

表10 陽性物質: positive effectを示したデータ間ばらつき (ICH-S7B data).

Drug	hERG(IC50)	APD	In vivo QT
Amiodarone	0.7-10, 5/5	6/16, 1-59	neg/3
Aprindine	0.23, 1/1		
Astemizole	0.0009-0.48/ 1313	3, 2/4	0.16-3, 5/5
Bepidil	0.026-13, 4/4	0.3-100, 6/10	3, 1/1
Cisapride	0.0065-0.1, 14/14	0.1-1, 12/13	0.1-4, 9/9
Clarithromycin	0.059-48, 4/4	3, 1/2	
Disopyramide	1.8-60, 3/3	2-40, 3/9	
Dofetilide	0.0039-1.0, 17/17	0.005-3, 14/14	0.005-0.025, 2/2
Domperidone	0.1-0.16, 3/3	1, 1/1	0.31, 1/3
Droperidol	0.028-0.032, 2/2	1, 3/3	
Erythromycin	38.9-104, 8/9	20-270, 11/11	20-40, 2/3
Grepafloxacin	27-104, 4/4	19-26, 2/2,	2, 1/1
Halofantrine	0.050, 1/1		
Haloperidol	0.026-1.36, 6/6	0.1, 2/2	0.63-3, 2/2
Ibutilide	0.02-0.1, 2/2	0.1, 1/1	0.005, 1/1
lidoflazine		5, 1/1	
NAPA	92, 1/1	300, 1/1	
Pimozide	0.01-1.74, 6/6	10, 1/1	0.16, 1/1
Prenylamine		neg/2	
Procainamide	380, 1/1	Neg/1	
Propafenone		neg/2	
Quinidine	0.08-8, 9/9	0.3-10, 7/10	0.3-12.5, 3/3
Sertindole	0.003-0.03, 7/7	0.3, 0.5, 3/3	0.32, 1/1
dl-Sotalol	74-169, 4/6	0.5-100, 10/11	1-30, 9/9
Sparfloxacin	0.23-34, 5/5	10-11, 2/2	2-3, 4/4
Terfenadine	0.017-350, 21/21	0.01-2, 3/13	0.3-2, 5/6
Terodiline	0.0037-0.7, 3/3	3, 2/5	0.3-2/53-10/ 3
Thiridazine	0.033-1.25, 6/6	0.3-3, 2/3	3, 2/3

HERG APD: range of IC50 μ M, positive case / No of reports, In vivo QT: range of dose mg/kg / reports

D. 考察

1. データ解析に関する考察

ブリュッセルおよび大阪会議で解析に用いたデータはILSI/HESIプロジェクトおよび日本製薬協による

QTPRODUCTによるProspectiveなデータ解析およびFDAが呼びかけ集めたretrospectiveなIn vivo QTアッセイ、hERGあるいはIkrによるイオンチャネルアッセイおよび再分極系特にAPD (APD90並びにAPD30-90) によるアッセイ系のヒトで不整脈を引き起こすと考えられている薬物と引き起こさないと考えられている薬物を用いた予測性、精度、結果の一致性に関する解析であり、それにHondegheem教授のProarrhythmicモデルのInstabilityなど3つのパラメータを用いるTRIADs解析⁸⁾も参考として検討した。

非臨床In vivo系に関しては、感度は比較的低いが、陽性物質はpositive、陰性物質はnegativeであり予測率として90%以上(10%以上だけをpositiveの基準とすれば100%)であり、In vivo QTアッセイ系の予測性は十分に高いと認識された(表13、14)。In vitroイオンチャネルアッセイ系、特にhERGアッセイは陽性薬物に対する感度およびヒット率が極めて高い(表13)が、同時に陰性薬物に対するfalse positive率も高いと思われる(表14)。再分極アッセイ系APDにおいては、APD90を用いた解析の結果では陽性物質の予測性が低い(表3、7)。一方、QTPRODUCTプロジェクトで用いたAPD30-90(Ikコンポーネントに相当)による解析法を用いた場合のヒット率は陽性物質に対し90%以上(例外がTerfenadine)とかなり高い結果(表7、13)を示した。陰性物質に対するfalse positiveはかなり予想されるが、APDアッセイ系の利点は他にもイオンチャネル成分の解析が可能なことである。つまりhERGアッセイはIkrチャネルの全てを発現した完全Ikrチャネルについて測定したものではない。一方、APDはより生理的状态のIkrを含むチャネルを有する系であり、関与するイオンチャネル成分を解析するのに優れている。APD30-90は活動電位に関与するイオンチャネル画分のうちIkrを含むIkに相当しており、今後有用な評価方法になるものと思われる。他に、51の陽性物質並びに陰性物質に一致する結果(高い予測性を示した)を示したProarrhythmic modelによるMAPのTRIADs解析⁸⁾のデータもHondegheem教授からBrussels会議で紹介され、S7B-EWGで検討した。会議では、TRIADs解析は十分な予想性を有することが認識されたが、特殊な技術と解析ソフトを必要としており、ガイドラインに記載する

には十分に一般化されていないと見なされた。一方 APD30-90解析も一般化されていないとされたが、APD試験法そのものは一般化されており、APD30-90は解析手段の差に過ぎないものとして日本サイドは有用性を主張している。大阪会議ではAPDアッセイ (APD30-90) をIkイオンチャネルを対象とするIon channel アッセイ系の一つとして含めることを提唱し、暫定的に了承されたが、次回に再度討議されるものと思われ、施設間変動、Safety marginなどの面から感度、信頼性に関して討議されると思われる。

① 施設間ばらつき

施設間ばらつきに関し、ILSI/HESIデータ結果によると、Ikrの場合には2施設において陽性、陰性結果は比較的良好一致し、IC50の施設間の差は3倍以内であった (ILSI/HESIデータ)。APD90の場合には陽性物質で延長したのは50%に過ぎない。In vivo QTアッセイでは、イヌTelemetry標本で陽性物質は全てQT延長、その場合の血中濃度はIkrのIC50と近い (Bepridil:0.25x、Cisapride:6x、Haloperidol:1.3x、Pimozide: 5x、Terfenazine: 4x、Thioridazine: 35x) という解析結果であった (表11: ILSI/HESIデータ)。一方、QTPRODUCTプロジェクトには50試験施設が参加し、dl-Sotalolを標準参照化合物として一施設で1-4化合物について試験を行っている。dl-Sotalolを用いた施設間の一致性あるいは結果に基づいた解析結果から (In vivo QTアッセイにおけるcut off値の計算はでは5%および10%の変化に対する検出力に基づいた。一方APD30-90アッセイでは施設内および施設間の変動を比較し、Sotalolに対するControl群の変化率の分布に従い、両群のcut off値を検討し、対照群の2.5SD (約4%) をcut off値にすることで感度100%、特異度99.8%となる。従って変化率10%の基準は十分な値とのことである。)、イヌTelemetry標本に関しては用量10mg/kg、ivで有意かつ10%のQTc延長をpositiveな基準としたが、10%以上のQTc延長だけを基準とすると、麻酔イヌ標本では陽性、陰性物質共的中率が100%であり、In vivoQTアッセイ系における高い合致性を示した。APD30-90は21施設で行い、dl-sotalolで全て21/21陽性の結果が得られている。QTPRODUCTにおけるこれらの高い合致性の結果は適

切な同一条件の設定の重要性を示していると思われ、GLPの必要性が示唆される。

表11 Ratio (non clinical conc. / Effective Therapeutic total Plasma Conc.) ILSI/HESI data

Positive	APD	QT	Negative	APD	QT
Cisapride	6	6	Amoxicillin	>	>50
Terfenazine	2	5	Aspirin	>	>
Bepridil	2	0.25	Captopril	>	1000
Haloperidol	6	1.3	Propranolol	>	160
Thioridazine	67	4	Verapamil	>	100
Pimozide	70	35	Diphenhydramine	3	3

② 安全域Safety Margin (血中レベルとの関連)

Safety marginについては、Industryサイドから評価に大きく利用しうるものとして、ガイドラインに採用が期待されている。Safety marginについて考慮すべき因子は血中濃度変動 (吸収、代謝酵素、排泄経路、分布) のばらつき、対象疾患 (リスク集団、重篤度、Risk/Benefitである。ILSI/HESIデータ (表11) から導かれた陽性物質に対する安全域Safety margin (nonclinical effective concentration/human effective therapeutic total plasma concentration) はIn vivo QTアッセイ系で0.25 - 35であり、APD90の2 - 70とそれほど離れておらず、両アッセイ系間で類似している。一方QTPRODUCTデータ (表12) では、陽性物質のSafety marginはIn vivo QTアッセイ系でTelemetryイヌで0.1 - 11.8、麻酔下イヌではTerfenazineを除くと0.1 - 18.6、Telemetryサルで0.4 - 3.4とアッセイ間で類似しており、比較的幅は小さい。一方、APD30-90アッセイ系ではSafety marginは0.21 - 379と大きな幅がある。これらとは別にSafety marginにかんしてはPhARMA/EFPIAグループのRetrospectiveなデータによる検討がある⁴⁾。本研究は100薬物についての調査を行い、そのうちhERG/Ikr、APD90、QT延長およびTdPに関する報告データに基づき、52薬物をTdPもしくはQTリスクに関し5カテゴリーに分類し、hERG IC50濃度とETPC (unbound 血中濃度) によりSafety marginを計算している。その結果、カテゴリー1に属する11薬物のうちAmiodaroneを除く10薬物のSMは30以内であり、カテゴリー2に属する6薬物およびカテゴリー3に属する7薬物は全てSM30以内であ

ったと発表している。ちなみにcut offを30 μ Mとすると、カテゴリー1ではSotalolとProcainamide、カテゴリー3ではErhthromycinがnegativeと判定され21/24がpositiveと判定されることになる。10 μ Mをcut offとすると、高リスクに分類されるカテゴリー1のヒット率は8/11、1 μ Mをcut offとすると、6/11となる。これらの結果からIn vivo QTアッセイおよびhERG/Ikrアッセイに関し、Safety marginを30とすれば、ほぼ安全であるとIndustryサイドは主張している。ガイドラインのNoteにおけるevidence of riskに関し、イオンチャネルアッセイにおいてIC50 >1 μ Mであればweakであり、In vivo QTアッセイにおいていわゆるsafety marginが>30であればweakであると記載されており、さらに低い値にする提案が大阪会議であったが、Regulatoryサイドの立場から考えると、Nonclinical effective concentration / human effective therapeutic plasma concentration (ETPC) 比30を示す薬物は逆にETPCの30倍濃度で試験しなくてはpositive結果が得られないことをも意味しており、施設、試験間の変動、個体間変動さらには例外の存在を考えると、必ずしも十分な濃度/用量で検討したことにならず、従って安全であるとの保証にはならない。同じことがcut off値にもいえることであり、最大濃度を10 μ Mに設定した試験でpositiveでなかったからと

表12 Ratio: Nonclin.conc./ Human ETPC (QTPRODUCT)

	APD	QTC		
		DogA	DogT	MonkT
Astemizole	320	18.6	0.7	
Beprisd	1.15	0.9	0.9	
Cisapride	0.37	1.0	1.9	0.9
E4031	6.1	1.0	5.2	1.1
Haloperidol	2.89			
MK499	6.05	0.2	1.6	
Pimozide	379			
Quinidine	0.21	0.2	0.5	0.4
Terfenadine		169	11.8	3.4
Thioridazine	0.47	1.4	0.1	0.4
dl-Sotalol			0.3	

Total plasma concentration at positive dose or conc., ETPC: Effective Therapeutic Plasma total Concentration, APD: 10 % increase in APD30-90, QTC: 10 % increase in QTC, DogA: anesthetized dog, DogT: Telemetry dog, MonT: Telemetry monkey

いてweakなリスクとは判定できないものと思う。リスク評価は個々のケースに従い統合的リスク評価を行えばよいのであって、一律に安全域を定める必要はないと思われる。

③ 予測性 (QTPRODUCT総合評価)

表13および14に総合評価を示す。Positive基準をAPDにおいて10% APD30-90延長、In vivo QTについて10%延長、hERG/Ikrについて50%抑制、In vitroアッセイのcut-off値を<10 μ M、とすると、陽性薬に関しては、In vitro hERG (Ikr) アッセイとIn vivo QTアッセイの組み合わせで、全てが陽性として判定し得る。陰性薬については臨床で問題がないカテゴリーにあると考えられる薬物についても陽性 (false positive) と判定されるものがでる。一方、In vitro系のcut off値を採用するとhERGアッセイとIn vivo QTアッセイの組み合わせにおいての陰性物質のfalse positiveはかなり低くなる。いずれにせよ陽性物質が陰性 (false negative) とならないことが重要であり、QTリスク予測 (陽性物質の予測) に関しては極めて高い予測性を示したものといえる。表15からは陽性物質の100%予測性を得られる組み合わせとしてはhERGとAPD30-90あるいはAPD30-90とIn vivo QTアッセイも考えられる。大阪会議ではAPD30-90はIon channel assayとして分類し、便宜的にIn vivo QTアッセイおよびion channelアッセイの組み合わせとしたが、論理に無理があるように思われる。アッセイ系の組み合わせによる予測性は臨床E14のヒト評価法に代替しうるかという問題に通じる。E14案におけるヒトで5mSecを検出するに95%信頼性を要求されるThorough QT/QTc試験では被験者60 - 70例について検討が必要とされている。一方非臨床In vivo QTアッセイで使用予想のイヌの例数ははるかに少なく、信頼性は劣る。一方非臨床での利点は被験物質の溶解性、薬力学的影響による限界はあるが、臨床用量をはるかに越す用量について検討しうることであり、リスクの予測性に関してほぼ同程度であるといえる。

S7B EWGの結論としてIn vivo QTアッセイおよびion channelアッセイ (hERG、IkrおよびAPDを含む) アッセイは非臨床QT評価におけるPrimaryアッセイ系として組み合わせて用いることが適切であり、かつ、両ア

ッセイ結果を用いた統合的リスク評価により、ほとんど100%の被験物質のQT惹起に関する陽性リスクを回避できるとの見解であり、臨床EWGとの合同会議で我々S7B EWGの見解、即ち：非臨床QT assessment (IRA) のQT延長予測は臨床Thorough QT/QTc試験に匹敵することを主張した。

しかしながらFDAのRobert Temple局長からこれまでS7B案に準じた非臨床試験とE14案に準じたThorough QT/QTc試験を行った4品目に関するFDA Reviewにおいて薬物Vおよび薬物Aの2品目が非臨床QT評価アッセイでnegativeでありながら臨床QT/QTc試験でpositive (7 mSec前後) で認められたことから非臨床アッセイ系の予測性に関する疑念を提示した。どちらかがfalse positive なのかfalse negative かという疑念、あるいはTdPリスクの予測として意味があるかという議論もあるが、両ガイドライン間の試験戦略の整合における乖離の解決には非臨床試験データの蓄積と更なる検討による非臨床QT評価アッセイ系の予測性と信頼性の保証が必要であり、再度データ結果の統計処理あるいは個々のデータの処理など解析法を精査し、信頼性の裏付けをすることで両EWGは合意した。

表13 総合評価【陽性物質】

Positive	hERG	APD 30-90	DogT	DogA	MonT
Astemizole	+	+	+	+	
Bepriidil	+	+	+	+	
Cisapride	+	+	+	+	+
Disopyramide			+	+	+
E-4031	+	+	+	+	+
Haloperidol	+	+	+	+	NE
MK-499	+	+	+	+	+
Pimozide	+	NE*	+	+	+
Quinidine	+	+	+	+	+
dl-Sotalol	NE	+	+	+	+
Terfenazine	+	N	+	+	(+)
Thioridazine	+	+	+	+	+

APD基準: 10% APD30-90延長、In vivo QT基準10%延長、hERG基準50%抑制、+: positive, (+): 用量依存傾向、NE: Negative、NE*: cut-off* <10 μ M、DogT: Dog telemetry, Dog A: Dog 麻酔、MonT: Monkey 麻酔

表14 総合評価【陰性物質】

Negative drug	hERG	APD 30-90	DogT	DogA	MonT
Amoxicillin	NE	NE	NE	NE	
Aspirin	NE			NE	NE
Captopril	NE	NE	NE	NE	
Ciprofloxacin	NE*	NE*	NE	NE	NE
Diphenhydram	+/NE*	+	+/NE	NE	
Flecainide	+	+			
Lidocaine	NE	NE			
Nifedipine	NE	NE	+	NE	
Propranolol	+/NE*	NE*	NE	NE	
Verapamil	NE	+	NE	NE	NE

HERG*: cut-off 値10 μ M、APD: APD30-90、DogT: Dog telemetry、Dog A: Dog 麻酔、MonT: Monkey 麻酔+; positive, neg: Negative

2. S7BガイドラインとICH会議の進行

S7Bは平成14年2月にステップ2に到達し、各極でのコメント対応を終え、ワシントンでの第5回EWG会議でコメントに基づく修正を行い、舞浜での第6回EWG会議における臨床QT評価メンバーとの合同EWG会議で整合した評価の進め方を行うとの認識で合意した。ステップ2以降のS7B EWGのリーダーはMHLWサイド(藤森)が務めている。表15は本年度のS7B-EWGメンバーである。現状を少し説明すると、FDAはこれまで非臨床評価の専門家であり、かつICHで長年ガイドライン作成に携わり、S7AおよびS7Bガイドライン作成にも積極的に関わってきたDr. DeGeorgeが退職し、新たにDr. Morse (CDER) が加わった。FDAのS7B代表はStep 2以後あるいはE14開始以後はほとんど発言を控えているようである。Topic Leaderとなった薬理専門家であるDr. Koenorも評価戦略に関しての発言は特に臨床QT評価との整合が絡んでからは専門分野以外はほとんどなくなった。従ってS7Bガイドラインの試験戦略は臨床E14のtopic leaderであるDr. Throckmortonさらにはその上司のDr. TempleによるFDAもしくはUSA政策との整合の感がある。現在FDA案を代弁しS7Bの修正に積極的に関与しているのはUS-PhARMA代表である。表16はこれまでのS7B活動状況と平成15年度のICH-EWG会議、合同会議および研究班の活動状況である。

表15 ICH-EWGメンバー

MHLW	K. Fujimori (OPSR), K. Nakazawa (NIHS)
EU	K. Olejniczak (CPMP)
US-FDA	D. Morse (CDER), J. Koener (CDER)
JPMA	M. Hashimoto, H. Honbo, K. Yamamoto
EFPIA	G. Bode, A.T. Sullivan
US-PhRMA	J. Green, P. Siegle
Canada	C.F. Strnad (TPD)
EFTA	B. P. Schmidt (Swissmed.)

表16 これまでのS7B活動状況と平成15年度活動状況

<u>(これまでのS7B活動経過)</u>	
平成13年5月	Step 1: ICH-Tokyo会議
平成14年2月	Step 2: ICH-Brussels会議
平成14年9月	Step 3: ICH-Washington会議
平成15年2月	Step 3: ICH-Maiihama会議
<u>(平成15年度の活動状況)</u>	
平成15年5月	第一回研究班会議
平成15年6月	第二回研究班会議
平成15年7月	Step 3:ブリュッセルS7BEWGS7B/E14合同会議
平成15年9月	第三回研究班会議
平成15年11月	第四回研究班会議
平成15年11月	Step 3:大阪S7BEWGS7B/E14合同会議
平成15年11月	第五回研究班会議

平成15年7月に開催されたICHブリュッセル会議における非臨床QT間隔延長評価ガイドラインS7Bは現在ステップ3であり、これまでの11月の大阪会議でステップ4にするという合意の下に本年度のICH会議は始まった。また本会議および暫定的なアムステルダム会議で非臨床QT間隔延長評価に中核となるアッセイ系の精度、予測性などに関するProspective並びにRetrospectiveなデータに関する検討を中心に討議を進める予定であったが、ブリュッセル会議の結果、臨床QT評価の進め方との整合のために臨床QT評価ガイドラインE14案の進行と歩調を合わせることに本ブリュッセル会議で合意・変更された。従って、S7Bは2003年11月の大阪でステップ4になることはなくなった。大阪会議では非臨床QT評価試験の進め方、すなわち各アッセイ系について予測性、一貫性、および感度について収集データに基づいて解析を行った。Evidenc of

risk部分、特にSafety marginに関してはガイドラインに記載することは基準として判断されることから不相当として、ブリュッセル会議において、記述の変更を行い、本文から除き、Note部分に移動した。非臨床試験実施のタイミングに関しては、臨床QT評価ガイドラインE14との整合によって、ブリュッセル会議において、Through QT試験の前までに施行することが妥当とされた。大阪会議では非臨床試験の原則として最初にヒトに適用する前に実施すること、または少なくともTolerability and pharmacokineticsに関する臨床試験の前（被験者の重篤なQT延長回避のため）に実施することを再提議し討議したが、これらの臨床試験もECG Monitoringを以って被験者の安全性を保証しようとの意見およびECG Monitoringの初期臨床試験における採用は当然との認識により、最初にヒトに適用する前に実施する必要はないとされた。現時点では非臨床試験（QT評価）では臨床QTリスクを除外できるとの確証がないので、「Thorough QT/QTc試験はほとんど全ての被験物質に適用する」（例えば非臨床データで懸念が認められても“Thorough QT/QTc”試験で作用なしであれば、その後の臨床試験では標準ECGだけで十分である。）とされ、「非臨床試験が将来ヒトでのQTリスクを除外出来ると認識されれば、臨床QT評価ガイドライン中のRecommendationは修正することがある。」および「非臨床or手に入る臨床データによりQT延長が予想される場合、初期健常者を用いた臨床試験における除外基準が考慮される。」とほとんど変更なく、（非臨床試験の臨床試験戦略に及ぼす役割は臨床結果の解釈および除外基準以外に現時点では利用されない。）という状態にある。これに対しては非臨床試験の理念および収集データの解析結果（ヒトQT延長リスク、即ち陽性に対して非臨床統合的リスク評価により十分に予測可能）を利用したいとする大多数のS7B-EWGメンバーの見解とは乖離している。

大阪会議ではILSI/HESIおよびJPMA-QTPRODUCTのデータ解析を基に試験系の予測性に関するこれまでのデータ解析と合わせた総合的検討を行った。S7B EWGグループはIn vivo QTアッセイ系とIn vitro ion channelアッセイ（hERG、IkrあるいはAPDアッセイ系も含むとした）の組み合わせにより統合的リスク評価

を行えば、陽性物質を陽性としてほぼ100%近く、非臨床試験により予測しようとの認識に達し、E14案に記述されている被験物質のalmost allが必ずしも全て臨床Thorough QT/QTc試験を行う必要がないことを主張したが、FDAのDr. Templeは非臨床試験の予測性に対する疑念としてFDAの承認審査における非臨床評価における陰性かつ臨床陽性を示す2品目を例に挙げた。いずれもMoxifloxacinを標準参照物質として用いており、MoxifloxacinではhERGアッセイIC50=0.75 μM、イヌQTアッセイQTc延長8-12mSec、ヒト100mg投与で臨床Thorough QT/QTc陽性であり適正な試験であった。一方、V申請薬物はhERG IC50=31 μM、イヌQTアッセイQTc延長4-7mSecで非臨床評価はnegative、臨床Thorough QT/QTcは > 5mSecであり陽性と判断されている。一方、A申請薬物はhERG IC50=83 μM、イヌQTアッセイno QTc延長で非臨床評価陰性、臨床Thorough QT/QTcは> 5mSecで陽性と判断された。大阪会議では非臨床QT評価系の予測性に関する信頼性を検証すべく、再度データ結果の統計処理あるいは個々のデータの処理など解析法を精査し、信頼性の裏付けによるE14 EWGへの十分な説明が先決であることがS7B-EWGとして認識している状況である。ちなみに後ほど上記の2薬物はいずれも心拍数増加を示していることが判明しており、そのような場合にはQTcの5mSec程度のArtifact延長が起きるとされる。いずれにせよS7Bガイドラインの進行に関してはE14のステップ2文書化まではRevisedステップ2あるいはステップ4にするかは決められないと判断している。

今後のS7Bの進行に関しては、3つの選択肢があると思われる。一つはあくまでもE14と共にステップ4を目指す（E14がステップ2になると同時にS7Bをrevisedステップ2に修正し、同時にPublic commentに掛ける）。二番目としてS7B独自で非臨床安全性試験ガイドラインとしてステップ4にする（現状では非臨床評価試験の実施時期および必要な試験データの要求を規定出来ないため、ガイドラインとしての意義がない）。第三番目として現状では試験法の背景データが十分でない（未熟である）として、ガイドライン化を延期するという選択があると思う。個人としては第二の選択を取りたいが、大阪会議でのS7BおよびE14 EWGの

認識ではまずは3つの非臨床試験アッセイ系のQTリスク予測性の信頼性を保証することに全力を挙げ、臨床QT/QTc評価に関する試験の軽減化を図る意向である。反面、臨床Thorough QT/QTc評価およびその後の臨床QT評価が実際の臨床施行上で問題がなければ、非臨床QTリスク評価の必要性に関しては当然再考すべきであり、場合によってはS7Bは消滅しても致し方ない場合もあると思う。

日本で本当にQT/TdPリスクが問題になるほど高いのかに関し、QTPRODUCTプロジェクト使用薬物に関し、日本人のQT/TdP事例を把握すべく、該当製薬会社に対し国内のQT/TdP事例の調査を研究班として依頼した。結果は、QT延長、TdP共に非常に報告事例が少なく、また調査の重要性の認識も低かったのかも知れないが、不明との回答も多かった。FDAメンバーによる日本で大きな問題にならない（薬害によるTdP死亡報告が少ない）理由というのは日本の報告体制の不備あるいはTdP発症時における追跡例えば救急（車）時のECG測定・記録と投薬歴関連性の追跡などにおける日本の体制不備によるのではないかと疑念に対して反論は難しい。今回、比較が可能と思われる調査報告を戴いたH薬物（向精神病薬）での海外と国内臨床試験におけるQT延長とTdP頻度は必ずしも国内で低いとの結果を示していないが、市販後事例はいずれも1例の報告であり、臨床用量および医療環境にやはり差があるかも知れない。一方、米国で事例の多かったC薬物の市販後の事例は必ずしも日本だけが低くはないのではと思わせるものであった。なお、現在、臨床試験の進め方、国内の治験サイズなど将来大きな国内医薬品開発における支障あるいは問題になることを、厚生労働省および医薬品機構（4月より医薬品総合機構）の規制サイドは深く認識しており、現在上田ICH研究班長による国内における医薬品のQT/TdP事例の調査を医薬品機構を中心として開始しており（責任：医薬品機構磯部課長）、また積極的にQTPRODUCTプロジェクト専門家等と呼んだ勉強会などによる現状把握に努めていることも報告する。

E. 結論

現在のS7Bガイドラインの構成そのものは前年度に

到達したステップ2（あるいは3）と大差はない。即ち規制（基本的考え方）に関する部分は本文としてガイドライン化し、試験系（試験技術）に関する部分はガイドラインと別の形で参照（論文化等）とすることである。主要なQT評価アッセイ系はIn vivo QTアッセイとIn vitroイオンチャンネルアッセイであり、再分極アッセイはFollow up試験とする。QT評価アッセイ系の試験成績、クラス分類並びにその他試験（毒性、薬理、薬物動態、臨床データ等）の情報を統合的に評価する統合的リスク評価“integrated risk assessment”を行う。しかしながら、非臨床QT評価の厳密度に関わる主要なアッセイ系の種類および試験タイミングが臨床QT評価試験における非臨床QTリスク評価結果の臨床試験戦略における利用価値の解釈により現在、二転三転している。S7B-EWGは被験物質がヒトでQT延長/TdPリスク陽性である場合には、In vivo QTアッセイおよびIn vitro Ion channelアッセイ（hERG/IKrあるいはAPD30-90アッセイ）の組み合わせを用いた非臨床統合的リスク評価により陽性と判断する上で十分な予測性を有し、臨床Thorough QT/QTc試験による有意なQT延長の予測性に匹敵する予測性を有すると考えているが、大阪におけるE14との合同EWG会議でも非臨床QT評価試験系によるQT延長/TdPリスクの予測性の検証に対するFDAの疑念により、ヒトでのThoroughなQT/QTc試験に匹敵できる予測性を与えるとの説得性のある段階に達していないとされた。その結果、US臨床サイド（特にFDAのDr. Temple）から非臨床QTリスク評価により、臨床試験における被験者を100%保証できないし、E14における臨床QT/QTc試験の対象となる薬物の範囲を限定することは認められないと指摘された。非臨床試験系の予測性の信頼性に関しては、再度データ結果の統計処理あるいは個々のデータの処理など解析法を精査し、E14（特にFDA）に説明することになっている。S7B案そのものは十分に討議されていると考えており、E14のICHプロセスの進行如何であると考えている。

G. 研究発表：

1. 論文発表

1. 藤森観之助、橋本宗弘：安全性に関わるトピックの動向。医薬品研究34, 8-513-518, 2003

2. Sato, K., Matsuki, N., Ohno, Y. and Nakazawa, K. Estrogens inhibit L-glutamate uptake activity of astrocytes via membrane estrogen receptor α . *J. Neurochem.* 86, 1498-1505 (2003)

- Nakazawa, K., Ojima, H., Ishii-Nozawa, R., Takeuchi, K. and Ohno, Y. Intracellular disulfide bond that affects ATP responsiveness of P2X₂ receptor/channel. *Eur. J. Pharmacol.* 474, 205-208 (2003)

- Nakazawa, K. and Ohno, Y. Block by phytoestrogens of recombinant human neuronal nicotinic receptors. *J. Pharmacol. Sci.* 93, 118-121 (2003)

- Nakazawa, K., Ojima, H., Ishii-Nozawa, R., Takeuchi, K. and Ohno, Y. Amino acid substitutions from an indispensable disulfide bond affect P2X₂ receptor activation. *Eur. J. Pharmacol.* (2003), in press

- Akaishi, T., Nakazawa, K., Sato, K., Saito, H., Ohno, Y., and Ito, Y. Hydrogen peroxide modulates whole cell Ca²⁺ currents through L-type channels in cultured rat dentate granule cells. *Neurosci. Lett.* (2003), in press

- Akaishi, T., Nakazawa, K., Sato, K., Saito, H., Ohno, Y., and Ito, Y. Modulation of voltage-gated Ca²⁺ current by 4-hydroxynonenal in dentate granule cells. *Biol. Pharm. Bull.* (2004), in press

2. 学会発表

1. 藤森観之助：安全性薬理試験ガイドライン（S7B）について。ICH即時報告会（平成15年8.28）

2. Fujimori K. : New requirement to assess the potential for QT interval prolongation: Guideline on Safety Pharmacology Studies for Assessing the Potential for Delayed Ventricular Repolarization (QT Interval Prolongation) by Human Pharmaceuticals (ICH-S7B). ICH 6 (11.14, 2003.)

3. 藤森観之助：シンポジウムS45 新薬開発の観点からみた「薬剤によるQT間隔延長」に関する非臨床・臨床試験とその評価: Nonclinical assessment of the potential for QT interval prolongation by pharmaceuticals 第77回日本薬理学会総会（平成15年3..10）

4. 中澤憲一、山越葉子、生島裕恵、土屋利江、大野泰雄“P2X₂受容体タンパク質の調製および原子間力

顕微鏡による観察”第77回日本薬理学会年会 2004年3月

5. 佐藤薫、中澤憲一、松木則夫、大野泰雄 “アストロサイトにおけるエストロゲンのグルタミン酸取り込み機構に対する抑制” 第77回日本薬理学会年会 2004年3月
6. 生島裕恵、中澤憲一、野澤（石井）玲子、竹内幸一、大野泰雄 “P2X2受容体のATP反応性に対する細胞内システイン残基の役割” 第77回日本薬理学会年会 2004年3月
7. 赤石樹泰、中澤憲一、佐藤薫、齋藤洋、大野泰雄、伊藤芳久 “脂質過酸化由来物質4-hydroxynonenalがラット歯状回顆粒細胞のホールセルCa²⁺電流に及ぼす影響” 第77回日本薬理学会年会 2004年3月

H. 参考資料

1. Puisieux, F. L., Adamantidis, M. M., Dumotier, B. M., Dupuis, B. A.: Cisapride-induced prolongation of cardiac action potential and early after depolarizations in rabbit Purkinje fibres. *Brit. J. Pharmacol.*, 117: 1377-1379 (1996)
2. Cavero I., Mestre M., Buillon J.M. & Crumbs W.: Drugs that prolong QT interval as an unwanted effect: Assessment of their likelihood of inducing hazardous cardiac dysrhythmias. *Exp. Opin. Pharmacotherap.* 2, 1-25, 2000.
3. EU-CPMP Point to consider: The assessment of the potential for QT interval prolongation by non-cardiovascular medicinal products. CPMP/986/96 (1997)
4. Draft guidance: Assessment of the QT prolongation potential of non-antiarrhythmic drugs. Canada FDA-PATPO, (<http://www.hc-sc.gc.ca/hpb-dgps/therapeut/htmleng/guidmain.html>), 2001
5. 安全性薬理試験ガイドライン、医薬審第902号厚生労働省医薬局審査管理課長通知平成13年6月
6. Drugs that prolong the QT interval and/or induce Torsade pointes ventricular arrhythmia. ArizonaCERT Univ. of Arizona Health Science Center : www.Torsades.org
7. Redfern W.S. Carlsson L., Davis A.S., Lynch W.G., MacKenzie I., Palethorpe S., Siegle P.K.S., Strang I., Sullivan A.T., Wallis R., Camm A.J. & Hammond T.G.: Relationship between preclinical cardiac electrophysiology, clinical QT interval prolongation and torsade de pointes for a broad range of drugs: evidence for a provisional safety margin in drug development. *Cardiovascular Research* 58, 32-45, 2003
8. Hondeghem L.M. and Hoffmann P.: Blinded test in isolated female rabbit heart reliably identifies Action Potential Duration prolongation and proarrhythmic drugs: Importance of Triangulation, Reverse use dependency and Instability. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 41, 14-24, 2003

III. 分担研究報告（非臨床有効性部門）

厚生労働科学研究費補助金（医薬品医療技術リスク評価研究事業）
平成15年度分担総括研究報告書

国際的審査協力のための医薬品の評価方法の確立

分担研究者：豊島 聡（国立医薬品食品衛生研究所医薬品医療機器審査センター センター長）
高仲 正（昭和大学薬学部 客員教授）
奥田 晴宏（国立医薬品食品衛生研究所有機化学 部長）

研究要旨

本研究では、国際的審査協力のための医薬品の評価方法を確立するため、非臨床的薬剤応答性評価に基づく医薬品有効性評価法の検討、医薬品等有効性評価法の生物統計学的検討、バイオテクノロジー医薬品の効力比較法の基礎的検討をそれぞれモデル系を構築して遂行した。

- ・非臨床的薬剤応答性評価に基づく医薬品有効性評価法の検討（緑膿菌の感受性推移について）：抗菌薬の審査において、感受性評価は有効性評価の重要な指標の一つであることから、他の菌種に比較すると耐性を獲得しやすい緑膿菌をモデルとして選択し、新鮮臨床分離株である緑膿菌520株の感受性について検討を行うとともに、その緑膿菌が分離された患者の抗菌薬使用歴について検討を行った。その結果、抗菌薬の感受性を評価する際には、被験薬投与以前の抗菌薬投与歴についても考慮した上での検討が重要であることが示唆された。
- ・医薬品等有効性評価法の生物統計学的検討：統計学の目的の一つは、観察や測定により得られたデータを適切に要約することである。ここでは、薬剤をいくつかの用量を投与し、その反応を経時的に観察する試験から得られたデータの解析方法を検討した。このような試験は薬効薬理試験で広く行われているが、そこで用いられている統計的方法はその情報を十分に利用しているとはいえない。本研究では、Holzhütterら（1995）の提案する曲線モデルに着目し、この関数のあてはめによる薬効の評価方法を構築することを目的としているが、このモデルを用いるためには状態数を示すパラメータの数を選択する必要がある。そこで、本年度はAICを用いて選択基準を行うことを試み、この基準により選択されたモデルのあてはまりについて調べた。事例における結果は良好であり、AICは一つの基準となりうると思われる。また、このような曲線あてはめのアプローチを用いた場合の薬効評価の指標について考察し、初期状態があるところまで減少するまでの時間が薬効の指標となりうることを示した。さらに、検討したモデルのさらなる可能性について考察を加えた。
- ・バイオテクノロジー医薬品の効力比較法の基礎的検討：本研究の目的は、ICHガイドラインの策定に先立つ複数のモデルデータの収集、それらデータの類型化及びcomparabilityに関する科学的評価方法の確立である。今年度は、種々の株化細胞及び培養条件から得られたヒトCOX-2糖鎖構造の解析を目的としたヒトCOX-2を大量発現可能な細胞種及び培養条件の検討と、昨年度に引き続き、さまざまな培養条件や精製方法に

より得られたCOX-2の特性を評価する新たな手段の開発を目的として、COX-2を選択的に阻害する新規化合物の探索を行った。すなわち、ヒトCOX-2糖鎖構造の解析を目的として、ヒトCOX-2大量発現可能な細胞種と考えられるヒト白血病細胞HL-60を選択するとともに添加する分化誘導剤の種類等の検討を行った。また、今回合成した誘導体から構造活性相関の情報が得られ、これを適用することによりCOX-2選択性の高い新規COX阻害化合物の開発の可能性が示唆された。

キーワード： 緑膿菌、抗菌剤感受性、用量反応曲線モデル、Comparability、シクロオキシゲナーゼ

A. 研究目的

1. 非臨床的薬剤応答性評価に基づく医薬品有効性評価法の検討：抗菌薬の審査において、感受性評価は有効性評価の重要な指標の一つである。そこで他の菌種に比較すると耐性を獲得しやすい緑膿菌をモデルとして選択し、新鮮臨床分離株である緑膿菌520株の感受性の検討を行うとともに、その緑膿菌が分離された患者の抗菌薬使用歴との関係について明らかにすることを目的に検討を行った。
2. 医薬品等有効性評価法の生物統計学的検討：生物統計学の目的の一つは、観察や測定により得られたデータを適切に要約することである。しかしながら、しばしば医薬品等の試験結果についての有効性評価の際に行われるデータの統計処理として、広く知られた方法が形式的に用いられる結果、データの解釈を行い評価する際に役にたっていないことがあるように感じられる。つまり、用いられている方法が必ずしも得られたデータの適切な要約になっていないのである。昨年度は、薬効薬理試験で広く行われている、異なる時点における異なる用量の反応を調べる試験より得られた時間-用量反応型データの解析方法を検討して、Holzhütterら（1995）の提案する用量反応曲線モデルを利用し、特定のメカニズムを想定しない時間-用量反応型曲線モデルのあてはめを行った。すなわち、Holzhütterら（1995）の導出した特定の関数に限定しない滑らかな曲線を描く関数のあてはめを試みた。この関数は状態数というパラメータの数を事前に設定する必要があるが、実際にこの方法を用いる場合にはこの数を決める必要がある。そこで本研究では、状態数の決定方法を検討する。

また、この方法を用いたときに、どのように薬効を評価すべきかについて考察するとともに、この方法の限界についても考察を行なう。

3. バイオテクノロジー医薬品の効力比較法の基礎的検討：バイオテクノロジー医薬品は、完全に人為的に制御することが不可能な細胞の生合成過程を用いて生産されるために、生産物において分子間で構造面での不均一性が発生することが多い。特に翻訳後修飾として糖鎖付加を受ける糖たん白質性医薬品では、たん白質性医薬品全体に共通するプロセッシング等による1次配列の多様性のみならず、糖鎖結合部位への糖鎖の付加の有無、糖鎖の種類・構造・存在割合等の要因により、分子種として極めて多様な成分（グリコフォーム）から構成されている。本研究においては、ICHガイドラインの策定に先立つ複数のモデルデータの収集、それらデータの類型化及びcomparabilityに関する科学的評価方法の確立を目的とする。バイオテクノロジー医薬品のモデルとしては、不均一性の面でみて上記の特質をもつ糖たん白を選定し、製造方法スキームの変更又は製造方法中、細胞培養工程、精製工程等、各工程における具体的な製造方法・製造条件の変更の内容及び程度が、当該モデルたん白（本研究ではシクロオキシゲナーゼのアイソザイムの1つであるCOX-2を選択した）の物理的・化学的性質・生物学的性質・免疫学的性質に及ぼす影響を評価・分析することとした。今年度は、昨年度に引き続き、さまざまな培養条件や精製方法により得られたCOX-2の特性を評価する新たな手段の開発を目的として、COX-2を選択的に阻害する新規化合物の探索を行った。また発現細胞及び培養条

件の違いによるCOX-2の構造の違いを示唆する結果が得られていたことから、ヒトCOX-2糖鎖構造の解析を目的としてヒトCOX-2の大量発現が可能な細胞種及び培養条件の検討を行った。

B. 研究方法

1. 緑膿菌の感受性推移について：東京都内の平均入院患者数710人の三次救命救急医療機関において、平成13年12月～平成14年5月までの6ヶ月間に入院患者から分離された緑膿菌520株を検討対象とした。感受性測定薬剤は、イミペネム (IPM)、アミカシン (AMK)、ゲンタマイシン (GM)、セフトジジム (CAZ)、レボフロキサシン (LVFX) の5薬剤とし、感受性測定には微量液体希釈法を用いた。
2. 医薬品等有効性評価法の生物統計学的検討：データにモデルとして用いる用量反応曲線の式（平成15年度分担研究報告書「医薬品等有効性評価法の生物統計学検討」参照）をあてはめるためには、各状態の数Nを事前に決める必要がある。しかし、これを事前に設定することは難しい。そこで、Nの数について複数の候補を用意しておいて、データへの適合という観点からNの数を決めることにした。このことを客観的に行うために、ここでは統計的モデル選択の方法論を適用することにした。統計的モデル選択法は多数の方法が提案されているが、ここでは、AIC（坂元ら（1983））に基づきNを選択することにした。そして、この指標で選択したNを採用した場合のデータへの適合といくつかの他の数を用いた場合のデータへの適合を調べることにした。Nの候補は1～10とした。
3. COX-2を選択的に阻害する新規化合物の検索：サリドマイドがリポ多糖誘導によるCOX-2の発現誘導を抑制するとの報告（Clin. Cancer Res. (2001) 7, 3349-3355）が発表されたことから、サリドマイドがCOX-2選択的阻害剤の新たなリード化合物になることを期待し、サリドマイドのフタルイミド骨格部分を基本骨格としたフタルイミド誘導体及びホモフタルイミド誘導体を各種合成し、アスピリンをコントロール化合物としてCOX-1/2阻害活性を測定した。ヒトCOX-2糖鎖構造の解析を目的としたヒト

COX-2を大量発現可能な細胞種及び培養条件の検討については、より大量培養を行いやすい浮遊細胞であるヒト白血病細胞HL-60をCOX-2産生細胞に選択し、添加する分化誘導剤の種類等の検討を行った。

C. 研究結果

1. 緑膿菌の感受性推移について：緑膿菌520株の薬剤耐性率はイミペネム (IPM) に対し32.1%と最も高く、次いでゲンタマイシン (GM)、レボフロキサシン (LVFX) の順であった。また、今回得られた結果を、当該医療機関におけるこれまでの緑膿菌耐性率に続けてプロットしたところ、AMK、GM、CAZ、LVFXの4薬剤については、耐性率はほぼ横這いであるのに対し、IPMについては上昇傾向が認められた。そこで、以下の検討については、IPMを中心に行った。IPM耐性の167株について、他の薬剤への耐性状況を確認したところ、今回検討した5薬剤全てに耐性を示す株が10株（6.0%）検出された。次に、IPM耐性株とカルバペネム系薬使用歴との関係についての検討を行った。今回検討した520株が分離された症例は計214例であり、うち、カルバペネム系薬の使用歴なしの症例は133例、カルバペネム系薬の使用歴ありの症例は81例であった。カルバペネム系薬使用歴のない症例から分離された緑膿菌では、その約80%がIPM感受性であるのに対し、カルバペネム系薬投与歴のある症例より分離された緑膿菌では、IPM感受性は20%であった。
2. 医薬品等有効性評価法の生物統計学的検討：AIC基準を用いた場合、AICの値が最も小さい値のものを選択することになる。事例のデータの状態数が1から10までのAICの値は、N=6のとき最小値となっている。他のNの値では、AICはN=4では1131に、N=8では1129に、N=10では1132となっており、それほどN=6の場合と違いはなさそうであった。N=3では1260、N=9では1289となってこれらの場合には少し離れていることがわかる。データとAICで選択された状態数N=6での予測値からの結果はあまりが良好であることを示した。N=2ではあまりは十分によいとはいえず、特に0.03mg/kgはデータと乖離している。パラメータの数が少なくモデルの

柔軟性が欠けている。しかし、 $N=4$ のあてはまりはかなりよくなっており、あてはまりは十分であるようである。 $N=10$ となるとパラメータが増えた分、多少データの変動に影響を受けているように見えるが、この場合もあてはまりは良好である。

検討するモデルでは、状態数である N の数をはじめに指定する必要がある、それを $N=3$ として、検討を行った。vehicle群、0.03mg/kg群、0.3mg/kg群をあてはめた結果、あてはまりは良好であった。予備的な検討の結果、用量 D を固定した時間反応曲線のあてはまりはすべての群で良好であったため、時間-用量反応曲線のあてはめを行った。この検討でも予備検討と同様に状態数 N は3としたが、さらに N を4の場合と5の場合についても検討を行った。いずれの場合も非線形最小二乗法は収束し、パラメータの推定値を得ることができた。 N を3としたときには、0.03mg/kgでのあてはまりは明らかに悪かった。状態数 N が4と5の時に比べ残差平方和の値もこのとき大きい。一方、状態数 N を4、5としたとき、あてはまりは良好であり、残差平方和も N が3のときに比べ、かなり改善していた。

3. COX-2を選択的に阻害する新規化合物の検索：フェニルフタルイミド誘導体のフェニル基上の置換基がCOX阻害活性に与える影響を検討することを目的に、フェニルホモフタルイミド誘導体のCOX-1/2阻害活性を評価し、アルキル置換基の与える影響を検討した。その結果、3,5-ジメチルフェニルホモフタルイミドのCOX-2阻害活性が最も強く、フェニルフタルイミドの場合と同様の傾向がみられた。また、3,4-ジメチルフェニルホモフタルイミド及び4-エチルフェニルホモフタルイミドにアスピリンより約4倍強いCOX-2阻害活性が認められたのに対し、2-アルキルフェニルホモフタルイミド誘導体は阻害活性を全く示さないか、もしくはアスピリンと同程度の阻害活性しか示さなかった。以上から、メタ位へのアルキル置換基の導入が、COX-2阻害活性を増強するのに対し、オルト位へのアルキル置換基の導入はCOX-2の阻害活性を減少させる方向に導くことがうかがえた。

COX-2を大量発現する細胞種と培養条件の検討：

ヒトCOX-2糖鎖構造の解析を目的としたヒトCOX-2を大量発現可能な細胞種及び培養条件の検討については、より大量培養を行いやすい浮遊細胞であり、分化誘導が比較的簡便で、使用する誘導剤の種類によって顆粒球、単球、マクロファージの3通りの分化方向性を有しているヒト白血病細胞HL-60を選択した。これまでヒト白血病細胞においては、分化誘導剤の添加などによる分化誘導によりCOX-2発現が誘導されることがmRNA発現の上昇で確認されているが(Prostaglandins (1995) 49, 371-382, Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids (2002) 67, 405-410)、蛋白発現に関しては確認されていないことから、各種分化誘導剤をHL-60に添加した際のCOX-2発現量をELISAで評価することとした。分化誘導剤は、12-o-tetradecanoyl phorbol-13-acetate (TPA, マクロファージ様に分化)、活性型ビタミンD (単球様に分化)、レチノイン酸、DMSO (共に顆粒球様に分化)を選択し、培養期間を2~4日間として検討した。その結果TPA 1nM存在下、3日間培養の条件でCOX-2の発現量が最も高かった。

D. 考察

1. 緑膿菌の感受性推移について：昨今、国内外を問わず、感染症治療領域においては、耐性菌が大きな問題となっている。我が国に置いては、MRSA、ペニシリン耐性肺炎球菌 (PRSP)、多剤耐性緑膿菌などが大きな問題となっている耐性菌である。今回は、これらのうち、緑膿菌に絞って検討を行った。その結果、緑膿菌の耐性度は年々上昇する傾向が見られ、また、その耐性株分離頻度は、カルバペネム系薬使用患者において著しく高いことが明らかとなった。薬剤耐性菌の出現は、その抗菌薬の使用量を大きく関連するとされている。今回の検討を実施した医療機関において、カルバペネム系薬の使用量は増加しており、これが当該医療機関におけるIPM耐性緑膿菌分離頻度の上昇と関連している可能性が考えられる。これは、国内のみの問題ではなく、海外においても同様の状況であり、3ヵ月毎に使用薬剤を変更するサイクリング療法などの試みもなされてきている。

2. 医薬品等有効性評価法の生物統計学的検討：本検討では、Nの数は1から10までしか調べていないが、データにあてはまるより単純な形が望ましいので、この事例ではこれ以上Nの数を増やすことに意味があるとは思えなかった。

検討した関数は、Holzhütterら（1995）の提案した時間-用量-反応曲線である。この曲線は状態数を適当に選ぶことにより柔軟な曲線のあてはめを可能にしている。しかしながら、この関数にはかなり制約がある。我々が理想とする関数は、用量と時間の変化によって変わる反応を表現する関数である。すなわち用量と時間の間を柔軟に表現できることが望ましいが、検討した関数では、用量と時間の関係はたった2つのパラメータ k と n に規定されてしまっている。このことがこの関数の欠点となっている。データによっては滑らかさのパラメータである状態数を多く用いても、見たい反応の関係を表現できないことがある。状態数をとりうる確率を用量と時間の関数として、その状態数の期待値で反応を表現するというHolzhütterら（1995）のアプローチはこの検討で示したように適用可能な場面があることは確かであろうが、より広い範囲のデータを扱うためには、用量と時間の関数である状態数をとる確率のモデルを柔軟にする必要があるであろう。本検討ではそこまでの検討はできなかった。

3. COX-2を選択的に阻害する新規化合物の検索：アスピリンより約100倍強力なCOX阻害活性をもつことが見出されたホモフタルイミド誘導体（昨年度報告）の構造を基に今回新たに合成したフタルイミド誘導体及びホモフタルイミド誘導体においては、COX-1/2選択性の向上は認められなかったものの、アスピリンより強いCOX阻害活性を有する新たな誘導体が見出され、さらにフタルイミド及びホモフタルイミド骨格上の置換基がCOX阻害活性に与える影響についての知見も得られた。今回合成した誘導体から得られた構造活性相関の情報を適用すれば、COX-2選択性の高い新規COX阻害化合物が開発可能と考える。高いCOX-2選択性を有する新規COX阻害化合物は、COX-2の物理的・化学的・生物学的・免疫学的性質の評価・分析における新たなツールとし

て有用であると考えられる。

・ヒトCOX-2の糖鎖構造の解析を目的としたヒトCOX-2を大量発現可能な細胞種及び培養条件の検討：ヒト白血病細胞HL-60をCOX-2産生細胞として選択し、添加する分化誘導剤の種類、培養期間の検討を行った。ELISAでCOX-2の発現量の評価をおこなった結果、TPA $1nM$ 存在下3日間の培養で、最も良好なCOX-2の発現が認められた。

E. 結論

1. 緑膿菌の感受性推移について：抗菌薬の審査において、感受性評価は有効性評価の重要な指標の一つである。今回の検討は緑膿菌、カルバペネム系薬を中心とした検討であったが、今回得られた知見は、緑膿菌とカルバペネム系薬の組み合わせの場合のみならず想定される状況である。従って、抗菌薬の感受性を評価する際には、被験薬投与以前の抗菌薬投与歴についても考慮した上での検討が重要である。

2. 医薬品等有効性評価法の生物統計学的検討：本検討では、Holzhütterらの提案するモデルにもとづき、時間-用量反応曲線あてはめの実施可能性の検討を行った。用いた事例については、あてはめは良好であったことから、種々の時間-用量反応型データにこのモデルを適用することは可能であると考えられた。しかし、時間-用量反応型データの解析方法として、本検討のような曲線あてはめのアプローチが、検定や分散分析と同様に用いられるようになるためには、いくつかの検討事項が課題として残っている。最も大きな課題は、その使い方であろう。我々は、あてはめるモデルの選択、あてはめの評価、結果の表記などを含めて、このアプローチをどのような手順でどう使えばよいかを示すガイドが必要であろうと考えている。また、本検討で用いた事例以外にも複数の事例を用いて、このアプローチが様々な時間-用量反応型データに適用可能であることを示すことが必要であると思われる。

3. COX-2を選択的に阻害する新規化合物の検索：本年度は、メタ位へのアルキル置換基の導入が、COX-2阻害活性を増強するのに対し、オルト位へのアルキル置換基の導入はCOX-2の阻害活性を減少させる方

向に導く可能性を明らかにすることができた。

・ヒトCOX-2の糖鎖構造の解析を目的としたヒトCOX-2を大量発現可能な細胞種及び培養条件の検討：ヒト白血病細胞HL-60をCOX-2産生細胞として選択し、分化誘導剤の種類、培養期間を検討することにより良好な成績が得られた。

F. 健康危険情報

特に無し

G. 研究発表

学会発表

Shimazawa R, Nagata R, Okuda H, Toyoshima S : Issues related to quality evaluation of new drug substances and drug products. AIMECS03: Fifth AFMC International Medicinal Chemistry Symposium (2003.10.14-17 Abstracts p148)

H. 参考資料

緑膿菌の感受性推移について

1. P.T. Tassios, et al., J. Clinic. Microbiol. 36:897-901, 1998
 2. P.R. Hsueh, et al., J. Clinic. Microbiol. 36:1347-1351, 1998
 3. Crit Care Med. 29: 1101-1108. 2001
医薬品等有効性評価法の生物統計学的検討
- (1) Holzhütter H., G. and Quedenau J., Mathematical modeling of cellular responses to external signals. J. Biologocal Systems, Vol3 (1995) pp.127-138.
 - (2) 久保田和彦、神谷大雄、木皿憲佐、佐々木健一編 基礎薬理学実験. 南江堂 (1987) .
 - (3) 坂元慶行、石黒真木夫、北側源四郎 情報量統計学. 共立出版株式会社 (1983) .
 - (3) 松本一彦、橋本修二、吉村功 薬効薬理データの統計解析Q&A. 日薬理誌108 (1996) pp.186-188.
 - (4) 吉村功、大森崇 薬理試験における統計解析のQ&A—反復測定データの解析法への一提案—. 日薬理誌110 (1997) pp.333~340.

厚生労働科学研究費補助金総合研究報告書概要版

研究費の名称＝厚生労働科学研究費補助金

研究事業名＝医薬品等医療技術リスク評価研究事業

研究課題名＝国際的審査協力のための医薬品の評価方法の確立

研究期間（西暦）＝2001～2003

研究年度（西暦）＝2003

主任研究者名（所属機関）＝上田 慶二（東京都多摩老人医療センター）

分担研究者名（所属機関）＝豊島 聰（国立医薬品食品衛生研究所医薬品医療機器審査センター）

高仲 正（昭和大学薬学部）

奥田 晴宏（国立医薬品食品衛生研究所有機化学部）

研究要旨＝本研究では、国際的審査協力のための医薬品の評価方法を確立するため、非臨床的薬剤応答性評価に基づく医薬品有効性評価法の検討、医薬品等有効性評価法の生物統計学的検討、バイオテクノロジー医薬品の効力比較法の基礎的検討をそれぞれモデル系を構築して遂行した。

- ・非臨床的薬剤応答性評価に基づく医薬品有効性評価法の検討（緑膿菌の感受性推移について）：抗菌薬の審査において、感受性評価は有効性評価の重要な指標の一つであることから、他の菌種に比較すると耐性を獲得しやすい緑膿菌をモデルとして選択し、新鮮臨床分離株である緑膿菌520株の感受性について検討を行うとともに、その緑膿菌が分離された患者の抗菌薬使用歴について検討を行った。その結果、抗菌薬の感受性を評価する際には、被験薬投与以前の抗菌薬投与歴についても考慮した上での検討が重要であることが示唆された。
- ・医薬品等有効性評価法の生物統計学的検討：統計学の目的の一つは、観察や測定により得られたデータを適切に要約することである。ここでは、薬剤をいくつかの用量を投与し、その反応を経時的に観察する試験から得られたデータの解析方法を検討した。このような試験は薬効薬理試験で広く行われているが、そこで用いられている統計的方法はその情報を十分に利用しているとはいえない。本研究では、Holzhütterら（1995）の提案する曲線モデルに着目し、この関数のあてはめによる薬効の評価方法を構築することを目的としているが、このモデルを用いるためには状態数を示すパラメータの数を選択する必要がある。そこで、本年度はAICを用いて選択基準を行うことを試み、この基準により選択されたモデルのあてはまりについて調べた。事例における結果は良好であり、AICは一つの基準となりうると思われる。また、このような曲線あてはめのアプローチを用いた場合の薬効評価の指標について考察し、初期状態があるところまで減少するまでの時間が薬効の指標となりうることを示した。さらに、検討したモデルのさらなる可能性について考察を加えた。
- ・バイオテクノロジー医薬品の効力比較法の基礎的検討：本研究の目的は、ICHガイドラインの策定に先立つ複数のモデルデータの収集、それらデータの類型化及びcomparabilityに関する科学的評価方法の確立である。今年度は、種々の株化細胞及び培養条件から得られたヒトCOX-2糖鎖構造の解析を目的としたヒトCOX-2を大量発現可能な細胞種及び培養条件の検討と、昨年度に引き続き、さまざまな培養条件や精製方法により得られたCOX-2の特性を評価する新たな手段の開発を目的として、COX-2を選択的に阻害する新規化合物の探索を行った。すなわち、ヒトCOX-2糖鎖構造の解析を目的として、ヒトCOX-2大量発現可能な細胞種と考えられるヒト白血病細胞HL-60を選択するとともに添加する分化誘導剤の種類等の検討を行った。また、今回合成した誘導体から構造活性相関の情報が得られ、これを適用することによりCOX-2選択性の高い新規COX阻害化合物の開発の可能性が示唆された。

非臨床的薬剤応答性評価に基づく医薬品有効性評価法の検討 — 緑膿菌の感受性推移について —

分担研究者：高仲 正（昭和大学薬学部 客員教授）

研究協力者：佐藤 淳子（国立医薬品食品衛生研究所医薬品医療機器審査センター審査官）

研究要旨

新鮮臨床分離緑膿菌のイミペネム（IPM）、アミカシン（AMK）、ゲンタマイシン（GM）、セフトラジウム（CAZ）、レボフロキサシン（LVFX）に対する感受性について検討を行った。その結果、AMK、GM、CAZ、LVFXについては、その耐性率の変化は横這いであるのに対し、IPMについては、上昇傾向が認められた。IPM使用有りの患者から検出される緑膿菌はIPM使用無しの患者から検出される緑膿菌よりもIPM耐性率が高いという結果が得られた。

抗菌薬の審査において、感受性評価は有効性評価の重要な指標の一つであり、抗菌薬の感受性を評価する際には、被験薬投与以前の抗菌薬投与歴についても考慮した上での検討が重要であることが示唆された。

A. 研究目的

緑膿菌 *Pseudomonas aeruginosa* は、生活環境中に広く生息しているグラム陰性桿菌である。健康人に対して病原性を発揮することは少ないとされているが、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌（MRSA）同様、院内感染や日和見感染症の原因菌として古くより注目されてきた菌である。元来、緑膿菌は、自然耐性を示す薬剤が多く、治療に難渋する例が多かったが、1980年代より、セフトロジン、セフトラジウムなどのセフェム系薬、アミカシンなどのアミノグリコシド系薬、イミペネムなどのカルバペネム系薬、そしてシプロフロキサシンなどのニューキノロン系薬などが開発され、緑膿菌による感染症がコントロール可能な時代が到来したかのようには思われた。しかし、元来、緑膿菌は、他の菌種に比較すると耐性を獲得しやすく、昨今、国内外を問わず、これらの系統の薬剤にも耐性を示す菌種が増加してきており、さらには、これらのいずれの系統にも耐性を示す多剤耐性緑膿菌が問題となってきている^{1) 2)}。

そこで今回、我々は、新鮮臨床分離株である緑膿菌

520株の感受性について検討を行い、さらにその緑膿菌が分離された患者の抗菌薬使用歴について検討を行った。

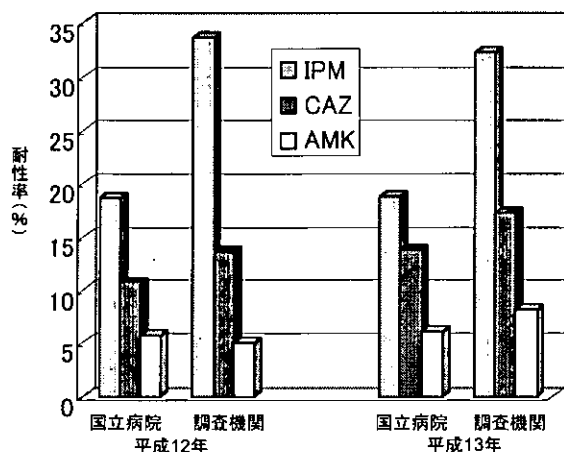
B. 研究方法

東京都内の平均入院患者数710人の三次救命救急医療機関において、平成13年12月～平成14年5月までの6ヶ月間に入院患者から分離された緑膿菌520株を検討対象とした。感受性測定薬剤は、イミペネム（IPM）、アミカシン（AMK）、ゲンタマイシン（GM）、セフトラジウム（CAZ）、レボフロキサシン（LVFX）の5薬剤とし、感受性測定には微量液体希釈法を用いた。

C. 研究結果

緑膿菌520株の各薬剤に対する耐性率は表1の通りであった。耐性率はIPMが32.1%と最も高く、次いでGM、LVFXの順であった。また、今回得られた結果を、当該医療機関におけるこれまでの緑膿菌耐性率に続けてプロットしたところ、AMK、GM、CAZ、LVFXの4

薬剤については、耐性率はほぼ横這いであるのに対し、IPMについては上昇傾向が認められた（図1）。また、当該医療機関における緑膿菌の耐性率は全国国立病院の平均値より高いことが明らかとなった（図2）。そこで、以下の検討については、IPMを中心に行った。



薬剤耐性状況の比較

表1 各薬剤の耐性率

	IPM	AMK	GM	CAZ	LVFX
耐性率 (%)	32.1	7.6	26.7	16.4	23.0

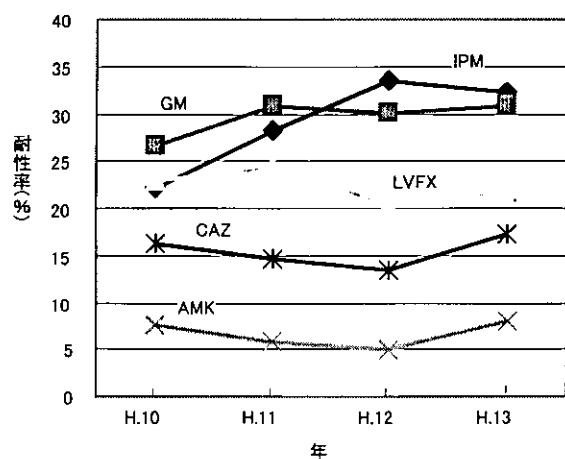


図1 各薬剤感受性の経年的変化

IPM耐性の167株について、他の薬剤への耐性状況を確認したところ、表2に示す通り、今回検討した5薬剤全てに耐性を示す株が10株（6.0%）検出された。

表2 IPM耐性の状況

	株数	%
IPMのみ耐性	62	37.1%
2剤耐性	46	27.5%
3剤耐性	32	19.2%
4剤耐性	17	10.2%
5剤耐性	10	6.0%

表3 IPM感受性とカルバペネム系薬使用歴

		感受性	
		感受性	耐性
薬剤使用	無	124件 (79.0%)	9件 (15.8%)
	有	33件 (21.0%)	48件 (84.2%)

次に、IPM耐性株とカルバペネム系薬使用歴との関係についての検討を行った。今回検討した520株が分離された症例は計214例であり、うち、カルバペネム系薬の使用歴なしの症例は133例、カルバペネム系薬の使用歴ありの症例は81例であった。カルバペネム系薬使用歴のない症例から分離された緑膿菌では、その約80%がIPM感受性であるのに対し、カルバペネム系薬投与歴のある症例より分離された緑膿菌では、IPM感受性は20%であった。

D. 考察

昨今、国内外を問わず、感染症治療領域においては、耐性菌が大きな問題となっている。我が国に置いては、MRSA、ペニシリン耐性肺炎球菌（PRSP）、多剤耐性緑膿菌などが大きな問題となっている耐性菌である。今回は、これらのうち、緑膿菌に絞って検討を行った。その結果、緑膿菌の耐性度は年々上昇する傾向が見られ、また、その耐性株分離頻度は、カルバペネム系薬使用患者において著しく高いことが明らかとなった。薬剤耐性菌の出現は、その抗菌薬の使用量を大きく関連するとされている。今回の検討を実施した医療機関において、カルバペネム系薬の使用量は増加しており、これが当該医療機関におけるIPM耐性緑膿菌分離頻度の上昇と関連している可能性が考えられる。これは、

国内のみの問題ではなく、海外においても同様の状況であり、3ヵ月毎に使用薬剤を変更するサイクリング療法などの試みもなされてきている³⁾。

E. 結 論

抗菌薬の審査において、感受性評価は有効性評価の重要な指標の一つである。今回の検討は緑膿菌、カルバペネム系薬を中心とした検討であったが、今回得られた知見は、緑膿菌とカルバペネム系薬の組み合わせの場合のみならず想定される状況である。従って、抗菌薬の感受性を評価する際には、被験薬投与以前の抗菌薬投与歴についても考慮した上での検討が重要である。

F. 健康危険情報

特に無し

G. 研究発表

特に無し。

参考文献

1. P.T. Tassios, et al., *J. Clinic. Microbiol.* 36:897-901, 1998
2. P.R. Hsueh, et al., *J. Clinic. Microbiol.* 36:1347-1351, 1998
3. D.P. Raymond, et. al., *Crit Care Med.* 29: 1101-1108. 2001

厚生労働科学研究費補助金（医薬品等医療技術リスク評価研究事業）
平成15年度分担研究報告書

医薬品等有効性評価法の生物統計学的検討

分担研究者：奥田 晴宏（国立医薬品食品衛生研究所有機化学部部長）

協力研究者：大森 崇（京都大学医学部助教授）

荒戸 照世（国立医薬品食品衛生研究所医薬品医療機器審査センター審査官）

志村 紀子（国立医薬品食品衛生研究所医薬品医療機器審査センター審査官）

笛木 修（国立医薬品食品衛生研究所医薬品医療機器審査センター審査官）

研究要旨

統計学の目的の一つは、観察や測定により得られたデータを適切に要約することである。ここでは、薬剤をいくつかの用量を投与し、その反応を経時的に観察する試験から得られたデータの解析方法を検討した。このような試験は薬効薬理試験で広く行われているが、そこで用いられている統計的方法はその情報を十分に利用しているとはいえない。本研究では、Holzhütterら（1995）の提案する曲線モデルに着目し、この関数のあてはめによる薬効の評価方法を構築することを目的としているが、このモデルを用いるためには状態数を示すパラメータの数を選択する必要がある。そこで、AICを用いて選択を行うことを試み、この基準により選択されたモデルのあてはまりについて調べた。事例に結果は良好であり、AICは一つの基準となりうると思われる。また、このような曲線あてはめのアプローチを用いた場合の薬効評価の指標について考察し、初期状態があるところまで減少するまでの時間が薬効の指標となりうることを示した。さらに、検討したモデルのさらなる可能性について考察を加えた。

キーワード：薬効薬理試験、時間-用量反応、統計解析、非線形最小二乗法、パラメータ、

AIC

A. 研究目的

本研究では、医薬品等の非臨床試験から得られるデータの統計処理法について検討する。特にある条件の試験を異なる用量で行い、経時的に反応が測定されるデータを対象とする。通常、このようなデータは時間と用量により反応の値が異なるように試験が行われ、その変化について考察がなされる。本稿ではこのような時間と用量と反応が組となったデータを時間-用量-反応型データと呼ぶこととし、これらの関係を時間-用量-反応関係と呼ぶことにする。

時間-用量-反応関係を調べるための検討は、多くの

薬理試験や毒性試験で実施されている（例えば、久保田ら（1987））。しかしながらそこから得られるデータに適用される統計解析の手法は必ずしもこの検討を行うために適した方法であるとはいえない。典型的な例は各時点について行われる検定である。どのような検定であろうと、どこかの時点で有意差があるかどうかを調べようとして、検定を繰り返せば、差がないにもかかわらず有意だと判定する確率は大きくなる。この問題は多重性の問題として広く知られているが、時間-用量-反応型データの解析ではこのことは無視されることが非常に多い。その理由はおそらく多重性を考慮