WG：平成20年 6月17日開催
 第7回臨床WG：平成20年 7月10日開催
 第8回臨床WG：平成21年 6月 3日開催

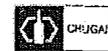
基礎WGの指示に基づき実施した非臨床試験及び自
主的に実施した試験・解析の結果について
(その3)

2008年6月19日

中外製薬株式会社

F.Hoffmann-La Roche Ltd.

発表の目的



Roche ロシュグループ

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. 脳内のカルボキシルエステラーゼ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
 - 脳内のカルボキシルエステラーゼ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

背景及び目的



Roche ロシュ グループ

- 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

- 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

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。

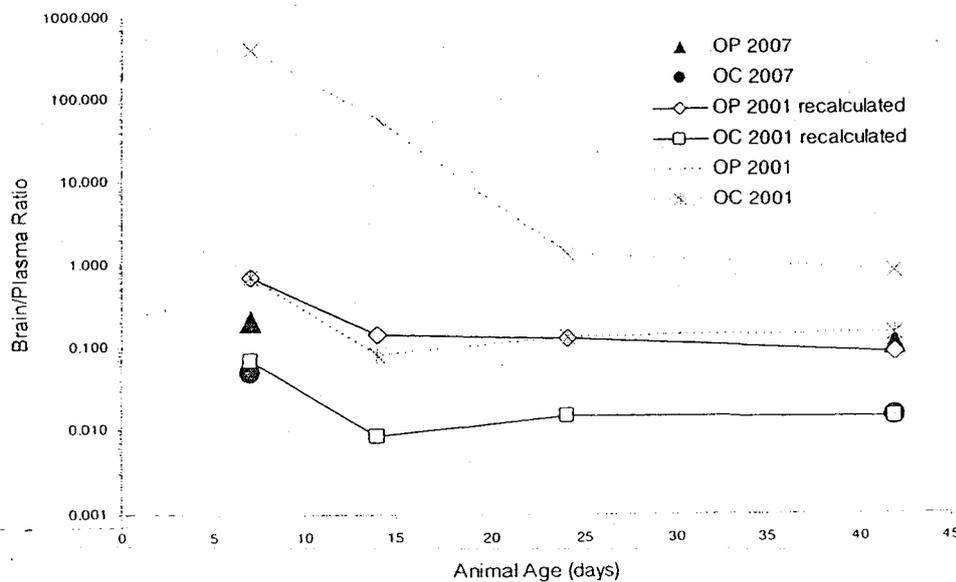


Figure: OP1000 mg/kg 投与後(2007年データは 920 mg/kg投与時のCmaxから外挿)の幼若ラットの各日齢及び成熟ラットにおけるOP及びOCの脳/血漿比 (Cmax)

結論

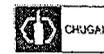


Roche ロシュグループ

- 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。

15

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)



Roche ロシュグループ

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

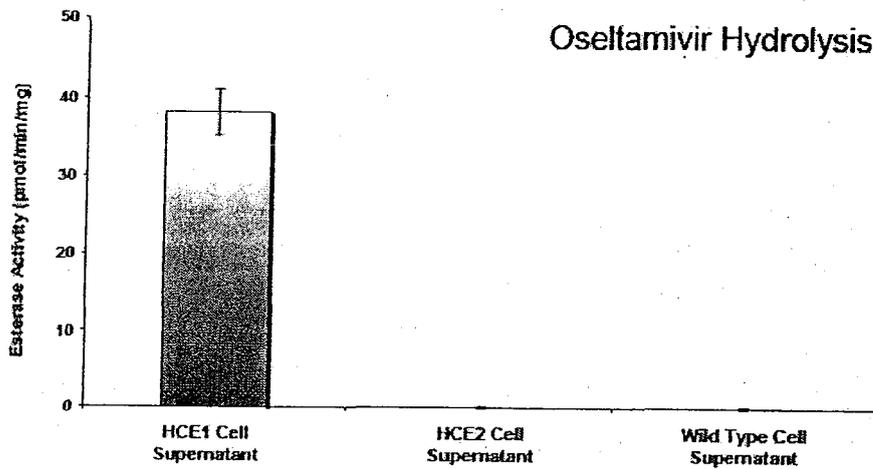
方法

- 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



Roche ロシュグループ

- 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



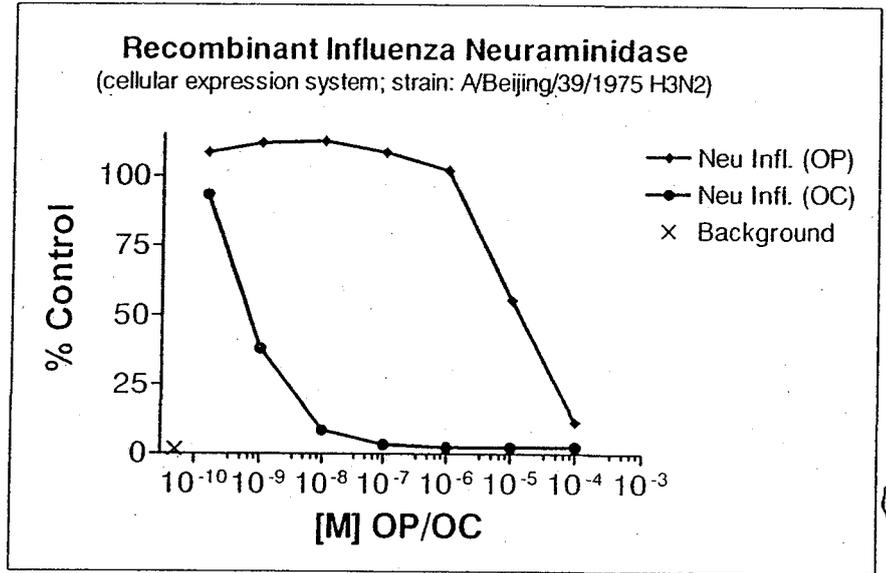
Roche ロシュ グループ

- 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)

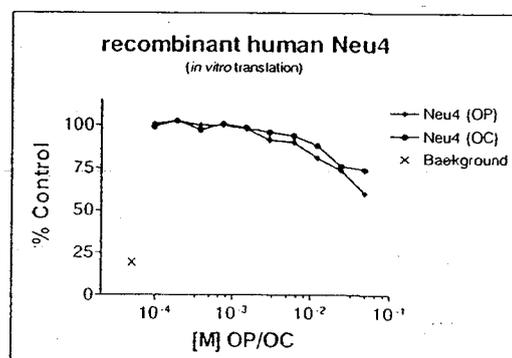
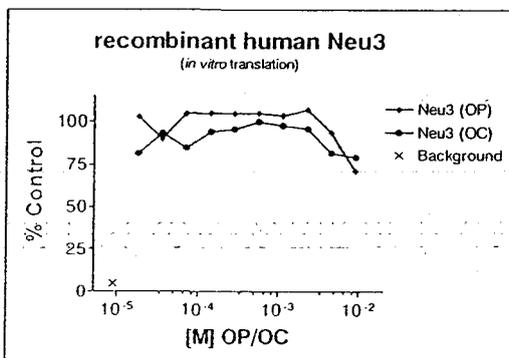
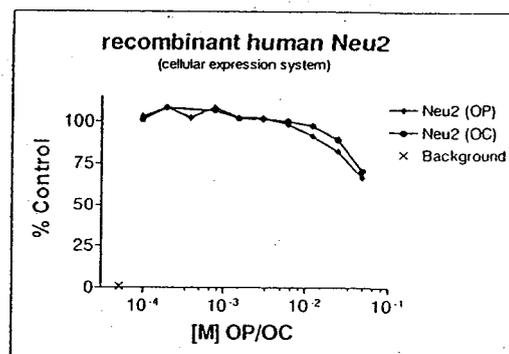
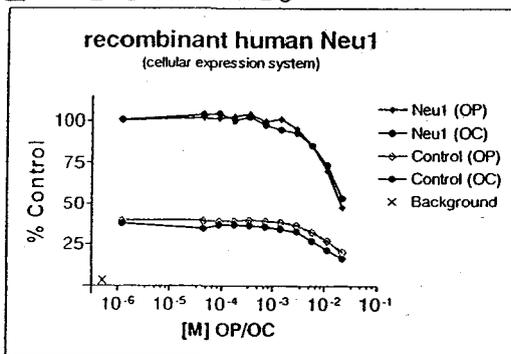


結果 — ヒトノイラミニダーゼ



Roche ロシュ グループ

- 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 — 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ニダ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 ¹	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

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ニダーゼ Neu1-4のいずれに対しても阻害活性を示さなかった。

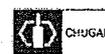
—この結果は、我々が先に報告した非臨床試験結果*と一致する。

- 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

結果 - 脳室内投与予備試験

TKモニタリング - 最高濃度



Roche ロシュグループ

Route	Compound: Dose	Analyte	Mean Cmax (ng/mL or ng/g)				
			Plasma	CSF	Cerebellum	Hippocampus	Olfactory bulb
ICV	OP: 0.2 µg/rat	OP	0.06**	17.2	40.1	245	7.94
		OC	NC***	4.66	10.2	2.54	0.949
ICV	OC: 0.2 µg/rat	OC	0.826	68.1	32.3	18.2	8.65
ICV	OP: 2 µg/rat	OP	0.658	70.8	299	947	49.6
		OC	0.436	5.23	3.24	13.6	9.60
ICV	OC: 2 µg/rat	OC	4.71	446	308	764	148
Oral	OP: 200 mg/kg	OP	7620	534	489	926	194
		OC	14600	569	177	128	232
Oral	OP: 1000 mg/kg	OP	16300	1120		2310	
		OC	49700	363		641	

Limit of quantification

Plasma: 0.1 ng/mL, CSF: ~0.1 ng/mL Brain: 0.5 ng/g

Extrapolated human brain level

OP: 2.1 ng/g, OC: 22.0 ng/g

* Study No. 8036P08のデータ, **濃度が0.1ng/mLを超えたのは1例のみ, *** NC: 計算せず

31

要約 - 脳室内投与予備試験



Roche ロシュグループ

• OPおよびOCの脳室内投与:

- OCの場合、脳室内投与後に経口投与と同程度に均一な脳曝露が得られる可能性が示されたが、OPの場合は経口投与に比べて脳曝露の均一性は低かった。
- 十分コントロールされた試験にもかかわらず、動物個体間差が著しく大きかった。
- 投与部位に近い海馬では比較的高いOPおよびOC濃度が検出された。
 - OPの場合、ヒト脳中濃度(外挿値)の450倍
 - OCの場合、ヒト脳中濃度(外挿値)の35倍
- 行動に対する影響はみられなかった。

• OP経口投与:

- 脳中OP及びOCの曝露は比較的高く均一であった。

32

中間結論と次のステップ 脳室内投与予備試験

- 脳室内投与予備試験の結果、脳室内投与により脳でのOPの均一な曝露が得られる可能性は低いことが判明した。
- ラットにおける中枢神経系の安全性薬理試験を、経口投与で実施した。その理由は以下の通り
 - 非常に高い用量のOPを経口投与した場合、OP及びOCの十分な安全域が確認できる比較的均一な脳曝露が得られる。
 - 臨床での投与経路と同じである(cf. ICH S7a guidelines)。

33

方法 – 成熟ラットにおけるOP経口投与後の脳への曝露と行動評価

- 行動
 - 雄性ラットにOP(500, 763及び1000 mg/kg*)を経口投与
 - 投与前, 投与1, 2, 4, 6及び8時間後に直腸温測定を含むIrwin変法を実施(体温測定を含む40以上の観察項目)
 - ブラインド下で行動観察
 - 試験系の確認のため、陽性対照としてD-amphetamin 10 mg/kg*投与群を設置
- 脳への曝露
 - 雄性SDラットにOP(763及び1000 mg/kg*)を経口投与
 - 血漿、脳脊髄液、及び灌流した脳を採取し測定

*用量はフリー体換算

34

結果 - 成熟ラットにおけるOP経口投与後の脳への曝露と行動評価



• 行動

- 行動, 運動量, 協調性及び感覚/運動反射反応に対する影響は認められなかった。
- 用量相関性のない一過性の軽度の体温低下(投与1時間後のみ、最大0.5°C)が認められた。
- D-amphetamineは予想されるような明らかな中枢刺激作用を示した。

• 脳への曝露

- OP経口投与(763及び1,000 mg/kg)後の脳中OP及びOC濃度最大値は、それぞれ約2,300および640 ng/gであった。
- OPおよびOCの脳/血漿比(AUC)は、それぞれ0.12及び0.01であった。

35

要約 - 成熟ラットにおけるOP経口投与後の脳への曝露と行動評価



• 行動

- OPは中枢神経系機能に影響を及ぼさず、ごく僅かな体温変化(最大0.5°Cの低下)がみられたのみであった。
- OPの無毒性量(NOEL)は1,000 mg/kg以上であると考えられた。

• 脳への曝露

- OP 1,000mg/kg経口投与後の脳および脳脊髄液中最高濃度は比較的高く、これらの成績は、過去の試験成績と同様であった。

36

総括

- OPの場合、脳室内投与後に均一な脳曝露が得られる可能性は低いことが判明した。
- 投与部位に最も近い部分では局所的に比較的高い濃度のOP及びOCが検出された(海馬では、OP及びOCそれぞれヒト脳中濃度(外挿値)の450倍および35倍)。
 - OP及びOC脳室内投与後に、行動に対する影響はみられなかった。
- 非常に高い用量のOP経口投与により、比較的高く均一なOP及びOCの脳曝露が達成された。
 - 40以上の観察項目で行ったIrwin変法試験の結果、中枢神経系への影響が無いことを確認した。

37

基礎WGに提出した試験報告書の データレビュー報告

- 目的
 - タミフル非臨床試験についての信頼性を確保するため、厚生労働省の指示に基づき、生データと報告された結果が一致しているかどうかを確認した。
- 結果
 - 基礎WGに提出した試験についてロシュ及び中外の非臨床専門家によるレビューの結果、問題となる点は見出されなかった。
- 結論
 - 生データと報告結果を照合した結果、試験の信頼性が確保されたと考える。

38

中枢神経系に関する非臨床試験および精神神経系有害事象の臨床的意義に関する総括

39

中枢移行性は低い

- ロシュ非臨床試験(経口投与)
 - フェレット及びラットのオートラジオグラフィ試験における脳での低曝露
 - 脳/血漿中濃度 (B/P)比 < 0.3
 - ラットTK試験における血漿中濃度に対する(灌流)脳濃度比: OPが約0.12, OCが約0.01
 - 幼若ラットにおけるB/P比は, 概ねOPが< 0.5, OCが< 0.08
- 公表文献
 - マウス持続静脈内投与試験: 定常状態の B/P比はOPが<0.1, OCが <0.01
 - 幼若マウス: 定常状態の B/P比はOPが約0.25 (Ose et al. 2007)
 - マウス経口投与試験: B/P比はOPが<0.2, OCが <0.02 (Morimoto et al. 2008)
- 臨床情報
 - 日本人/白人健康成人ボランティアにおける脳脊髄液濃度測定試験
 - 2報の小児インフルエンザ患者における報告

結論:

非臨床試験のデータおよび臨床情報からは、OPおよびOCの中枢への移行性は低いことが示された。

40

中枢移行性が低いことを説明する機序

ロシュの非臨床試験

- OP: 脳血管関門(BBB)の透過性は比較的良好であるが、BBBのP-gp(トランスポーター)により能動的に排出(active efflux)される。
- OC: 物理化学的性質 (i.e. logD, polar surface area) により、OCのBBB透過性は低くなる。
 - 局所における OPからOCへの変換はラット及びヒト脳組織中では非常に低い。

公表文献

- OP: BBBで P-gp による能動的排出により制御されているため脳曝露は少ない ; P-gp knock-outマウスのOPのB/P 比は wild-typeマウスに比べて5-6倍増加した (Morimoto et al. 2008)。
- OC: *in vitro*試験では OAT1, OAT3が脳からのOCの排出に関与している可能性が示唆されている (Ito et al. Abstract 2007)。しかし *in vivo*ではそのような能動的トランスポーターは報告されていない。

41

透過機序についての考察

病的あるいは遺伝的変動状態での低い脳透過性を確認

OPに関して

- P-gpはOPの排出に重要であるが、P-gpがない場合においても、B/P比はおよそ0.35 – 0.85と推察される(P-gp knock-outマウスのデータ, Ose et al. 2007, Morimoto et al. 2008)
- そのような場合においても、OPの血漿中濃度は低いことから、脳での最大曝露はわずかであると予想される。
 - ヒトで報告されているP-gp変異が機能に影響するかどうかは不明である。
 - 併用される薬物との相互作用に関して精神神経系の有害事象をレビューした結果からは、P-gp阻害の徴候は認められていない。

OCに関して

- BBB障害時(炎症過程など)の脳OC濃度は300 ng/g以下と推定される。
- ラットにおいては脳濃度が高い場合においても(OCで641 ng/g)、Irwin変法による行動の検討では中枢神経系に対する影響を認めなかった。
- BBB障害時の過大解釈について
 - 完全なBBB障害は、それ自体で致死となると考えられる。
 - 小児脳症患者では、CSF中にOCが検出されなかったことが報告されている (Straumanis et al. 2002)。

42

OP及びOCは *in vitro*で中枢作用を示さない

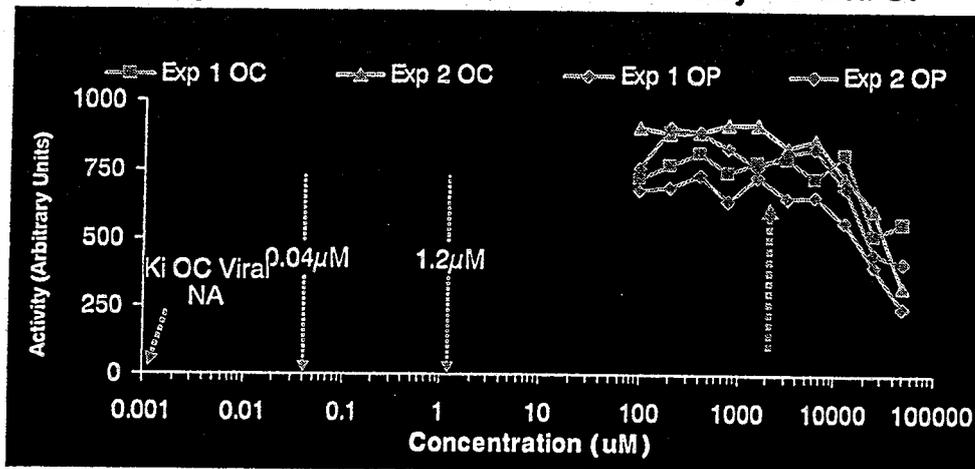


Roche ロシュグループ

ノイラミニダーゼの選択性に関するロシュの試験

- OP及びOCともに1 mMまで活性は認められなかった:
 - PC12細胞(神経系のモデルシステムとして使用されるラット神経内分泌腫瘍細胞株)
 - ラット及びサルの脳由来NA活性
 - リコンビナントヒトノイラミニダーゼ(Neu1-4 =存在する全てのアイソフォーム)

Monkey brain neuraminidase: inhibition by OC and OP



43

OP及びOCは *in vitro*で中枢作用を示さない



Roche ロシュグループ

他の標的に対する影響

ロシュ非臨床試験

- 重要な標的を含む157アッセイにおいて、OP及びOCは 30 μ M まで活性を示さなかった。
 - 受容体
 - glutamate, dopamine, serotonin, epinephrineなどの神経伝達物質
 - Chemokine, hormone及びneuropeptide
 - イオンチャネル
 - Ca²⁺, Na⁺, K⁺, hERG channels
 - 酵素
 - Proteases, kinases, phosphatases, NO synthases, MAO-A & B, Na⁺/K⁺-ATPase
 - 114 標識リガンド結合アッセイ
 - 43 機能アッセイ

公表文献

- dopamine, norepinephrine及びserotonin系に対し影響がないことにより(Satoh et al. 2007)、更に支持される。

44

- オセルタミビルは非常に高い用量の経口投与(300 ~ 1000 mg/kg)* においても動物種、齢にかかわらず、中枢作用を誘発しなかった。

OPは、

- げっ歯類およびサル急性および慢性毒性試験において、活動性の亢進あるいは他の異常行動を誘発しなかった。
 - ラット及びマウスのIrwin変法試験において、意味のある異常行動を誘発しなかった。
 - 1歳以下の幼児への投与を支持するために実施した7日齢幼若ラット試験のFOB試験では、300 mg/kgでCNSに対する影響は認められなかった。
 - マウスでのhexobarbital-誘発睡眠に対する影響はなかった。
 - マウスの痙攣モデルにおいて興奮性の作用を認めなかった。
 - 脳、脊髄、坐骨神経に病理組織学的変化はみられなかった。
- これらの結果は、日本人の健康成人男子ボランティアで行われた臨床試験においてOPが睡眠パラメータに何ら影響しなかったことと一致している。

*フリー体換算、臨床用量(1~2 mg/kg bid)の約150 ~ 1,000 倍高い用量

45

要約:精神神経系有害事象についての薬理学的機構よる説明

- CNSへの移行
 - 非臨床及び臨床試験において、OP及びOCの中枢移行性は低かった。
- 薬力学
 - In vitro試験においてタミフルが中枢神経系副作用を現す機序は認められていない。
 - 非常に高い用量においてもげっ歯類及びサルで異常行動は認められていない。
 - 日本人健康成人ボランティアにおける睡眠検査室試験においてオセルタミビルの影響は認められていない。
- 薬理遺伝学と薬物・薬物相互作用
 - 薬理遺伝学的機序は確認されていない。

結論



Roche ロシュグループ

- OP及びOCは、
 - 中枢移行性が低い。
 - 以下のことが認められていない。
 - 非臨床および臨床試験で中枢作用
 - 中枢作用を誘発する作用機序
 - 薬理遺伝学的機序

以上のように、タミフルが精神神経系有害事象の原因となるようなエビデンスは得られなかった。

資料2-2

資料1

リン酸オセルタミビルの基礎的調査検討のための主要な文献等

・ Effect of a neuraminidase inhibitor (oseltamivir) on mouse jump-down behavior via stimulation of dopamin receptors

Minoru Suzuki and Yutaka Masuda, Biomedical Research 29(5) 233-238, 2008.....p1

・ Activation of the prodrug oseltamivir is impaired by two newly identified carboxylesterase 1 variants

Hao-Jie Zhu and John S. Markowitz, Drug Metab Dispos doi:10.1124/dmd.108.024943, 2008.....p7

・ Limited brain distribution of Ro 64-0802, a pharmacologically active form of oseltamivir, by active efflux across the blood brain barrier mediated by organic anion transporter 3 and multidrug resistance-associated protein 4

Atsushi Ose, Mototsugu Ito, et al. Drug Metab Dispos 2008; doi:10.1124/dmd.108.024018 (2008).....p11

・ Human carboxylesterases HCE1 and HCE 2: Ontogenic expression, inter-individual variability and differential hydrolysis of oseltamivir, aspirin, deltamethrin and permethrin.

Yang, et al. Biochem Pharmacol 2008 ; doi:10.1016/j.bcp.2008.10.005.....p18

・ 異常行動モデルとしての薬物誘発ジャンピング行動に対するタミフルの影響とその防御法に関する研究

小野ら (第113回日本薬理学会近畿支部会)p28

以上

Effect of a neuraminidase inhibitor (oseltamivir) on mouse jump-down behavior via stimulation of dopamine receptors

Minoru SUZUKI¹ and Yutaka MASUDA²

¹Department of Neuropsychiatry, ²Psychosomatic Division, Akita University School of Medicine, Akita 010-8543, Japan

(Received 7 July 2008; and accepted 31 July 2008)

ABSTRACT

Oseltamivir (Tamiflu[®], Roche Laboratories, Inc.) is a neuraminidase inhibitor that can cause jump-down behaviors in children. There is a mouse slip-down model, in which the dopamine D2 receptor activity is increased by serum sialoglycolipids and the mouse jump-down behavior appears in response to the dopamine D2 receptor agonist, PPHT. The present study examined the effect of oseltamivir on jump-down behavior in mice. Oseltamivir sialylates a serum glycolipid and this modified glycolipid induces jump-down behavior via the stimulation of dopamine D2 receptors. This mechanism may be involved in the abnormal behavior of children taking oseltamivir.

Oseltamivir (Tamiflu[®], Roche Laboratories, Inc.) is an antiviral drug used to treat influenza. It can reduce the duration and severity of the illness if administered within 48 hours after the onset of symptoms (4, 13, 19). Recently, fatal accidents due to abnormal behaviors such as jumping from high places after taking oseltamivir have been reported in juvenile patients in Japan (7, 18, 20). These abnormal behaviors usually occur after the initial administration of oseltamivir (8). In March 2007, the Japanese Ministry of Health, Labour and Welfare announced a ban on the use of oseltamivir in patients from 10–19 years of age (12). However, little is known about either the contribution of this drug to these behaviors or the mechanism involved.

Sialic acids exist mostly in the terminal positions of biomolecules (such as glycoproteins, glycolipids and gangliosides) and cell membranes and are involved in a wide variety of physiological processes, including immune functions (24, 26). Neuraminidases are called sialidases because they hydrolyze the terminal sialic acid linkage in these biomolecules and variations in human sialidase activity have been

implicated in serious diseases and symptoms including neuropsychiatric problems (1, 2, 25). Oseltamivir is a representative neuraminidase inhibitor.

Slip-down behavior in mice is induced by a comparatively low-dose of the dopamine D2 receptor agonist, PPHT (17), and that the representative dopamine D2 receptor agonists morphine and quinpirole induce jump-down behavior in mice (6, 10). In addition, we noticed that mouse jump-down behavior appeared by increased doses of PPHT during previous experiment. An increase in dopamine D2 receptor activity is closely associated with sialylation of a serum glycolipid (15). Oseltamivir might influence the dopamine D2 receptor activity through sialoglycolipids and oseltamivir might be connected to the manifestation of the jump-down behavior. An animal model is useful for understanding these behavioral phenomena. Therefore, the jump-down behavior in mice could be a model for the jump-down behavior in human children taking oseltamivir.

The present study investigated the effect of oseltamivir on jump-down behavior in mice, a serum glycolipid associated with this behavior and changes in glycosylation of this glycolipid in response to oseltamivir.

Address correspondence to: Minoru Suzuki M.D., Department of Neuropsychiatry, Akita University School of Medicine, 1-1-1 Hondo, Akita 010-8543, Japan
Tel: +81-18-834-1111, Fax: +81-18-884-6445
E-mail: suzukimi@kyusei.or.jp

MATERIALS AND METHODS

Animals. Eight-week-old male ddY mice that weighed 25–30 g were purchased from Japan SLC (Shizuoka, Japan). A group of 5 mice were housed in a plastic cage (338 × 140 × 225 mm) with free access to food (ED-7; Clea Japan, Tokyo, Japan) and water. The animal room was kept at 21–25°C with 50–60% humidity and was illuminated from 7:00 to 19:00. All experiments were carried out according to the guidelines of the Ethics Committee for Animal Experiments of the Akita University School of Medicine.

Dosage of PPHT inducing mouse jump-down behavior. The dopamine D2 receptor agonist 2-(*N*-phenylethyl-*N*-propyl) amino-5-hydroxytetralin hydrochloride (PPHT; Funakoshi, Tokyo, Japan) was dissolved in water. The observation of mouse jump-down behavior is the same as procedure of observation of mouse slip-down behavior which we previously reported (17). This method was established for the detection of neuronal D2 dopamine receptor activity. In brief, a raised platform measuring 10 cm in diameter and 20 cm high was prepared. One group of five mice in a cage was intraperitoneally injected with 200, 150, 100, or 50 µg/kg of PPHT, or 100 µL of physiological saline (PS) as a control. Twenty minutes after the injection, the mice were placed individually on the platform for 5 min and thereafter both slip-down behavior and jump-down behavior were investigated.

Effect of oseltamivir on jump-down behavior. From results of the above experiment, 50 µg/kg of PPHT was determined to be a suboptimal dose of mouse jump-down behavior. Other naïve mice groups were prepared. Two trials separated by a 20-min interval were observed to confirm that all of the mice remained on the platform for 5 min without jumping-down and slipping-down before the administration of drugs. Then the mice were injected intraperitoneally with oseltamivir solution or with PS as a control (5 mice each). Oseltamivir was dissolved in water and 25 mg/kg, 50 mg/kg, or 100 mg/kg was injected intraperitoneally in mice (5 mice each). Two hours after injection with oseltamivir solution or with PS, each mouse was placed individually on the platform and jump-down behavior was examined for 5 min. These mice were also injected intraperitoneally with PPHT at the suboptimal dose of 50 µg/kg. Twenty minutes after injection with PPHT of 50 µg/kg, jump-down behavior was again examined

for 5 min.

Isolation of the glycolipid fraction from sera. The effect of oseltamivir was thought to be related to serum glycolipid. Oseltamivir solution (100 mg/kg) was injected intraperitoneally in 5 groups of mice and PS (100 µL) was injected into another 5 groups. Sera were collected 2 h after this treatment. Glycolipids were separated from the sera by the methanol-chloroform method, as reported previously (16). In brief, 1 mL of sera was added to 2.5 mL methanol and 1.25 mL chloroform. The fluid was agitated for 2 min and left at room temperature (RT) for 10 min. Then another 1.25 mL chloroform was added and the mixture was agitated for 30 s. After addition of 1.25 mL water and agitation for another 30 s, the mixture was centrifuged at 150 × *g* for 5 min at RT, thus resulting in an upper methanol-water layer containing proteins and a lower chloroform layer containing lipids and glycolipids. The lower layer was collected and evaporated and the lipids and glycolipids were redissolved in 2 mL water. The solution was applied to an ion-exchange DE-52 column (Whatman International, Maidstone, UK) saturated with 10 mM NaHCO₃, pH 8.3 and eluted with 50, 100, 150, 200, 250 and 300 mM NaCl in stages. The eluted fractions were refined to less than 3 kDa with the use of an ultrafiltration membrane (Centricon; Amicon, Tokyo, Japan). Two hundred microliters of each fraction was injected intraperitoneally into the naïve group of 5 mice and then the mice were additionally injected with 50 µg/kg PPHT 20 min after the fraction injection. The effect on neural D2 receptor activity was investigated by the jump-down method.

Detection of the sugar chain structures of effective glycolipids. To detect the sugar chain structures of the glycolipids, a 50% ethanol lectin-enzyme-linked immunosorbent assay (lectin-ELISA) was performed, as reported previously (16). In brief, 50 µL of the lipid fraction eluted with 250 mM NaCl in the serum of 5 mice treated with 100 mg/kg oseltamivir or 5 mice treated with PS was mixed with 50 µL ethanol and poured into one well of a 96-well plate (Sumitomo Bakelite, Tokyo, Japan). After 2 h, the well was washed three times with a washing solution (PS containing 0.005% Tween 20; Seikagaku Co., Tokyo, Japan). After a 30-min block with 5% bovine serum albumin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), the well was washed again three times with the same washing solution. Five different biotinylated lectins that recognize specific sugar

chain structures (ABA, Gal β ₁₋₃GalNAc; DBA, GalNAc α ₁₋₃GalNAc; SSA, Sial α ₂₋₆Gal; AAL, Fuc α ₁₋₂Gal; MAM, Sial α ₂₋₃Gal) were prepared at 2 μ g/mL in PS and 100 μ L of the mixture was added to the well. After 1 h incubation at RT, the well was washed three times with the washing solution. One hundred microliters of peroxidase-conjugated avidin (Seikagaku Co.) prepared at 0.1 μ g/mL in PS was then added to the well. After 15-min incubation at RT, the well was washed four times with PS. Development of the color reaction was performed with a developing kit (Sumitomo Bakelite) and absorbance was measured at 455 nm and 650 nm.

Confirmation of the glycolipid effect. The glycolipid fraction eluted with 250 mM NaCl from the sera of mice treated with PS or the sera of mice treated with 100 mg/kg oseltamivir was applied to a *Macckia amurensis* agglutinin (MAM) affinity column (Seikagaku Co.). MAM is the specific lectin for Sial α ₂₋₃Gal and this affinity column was used to refine the glycolipid that has Sial α ₂₋₃Gal in the sugar chain terminal. Fractions eluted with 6 M urea were desalted over a CD-50 desalting column (Pharmacia, Uppsala, Sweden) and freeze-dried. Glycolipids were redissolved in water to a concentration of 10 μ g/mL. A concentration of 25, 50, or 100 μ g/kg of glycolipid solution was injected intraperitoneally into mice (5 each) and the effect on jump-down behavior was investigated after treatment with the sub-optimal dose of PPHT.

Statistical analysis. The Kruskal-Wallis rank test

was used to determine significant differences among groups. The Mann-Whitney U test was used for further analysis. $P < 0.01$ was considered to be statistically significant.

RESULTS

Suboptimal dose of the dopamine D2 receptor agonist PPHT

A concentration of 100 μ g/kg of PPHT induced slip-down behavior, but 50 μ g/kg did not. On the other hand, concentrations of 200 and 150 μ g/kg induced jump-down behavior, but 100 and 50 μ g/kg did not (Table 1).

Effect of oseltamivir on jump-down behavior

To determine whether oseltamivir induces jump-down behavior in mice, the behavior of the mice 2 h were examined after the injection of various concentrations of oseltamivir or PS and then at 20 min after the injection of 50 μ g/kg PPHT. Mice treated with oseltamivir or PS showed no jump-down behavior, but after being treated with D2 receptor agonist, the mice treated with 50 or 100 mg/kg oseltamivir showed jump-down behavior (Table 2). The number of mice exhibiting jump-down behavior increased dose-dependently.

Effects of serum glycolipid fractions on jump-down behavior

To determine whether glycolipid fractions from 100 mg/kg oseltamivir-treated mice induce jump-down behavior, the mice were injected intraperitoneally

Table 1 Jump-down or slip-down behavior induced by the dopamine D2 receptor agonist PPHT

	Dose of PPHT (μ g/kg)				PS (control)
	200	150	100	50	
Jump-down behavior	5	5	0	0	0
Slip-down behavior	0	0	5	0	0

Values in this table indicate the number of mice that showed jump-down or slip-down behavior among the 5 treated mice. PPHT: 2-(*N*-phenylethyl-*N*-propyl) amino-5-hydroxytetralin hydrochloride. PS: physiologic saline.

Table 2 Number of mice exhibiting jump-down behavior

	Dose of oseltamivir solution (mg/kg)			PS (control)
	100	50	25	
2 h after oseltamivir injection	0	0	0	0
20 min after further D2 receptor agonist injection	5*	2*	0	0

Values in this table indicate the number of mice that showed jump-down behavior among the 5 treated mice. The D2 receptor agonist was used at 50 μ g/kg. In the lower data, a statistically significant difference was found ($k = 3$, $n_1 = n_2 = n_3 = 5$, $n = 15$, $H = 12.5$, $P < 0.009$; Kruskal-Wallis rank test). * $P < 0.01$ vs. control (Mann-Whitney U test). PS: physiologic saline.

ally with serum glycolipid fractions eluted with various concentrations of NaCl and evaluated their behavior. The glycolipid fraction from 100 mg/kg oseltamivir-treated mice eluted with 250 mM NaCl induced jump-down behavior (Table 3). None of the other fractions from 100 mg/kg oseltamivir- or PS-treated mice induced this behavior.

Sugar chain reactivities of glycolipid eluted with 250 mM NaCl

To identify the sugar chain structures of the effective glycolipid eluted with 250 mM NaCl, the reactivity of five kinds of sugar chain structures were investigated using by the 50% ethanol lectin-ELISA method. The sugar chain structures Gal β ₁₋₃GalNAc, GalNAc α ₁₋₃GalNAc, Sial α ₂₋₆Gal and Sial α ₂₋₃Gal were found in the glycolipid fractions of mice treated with 100 mg/kg oseltamivir or PS (Table 4). No Fuca α ₁₋₂Gal reactivity was found. The Gal β ₁₋₃GalNAc, GalNAc α ₁₋₃GalNAc and Sial α ₂₋₆Gal reactivity was similar in both groups, but the Sial α ₂₋₃Gal reactivity was greater in the mice treated with 100 mg/kg oseltamivir than in the mice treated with PS.

Confirmation of the glycolipid effect

To confirm the glycolipid effect, three concentrations of the glycolipid fraction or PS were each injected intraperitoneally into 5 mice and the effects on jump-down behavior were investigated. After refinement with a MAM column, the glycolipid from mice treated with oseltamivir dose-dependently induced jump-down behavior after treatment with 50 μ g/kg PPHT. The glycolipid from mice treated with PS did not induce this behavior, even at the dose of 100 μ g/kg and after treatment with 50 μ g/kg PPHT (Table 5).

DISCUSSION

Oseltamivir is a sialic acid analogue that inhibits influenza type A and type B neuraminidase, the viral enzyme that allows the release of virus from infected cells. In addition, oseltamivir is an ester prodrug activated by hepatic carboxylesterases. It is thought that the sudden onset of reactions such as abnormal behaviors and sudden death during sleep are caused by the prodrug of oseltamivir, oseltamivir phosphate. On the other hand, adverse reactions such as

Table 3 Jump-down behavior in mice treated with glycolipids isolated from sera

Injected fraction	Serum glycolipids from	
	mice treated with PS	mice treated with 100 mg/kg oseltamivir
Eluted with 50 mM NaCl	0	0
100	0	0
150	0	0
200	0	0
250	0	5
300	0	0

Values in this table indicate the number of mice that showed jump-down behavior among the 5 injected mice. All mice were also treated with 50 μ g/kg dopamine D2 receptor agonist PPHT 20 min after the fraction injection. PS: physiologic saline.

Table 4 Sugar chain reactivities of the serum glycolipids eluted with 250 mM NaCl

	Serum glycolipid from		
	mice treated with PS	mice treated with 100 mg/kg oseltamivir	PS (negative control)
Gal β ₁₋₃ GalNAc	0.126	0.127	0.036
GalNAc α ₁₋₃ GalNAc	0.116	0.118	0.050
Sial α ₂₋₆ Gal	0.091	0.088	0.045
Sial α ₂₋₃ Gal	0.086	0.153	0.043
Fuca α ₁₋₂ Gal	0.037	0.035	0.036

Values indicate absorbance at dual wavelengths of 455 nm and 650 nm.

Serum glycolipid was obtained from the 5 mice treated with PS or the 5 mice treated with 100 mg/kg oseltamivir. PS: physiologic saline.

Table 5 Mice jumping-down after treatment with refined glycolipid

Glycolipid dose ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Glycolipid from	
	mice treated with PS	mice treated with 100 mg/kg oseltamivir
100	0	5*
50	0	3
25	0	0
PS (control)	0	

Values in this table indicate the number of mice that showed jump-down behavior among 5 treated mice. All mice were treated with 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ D2 receptor agonist. In the right column data, statistical differences were analyzed by the Kruskal-Wallis rank test ($k=3$, $n_1 = n_2 = n_3 = 5$, $n = 15$, $H = 12.5$, $P < 0.009$).

* $P < 0.01$ vs. control (Mann-Whitney U test). PS: physiologic saline.

pneumonia, sepsis, hyperglycemia and gastrointestinal bleeding are thought to be delayed reactions induced by oseltamivir and the active metabolite of oseltamivir, oseltamivir carboxylate (OC), is thought to be the cause of delayed reactions (9). Recently, OC has been described to have an inhibitory action on human cytosolic sialidase. It was hypothesized that this effect might be a mechanism by which oseltamivir induces adverse neuropsychiatric reactions (14). Since OC inhibits the human cytosolic sialidase and it can also damage the cell functions in various human tissues, this may explain the delayed reactions induced by oseltamivir. However, abnormal behaviors occur after the initial administration of oseltamivir (8), therefore, it is supposed that the mechanism of such abnormal behavior might be different from the hypothesis (9).

There were two novel findings in the present study: 1) oseltamivir induced jump-down behavior in mice in association with stimulated neuronal D2 receptor activity and 2) this effect of oseltamivir was associated with the Sial α_{2-3} Gal form of sialylation of serum glycolipid. Neither oseltamivir nor its carboxylic acid metabolite, GS4071, influence the re-uptake/release of three monoamines (dopamine, serotonin and norepinephrine) or GTP binding in postsynapses (23). However, another investigation using rats indicates the possibility that oseltamivir has effects on the central nervous system, especially when combined with other agents (11). Serum glycolipid would be expected to be sialylated following oseltamivir treatment; however, the mechanism of sialylation with the Sial α_{2-3} Gal form is not clear. Lipids can pass through the blood-brain barrier and dopaminergic neurons possess glycoside receptors (21). Serum glycolipid regulates the dopaminergic neuron activity, while sialylation enhances the effect of increased D2 receptor activity

by agonists. A previous study reported that oseltamivir enhances the effect of ganglioside on opioid receptors (5).

Hyperthermia excites the hypothalamus, which decreases the plasma sialic acid level (3). Decreased sialylation of serum glycolipids regulates dopaminergic neuron activity relating to hyperthermia. With regard to the jump-down behavior of children taking oseltamivir, oseltamivir may block glycolipid desialylation and neuronal D2 receptor activity in children infected with influenza may be increased. Slip-down behavior in mice is caused by dopaminergic hyperactivity to escape from an uneasy situation (15). Jump-down behavior in mice is also caused by dopaminergic hyperactivity and could also indicate behavior to escape from an uneasy situation. This is a basic adaptive behavior in animals and experience refines the behavior. Some children may not be able to handle this type of hyperactive D2 activity.

The results of the present study shed light on the mechanism underlying abnormal behaviors of some children in response to oseltamivir. It would be useful to examine the oseltamivir-induced jump-down behavior in influenza-infected mice. Human studies such as a sugar-chain analysis of blood phospholipids of patients who take oseltamivir are also needed.

REFERENCES

1. Becker CG, Artola A, Gerardy-Schahn R, Becker T, Welzl H and Schachner M (1996) The polysialic acid modification of the neural cell adhesion molecule is involved in spatial learning and hippocampal long-term potentiation. *J Neurosci Res* 45, 143-152.
2. Boyzo A, Ayala J, Gutiérrez R and Hernández-R J (2003) Neuraminidase activity in different regions of the seizing epileptic and non-epileptic brain. *Brain Res* 964, 211-217.
3. Chen WF, Chen JJ and Chen L (1995) Excitation of hypothalamic nucleus arcuatus neuron induced decrease of plasma

- sialic acid level in rats. *Sheng Li Xue Bao* 47, 597–600. (in Chinese)
4. Cooper NJ, Sutton AJ, Abrams KR, Wailoo A, Turner D and Nicholson KG (2003) Effectiveness of neuraminidase inhibitors in treatment and prevention of influenza A and B: systematic review and meta-analyses of randomised controlled trials. *BMJ* 326, 1235.
 5. Crain SM and Shen KF (2004) Neuraminidase inhibitor, oseltamivir blocks GM1 ganglioside-regulated excitatory opioid receptor-mediated hyperalgesia, enhances opioid analgesia and attenuates tolerance in mice. *Brain Res* 995, 260–266.
 6. Gendreau PL, Petitto JM, Gariépy JL and Lewis MH (1998) D2-like dopamine receptor mediation of social-emotional reactivity in a mouse model of anxiety: strain and experience effects. *Neuropsychopharmacology* 18, 210–221.
 7. Hama R (2005) Discussion of the causal relationship between oseltamivir phosphate (Tamiflu), and sudden death and death from abnormal behavior. 37th Annual Meeting of the Japanese Society for Pediatric Infectious Diseases. November 2005 (abstract).
 8. Hama R (2006) Tamiflu causes abnormal behaviors at noon (after taking first time) of the first day. Part 1. *The Informed Prescriber* 21, 110–116. (in Japanese)
 9. Hama R (2007) Oseltamivir's adverse reactions: fifty sudden deaths may be related to central suppression. *BMJ* 335, 59.
 10. Hui KS and Roberts MB (1975) An improved implantation pellet for rapid induction of morphine dependence in mice. *J Pharmacol* 27, 569–573.
 11. Izumi Y, Tokuda K, O'dell KA, Zorumski CF and Narahashi T (2007) Neuroexcitatory actions of Tamiflu and its carboxylate metabolite. *Neurosci Lett* 426, 54–58.
 12. Japan issues Tamiflu warning after child deaths. *Times* March 21, 2007. <http://www.timesonline.co.uk/tol/news/world/asia/article1549260.ece>.
 13. Jefferson T, Demicheli V, Rivetti D, Jones M, Di Pietrantonj C and Rivetti A. (2006) Antivirals for influenza in healthy adults: systematic review. *Lancet* 367, 303–313.
 14. Li CY, Yu Q, Ye ZQ, Sun Y, He Q, Li XM, Zhang W, Luo J, Gu X, Zheng X and Wei L (2007) A nonsynonymous SNP in human cytosolic sialidase in a small Asian population results in reduced enzyme activity: potential link with severe adverse reactions to oseltamivir. *Cell Res* 17, 357–362.
 15. Masuda Y (2007) Sialic acid-rich glycolipid of schizophrenia sera. *Akita J Med* 34, 123–127.
 16. Masuda Y, Sugawara J, Ohnuma S and Sugiyama T (2002) Humoral GalNAcα1-3GalNAc-lipid reactivity of humans in hypomanic state. *Tohoku J Exp Med* 197, 115–118.
 17. Masuda Y, Suzuki M, Takemura T, Sugawara J, Guo N, Liu Y, Kawarada Y, Shimizu T and Sugiyama T (2003) Pharmacological mechanism in slip-down behavior of mice. *Tohoku J Exp Med* 201, 23–27.
 18. Maxwell SR (2007) Tamiflu and neuropsychiatric disturbance in adolescents. *BMJ* 334, 1232–1233.
 19. National Institute for Clinical Excellence. *Amantadine, oseltamivir and zanamivir for the treatment of influenza (review of existing guidance No. 58)*. October 2007. <http://guidance.nice.org.uk/page.aspx?o=456310>.
 20. Okumura A, Kubota T, Kato T and Morishima T (2006) Oseltamivir and delirious behavior in children with influenza. *Pediatr Infect Dis J* 25, 572.
 21. Radad K, Gille G, Moldzio R, Saito H and Rausch WD (2004) Ginsenosides Rb1 and Rg1 effects on mesencephalic dopaminergic cells stressed with glutamate. *Brain Res* 1021, 41–53.
 22. Rodriguez JA, Piddini E, Hasegawa T, Miyagi T and Dotti CG (2001) Plasma membrane ganglioside sialidase regulates axonal growth and regeneration in hippocampal neurons in culture. *J Neurosci* 21, 8387–8395.
 23. Satoh K, Nonaka R, Ogata A, Nakae D and Uehara S (2007) Effects of oseltamivir phosphate (Tamiflu) and its metabolite (GS4071) on monoamine neurotransmission in the rat brain. *Biol Pharm Bull* 30, 1816–1818.
 24. Schauer R (2000) Achievements and challenges of sialic acid research. *Glycoconj J* 17, 485–499.
 25. Seyrantepe V, Poupetova H, Froissart R, Zabot MT, Maire I and Pshchetsky AV (2003) Molecular pathology of NEU1 gene in sialidosis. *Hum Mutat* 22, 343–352.
 26. Traving C and Schauer R (1998) Structure, function and metabolism of sialic acids. *Cell Mol Life Sci* 54, 1330–1349.

Short Communication

Activation of the Antiviral Prodrug Oseltamivir Is Impaired by Two Newly Identified Carboxylesterase 1 Variants

Received September 28, 2008; accepted November 18, 2008

ABSTRACT:

Oseltamivir phosphate is an ethyl ester prodrug widely used in the treatment and prevention of both Influenzavirus A and B infections. The conversion of oseltamivir to its active metabolite oseltamivir carboxylate is dependent on ester hydrolysis mediated by carboxylesterase 1 (CES1). We recently identified two functional CES1 variants p.Gly143Glu and p.Asp260fs in a research subject who displayed significant impairment in his ability to metabolize the selective CES1 substrate, methylphenidate. In vitro functional studies demonstrated that the presence of either of the two mutations can result in severe reductions in the catalytic efficiency of CES1 toward methylphenidate, which is required for hydrolysis and pharmacological deactivation. The aim of the present study was to investigate the function of these mutations on activating (hydrolyzing) oseltamivir to oseltamivir carboxylate using the cell lines

expressing wild type (WT) and each mutant CES1. In vitro incubation studies demonstrated that the S9 fractions prepared from the cells transfected with WT CES1 and human liver tissues rapidly convert oseltamivir to oseltamivir carboxylate. However, the catalytic activity of the mutant hydrolases was dramatically hindered. The V_{max} value of p.Gly143Glu was approximately 25% of that of WT enzyme, whereas the catalytic activity of p.Asp260fs was negligible. These results suggest that the therapeutic efficacy of oseltamivir could be compromised in treated patients expressing either functional CES1 mutation. Furthermore, the potential for increased adverse effects or toxicity as a result of exposure to high concentrations of the nonhydrolyzed prodrug should be considered.

Oseltamivir phosphate (Tamiflu; Roche, Nutley, NJ) is widely used in the treatment and prophylaxis of both Influenzavirus A and B infections. In addition, oseltamivir may be effective in preventing or treating avian influenza or so-called "bird flu." Oseltamivir is an ester prodrug and, in general, it is readily converted to its active form oseltamivir carboxylate mediated by hepatic carboxylesterase 1 (CES1) (Fig. 1) (Shi et al., 2006). The active metabolite exerts its antiviral effects via the selective inhibition of neuraminidase.

Carboxylesterases are members of the $\alpha\beta$ hydrolase fold family and expressed in many tissues, especially in the liver, small intestine, and lung (Sato and Hosokawa, 2006; Ross and Crow, 2007). The major human carboxylesterases include CES1 (UniProtKB/Swiss-Prot P23141) and carboxylesterase 2 (CES2) (UniProtKB/Swiss-Prot O00748). CES1 and CES2 are largely distinguished from one another by their substrate specificity and tissue distribution (Imai et al., 2006; Sato and Hosokawa, 2006). CES1 more readily catalyzes substrates with a relatively large acyl group and small alcohol group such as methylphenidate, temocapril, and oseltamivir (Sun et al., 2004; Imai et al., 2005; Shi et al., 2006). In contrast, CES2 preferentially hydrolyzes compounds bearing a small acyl moiety and bulky alcohol group, which includes agents such as cocaine and irinotecan. CES1 predominates in the human liver, whereas CES2 is the major carboxylesterase expressed in the intestine (Imai et al., 2006). Hepatic CES1 is the major esterase governing the metabolism of numerous and

structurally diverse therapeutic agents formulated as carboxylic acid esters, carbamates, thioesters, and amide compounds including those prodrugs formulated as esters. In addition, a number of endogenous substrates are recognized.

In a recent study, we identified two CES1 mutations, p.Gly143Glu and p.Asp260fs (Zhu et al., 2008), in a subject who displayed profound alteration of the pharmacokinetics of racemic (*dl*)-methylphenidate (Ritalin; Novartis Pharmaceuticals, Summit, NJ), a selective CES1 substrate, during a single-dose pharmacokinetic study (Patrick et al., 2007). The minor allele frequency of p.Gly143Glu was estimated to be 3.7, 4.3, 2.0, and 0% in white, black, Hispanic, and Asian populations, respectively, by a genotyping study that contains a total of 925 subjects with varied racial and ethnic backgrounds. It was concluded that the p.Asp260fs variant was extremely rare because none of the 925 screened subjects carried this mutation. The functional consequences of both mutations were investigated using cell lines stably expressing each individual mutant. The in vitro incubation study demonstrated that the catalytic function of both p.Gly143Glu and p.Asp260fs is impaired to such a significant degree that CES1-mediated methylphenidate hydrolysis was essentially nil using these two CES1 mutants, whereas wild-type (WT) CES1 readily cleaved the ester (Zhu et al., 2008).

Even though the two newly discovered CES1 mutations were determined to be dysfunctional enzymes in terms of hydrolyzing methylphenidate to its inactive metabolite ritalinic acid, the influence of these CES1 variants on prodrug activation has not been examined to date. Oseltamivir (a drug in wide therapeutic use) has recently been shown to be a selective

Article, publication date, and citation information can be found at
<http://dmd.aspetjournals.org>.
doi:10.1124/dmd.108.024943.

ABBREVIATIONS: CES1, carboxylesterase 1; CES2, carboxylesterase 2; WT, wild type; PNPA, *p*-nitrophenyl acetate; PNP, *p*-nitrophenol; HPLC, high-performance liquid chromatography.

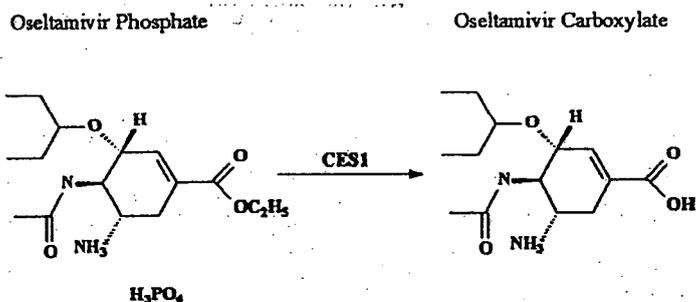


FIG. 1. CES1-mediated activation of osetamivir phosphate.

substrate of CES1 (Shi et al., 2006), making it an excellent candidate compound to assess the effect(s) of the identified *CES1* mutations on prodrug activation. In addition, accumulating evidence has indicated that the biotransformation of osetamivir phosphate to the primary active form osetamivir carboxylate is not only related to its antiviral efficacy but also associated with potential toxicity (http://www.fda.gov/cder/foi/nda/2000/21-246_Tamiflu_Pharmr.pdf).

In the present study, we investigated the influence of the two newly identified *CES1* variants on the metabolism (i.e., activation) of the prodrug osetamivir phosphate. The results suggested that genetic variants of *CES1* that result in dysfunctional enzyme activity could likewise play an important role in both therapeutic efficacy as well as tolerability or toxicity during osetamivir therapy.

Materials and Methods

Materials. Osetamivir phosphate and its active metabolite osetamivir carboxylate were obtained from Toronto Research Chemicals Inc. (North York, ON, Canada). *p*-nitrophenyl acetate (PNPA) and *p*-nitrophenol (PNP) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). All other chemicals and reagents were of the highest analytical grade and were commercially available.

Enzymatic Study. The establishment of Flp-In-293 cells (Invitrogen, Carlsbad, CA) stably expressing WT and p.Gly143Glu and p.Asp260fs *CES1* has been described previously (Zhu et al., 2008). The transfected cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium containing 10% fetal bovine serum and 100 µg/ml hygromycin B. After reaching approximately 95% confluence, cells were then washed and harvested in reaction buffer (phosphate-buffered saline containing 10 mM HEPES, pH 7.4). Afterward, cells were sonicated and then centrifuged at 9000g for 30 min at 4°C. The supernatant (S9 fraction) was collected and stored at -70°C until use. The liver tissues were obtained from a healthy liver donor and determined to express neither p.Gly143Glu nor the p.Asp260fs mutation and served as a native *CES1* control. The liver samples (~300 mg) were homogenized, and the S9 fraction was obtained after centrifugation at 9000g for 30 min at 4°C. The protein concentrations were determined using a Pierce BCA assay kit (Pierce, Rockford, IL).

The osetamivir hydrolysis study was carried out in 1.5-ml tubes at a total volume of 100 µl. Before incubations, osetamivir phosphate solutions were freshly prepared in 50 µl of reaction buffer. The reaction was initiated by mixing osetamivir phosphate with 50 µl of S9 fractions. The final osetamivir phosphate concentrations ranged from 10 to 5000 µM. Our preliminary study indicated that the formation of osetamivir carboxylate was linear with a series of S9 protein concentrations (0.05–0.5 mg/ml) and incubation times (5–15 min) that we tested. In the present study, the enzymatic reactions were performed with the final S9 protein concentration standardized at 0.1 mg/ml and an incubation period of 10 min at 37°C. After incubation, the reaction was terminated by adding 500 µl of methanol containing 40 µM ritalinic acid as the internal standard. The mixture was centrifuged at 16,000g for 5 min to precipitate protein, and the supernatants were then analyzed using an established high-performance liquid chromatography (HPLC) assay. Enzyme kinetic data of osetamivir hydrolysis were fit to the Michaelis-Menten equation, and kinetic parameters K_m and V_{max} were calculated using nonlinear regression analysis with GraphPad Prism software (GraphPad Software Inc., San Diego, CA). In addition, PNPA, a widely used esterase substrate (including *CES1*,

was included in the study as a positive control using a method described previously (Zhu et al., 2008).

HPLC Analysis. An HPLC method was used to measure osetamivir carboxylate formation as a consequence of osetamivir phosphate hydrolysis. The HPLC system consisted of an Agilent 1100 HPLC system (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) equipped with a diode-array detector with the wavelength set at 220 nm. The mobile phase was a mixture of methanol and 20 mM KH_2PO_4 (pH2.5). A gradient elution was applied for the separation with the time program set as follows: from 0 to 4 min, methanol was 44%, and increased to 50% from 4 to 14 min, then maintained at 50% until 16 min, where methanol was returned to the initial condition (44%). Ritalinic acid, osetamivir carboxylate, and osetamivir were eluted at 5.1, 6.0, and 15.7 min, respectively, with the flow rate set at 1 ml/min. In Fig. 2, a typical chromatogram is represented of 100 µM of osetamivir hydrolyzed by WT *CES1* S9 fractions after incubation. The intraday and interday relative standard deviations were determined to be less than 10%. The lower limit of quantification of osetamivir carboxylate was 0.25 µM.

Results

PNPA is a sensitive and established model substrate of *CES1* as well as other human esterases. The PNPA hydrolysis assay demonstrated that WT *CES1* prepared from the cells transfected with WT *CES1* gene rapidly hydrolyzed PNPA to PNP with a catalytic efficiency comparable with that of normal human liver tissues (Fig. 3). Consistent with our previous observations, the enzymatic activity of both p.Gly143Glu and p.Asp260fs toward PNPA was dramatically reduced relative to WT enzyme (Zhu et al., 2008).

The osetamivir phosphate incubation study demonstrated that the S9 preparations of both WT *CES1*-transfected cells and human liver tissues efficiently convert osetamivir to its active antiviral component, osetamivir carboxylate, suggesting that osetamivir serves as an excellent substrate of *CES1* (Fig. 3). The V_{max} and K_m values were determined to be 145 ± 5 nmol/min/mg protein and 1.38 ± 0.13 mM, respectively, under our experimental conditions (Fig. 4). The *CES1* variants p.Gly143Glu and p.Asp260fs displayed poor catalytic activity toward osetamivir hydrolysis (Figs. 3 and 4). The V_{max} value of p.Gly143Glu was found to be 37 ± 1 nmol/min/mg protein, which is approximately 25% of that of WT *CES1*. The K_m value of p.Gly143Glu was estimated to be 2.15 ± 0.18 mM. In addition, p.Asp260fs failed to produce any detectable hydrolysis of osetamivir as measured by the formation of osetamivir carboxylate (Fig. 3). The human liver S9 fractions prepared from a healthy donor specimen produced similar catalytic activity toward both PNPA and osetamivir phosphate, which was in excellent agreement with that of our WT *CES1*-transfected cells (Fig. 3).

Discussion

CES1 is the predominant hydrolase in the liver and plays an important role in the biotransformation of drugs and prodrugs that contains ester bonds. *CES1* genetic variants and their potential for having therapeutic implications have been increasingly reported recently. Our previous study identified two nonsynonymous coding region variants, p.Gly143Glu and p.Asp260fs. In vitro functional studies have shown that the catalytic function mediating the typically efficient and rapid hydrolysis of methylphenidate was clearly disrupted in both the p.Gly143Glu variant and the p.Asp260fs mutation. The potential for clinically significant outcomes in the presence of these two mutations was investigated in the original subject found to carry both *CES1* variants. That subject displayed an extremely abnormal pharmacokinetic profile after the administration of methylphenidate, displaying vastly higher overall blood concentrations of methylphenidate and an unprecedented distortion in the disposition of the respective isomers of the drug (Patrick et al., 2007; Zhu et al., 2008).

ASPET DRUG METABOLISM AND DISPOSITION

Downloaded from ascelibrary.org by Seattle University on 06/11/15

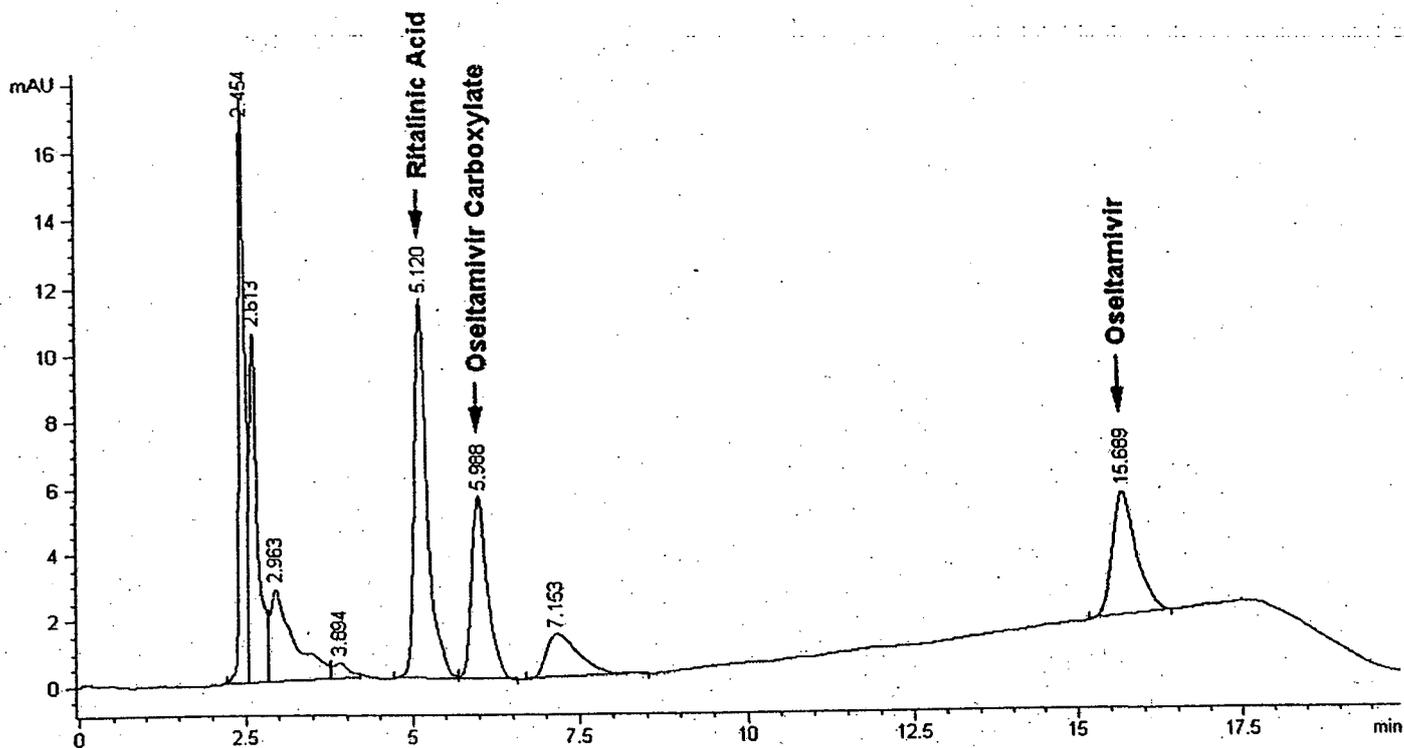


FIG. 2. Representative chromatograph of oseltamivir carboxylate. Oseltamivir carboxylate was analyzed by the HPLC assay after incubation of oseltamivir phosphate (100 μ M) and WT CES1 S9 fractions at 37°C for 10 min.

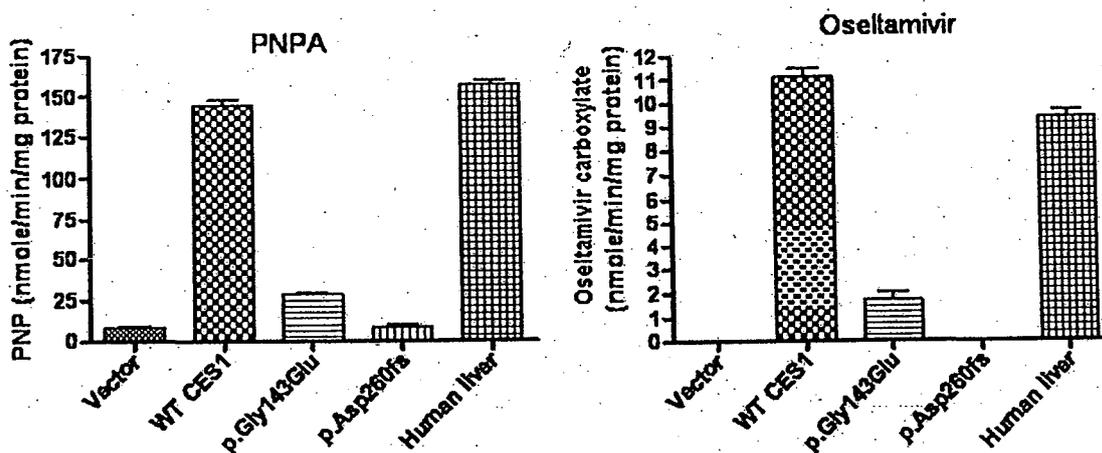


FIG. 3. Hydrolysis of PNPA and oseltamivir by human liver microsomal, WT CES1, and its mutants p.Gly143Glu and p.Asp260fs. The hydrolytic products of PNPA and oseltamivir were determined after incubating the substrates with the enzymes at 37°C for 10 min. Data were expressed as the mean \pm S.D. ($n = 4$).

In addition, the subject experienced significantly higher cardiovascular vital signs relative to other 19 study subjects serving as a pharmacodynamic correlate to the pharmacokinetic observations (Zhu et al., 2008).

Because the activation of many ester prodrugs depends to a great degree upon functional CES1 enzyme to produce the therapeutic moiety, dysfunctional CES1 variants could hinder prodrug activation and lead to the alteration of therapeutic effects and accumulation of the parent prodrug with continued dosing. Such an outcome could lead to therapeutic failure and, depending on the compound administered, unanticipated adverse effects or toxicities. As a prodrug, oseltamivir does not exhibit activity toward the influenza virus unless it is converted to its active metabolite oseltamivir carboxylate by CES1 (Fig. 1). In the present study, the catalytic activity of p.Gly143Glu and p.Asp260fs toward oseltamivir hydrolysis (i.e., activation) was inves-

tigated using transfected cell lines stably expressing WT and individual mutant CES1 enzyme. The data indicated that the enzymatic activity of p.Gly143Glu is substantially decreased with a V_{max} value approximately one fourth that of WT CES1, whereas p.Asp260fs failed to show any measurable hydrolytic activity toward oseltamivir. Acknowledging the limitations of in vitro methodologies, this fundamental alteration in the catalytic activity of CES1 strongly suggests that the activation of oseltamivir would be compromised in patients who express such CES1 variants. In addition to these two mutations, several other natural nonconservative CES1 variants were recently determined to also have functional significance (Shi et al., 2006; Tang et al., 2006). Furthermore, beyond the coding area mutations, a number of functional variants have been reported in the transcriptional regulation region of CES1 gene (Geshi et al., 2005; Hosokawa et al., 2008; Yoshimura et al., 2008). Among those, a single nucleotide

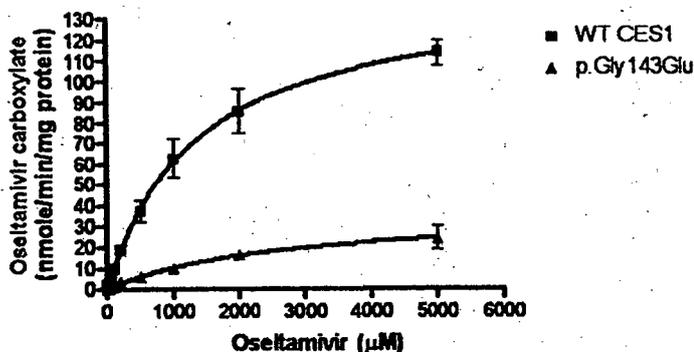


FIG. 4. Enzymatic kinetics study of oseltamivir hydrolysis catalyzed by WT CES1 and its variant p.Gly143Glu. The hydrolysis of oseltamivir (10–5000 µM) was determined after incubation with the cell S9 fractions at 37°C for 10 min. The V_{max} and K_m values were calculated using nonlinear regression analysis with GraphPad Prism software. Data present means ± S.D. for four independent experiments.

polymorphism, -816A/C of the *CES1A2* gene was found to be associated with an improved therapeutic response to an angiotensin-converting enzyme inhibitor imidapril, which is a prodrug and selectively activated by CES1 (Geshi et al., 2005).

It was noted that the observed V_{max} value of WT CES1 is consistent with that reported by Shi et al. (2006), whereas the K_m value is seven times higher. We suspect this difference is more likely than not the result of different experimental conditions used in these two independent studies. For example, the reaction buffer used in the present study was phosphate-buffered saline containing 10 mM HEPES (pH 7.4), whereas a Tris buffer was used in the study by Shi et al. (2006). Indeed, a recent in vitro study addressing this very issue indicates that different enzymatic activity of CES could be observed when different assay buffers were used (Williams et al., 2008). Finally, the S9 fractions used in the present study were prepared from a stable CES1 cell line rather than a transient expression assay.

Functional CES1 is not only critical for the conversion of oseltamivir to its active metabolite to achieve a favorable therapeutic response, but it is also related to the toxicity during oseltamivir therapy. Converging evidence suggests that CES1 function in juvenile animals remain at a significantly lower level than that of adult animals (Kadner et al., 1992; Morgan et al., 1994; Moser et al., 1998; Karanth and Pope, 2000; Padilla et al., 2004; Anand et al., 2006). Animal studies demonstrated that juvenile rats did not hydrolyze oseltamivir efficiently, and they are more susceptible than adults to oseltamivir toxicity (http://www.fda.gov/cder/foi/nda/2000/21-246_Tamiflu_Pharmr.pdf). The present study suggests that, in addition to age, genetic variation is potentially an important factor influencing the enzymatic function of CES1 and could play a role in the therapeutic outcome and toxicity of pharmacotherapy with oseltamivir as well as other known CES1 substrates. Our previously published data with the psychostimulant methylphenidate indicate that the effects of CES1 variants on drug disposition are already advanced beyond the realm of speculation.

In summary, two newly identified CES1 mutations p.Gly143Glu and p.Asp260fs were determined to be dysfunctional enzymes with respect to the activation of the prodrug oseltamivir. Impaired enzymatic function could have significant implications with regard to both the therapeutic efficacy and tolerability of oseltamivir. It should be noted that the extremely low prevalence of p.Asp260fs mutation relegates its clinical significance to being very minor even though it results in a nonfunctional enzyme. However, p.Gly143Glu is a common variant in all populations assessed thus far, with the exception of Asians. A clinical study, particularly one assessing patients who have

been genotyped and found to be heterozygously expressing p.Gly143Glu, is warranted to elucidate the influence of the p.Gly143Glu mutation on the pharmacological disposition and potential toxicities of oseltamivir.

Department of Pharmaceutical and Biomedical Sciences,
Laboratory of Drug Disposition and Pharmacogenetics,
Charles P. Darby Children's Research Institute,
Medical University of South Carolina,
Charleston, South Carolina

HAO-JIE ZHU
JOHN S. MARKOWITZ

References

Anand SS, Kim KB, Padilla S, Muralidhara S, Kim HJ, Fisher JW, and Bruckner JV (2006) Ontogeny of hepatic and plasma metabolism of deltamethrin in vitro: role in age-dependent acute neurotoxicity. *Drug Metab Dispos* 34:389–397.

Geshi E, Kimura T, Yoshimura M, Suzuki H, Koba S, Sakai T, Saito T, Koga A, Muramatsu M, and Katagiri T (2005) A single nucleotide polymorphism in the carboxylesterase gene is associated with the responsiveness to imidapril medication and the promoter activity. *Hypertens Res* 28:719–725.

Hosokawa M, Furihata T, Yaginuma Y, Yamamoto N, Watanabe N, Tsukada E, Ohnata Y, Kobayashi K, Satoh T, and Chiba K (2008) Structural organization and characterization of the regulatory element of the human carboxylesterase (*CES1A1* and *CES1A2*) genes. *Drug Metab Pharmacokin* 23:73–84.

Imai T, Imoto M, Sakamoto H, and Hashimoto M (2005) Identification of esterases expressed in Caco-2 cells and effects of their hydrolyzing activity in predicting human intestinal absorption. *Drug Metab Dispos* 33:1185–1190.

Imai T, Taketani M, Shii M, Hosokawa M, and Chiba K (2006) Substrate specificity of carboxylesterase isozymes and their contribution to hydrolase activity in human liver and small intestine. *Drug Metab Dispos* 34:1734–1741.

Kadner SS, Katz J, and Finlay TH (1992) Esterase-1: developmental expression in the mouse and distribution of related proteins in other species. *Arch Biochem Biophys* 296:435–441.

Karanth S and Pope C (2000) Carboxylesterase and A-esterase activities during maturation and aging: relationship to the toxicity of chlorpyrifos and parathion in rats. *Toxicol Sci* 58:282–289.

Morgan EW, Yan B, Greenway D, and Parkinson A (1994) Regulation of two rat liver microsomal carboxylesterase isozymes: species differences, tissue distribution, and the effects of age, sex, and xenobiotic treatment of rats. *Arch Biochem Biophys* 315:513–526.

Moser VC, Chanda SM, Mortensen SR, and Padilla S (1998) Age- and gender-related differences in sensitivity to chlorpyrifos in the rat reflect developmental profiles of esterase activities. *Toxicol Sci* 46:211–222.

Padilla S, Sung HJ, and Moser VC (2004) Further assessment of an in vitro screen that may help identify organophosphorus pesticides that are more acutely toxic to the young. *J Toxicol Environ Health A* 67:1477–1489.

Patrick KS, Straughn AB, Minhinnett RR, Yeatts SD, Herrin AE, DeVane CL, Malcolm R, Janis GC, and Markowitz JS (2007) Influence of ethanol and gender on methylphenidate pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Clin Pharmacol Ther* 81:346–353.

Ross MK and Crow JA (2007) Human carboxylesterases and their role in xenobiotic and endobiotic metabolism. *J Biochem Mol Toxicol* 21:187–196.

Satoh T and Hosokawa M (2006) Structure, function and regulation of carboxylesterases. *Chem Biol Interact* 162:195–221.

Shi D, Yang J, Yang D, LeCluyse EL, Black C, You L, Akhlaghi F, and Yan B (2006) Anti-influenza prodrug oseltamivir is activated by carboxylesterase human carboxylesterase 1 and the activation is inhibited by antiplatelet agent clopidogrel. *J Pharmacol Exp Ther* 319:1477–1484.

Sun Z, Murry DJ, Sanghani SP, Davis WI, Kedishvili NY, Zou Q, Hurley TD, and Bosron WF (2004) Methylphenidate is stereoselectively hydrolyzed by human carboxylesterase CES1A1. *J Pharmacol Exp Ther* 310:469–476.

Tang M, Mukundan M, Yang J, Charpentier N, LeCluyse EL, Black C, Yang D, Shi D, and Yan B (2006) Antiplatelet agents aspirin and clopidogrel are hydrolyzed by distinct carboxylesterases, and clopidogrel is transesterified in the presence of ethyl alcohol. *J Pharmacol Exp Ther* 319:1467–1476.

Williams ET, Ehsani ME, Wang X, Wang H, Qian YW, Wrighton SA, and Perkins EJ (2008) Effect of buffer components and carrier solvents on in vitro activity of recombinant human carboxylesterases. *J Pharmacol Toxicol Methods* 57:138–144.

Yoshimura M, Kimura T, Ishii M, Ishii K, Matsuura T, Geshi E, Hosokawa M, and Muramatsu M (2008) Functional polymorphisms in carboxylesterase1A2 (*CES1A2*) gene involves specific protein 1 (Sp1) binding sites. *Biochem Biophys Res Commun* 369:939–942.

Zhu HJ, Patrick KS, Yuan HJ, Wang JS, Donovan JL, DeVane CL, Malcolm R, Johnson JA, Youngblood GL, Sweet DH, et al. (2008) Two CES1 gene mutations lead to dysfunctional carboxylesterase 1 activity in man: clinical significance and molecular basis. *Am J Hum Genet* 82:1241–1248.

Address correspondence to: Dr. Hao-Jie Zhu, Charles P. Darby Children's Research Institute, Room 405B, Medical University of South Carolina, 173 Ashley Avenue, Charleston, SC 29425. E-mail: zhuh@muscu.edu

DMD DRUG METABOLISM AND DISPOSITION ASPET

Limited Brain Distribution of [3R,4R,5S]-4-Acetamido-5-amino-3-(1-ethylpropoxy)-1-cyclohexene-1-carboxylate Phosphate (Ro 64-0802), a Pharmacologically Active Form of Oseltamivir, by Active Efflux across the Blood-Brain Barrier Mediated by Organic Anion Transporter 3 (Oat3/Slc22a8) and Multidrug Resistance-Associated Protein 4 (Mrp4/Abcc4)

Atsushi Ose, Mototsugu Ito, Hiroyuki Kusuhara, Kenzo Yamatsugu, Motomu Kanai, Masakatsu Shibasaki, Masakiyo Hosokawa, John D. Schuetz, and Yuichi Sugiyama

Graduate School of Pharmaceutical Sciences, the University of Tokyo, Bunkyo-ku, Tokyo, Japan (A.O., M.I., H.K., K.Y., M.K., M.S., Y.S.); Chiba Institute of Science, Choshi-city, Chiba, Japan (M.H.); and Department of Pharmaceutical Sciences, St. Jude Children's Research Hospital, Memphis, Tennessee (J.D.S.)

Received August 18, 2008; accepted November 20, 2008

ABSTRACT:

[3R,4R,5S]-4-Acetamido-5-amino-3-(1-ethylpropoxy)-1-cyclohexene-1-carboxylate phosphate (Ro 64-0802) is a pharmacologically active form of the anti-influenza virus drug oseltamivir. Abnormal behavior is a suspected adverse effect of oseltamivir on the central nervous system. This study focused on the transport mechanisms of Ro 64-0802 across the blood-brain barrier (BBB). Ro 64-0802 was found to be a substrate of organic anion transporter 3 (OAT3/SLC22A8) and multidrug resistance-associated protein 4 (MRP4/ABCC4). Human embryonic kidney 293 cells expressing OAT3 exhibited a greater intracellular accumulation of Ro 64-0802 than mock-transfected cells (15 versus 1.2 μM /mg protein/10 min, respectively). The efflux of Ro 64-0802 was 3-fold greater when MRP4 was expressed in MDCKII cells and was significantly inhibited by indomethacin. After its microinjection into the cerebrum,

the amount of Ro 64-0802 in brain was significantly greater in both *Oat3*^{-/-} mice and *Mrp4*^{-/-} mice compared with the corresponding wild-type mice (0.36 versus 0.080 and 0.32 versus 0.060 nmol at 120 min after injection, respectively). The brain/plasma concentration ratio ($K_{p, \text{brain}}$) of Ro 64-0802, determined in wild-type mice after subcutaneous continuous infusion for 24 h, was close to the capillary volume (approximately 10 $\mu\text{L/g}$ brain). Although the $K_{p, \text{brain}}$ of Ro 64-0802 was unchanged in *Oat3*^{-/-} mice, it was significantly greater in *Mrp4*^{-/-} mice (41 $\mu\text{L/g}$ of brain). These results suggest that Ro 64-0802 can cross the BBB from the blood, but its brain distribution is limited by its active efflux by *Mrp4* and *Oat3* across the BBB. The transporter responsible for the brain uptake of Ro 64-0802 remains unknown, but *Oat3* is a candidate transporter.

Oseltamivir is an ester-type prodrug of Ro 64-0802, a potent and selective inhibitor of viral neuraminidase, a key enzyme involved in the release of influenza virus from host cells. Oseltamivir is used for the treatment and prophylaxis of infectious diseases caused by both Influenzavirus A and Influenzavirus B (Bardsley-Elliot and Noble, 1999). In recent studies, abnormal behavior, such as jumping and falling from balconies, has been reported in teenagers or younger

people who are taking oseltamivir (<http://www.fda.gov/cder/drug/infopage/tamiflu/QA20051117.htm>; Fuyuno, 2007). In response to these reports, the Ministry of Health, Labor and Welfare has issued a warning regarding the use of oseltamivir as a medication for teenagers or younger people and has prohibited the prescribing of oseltamivir for them in Japan.

This work supported in part by a grant-in-aid for Scientific Research (A) [Grant 20249008] and Scientific Research (B) [Grant 20390046] from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology.

Article, publication date, and citation information can be found at <http://dmd.aspetjournals.org>.
doi:10.1124/dmd.108.024018.

The pharmacological actions of oseltamivir on the central nervous system have been reported in several animal studies (Izumi et al., 2007; Satoh et al., 2007; Usami et al., 2008; Yoshino et al., 2008), although the association between such pharmacological actions and abnormal behavior remains an open question. The systemic administration of oseltamivir increases dopamine levels in the rat medial prefrontal cortex (Yoshino et al., 2008), and oseltamivir and Ro

ABBREVIATIONS: Ro 64-0802, [3R,4R,5S]-4-acetamido-5-amino-3-(1-ethylpropoxy)-1-cyclohexene-1-carboxylate phosphate; BBB, blood-brain barrier; CES1A1, carboxylesterase 1A1; P-gp, P-glycoprotein; Oat/OAT, organic anion transporter; Mrp/MRP, multidrug resistance-associated protein; HEK, human embryonic kidney; MDCK, Madin-Darby canine kidney; LC, liquid chromatography; MS, mass spectrometry; GFP, green fluorescent protein; ANOVA, analysis of variance; PCR, polymerase chain reaction; Mdr, multidrug resistance; Bcrp, breast cancer resistance protein; Oatp, organic anion transporter peptide.

64-0802 enhance spike synchronization between hippocampal CA3 pyramidal cells and evoked synchronized population bursts, which recruit virtually all of the neurons in the network (Usami et al., 2008). It has also been demonstrated that oseltamivir and Ro 64-0802 affect neuronal excitability in rat hippocampal slices and that Ro 64-0802 is 30 times more potent than oseltamivir (Izumi et al., 2007).

Whether oseltamivir and Ro 64-0802 cross the blood-brain barrier (BBB) is an important issue, considering their pharmacological actions on the central nervous system. In clinical studies, both oseltamivir and Ro 64-0802 were detected in the plasma after oral administration of oseltamivir. Oseltamivir is converted to Ro 64-0802 by carboxylesterase 1A1 (CES1A1) in the liver (Shi et al., 2006). Most of the administered dose is recovered in the urine as Ro 64-0802 by glomerular filtration and tubular secretion by organic anion transporters in the kidney (He et al., 1999). The penetration of drugs to the brain from the circulating blood is limited by the BBB, which is formed by endothelial cells connected tightly to adjacent cells. It has been shown that oseltamivir can cross the BBB, but P-glycoprotein (P-gp) limits its brain penetration at the BBB (Morimoto et al., 2008; Ose et al., 2008). In contrast, Ro 64-0802 exhibits only a limited distribution in the brain because it is close to the brain capillary volume. Therefore, the permeability of Ro 64-0802 across the BBB has been considered to be quite low because of its hydrophilic nature and anionic charge at neutral pH.

In this study, we hypothesized that the low distribution of Ro 64-0802 in the brain is attributable to active efflux at the BBB. We focused on two organic anion transporters—organic anion transporter 3 (OAT3/*SLC22A8*) and multidrug resistance-associated protein 4 (MRP4/*ABCC4*)—as the candidate transporters involved. Oat3 is expressed on the abluminal membrane of the brain capillary endothelial cells in rodents (Kikuchi et al., 2003; Mori et al., 2003; Roberts et al., 2008). Cumulative *in vivo* studies suggest that Oat3 plays a significant role in the uptake of hydrophilic organic anions into the endothelial cells, the first step in its overall elimination from the brain to the blood (Ohtsuki et al., 2002; Kikuchi et al., 2003, 2004; Mori et al., 2003, 2004). Ro 64-0802 has been identified as a substrate of OAT1/*SLC22A6* (Hill et al., 2002). Considering the overlapping substrate specificities of OAT1 and OAT3, it is possible that OAT3 accepts Ro 64-0802 as substrate. MRP4 is an ATP-binding cassette transporter localized in the luminal membrane of the brain capillary endothelial cells (Leggas et al., 2004). MRP4 accepts anionic drugs as substrates (Ci et al., 2007; Hasegawa et al., 2007; Imaoka et al., 2007) and mediates their unidirectional efflux into the circulating blood (Leggas et al., 2004). It has been demonstrated that the elimination of topotecan from the brain was delayed and that the concentration of topotecan in the cerebrospinal fluid was greatly enhanced in *Mrp4*^{-/-} mice compared with the corresponding wild-type mice (Leggas et al., 2004). It has also been demonstrated that the brain/plasma concentration ratio of 9'-(2'-phosphonylmethoxyethyl)-adenine 3 h after intravenous administration was greater in *Mrp4*^{-/-} mice than in wild-type mice (Belinsky et al., 2007).

In this study, *in vivo* experiments were undertaken using wild-type, *Oat3*^{-/-}, and *Mrp4*^{-/-} mice to examine the involvement of Oat3 and MRP4 in the uptake and efflux of Ro 64-0802 across the BBB.

Materials and Methods

Reagents. Oseltamivir phosphate and its active metabolite, Ro 64-0802 (purity >95%), were synthesized according to a previous report (Yamatsugu et al., 2007). All other chemicals used in the experiments were of analytical grade.

Animals. *Mrp4*^{-/-} mice had been established previously (Leggas et al., 2004). *Oat3*^{-/-} mice were obtained from Deltagen, Inc. (San Carlos, CA).

Male C57BL/6J, *Mrp4*^{-/-}, and *Oat3*^{-/-} mice were maintained by CLEA Japan, Inc. (Tokyo, Japan). All mice (10–18 weeks old) were maintained under standard conditions with a reverse dark-light cycle. Food and water were available *ad libitum*. All experiments using animals in this study were performed according to the guidelines provided by the Institutional Animal Care Committee (Graduate School of Pharmaceutical Sciences, University of Tokyo).

Uptake of Ro 64-0802 by Human OAT3-Expressing HEK293 Cells. An *in vitro* transport experiment was performed as described previously (Deguchi et al., 2004). After the cells had been washed twice and preincubated with Krebs-Henseleit buffer at 37°C for 15 min, drug uptake was initiated by the addition of Krebs-Henseleit buffer containing Ro 64-0802 (10 μM). The Krebs-Henseleit buffer consisted of 118 mM NaCl, 23.8 mM NaHCO₃, 4.8 mM KCl, 1.0 mM KH₂PO₄, 1.2 mM MgSO₄, 12.5 mM HEPES, 5.0 mM glucose, and 1.5 mM CaCl₂, adjusted to pH 7.4. Uptake was terminated at the designated times by the addition of ice-cold Krebs-Henseleit buffer after the removal of the incubation buffer. The cells were then washed twice with 1 ml of ice-cold Krebs-Henseleit buffer, solubilized in 500 μl of 1 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4), and stored overnight at 4°C. After sonication, aliquots (250 μl) were subjected to liquid chromatography (LC)-mass spectrometry (MS) analysis. The remaining 20 μl of cell lysate was used to determine the protein concentration by the method of Lowry et al. (1951), with bovine serum albumin as the standard.

Construction of Human MRP4/CES1A1-Expressing MDCKII Cells. CES1A1 cDNA was subcloned into the pTARGET vector (Promega, Madison, WI) (Mori et al., 1999) and transfected into MDCKII cells with Lipofectamine 2000 reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA), according to the manufacturer's protocol. The transfectants were selected by culturing them in the presence of neomycin (1600 μg/ml) (Invitrogen) and were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (Invitrogen) supplemented with 10% fetal bovine serum, 1% antibiotic-antimycotic (Invitrogen), and neomycin (400 μg/ml) at 37°C with 5% CO₂ and 95% humidity. MDCKII cells with sufficient CES1A1 activity (CES1A1-MDCKII) were cloned and used as the hosts for infection with recombinant adenovirus carrying the human *MRP4* gene, which had been established previously (Ci et al., 2007; Hasegawa et al., 2007; Imaoka et al., 2007). CES1A1-MDCKII cells were infected with recombinant adenovirus containing human MRP4 transporter cDNA at a multiplicity of infection of 10 for 48 h to overexpress human MRP4 (MRP4/CES1A1-MDCKII). Green fluorescent protein (GFP) was used as the negative control (GFP/CES1A1-MDCKII).

The expression of MRP4 protein was confirmed by Western blotting. The cell lysates were loaded onto a SDS-polyacrylamide gel (7.5%) with a 3.75% stacking gel. *N*-Linked carbohydrate groups were cleaved from the MRP4 protein in the cell lysates with *N*-glycosidase F (PNGase F; New England Biolabs, Ipswich, MA). Digestion was performed according to the manufacturer's instructions, except that the samples were incubated for 30 min at 37°C in denaturing buffer rather than for the recommended 10 min at 100°C. To minimize protein degradation, protease inhibitors were included in all the steps. After incubation at 37°C for 30 min, the samples were separated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (7.5%). The proteins were electroblotted on to a polyvinylidene difluoride membrane (Pall Corporation, East Hills, NY). The membrane was blocked with blocking buffer [Tris-buffered saline containing 0.05% Tween 20 (TTBS) and 3% skimmed milk] for 1 h at room temperature. After it had been washed with TTBS, the membrane was incubated overnight at 4°C with monoclonal anti-MRP4 M4I-10 antibody (1:1000 in blocking buffer; Abcam Inc., Cambridge, MA). The protein was detected by binding horseradish peroxidase-labeled anti-rat IgG antibody (1:5000 in blocking buffer; GE Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK). Immunoreactivity was detected with an ECL Plus Western Blotting Detection Kit (GE Healthcare).

Efflux of Ro 64-0802 Formed Intracellularly from Oseltamivir in MRP4/CES1A1-MDCKII and GFP/CES1A1-MDCKII Cells. After the cells had been washed twice and preincubated with Krebs-Henseleit buffer at 37°C for 15 min, oseltamivir (10 μM) was added to the incubation buffer in the presence or absence of indomethacin (50 μM). At the designated times, the incubation buffer was collected. Ice-cold Krebs-Henseleit buffer was then added, and the cells were washed four times. After the cells had been collected, they were frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until use. The efflux

clearance of Ro 64-0802 from the transfectants was determined using the integration plot method. The amount of Ro 64-0802 effluxed to the buffer at time t [$X_{\text{buffer}}(t)$, nanomoles per milligram of protein] can be described by the following equation:

$$dX_{\text{buffer}}(t)/dt = CL_{\text{efflux}} \times C_{\text{cell}}(t)$$

where CL_{efflux} (microliters per minute per milligram of protein) represents the efflux clearance of Ro 64-0802 from the cells, and $C_{\text{cell}}(t)$ (micromolar concentration) is the cellular concentration of Ro 64-0802. Cellular volume was assumed to be 4 $\mu\text{l}/\text{mg}$ protein. The integration of this equation from time 0 to time t yields the following equation:

$$X_{\text{buffer}}(t) = CL_{\text{efflux}} \times AUC_{\text{cell}}(0-t)$$

where $AUC_{\text{cell}}(0-t)$ (micromolar concentration \times min) represents the area under the cellular concentration-time curve for Ro 64-0802 from time 0 to time t . Because the amount of Ro 64-0802 in buffer [$A_{\text{buffer}}(t)$, nanomoles per milligram of protein] is given by the sum of $X_{\text{buffer}}(t)$ and the amount of Ro 64-0802 existing in the buffer at time 0 (X_0), $A_{\text{buffer}}(t)$ is described by the following equation:

$$A_{\text{buffer}}(t) = CL_{\text{efflux}} \times AUC_{\text{cell}}(0-t) + X_0$$

Thus, the CL_{efflux} value can be obtained by fitting $A_{\text{buffer}}(t)$ versus $AUC_{\text{cell}}(0-t)$ using a least-squares regression program (MULTI) (Yamaoka et al., 1981).

Efflux of Ro 64-0802 from the Cerebral Cortex of Wild-Type, *Oat3*^{-/-}, and *Mrp4*^{-/-} Mice after Microinjection. The efflux of the test compounds from the brain after their microinjection into the cerebral cortex was investigated using the brain efflux index method, as described previously (Kakee et al., 1996). Ro 64-0802 (1 mM) in 0.5 μl of ECF buffer (122 mM NaCl, 25 mM NaHCO₃, 10 mM *d*-glucose, 3 mM KCl, 1.4 mM CaCl₂, 1.2 mM MgSO₄, 0.4 mM K₂HPO₄, and 10 mM HEPES, pH 7.4) was injected into the cerebral cortex (4.5 mm lateral to the bregma and 2.5 mm in depth). After the intracerebral microinjection, the mice were decapitated, and the amount of Ro 64-0802 that remained in the ipsilateral cerebrum was determined with LC-MS analysis.

Brain/Plasma Concentration Ratio of Ro 64-0802 after Subcutaneous Infusion of Oseltamivir or Ro 64-0802 in Wild-Type, *Oat3*^{-/-}, and *Mrp4*^{-/-} Mice. Male C57BL/6J, *Mrp4*^{-/-}, and *Oat3*^{-/-} mice (10–18 weeks old), weighing approximately 25 to 30 g, were used for these experiments. An osmotic pump (8 $\mu\text{l}/\text{h}$; Alzet, Cupertino, CA) was implanted under the skin in the backs of the mice under pentobarbital anesthesia (30 mg/kg). The mice received a continuous subcutaneous infusion of oseltamivir or Ro 64-0802 at doses of 400 or 80 nmol/h/mouse, respectively. Blood samples were collected from the postcaval vein at 24 h after treatment under pentobarbital anesthesia, and the brain was excised immediately. Plasma was obtained by centrifugation of the blood samples (10,000g). The esterase inhibitor, dichlorvos (200 $\mu\text{g}/\text{ml}$), was used to prevent *ex vivo* hydrolysis of the oseltamivir to Ro 64-0802 in the blood and plasma (Wiltshire et al., 2000; Lindegardh et al., 2006). The plasma and brain concentrations of Ro 64-0802 were determined with LC-MS analysis.

Quantification of Ro 64-0802 in Plasma and Brain Specimens. The brain was homogenized with a 4-fold volume of phosphate-buffered saline to obtain a 20% brain homogenate. Plasma specimens (10 μl) were mixed with 40 μl of ethanol, and the brain homogenates (100 μl) were mixed with 400 μl of ethanol. All of these mixed solutions were centrifuged at 15,000g for 10 min. The supernatants of the plasma specimens were mixed with an equal volume of water and subjected to LC-MS analysis. The supernatants of the brain specimens (350 μl) were evaporated, and the pellets were reconstituted with 50 μl of 20% ethanol. The reconstituted specimens were centrifuged at 15,000g for 10 min, and an aliquot of the supernatant was subjected to LC-MS analysis.

An LCMS2010EV equipped with a Prominence LC system (Shimadzu, Kyoto, Japan) was used for the analysis. Samples were separated on a CAPCELL PAK C18 MGII column (3 μm , 2 mm \times 50 mm; Shiseido, Tokyo, Japan) in binary gradient mode at a flow rate of 1 ml/min. Formic acid (0.05%) and acetonitrile were used for the mobile phase. The acetonitrile concentration was initially 10% and then increased linearly to 40% over 2 min. Finally, the column was reequilibrated at an acetonitrile concentration of 10% for 3 min.

The total run time was 5 min. Ro 64-0802 was eluted at 2.5 min. In the mass analysis, Ro 64-0802 was detected at a mass-to-charge ratio of 285.15 under positive electron spray ionization conditions. The interface voltage was -3.5 kV, and the nebulizer gas (N₂) flow was 1.5 l/min. The heat block and curved desolvation line temperatures were 200 and 150°C, respectively.

Statistical Analysis. Data are presented as means \pm S.E. of three to six animals, unless otherwise specified. Student's two-tailed unpaired *t* test and one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test were used to identify significant differences between groups when appropriate. Statistical significance was set at $P < 0.05$.

Results

Uptake of Ro 64-0802 into Human OAT3-Expressing HEK293 Cells. To show that Ro 64-0802 is an OAT3 substrate, an *in vitro* transport experiment was performed. The intracellular accumulation of Ro 64-0802 was significantly greater in HEK293 cells expressing human OAT3 than in mock-transfected cells (1.2 ± 0.2 and 15.1 ± 0.2 $\mu\text{l}/10$ min/mg protein for vector-transfected and OAT3-expressing HEK293 cells, respectively).

Construction of Human MRP4/CES1A1-Expressing MDCKII Cells. A clone of the MDCKII cells exogenously expressing CES1A1 was selected by measuring the hydrolytic activity against *p*-nitrophenyl acetate (data not shown). The subsequent study was performed using this clone as the host. After infection with the recombinant adenovirus, the protein expression of MRP4 in the MRP4/CES1A1-expressing MDCKII cells was confirmed by Western blot analysis (Fig. 1A). An anti-MRP4 monoclonal antibody recognized a 175-kDa protein, which is larger than the molecular mass for MRP4 (149 kDa) predicted from the sequence in the Swiss-Prot database. Deglycosylation of the cell lysates with *N*-glycosidase F resulted in a reduction in the molecular mass, suggesting that the molecular mass of MRP4 in the MRP4/CES1A1-expressing MDCKII cells was increased by glycosylation (Fig. 1B).

Efflux of Ro 64-0802 Formed Intracellularly from Oseltamivir in Human GFP/CES1A1 and MRP4/CES1A1-Expressing MDCKII Cells. An efflux transport experiment was conducted using MRP4/CES1A1- and GFP/CES1A1-MDCKII cells. When MRP4/CES1A1- and GFP/CES1A1-MDCKII cells were incubated with oseltamivir, Ro 64-0802 was detected in both the buffer and the cells in a time-dependent manner (Fig. 1, C and D). The concentration of Ro 64-0802 in the buffer was higher for the MRP4/CES1A1-MDCKII cells than for the GFP/CES1A1-MDCKII cells, and cellular Ro 64-0802 was lower in the MRP4/CES1A1-MDCKII cells (Fig. 1, C and D). Indomethacin, an inhibitor of MRP4 (Reid et al., 2003; Nozaki et al., 2007), reversed the effects of exogenous MRP4 expression. Integration plots of the efflux transport of Ro 64-0802 are shown in Fig. 2A. The efflux clearance of Ro 64-0802 from MRP4/CES1A1-MDCKII cells was 3.1-fold greater than that from GFP/CES1A1-MDCKII cells and was significantly inhibited by indomethacin (Fig. 2B).

Efflux of Ro 64-0802 from the Cerebral Cortex of Wild-Type and *Oat3*^{-/-} Mice after Microinjection. Real-time PCR was performed to check the adaptive regulation of efflux transporters at the BBB of *Oat3*^{-/-} mice. There were no significant differences in the mRNA expression of *Mdr1a*, *Bcrp*, *Mrp4*, organic anion transporter peptide 1a4 (*Oatpla4*), or *Oatp1c1* in the cerebral cortex, quantified by real-time PCR, between wild-type and *Oat3*^{-/-} mice (data not shown).

To examine the involvement of *Oat3* in the efflux transport of Ro 64-0802 across the BBB, Ro 64-0802 was directly injected into the mouse cerebral cortex, and the amount of Ro 64-0802 remaining in the brain was determined at 60 and 120 min after injection. The amount of Ro 64-0802 remaining in the brain was compared between wild-type and *Oat3*^{-/-} mice (Fig. 3). As shown in Fig. 3, *Oat3*^{-/-}

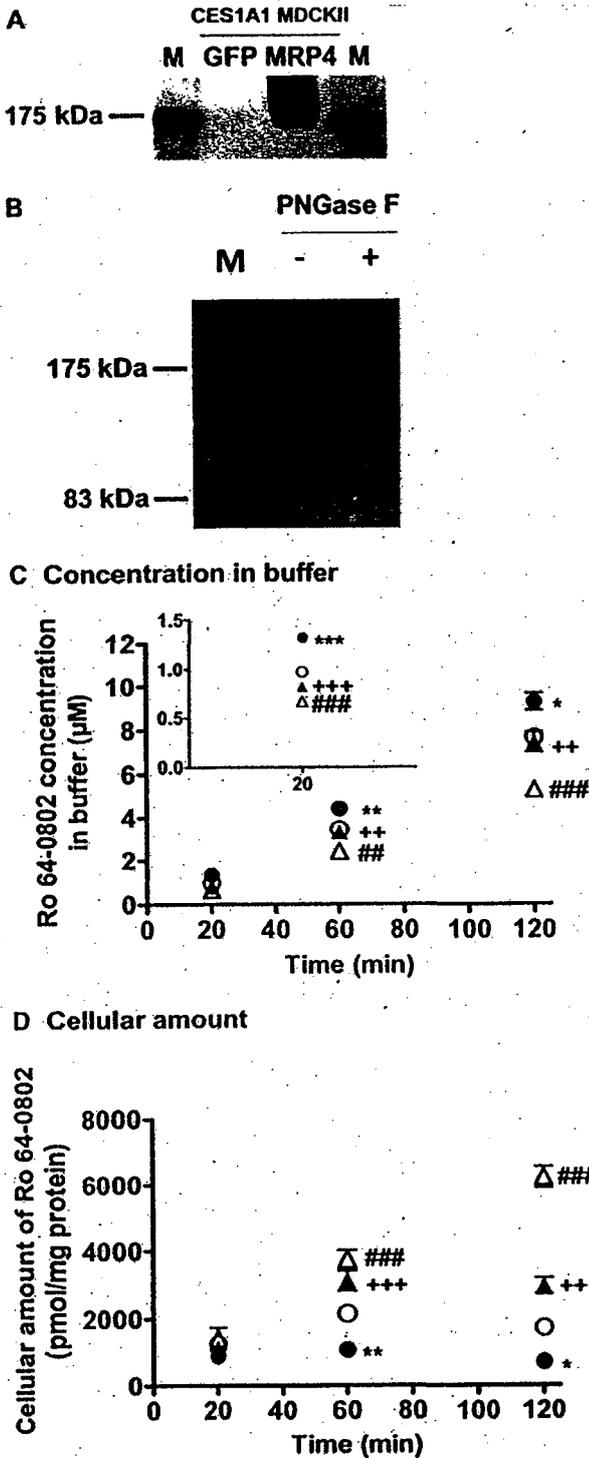


FIG. 1. Efflux of intracellularly formed Ro 64-0802 from mock-transfected and MRP4-expressing MDCKII cells. A and B, Western blotting. A, cell lysates were prepared from mock-transfected (GFP/CES1A1-MDCKII) and MRP4-expressing MDCKII cells (MRP4/CES1A1-MDCKII) and subjected to SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (7.5%). B, N-linked carbohydrate groups were cleaved from the MRP4 protein in the cell lysates using N-glycosidase F (PNGase F). MRP4 was detected by the monoclonal anti-MRP4 M4I-10 antibody. C and D, efflux transport study: MRP4/CES1A1-MDCKII (●, ▲) and GFP/CES1A1-MDCKII cells (○, △) were incubated with 10 μM oseltamivir in the presence (▲, △) or absence (●, ○) of indomethacin (50 μM) at 37°C. Each point represents the mean ± S.E. (n = 6). Statistical significance was calculated by one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test. *, P < 0.05; **, P < 0.01; ***, P < 0.001; significantly different between MRP4/CES1A1-MDCKII and GFP/CES1A1-MDCKII cells. ##, P < 0.01; ###, P < 0.001; significantly different in GFP/CES1A1-MDCKII cells with and without indomethacin. ++, P < 0.01; +, P < 0.05; significantly different in MRP4/CES1A1-MDCKII cells with and without indomethacin.

mice exhibited delayed elimination of Ro 64-0802 from the brain compared with that in wild-type mice.

Efflux of Ro 64-0802 from the Cerebral Cortex of Wild-Type and *Mrp4*^{-/-} Mice after Microinjection. Real-time PCR was used to check the adaptive regulation of efflux transporters at the BBB of *Mrp4*^{-/-} mice. No significant differences were observed in the mRNA expression levels of *Mdr1a*, *Bcrp*, *Oat3*, *Oatp1a4*, or *Oatp1c1* in the cerebral cortex, quantified by real-time PCR, between wild-type and *Mrp4*^{-/-} mice (data not shown).

To examine the involvement of *Mrp4* in the efflux transport of Ro 64-0802 across the BBB, Ro 64-0802 was directly injected into the mouse cerebral cortex, and the amount of Ro 64-0802 remaining in the brain was determined at 60 and 120 min after injection. The amount of Ro 64-0802 remaining in the brain was compared between wild-type and *Mrp4*^{-/-} mice (Fig. 4). As shown in Fig. 4, *Mrp4*^{-/-} mice exhibited delayed elimination of Ro 64-0802 from the brain compared with that in wild-type mice.

Brain/Plasma Concentration Ratio of Ro 64-0802 after Subcutaneous Infusion of Oseltamivir or Ro 64-0802 in Wild-Type, *Oat3*^{-/-}, and *Mrp4*^{-/-} Mice. To clarify the importance of the *Oat3*- and *Mrp4*-mediated efflux of Ro 64-0802 at the BBB, Ro 64-0802 was given to mice by subcutaneous infusion for 24 h, and the *K_{p, brain}* of Ro 64-0802 was determined. The concentrations of Ro 64-0802 in

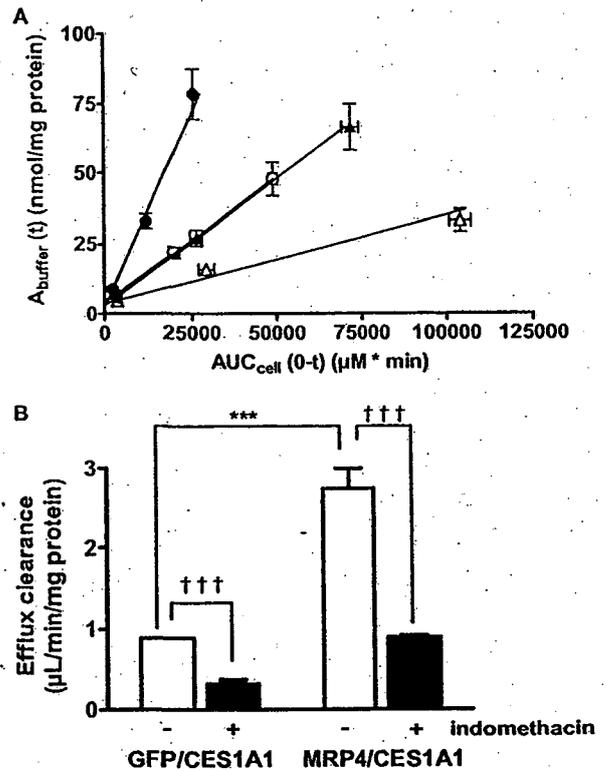


FIG. 2. Integration plots of the efflux transport of Ro 64-0802 from MRP4/CES1A1-MDCKII and GFP/CES1A1-MDCKII cells. A, integration plot: the amount of Ro 64-0802 in buffer [*A_{buffer}*(*t*)] was plotted against *AUC_{cell}*(0-*t*) in MRP4/CES1A1-MDCKII (●, ▲) and GFP/CES1A1-MDCKII cells (○, △) in the presence (▲, △) or absence (●, ○) of indomethacin (50 μM). The data used for the calculation are cited in Fig. 1, C and D. The slope of the plot represents the efflux clearance. Each point represents a mean ± S.E. (n = 6). B, efflux clearance of Ro 64-0802: The efflux clearance of Ro 64-0802 was calculated from the slope of the integration plot (A). Statistical significance was calculated by one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test. ***, P < 0.001; significantly different between MRP4/CES1A1-MDCKII and GFP/CES1A1-MDCKII cells. †††, P < 0.001; significantly different efflux clearance in the presence and absence of indomethacin. Data represent means ± computer-calculated S.D. (microliters per minute per milligram of protein).

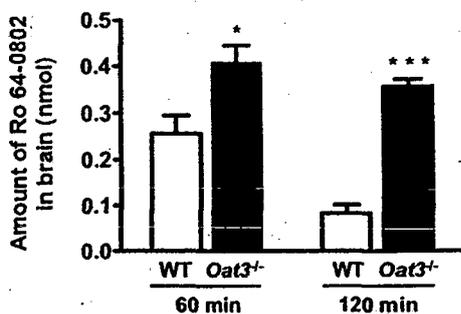


FIG. 3. Comparison of the amounts of Ro 64-0802 in the ipsilateral cerebrum after intracerebral microinjection of Ro 64-0802 in wild-type (WT) and *Oat3*^{-/-} mice. Ro 64-0802 (1 mM) in 0.5 μ l of ECF buffer was injected into the Par2 region (4.5 mm lateral to the bregma and 2.5 mm in depth). The amount of Ro 64-0802 in the ipsilateral cerebrum was determined at 60 and 120 min after treatment. \square , data for wild-type mice; \blacksquare , data for *Oat3*^{-/-} mice. Each bar represents the mean \pm S.E. ($n = 3-4$). Statistically significant differences between wild-type and *Oat3*^{-/-} mice: *, $P < 0.05$; ***, $P < 0.001$.

the plasma were 4.5 ± 0.6 and 4.5 ± 1.3 μ M in wild-type and *Oat3*^{-/-} mice, respectively. The $K_{p, \text{brain}}$ of Ro 64-0802 in *Oat3*^{-/-} mice was not significantly different from that in wild-type mice and remained close to the capillary volume in the brain (Fig. 5). After subcutaneous infusions of oseltamivir in wild-type or *Mrp4*^{-/-} mice, the plasma concentrations of Ro 64-0802 were 6.9 ± 2.3 and 12 ± 5 μ M, respectively. The $K_{p, \text{brain}}$ of Ro 64-0802 was 3.8-fold higher in *Mrp4*^{-/-} mice than that in wild-type mice (Fig. 6). Even after subcutaneous infusions of Ro 64-0802, the $K_{p, \text{brain}}$ of Ro 64-0802 was 6.4-fold greater in *Mrp4*^{-/-} mice than that in wild-type mice (Fig. 6). The plasma concentrations of Ro 64-0802 were 5.7 ± 0.8 and 3.8 ± 1.7 μ M in wild-type and *Mrp4*^{-/-} mice treated with Ro 64-0802, respectively.

Discussion

Abnormal behavior is a suspected adverse effect of oseltamivir on the central nervous system. To understand the pharmacological action of oseltamivir in the brain, its uptake and efflux transport across the BBB were investigated as factors that determine its exposure to the central nervous system. In this study, we focused on Oat3 and Mrp4 as transporters of Ro 64-0802, a pharmacologically active form of oseltamivir, across the BBB.

First, we examined the involvement of Oat3 in the elimination of Ro 64-0802 from the cerebral cortex after microinjection because an in vitro transport study using OAT3-expressing HEK cells identified

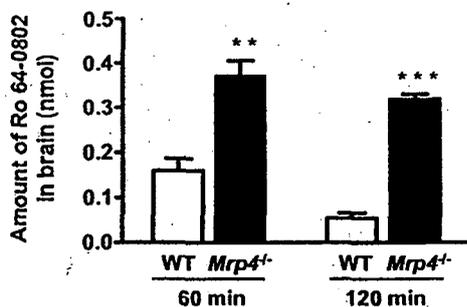


FIG. 4. Comparison of the amounts of Ro 64-0802 in the ipsilateral cerebrum after intracerebral microinjection of Ro 64-0802 in wild-type (WT) and *Mrp4*^{-/-} mice. Ro 64-0802 (1 mM) in 0.5 μ l of ECF buffer was injected into the Par2 region (4.5 mm lateral to the bregma and 2.5 mm in depth). The amount of Ro 64-0802 in the ipsilateral cerebrum was determined at 60 and 120 min after treatment. \square , data for wild-type mice; \blacksquare , data for *Mrp4*^{-/-} mice. Each bar represents the mean \pm S.E. ($n = 3-4$). Statistically significant differences between wild-type and *Mrp4*^{-/-} mice: **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$.

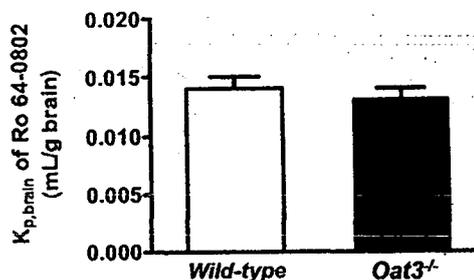


FIG. 5. Comparison of the brain/plasma concentration ratio ($K_{p, \text{brain}}$) of Ro 64-0802 after subcutaneous infusion of Ro 64-0802 in wild-type and *Oat3*^{-/-} mice. Mice received a continuous subcutaneous infusion of Ro 64-0802 at a dose of 80 nmol/h/mouse for 24 h, with an osmotic pump. The plasma and brain concentrations of Ro 64-0802 were determined at 24 h after treatment. \square , data for wild-type mice; \blacksquare , data for *Oat3*^{-/-} mice. Each bar represents the mean \pm S.E. ($n = 3-4$).

Ro 64-0802 as a substrate of OAT3. The elimination of Ro 64-0802 from the brain after its microinjection into the cerebral cortex was markedly delayed in *Oat3*^{-/-} mice compared with wild-type mice (Fig. 3). This suggests that Oat3 plays a significant role in the efflux of Ro 64-0802 from the brain by facilitating its uptake from the brain interstitial space to endothelial cells. For the directional efflux of Ro 64-0802 from the brain to the blood across the BBB, a transporter(s) is also required to facilitate its luminal efflux, considering the hydrophilic nature of Ro 64-0802. In a previous study, we demonstrated that the brain concentrations of Ro 64-0802 in *Mdr1a/1b*^{-/-} and *Abcg2*^{-/-} mice are similar to that in wild-type mice (Ose et al., 2008), excluding the possibility that P-gp and Bcrp are involved in the luminal efflux of Ro 64-0802. Therefore, we focused on Mrp4, another ATP-binding cassette transporter at the BBB, as a candidate transporter because it has been reported to mediate the active efflux of topotecan and adefovir across the BBB (Leggas et al., 2004; Belinsky et al., 2007). To show that Ro 64-0802 is a substrate of MRP4, we constructed double transfectant cells expressing both CES1A1, an enzyme producing Ro 64-0802 from oseltamivir, and MRP4 (MRP4/CES1A1-MDCKII). The double transfectant exhibited enhanced efflux of Ro 64-0802 (which was inhibited by an MRP4 inhibitor, indomethacin) compared with GFP/CES1A1-MDCKII (Fig. 2B). It should be noted that the host cells also exhibited indomethacin-sensitive efflux of Ro 64-0802. This is presumably attributable to endogenous canine MRP4 because its mRNA expression was detected by reverse transcription-PCR in MDCKII cells (data not shown). The involvement of Mrp4 in the efflux of Ro 64-0802 across the BBB was

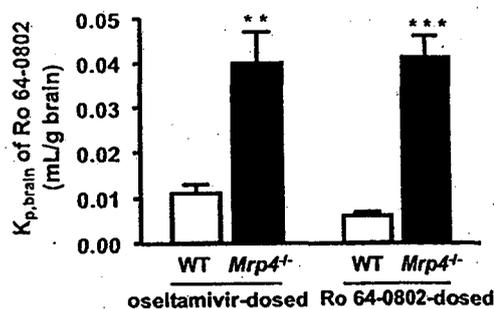


FIG. 6. Comparison of the brain/plasma concentration ratio ($K_{p, \text{brain}}$) of Ro 64-0802 after subcutaneous infusion of either oseltamivir or Ro 64-0802 in wild-type (WT) and *Mrp4*^{-/-} mice. Mice received a continuous subcutaneous infusion of either oseltamivir or Ro 64-0802 at a dose of 400 or 80 nmol/h/mouse, respectively, for 24 h with an osmotic pump. The plasma and brain concentrations of Ro 64-0802 were determined at 24 h after treatment. \square , data for wild-type mice; \blacksquare , data for *Mrp4*^{-/-} mice. Each bar represents the mean \pm S.E. ($n = 4-6$). Statistically significant differences between wild-type and *Mrp4*^{-/-} mice: **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$.

then examined using *Mrp4*^{-/-} mice by microinjection into the cerebral cortex. *Mrp4*^{-/-} mice exhibited delayed elimination of Ro 64-0802 from the cerebral cortex after its microinjection compared with that in wild-type mice (Fig. 4). Therefore, *Mrp4* plays an important role in the luminal efflux of Ro 64-0802 after its cellular uptake by *Oat3* from the brain side.

To show the importance of the active efflux of Ro 64-0802 at the BBB mediated by *Oat3* and *Mrp4*, the $K_{p, \text{brain}}$ of Ro 64-0802 was determined in *Oat3*^{-/-} or *Mrp4*^{-/-} mice given Ro 64-0802 by subcutaneous infusion for 24 h. Our approach was based on the pharmacokinetic concept that reduced efflux across the BBB may lead to an increase in the $K_{p, \text{brain}}$. Consistent with a previous report (Ose et al., 2008), the $K_{p, \text{brain}}$ of Ro 64-0802 was close to the capillary volume in wild-type mice. The $K_{p, \text{brain}}$ of Ro 64-0802 observed in *Oat3*^{-/-} mice was also close to the capillary volume (Fig. 5). In contrast, the $K_{p, \text{brain}}$ of Ro 64-0802 was 4- to 6-fold greater in *Mrp4*^{-/-} mice than that in wild-type mice receiving either oseltamivir or Ro 64-0802 (Fig. 6). These *in vivo* results using *Mrp4*^{-/-} mice thus indicate that Ro 64-0802 crosses the BBB from the blood side to the brain, but *Mrp4* limits its penetration into the brain by extruding it into the blood. The latter finding is consistent with the results of our microinjection experiment. However, the lack of effect of knockout of *Oat3* on the $K_{p, \text{brain}}$ of Ro 64-0802 seems to contradict the results of the microinjection experiment. There are three explanations for this discrepancy. The first explanation is that luminal *Mrp4* is more important in preventing brain penetration than abluminal *Oat3*. The second explanation is that, considering the mediation of bidirectional transport by *Oat3* (Bakhiya et al., 2003), it is possible that *Oat3* on the abluminal membrane of brain endothelial cells may act in the efflux of Ro 64-0802 from inside the endothelial cells into the brain, as well as in its uptake from the brain to the endothelial cells (Fig. 7). The third explanation is that, considering the hydrophilic character of Ro 64-0802, with an anionic charge, its luminal uptake probably involves transporters. Kikuchi et al. (2003) suggested that *Oat3* is expressed on

both the luminal and abluminal membranes of rat brain capillaries; however, this localization is controversial (Mori et al., 2003; Roberts et al., 2008). *Oat3* may serve as an uptake system for Ro 64-0802 on the luminal membrane from the circulating blood into the brain (Fig. 7). Further studies using *Mrp4* and *Oat3* double knockout mice can answer these questions and perhaps confirm these speculations.

Figure 7 summarizes the proposed mechanisms determining the brain distribution of oseltamivir and Ro 64-0802 in humans. P-gp, MRP4, and CES1A1 are factors that determine the brain distribution of oseltamivir and Ro 64-0802 in humans. CES1A1 is predominantly expressed in the brain capillaries in human brain (Yamada et al., 1994), although whether CES1A1 is the only enzyme responsible for the conversion of oseltamivir remains to be examined. MRP4 is also expressed on the luminal membranes of human brain capillaries (Nies et al., 2004; Bronger et al., 2005). Because oseltamivir crosses the BBB, Ro 64-0802 can be produced during the penetration of oseltamivir across the BBB and then be subjected to active efflux by MRP4. Although Northern blotting did detect OAT3 mRNA expression in the human brain (Cha et al., 2001), its distribution and membrane localization remain to be determined. Therefore, whether Ro 64-0802 can penetrate into the brain and is eliminated from the brain by OAT3 in humans, as well as in mice, also remains in question. Fluctuations in their activities will cause interindividual variations in their exposure to the central nervous system. For instance, genetic variations have been reported for P-gp and MRP4, which may alter their transport activities and expression. The silent mutation 3435C>T is associated with reduced P-gp expression (Hoffmeyer et al., 2000) and affects protein folding, resulting in a substrate-dependent functional change (Kimchi-Sarfaty et al., 2007). In MRP4, the nonsynonymous mutations 559G>T, 1460G>A, and 2269G>A are associated with altered transport activity and expression (Abla et al., 2008; Krishnamurthy et al., 2008). It is possible that these polymorphisms are associated with the adverse effects of Ro 64-0802 on the central nervous system.

In conclusion, *Mrp4* and *Oat3* are responsible for the elimination of Ro 64-0802 from the brain across the BBB although, at steady-state, *Oat3* may not affect its brain distribution, probably because of its possible contribution also to the brain uptake of Ro 64-0802. This is the first demonstration of the cooperation of uptake and efflux transporters in the directional (brain-to-blood) transport of anionic drugs across the BBB.

Acknowledgments. We thank Dr. Junko Iida and Futoshi Kurotobi (Shimadzu) for technical support with the LC-MS system.

References

- Abla N, Chinn LW, Nakamura T, Liu L, Huang CC, Johns SJ, Kawamoto M, Stryke D, Taylor TR, Ferrin TE, Giacomini KM, and Kroetz DL (2008) The human multidrug resistance protein 4 (MRP4, ABCC4): functional analysis of a highly polymorphic gene. *J Pharmacol Exp Ther* 325:859–868.
- Bakhiya A, Bahn A, Burckhardt G, and Wolff N (2003) Human organic anion transporter 3 (hOAT3) can operate as an exchanger and mediate secretory urate flux. *Cell Physiol Biochem* 13:249–256.
- Bardsley-Elliot A and Noble S (1999) Oseltamivir. *Drugs* 58:851–860; discussion 861–862.
- Belinsky MG, Guo P, Lee K, Zhou F, Kotova E, Grinberg A, Westphal H, Shchavaleva I, Klein-Szanto A, Gallo JM, et al. (2007) Multidrug resistance protein 4 protects bone marrow, thymus, spleen, and intestine from nucleotide analogue-induced damage. *Cancer Res* 67:262–268.
- Bronger H, König J, Kopplow K, Steiner HH, Ahmadi R, Herold-Mende C, Keppler D, and Nies AT (2005) ABC drug efflux pumps and organic anion uptake transporters in human gliomas and the blood-tumor barrier. *Cancer Res* 65:11419–11428.
- Cha SH, Sekine T, Fukushima JI, Kanai Y, Kobayashi Y, Goya T, and Endou H (2001) Identification and characterization of human organic anion transporter 3 expressing predominantly in the kidney. *Mol Pharmacol* 59:1277–1286.
- Ci L, Kusuhara H, Adachi M, Schuetz JD, Takeuchi K, and Sugiyama Y (2007) Involvement of MRP4 (ABCC4) in the luminal efflux of ceftiozime and cefazolin in the kidney. *Mol Pharmacol* 71:1591–1597.
- Deguchi T, Kusuhara H, Takadate A, Endou H, Otogiri M, and Sugiyama Y (2004) Characterization of uremic toxin transport by organic anion transporters in the kidney. *Kidney Int* 65:162–174.
- Fuyuno I (2007) Tamiflu side effects come under scrutiny. *Nature* 446:358–359.

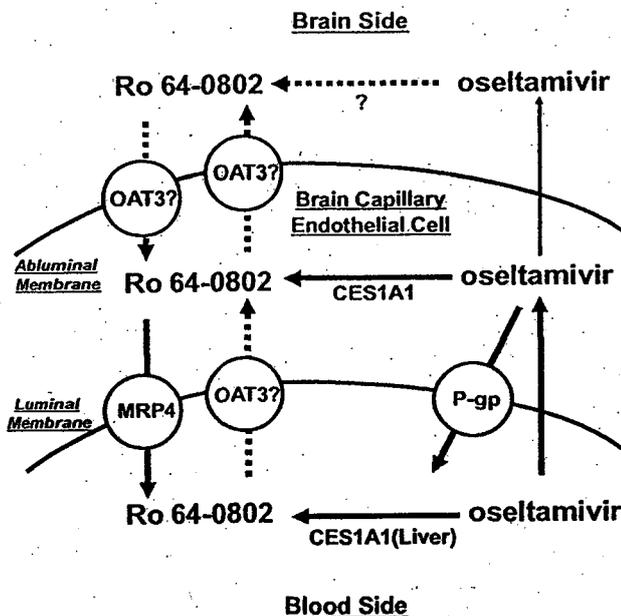


Fig. 7. Schematic representation of the proposed mechanism underlying the brain distribution of oseltamivir and Ro 64-0802 in humans. Oseltamivir crosses the BBB, and Ro 64-0802 is produced by the penetration of oseltamivir across the BBB. Both oseltamivir and Ro 64-0802 are subjected to active efflux by P-gp and MRP4, respectively. The functional importance of OAT3 at the human BBB has not yet been established, so the hypothetical pathway is shown with a broken line.

- Hasegawa M, Kusuhara H, Adachi M, Schuetz JD, Takeuchi K, and Sugiyama Y (2007) Multidrug resistance-associated protein 4 is involved in the urinary excretion of hydrochlorothiazide and furosemide. *J Am Soc Nephrol* 18:37-45.
- He G, Massarella J, and Ward P (1999) Clinical pharmacokinetics of the prodrug oseltamivir and its active metabolite Ro 64-0802. *Clin Pharmacokinet* 37:471-484.
- Hill G, Cihlar T, Oo C, Ho ES, Prior K, Wiltshire H, Barrett J, Liu B, and Ward P (2002) The anti-influenza drug oseltamivir exhibits low potential to induce pharmacokinetic drug interactions via renal secretion-correlation of in vivo and in vitro studies. *Drug Metab Dispos* 30:13-19.
- Hoffmeyer S, Burk O, von Richter O, Arnold HP, Brockmöller J, John A, Casorbi I, Gerloff T, Roots I, Eichelbaum M, et al. (2000) Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:3473-3478.
- Imaoka T, Kusuhara H, Adachi M, Schuetz JD, Takeuchi K, and Sugiyama Y (2007) Functional involvement of multidrug resistance-associated protein 4 (MRP4/ABCC4) in the renal elimination of the antiviral drugs adefovir and tenofovir. *Mol Pharmacol* 71:619-627.
- Izumi Y, Tokuda K, O'dell KA, Zorumski CF, and Narahashi T (2007) Neuroexcitatory actions of Tamiflu and its carboxylate metabolite. *Neurosci Lett* 426:54-58.
- Kakee A, Terasaki T, and Sugiyama Y (1996) Brain efflux index as a novel method of analyzing efflux transport at the blood-brain barrier. *J Pharmacol Exp Ther* 277:1550-1559.
- Kikuchi R, Kusuhara H, Abe T, Endou H, and Sugiyama Y (2004) Involvement of multiple transporters in the efflux of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase inhibitors across the blood-brain barrier. *J Pharmacol Exp Ther* 311:1147-1153.
- Kikuchi R, Kusuhara H, Sugiyama D, and Sugiyama Y (2003) Contribution of organic anion transporter 3 (Slc22a8) to the elimination of p-aminohippuric acid and benzylpenicillin across the blood-brain barrier. *J Pharmacol Exp Ther* 306:51-58.
- Kimchi-Sarfaty C, Oh JM, Kim IW, Sauna ZE, Calcagno AM, Ambudkar SV, and Gottesman MM (2007) A "silent" polymorphism in the MDR1 gene changes substrate specificity. *Science* 315:525-528.
- Krishnamurthy P, Schwab M, Takenaka K, Nachagari D, Morgan J, Leslie M, Du W, Boyd K, Cheok M, Nakauchi H, et al. (2008) Transporter-mediated protection against thiopurine-induced hematopoietic toxicity. *Cancer Res* 68:4983-4989.
- Leggas M, Adachi M, Scheffer GL, Sun D, Wielinga P, Du G, Mercer KE, Zhuang Y, Panetta JC, Johnston B, et al. (2004) Mrp4 confers resistance to topotecan and protects the brain from chemotherapy. *Mol Cell Biol* 24:7612-7621.
- Lindegardh N, Davies GR, Tran TH, Farrar J, Singhasivanon P, Day NP, and White NJ (2006) Rapid degradation of oseltamivir phosphate in clinical samples by plasma esterases. *Antimicrob Agents Chemother* 50:3197-3199.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, and Randall RJ (1951) Protein measurement with Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-267.
- Mori M, Hosokawa M, Ogasawara Y, Tsukada E, and Chiba K (1999) cDNA cloning, characterization and stable expression of novel human brain carboxylesterase. *FEBS Lett* 458:17-22.
- Mori S, Ohtsuki S, Takanaga H, Kikkawa T, Kang YS, and Terasaki T (2004) Organic anion transporter 3 is involved in the brain-to-blood efflux transport of thiopurine nucleobase analogs. *J Neurochem* 90:931-941.
- Mori S, Takanaga H, Ohtsuki S, Deguchi T, Kang YS, Hosoya K, and Terasaki T (2003) Rat organic anion transporter 3 (rOAT3) is responsible for brain-to-blood efflux of homovanillic acid at the abluminal membrane of brain capillary endothelial cells. *J Cereb Blood Flow Metab* 23:432-440.
- Morimoto K, Nakakariya M, Shirasaka Y, Kakinuma C, Fujita T, Tamai I, and Ogihara T (2008) Oseltamivir (Tamiflu) efflux transport at the blood-brain barrier via P-glycoprotein. *Drug Metab Dispos* 36:6-9.
- Nies AT, Jedlitschky G, König J, Herold-Mende C, Steiner HH, Schmitz HP, and Keppler D (2004) Expression and immunolocalization of the multidrug resistance proteins, MRP1-MRP6 (ABCC1-ABCC6), in human brain. *Neuroscience* 129:349-360.
- Nozaki Y, Kusuhara H, Kondo T, Iwaki M, Shiroyanagi Y, Nakayama H, Horita S, Nakazawa H, Okano T, and Sugiyama Y (2007) Species difference in the inhibitory effect of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on the uptake of methotrexate by human kidney slices. *J Pharmacol Exp Ther* 322:1162-1170.
- Ohtsuki S, Asaba H, Takanaga H, Deguchi T, Hosoya K, Ottagiri M, and Terasaki T (2002) Role of blood-brain barrier organic anion transporter 3 (OAT3) in the efflux of indoxyl sulfate, a uremic toxin: its involvement in neurotransmitter metabolite clearance from the brain. *J Neurochem* 83:57-66.
- Ose A, Kusuhara H, Yamatsugu K, Kanai M, Shibasaki M, Fujita T, Yamamoto A, and Sugiyama Y (2008) P-glycoprotein restricts the penetration of oseltamivir across the blood-brain barrier. *Drug Metab Dispos* 36:427-434.
- Reid G, Wielinga P, Zelcer N, van der Heijden I, Kuil A, de Haas M, Wijnholds J, and Borst P (2003) The human multidrug resistance protein MRP4 functions as a prostaglandin efflux transporter and is inhibited by nonsteroidal antiinflammatory drugs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:9244-9249.
- Roberts LM, Black DS, Raman C, Woodford K, Zhou M, Haggerty JE, Yan AT, Cwirla SE, and Grindstaff KK (2008) Subcellular localization of transporters along the rat blood-brain barrier and blood-cerebral-spinal fluid barrier by in vivo biotinylation. *Neuroscience* 155:423-438.
- Sato K, Nonaka R, Ogata A, Nakae D, and Uehara S (2007) Effects of oseltamivir phosphate (Tamiflu) and its metabolite (GS4071) on monoamine neurotransmission in the rat brain. *Biol Pharm Bull* 30:1816-1818.
- Shi D, Yang J, Yang D, LeCluyse EL, Black C, You L, Akhlaghi F, and Yan B (2006) Anti-influenza prodrug oseltamivir is activated by carboxylesterase human carboxylesterase 1, and the activation is inhibited by antiplatelet agent clopidogrel. *J Pharmacol Exp Ther* 319:1477-1484.
- Usami A, Sasaki T, Satoh N, Akiba T, Yokoshima S, Fukuyama T, Yamatsugu K, Kanai M, Shibasaki M, Matsuki N, et al. (2008) Oseltamivir enhances hippocampal network synchronization. *J Pharmacol Sci* 106:659-662.
- Wiltshire H, Wiltshire B, Citron A, Clarke T, Serpe C, Gray D, and Herron W (2000) Development of a high-performance liquid chromatographic-mass spectrometric assay for the specific and sensitive quantification of Ro 64-0802, an anti-influenza drug, and its pro-drug, oseltamivir, in human and animal plasma and urine. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 745:373-388.
- Yamada T, Hosokawa M, Satoh T, Moroo I, Takahashi M, Akatsu H, and Yamamoto T (1994) Immunohistochemistry with an antibody to human liver carboxylesterase in human brain tissues. *Brain Res* 658:163-167.
- Yamaoka K, Tanigawara Y, Nakagawa T, and Uno T (1981) A pharmacokinetic analysis program (multi) for microcomputer. *J Pharmacobiodyn* 4:879-885.
- Yamatsugu K, Kamijo S, Suto Y, Kanai M, and Shibasaki M (2007) A concise synthesis of Tamiflu: third generation route via the Diels-Alder reaction and the Curtius rearrangement. *Tetrahedron Lett* 48:1403-1406.
- Yoshino T, Nisijima K, Shioda K, Yui K, and Kato S (2008) Oseltamivir (Tamiflu) increases dopamine levels in the rat medial prefrontal cortex. *Neurosci Lett* 438:67-69.

Address correspondence to: Dr. Yuichi Sugiyama, Department of Molecular Pharmacokinetics, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, The University of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0033, Japan. E-mail: sugiyama@mol.f.u-tokyo.ac.jp