

図 1

濁液の一部を用いて、1.6cells/wellになるように細胞を再播種し、コロニー形成率（それぞれPE0およびPE3）を算出した。また、処理終了直後から発現時間終了までの間毎日細胞数を計測し、各濃度における相対増殖率（RSG）を算出した。処理終了3日（発現時間終了）後に、2000cells/wellとなるように細胞を播種し、3 μg/mLトリフルオロチミジン(TFT)中で選択培養し、12日目に突然変異コロニー（TFT耐性コロニー）の数を計数し、突然変異率を算出した。溶媒対照群については2プラスコを用い、各プラスコにつき96ウェルプレート4枚（計8枚）、その他の処理群では各群1プラスコにつき2枚のプレートを用いた。

C. 研究結果

1. ヒト型*in vitro*試験系での細胞分裂毒（COL、VBL、GSF）の試験結果

COL、VBL、GSFの細胞毒性（RS）、TK遺伝子突然変異（TK-MF）、小核（MN）、コメット（COM）の結

果を図1に示す。各試験化合物で細胞を4時間処理し、その直後に細胞毒性とコメットを測定し、48時間後、と72時間後にそれぞれ小核と、TK遺伝子突然変異を測定した。COLでは細胞毒性は20ng/mLにおいて、強い細胞毒性が現れ、その後、TK-MF、MNが濃度依存的に増加した。コメットはいずれの濃度においても陽性反応は見られなかった。VBL、GSFは細胞毒性が十分に表れないにもかかわらず、TK-MF、MNの誘発が認められた。VBLと、GSFのTK-MF、MNの反応性は極めて類似していた。また、両化合物ともコメットは全ての用量において陰性であった。GSFは溶解性が低く、100 μg/mL以上では沈殿が生じた。この沈殿は、処理後の培養時でも全てを除去することができず、このことがTK遺伝子突然変異試験を困難にした。最高用量でのTK-MFの下降はこの沈殿が原因と考えられる。

Trichlorfon (異数性誘発物質)

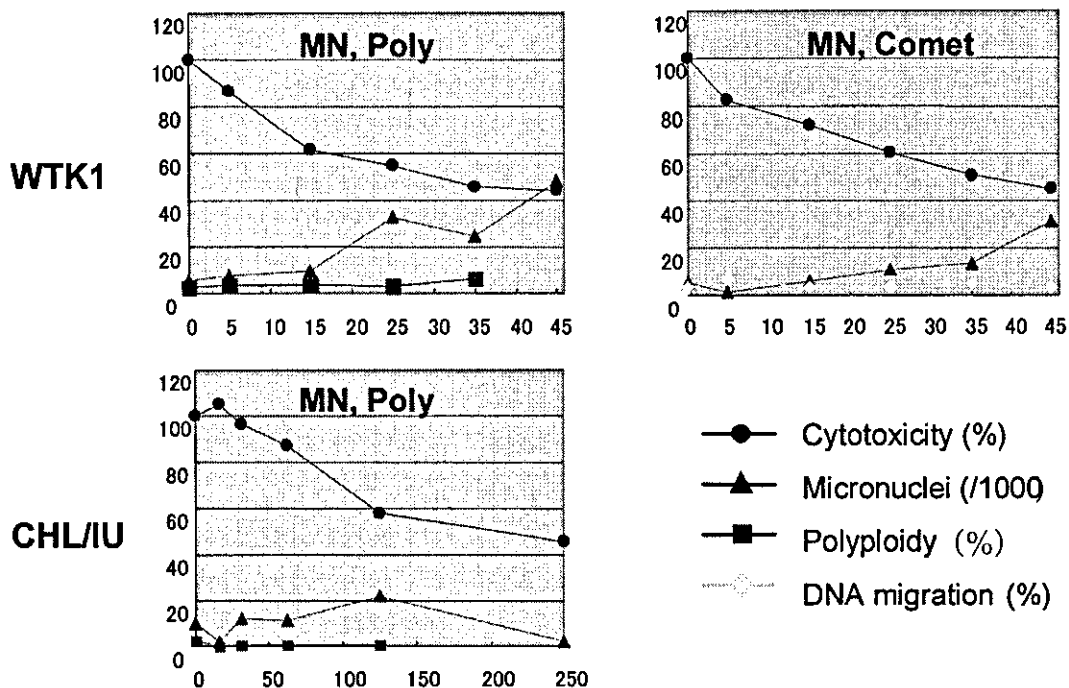


図 2

Carbendazim (倍数性誘発物質)

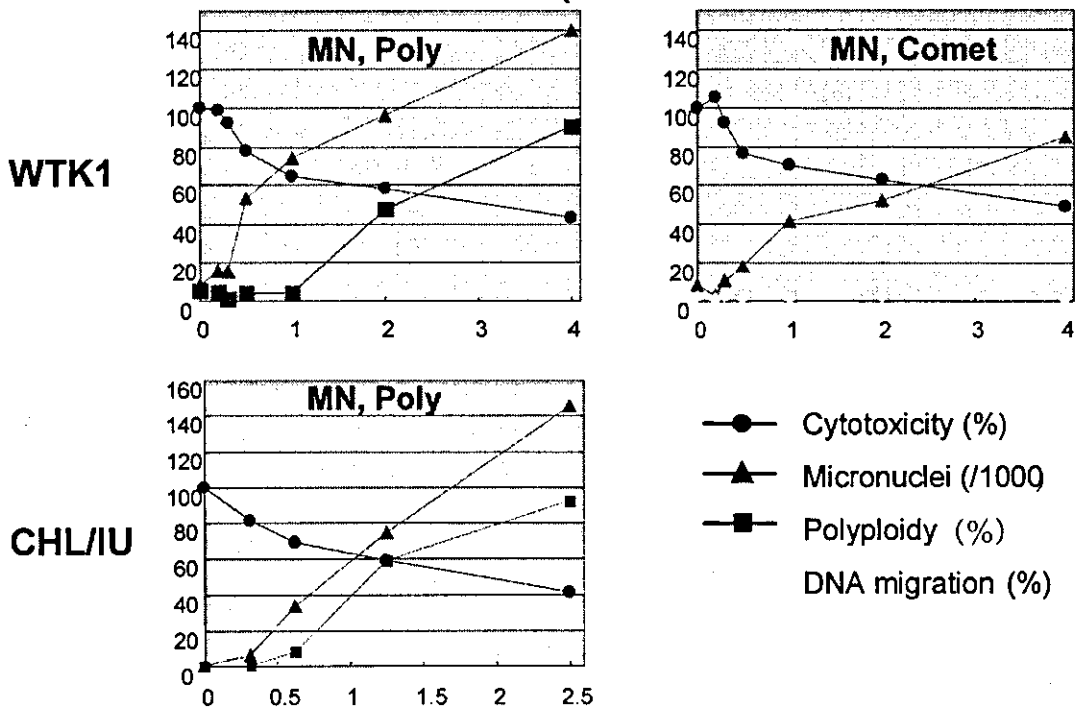


図 3

2. TFと、MBCの小核、および染色体の数的異常誘発性

TF、またはMBCで細胞を24時間処理し、小核、倍数体、コメットの頻度を測定した。細胞毒性は24時間処理後の細胞の相対増殖率を指標とした。実験は2回行い、1回目に小核と倍数体頻度、2回目に小核とコメットを持つ細胞の頻度を測定した。結果を図2に示す。TFは濃度依存的に細胞毒性を示し、25 μ g/mL以上において小核を誘発した。一方、倍数性の出現頻度、コメット細胞の出現頻度の増加は認められなかった。

MBC処理では1 μ g/mL以下の比較的細胞毒性が弱い用量からも小核の顕著な誘発が見られた。倍数体細胞の出現は2 μ g/mL以上で濃度依存的に観察された。コメット細胞の誘発は最高用量でも認められなかった。

このようなTFの小核誘発、MBCの小核誘発および倍数性細胞の誘発はCHL/IU細胞でも観察された。

D. 考 察

WTK-1細胞からなるヒト型試験系は、コメット試験、小核試験、TK遺伝子突然変異からなるマルチエンドポイントの試験系であり、理論的にはそれぞれDNAの初期損傷、その後の細胞分裂に伴うゲノムの視覚的異常、最終的なゲノム情報の変化を連続的にとらえることができる系である。これまで典型的なmutagen、およびclastogenについて試験をし、既存の遺伝毒性データとほぼ同程度の検出能力をもつことから、新たな遺伝毒性試験系として認知されつつある。

COL、VBL、GSFは細胞分裂毒であり、直接DNAに損傷を与えず、細胞分裂に関与するタンパク質に結合し、染色体不分離などを介して、染色体の数的異常を引き起こすと考えられている。これら化合物は、細菌による復帰突然変異試験陰性、染色体異常が陽性との結果がある。しかしながら、染色体異常の結果は倍数性を指標とした結果であり、異数性がこれら化合物によって誘発されたかは明らかではない。

染色体の異数性はがん細胞に高頻度に観察される。染色体の消失はがん抑制遺伝子のヘテロ接合性消失のメカニズムの一つであり、逆に染色体の増加はがん遺伝子の増幅を引き起こし、がん発生に深く関与していると考えられている。また、ダウン症、ターナー症な

ど先天的な遺伝性疾患においても、染色体の数的異常は、構造異常よりも高頻度に認められる。このようなことから、欧米では最近、染色体の数的異常の検出の重要性が論議されている。

体細胞の細胞分裂時に異常分裂が起こると、極に移動できずに残された染色体は小核となると考えられていることから、小核試験が染色体の異数性を検出できるとの報告が数多くある。実際に、今回、我々が試験したCOL、VBL、GSFなどを含む大部分の細胞分裂毒は小核を誘発する。これら化合物はTK遺伝子突然変異試験においても陽性を示した。COLやVBLはTK遺伝子を含む染色体全体の消失を引き起こし、突然変異をもたらすことが報告されていることから、小核の誘発と、TK突然変異の誘発は、染色体の異数性によるものと予想される。しかしながら、これら誘発された小核のすべてが異数性に由来するかどうかは明らかではない。染色体の動原体DNAをプローブとFISH解析では、動原体を持つ小核の頻度は、自然誘発、および細胞分裂毒誘発において大きく変わらないことが報告されている。また、WTK-1細胞を含む*in vitro*小核試験に用いられる細胞の大部分はp53異常細胞であり、もともと染色体が不安定であり、異数性を引き起こしやすいことも考えられる。事実、WTK-1細胞と由来を同じくし、p53正常細胞であるTK6では、細胞分裂毒による小核誘発は見られるが、TK遺伝子突然変異では陰性の結果が得られている。これらのことから、染色体異数性と、小核形成の関係については、染色体分配機構に基づく、分子生物学的、細胞遺伝学的な解析が必要と考えられる。

また、COL、VBL、GSFは主として染色体倍数性を誘発することから、小核形成は染色体の倍数化に伴う副次的な影響と考えることもできる。そこで今回、我々は異数性誘発物質であるTFと、倍数性誘発物質であるMBCの小核誘発性について検討した。両物質はともに殺虫剤として開発されたが、TFはダウン症候群高発生率の原因物質であることが示唆されており、MBCについては抗ガン剤としての開発が検討されている。両者の異数性、もしくは倍数性の誘発は主としてマウス生殖細胞で報告されている。今回の我々のヒト細胞を用いた結果では、TFは染色体の倍数性を伴わずに小核を誘発し、また、MBCは小核、倍数性とも誘発したが、

低濃度では小核のみを誘発した。同様の結果はチャイニーズハムスター細胞 (CHL/IU) でも確認された。これらの結果は、小核は倍数性を伴わなくとも出現することを示すものであり、染色体の倍数化とは別のメカニズムが関与することが明らかとなった。

しかしながら今回のTFとMBCの結果はこれまでの我々の報告と大きく異なるものである。すなわち、今回TFはWTK-1、CHL細胞とも25-45 μ g/mLで50%細胞毒性と、それに伴う小核の誘発が観察されたのに対して、これまでの試験は15 μ g/mLで強い細胞毒性と小核が観察され、MBCに関しては、今回0.5-4.0 μ g/mLが至適試験濃度であったのに対して、これまででは0.2-0.9 μ g/mLで試験を行った。今後、処理時間、発現時間、細胞遺伝学的解析も含めこれらモデル化合物の試験全体の再検討を行い、染色体異常性と、小核形成の関係を明らかにする必要があると考えられる。

E. 結論

ヒトリンパ芽球由来のWTK-1細胞を基礎とし、コメント試験、小核試験、TK遺伝子突然変異試験からなるヒト型*in vitro*遺伝毒性検出系を構築した。本試験系は互いの試験結果を比較し、遺伝毒性の特徴を推測することが可能である。細胞分裂毒である、COL、VBL、GFBで試験を行った結果、小核試験でこれら化合物を効率的に検出できることが明らかとなった。本試験系の染色体異常性検出能力を確認するため異常性誘発物質であるTFと倍数性誘発物質MBCを用い、小核誘発率と、倍数性誘発率等を検討した。その結果、両物質とも小核を誘発したが、倍数性を誘発したのはMBCのみ

であった。これらの結果は、異常性のみを誘発する物質も小核試験で検出できることを示すものである。

F. 研究発表

1. 論文発表

Yamada, K., T. Suzuki, A. Kohara, M. Hayashi, T. Mizutani, and K. Saeki (2004) *In vivo* mutagenicity of benzo[f]quinoline, benzo[h]quinoline, and 1,7-phenanthroline using the lacZ transgenic mice *Mutat. Res.*, 559, 83-95.

Zang, L., H. Sakamoto, M. Sakuraba, D-S Wu, L-S Zhang, T. Suzuki, M. Hayashi, M. Honma (2004) Genotoxicity of microcystin-LR in human lymphoblastoid TK6 cells, *Mutat. Res.*, 557, 1-6.

Suzuki, H., T. Shirotori, and M. Hayashi (2004) A liver micronucleus assay using young rats exposed to diethylnitrosamine: methodological establishment and evaluation. *Cytogenet. Genome. Res.*, 104, 299-303.

Wang, W., Seki, M., Otsuki, M., Tada, S., Takao, N., Yamamoto, K., Hayashi, M., Honma, M. and Enomoto, T. (2004) The absence of a functional relationship between ATM and BLM, the components of BASC, in DT40 cells. *Biochem. Biophys. Acta* 168, 137-144.

Yatagai F, Morimoto S, Kato T, Honma M. (2004) Further characterization of loss of heterozygosity enhanced by p53 abrogation in human lymphoblastoid TK6 cells: disappearance of endpoint hotspots. *Mutat. Res.*, 560, 133-145.

厚生労働科学研究費補助金（医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業）
平成16年度分担研究報告書

－免疫毒性試験法の標準化に関する調査研究－

分担研究者：澤田 純一（国立医薬品食品衛生研究所 機能生化学部長）
協力研究者：大沢 基保（帝京大学薬学部 教授）
今井 俊夫（国立医薬品食品衛生研究所病理部 室長）
手島 玲子（国立医薬品食品衛生研究所機能生化学部 室長）
中村 和市（塩野義製薬株式会社新薬研究所 主管研究員）
筒井 尚久（三菱ウェルファーマ株式会社安全性研究所 グループマネージャー）
久田 茂（帝国臓器製薬株式会社安全性・代謝研究部 主席研究員）
牧 栄二（ヤンセンファーマ株式会社研究開発本部データ管理部 部長）
笹木 修（医薬品医療機器総合機構新薬審査第一部 審査専門員）
山口 光峰（医薬品医療機器総合機構新薬審査第一部 審査専門員）

研究要旨：

免疫毒性試験法に関する国内外の動向調査を行うと同時に、免疫毒性試験データ調査票の改訂を行い、追加調査を行った。収集された免疫毒性試験データの解析を行った結果、標準的毒性試験に含まれる免疫関連指標によって免疫毒性試験の免疫機能指標の変化をある程度予測しうることが明らかになり、標準的毒性試験の所見と同時に、その他の懸念される要因を考慮して、免疫毒性試験の実施の必要性を判断することが合理的であるとの結論に達した。次いで、ICH免疫毒性試験ガイドライン案（Step 2文書）を作成し、コメント募集を開始した。

キーワード：免疫毒性試験法、免疫毒性データ収集、ICHガイドライン案

A. 研究目的

免疫毒性試験法に関する文献調査及び国内外の動向調査等を行い、ICHにおける調和ガイドラインの作成を目的とした免疫毒性試験データ収集を行う。得られた情報を基に、免疫毒性試験ガイダンス（案）を作成する。

B. 研究方法

平成16年度においては、ICH S8 Expert Working Group（EWG）と共同して、三極のガイダンスを調和するために必要とされる免疫毒性試験データの追加収集を行い、データ解析を行った。また、解析結果を参考にし

て、ICH免疫毒性試験法ガイドライン案を作成した。

今年度においては、ヒトまたは動物の組織を研究対象としなかったため、倫理面への配慮に関する該当事項はない。

C. 研究結果

1. 免疫毒性試験データの収集及び解析

前年度に引き続き、免疫毒性試験データを追加収集するための調査票（エクセルファイル）を改訂し、日米欧の製薬企業に頒布してデータを追加収集した。

得られたデータは一覧表形式にまとめられ、平成16年11月に横浜において開催されたEWG会議で詳細に

解析された。64化合物に関する免疫毒性試験成績が寄せられたが、評価を行うに当たって不十分なデータ及び細胞毒性を示す抗がん剤を除き、45化合物が評価に用いられた。標準的毒性試験 (STS) の結果と追加の免疫毒性試験 (AIS) の結果の相関を解析したところ、27の化合物で一致した結果 (カテゴリーA及びB) が得られ、12化合物で、STSのみ陽性 (カテゴリーD) となり、6化合物 (13%) でAISのみ陽性 (カテゴリーC) の結果が得られた (表1)。また、データの偏りが無いことを確認するために追加解析も行った。最終的に、得られた結果は、STS が一次スクリーニングとして優れており、その他の懸念要因を考慮して、追加の免疫毒性試験を行えば効率的に免疫毒性を検出しうることが示唆された。これらのデータは、三極のガイダンスまたはガイダンス案の調和を図る上で非常に参考になると判断され、ICH運営委員会に報告するとともに、詳細な解析結果を論文として公表することとなった。

表1 64化合物の評価結果

カテゴリー	STS	AIS	化合物数	%
A	+	+	11	24
B	-	-	16	36
C	-	+	6	13
D	+	-	12	27
E	データ不十分		12	-
X	細胞毒性抗がん剤		7	-

標準的な毒性試験 (STS) においては、病理組織学的検査、血液学的検査等で変化の認められたものを陽性 (+) とし、追加の免疫毒性試験 (AIS) においては、T細胞依存性抗体産生、フローサイトメトリー法、NK細胞活性等において陽性の結果が得られたものを陽性 (+) として、それぞれのカテゴリーに属する化合物の数を示した。

2. ICH免疫毒性試験法ガイドライン案作成

免疫毒性がS8として正式なICHのトピックとなり、EWGが構成された後は、ICH免疫毒性試験ガイドライン案作成のため、試験法の標準化及び免疫毒性試験実施の必要条件に関して、頻繁な電話会議及び電子メール交換により議論を重ねた。その後、平成16年11月に横浜で開催されたEWG会議において最終的合意が得られ、Step 2の免疫毒性試験法ガイドライン案が作成さ

れた (資料1)。同英文ガイドライン案をさらに、邦文に翻訳し (資料2)、意見の収集を開始した。

D. 考察

今後は、ICHガイドライン案へのコメントに対応し、Step 3文書を作成する必要がある。また、今回のガイダンス案の対象から除外した、薬物アレルギー関連の試験法に関しても、さらに調査を継続する必要がある。

E. 結論

平成16年度は、日米欧の免疫毒性試験ガイドラインの国際調和を目的として、免疫毒性データの追加収集及び解析を行った。得られたデータを参考に、ICHの免疫毒性試験ガイドライン案 (Step 2文書) の作成及び翻訳を行った。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

- 1) 中村和市: ICHトピックスS8. *ImmunoTox Letter*, 9(1), 1-2, 2004.
- 2) 中村和市、澤田純一: ICH免疫毒性試験ガイドライン. *ImmunoTox Letter*, 9(2), 4-6, 2004.
- 3) 中村和市: ICHトピックスS8: 免疫毒性試験. 日本トキシコロジー学会、大阪、2004.7.
- 4) 久田茂: ICH免疫毒性データ調査について. 日本トキシコロジー学会、大阪、2004.7.
- 5) 中村和市: 安全性に関するトピックの動向—S8: *Immunotoxicology Study*—. *医薬品研究*; 35(11), 597-602, 2004
- 6) Weaver JL, Tsutsui N, Hisada S, Vidal JM, Spanhaak S, Sawada J, Hastings KL, van der Laan JW, van Loveren H, Kawabata TK, Sims J, Durham SK, Fueki O, Matula TI, Kusunoki H, Ulrich P, Nakamura K: A survey of industry practices on the immunotoxicology evaluation of pharmaceuticals. submitted.

(資料 1)

IMMUNOTOXICOLOGY STUDIES FOR HUMAN PHARMACEUTICALS

Draft ICH Consensus Guideline (Step 2)

INTRODUCTION

Evaluation of potential adverse effects of human pharmaceuticals on the immune system should be incorporated into standard drug development. Toxicity to the immune system encompasses a variety of adverse effects. These include suppression or enhancement of the immune response. Suppression of the immune response can lead to decreased host resistance to infectious agents or tumor cells, whereas enhancing the immune response can stimulate the expansion of autoreactive immune cells and lead to autoimmune diseases. Drug or drug-protein adducts might also be recognized as foreign and stimulate an anti-drug response. Subsequent exposures to the drug can lead to hypersensitivity (allergic) reactions. Much of the science and method development and validation efforts in the past have been focused on evaluating drug development candidates for their potential to be either immunosuppressive or contact (dermal) sensitizers.

1.1 Objectives of the guideline

The objectives of this guideline are to provide (1) recommendations on nonclinical testing approaches to identify compounds which have the potential to be immunosuppressive, and (2) guidance on a weight-of-evidence decision making approach for immunotoxicity testing.

1.2 Background

The most robust methods available for practical use in the assessment of adverse drug effects on immune function are those designed to detect and evaluate immunosuppression. Historically, unintended immunosuppression has been causally related to antiproliferative drugs primarily used to treat cancer. In such instances, adverse findings in

nonclinical studies are predictive of human immunotoxicity in a rather straightforward manner. That is, specific assays to determine immunotoxicity are probably not valuable in drug risk assessment since the target tissues are usually rapidly dividing cell types, such as bone marrow-derived immune system progenitor cells. Hence, the adverse effects on immune function can be predicted based on pharmacologic activity and can usually be reliably modelled in animals.

It has become apparent in recent years that immunosuppression can be associated with other types of drugs. It is possible to divide these drugs into two distinct groups: Those that are intended to modulate immune function for therapeutic purposes (e.g. drugs intended to prevent organ transplant rejection) where adverse immunosuppression can be considered exaggerated pharmacodynamics, and those that are not intended to affect immune function but can cause unintended immunosuppression due for instance, to induced necrosis, apoptosis of immune cells or interaction with cellular receptors shared by both target tissues and non-target immune system cells. Although this difference is relatively obvious, distinction between exaggerated pharmacodynamics and non-target toxicity can be less obvious for certain classes of drugs (e.g. anti-inflammatory drugs).

1.3 Scope of the Guideline

This guideline is focused on providing recommendations on nonclinical testing for immunosuppression induced by low molecular weight drugs (non-biologicals). This guideline applies to new pharmaceuticals intended for use in humans, as well as to marketed drug products proposed for different indications or other variations on the current product label in which the change could result in unaddressed and relevant toxicologic issues. In addition, the guideline might also apply to drugs in which clinical signs of immunosuppression are observed during clinical trials and following approval to market. The term immunotoxicity in this guideline will primarily refer to immunosuppression,

i.e. a state of increased susceptibility to infections or the development of tumors.

It is beyond the scope of this guideline to provide specific guidance on how each immunotoxicity study should be performed. General guidance is provided in Appendix 1.

1.4 Overview

The general principles that apply to this guideline are:

- 1) All new investigational drugs should be evaluated for the potential to produce immunosuppression.
- 2) Methods include standard toxicity studies (STS) and additional immunotoxicity studies conducted as appropriate. Whether additional immunotoxicity studies are appropriate should be determined by a weight of evidence review of cause(s) for concern.

The description of the guideline below will follow the flow diagram shown in Figure 1. More detailed descriptions of the testing methods are described in Appendix 1.

2. GUIDELINE

2.1 Assessment of potential immunotoxicity

The initial screen for potential immunotoxicity involves the standard toxicity studies. Data from rodent and non-rodent studies from early short term to more chronic repeat-dose studies should be taken into consideration. Additional details on the parameters that should be evaluated and the reporting of histopathology findings are provided in Appendix 1.

In addition to the findings from the STS, other causes for concern that might prompt additional immunotoxicity studies include: (1) the pharmacological properties of the drug, (2) the intended patient population, (3) known drug class effects, and (4) the disposition of the drug.

The flow diagram (Figure 1) illustrates the recommended decision process in immunotoxicity evaluation.

2.1.1 Standard toxicity studies

Data from STS should be evaluated for signs of immunotoxic potential. Signs that should be taken into consideration are the following.

- (1) Hematological changes - Evidence of myelosuppression, usually seen in peripheral blood changes (e.g. pancytopenia, leukopenia, lymphopenia, or other blood dyscrasias);
- (2) Alterations in immune system organ weights and histology (e.g. changes in thymus, spleen, lymph nodes, and/or bone marrow);
- (3) Decreased basal serum immunoglobulins - serum globulins are a rather insensitive marker of immunotoxicity due to the long half life of immunoglobulins. However, changes in globulins that occur without a plausible explanation can indicate potential immunotoxicity.
- (4) Increased incidence of infections.
- (5) Evidence of carcinogenicity, especially in the absence of genotoxicity.

If the findings from the STS indicate that there are signs of immunotoxicity, the decision to conduct additional immunotoxicity testing should be considered in a weight-of-evidence review of the data. Similar to the assessment of risk with toxicities in other organ systems, the assessment of immunotoxicity should include the following:

- statistical and biological significance of the changes,
- severity of the effects,
- dose dependency,
- safety factor above the expected clinical dose,
- study duration,
- number of species and endpoints affected,
- changes that may occur secondarily to other factors (eg. stress, see appendix 1),
- possible cellular targets and/or mechanism of action,
- doses which produce these changes in relation to doses which produce other toxicities and

- reversibility of effect(s).

2.1.2 Other Causes for Concern in the Weight-of-Evidence Review

The following factors should also be considered:

(1) If the pharmacological properties of a test compound indicate it has the potential to produce significant immunosuppression, additional immunotoxicity testing should be considered. For example, anti-inflammatory drugs are known to affect the function of certain types of cells of the immune system; however, their ability to suppress adaptive and/or innate immune responses is not clear. Information on the ability of the compound to affect the immune system can be gathered as part of the pharmacological studies conducted during the discovery or early development phases. These non-GLP pharmacology studies could be used in deciding if additional immunotoxicity studies are needed. The decision to conduct additional immunotoxicity studies should be based on a weight of evidence approach.

(2) The targeted patient population should also be considered. For instance, additional immunotoxicity testing might be needed if the majority of the targeted patient population is immunocompromised.

(3) Compounds structurally similar to compounds with known immunosuppressive properties should also be considered for additional immunotoxicity testing.

(4) If the compound and/or its metabolites are known to be retained at high concentrations in cells of the immune system, additional immunotoxicity testing should be considered.

If signs of immunotoxicity are observed in STS and/or one of the above four factors apply, it is recommended that the sponsor conduct studies of drug effect on immune function

or provide justification for not performing these evaluations.

2.2 Selection and Design of Additional Immunotoxicity Studies

2.2.1 Selection of assays

If the weight-of-evidence approach indicates that additional immunotoxicity studies are needed, there are a number of animal models which can be used. If there are changes in standard toxicity testing data suggesting immunosuppression, the type of additional immunotoxicity testing that is appropriate will depend on the nature of the immunological changes observed and concerns raised by the class of compound.

It is recommended that an immune function study be conducted. Where a specific target is not identified, an immune function study such as the T-cell dependent antibody response (TDAR) is recommended. If specific cell types are affected in STS, assays that measure function of that specific cell type might be conducted (see appendix 1).

Immunophenotyping of leukocyte populations, a non-functional assay, can be conducted to identify the specific cell populations affected and useful clinical biomarkers.

2.2.2 Study Design

It is a generally accepted study design to assess drug-induced immunosuppression in studies with 28 consecutive daily oral doses in mice or rats. The species, dose, duration, and route of administration used in immune function assays should be consistent, where possible, with the nonclinical toxicology study in which an adverse immune effect was observed. The high dose should be above the no observed adverse effect level (NOAEL) but below a level inducing changes secondary to stress. Multiple dose levels are recommended in order to determine dose-response relationships and the dose at

which no immunotoxicity is observed. Adaptations of immune function assays developed in rodents have been described using non-rodent species. Under most circumstances, immunological test methods can be appropriately modified for these other species.

2.2.3 Evaluation of Need for Follow-up Testing

Results of the entire data set should be evaluated as to whether sufficient data are available to reasonably determine the risk of immunotoxicity. If the overall risk-benefit analysis suggests that the risk of immunotoxicity is acceptable, then no follow-up testing might be called for.

3. FOLLOW-UP IMMUNOTOXICITY STUDIES

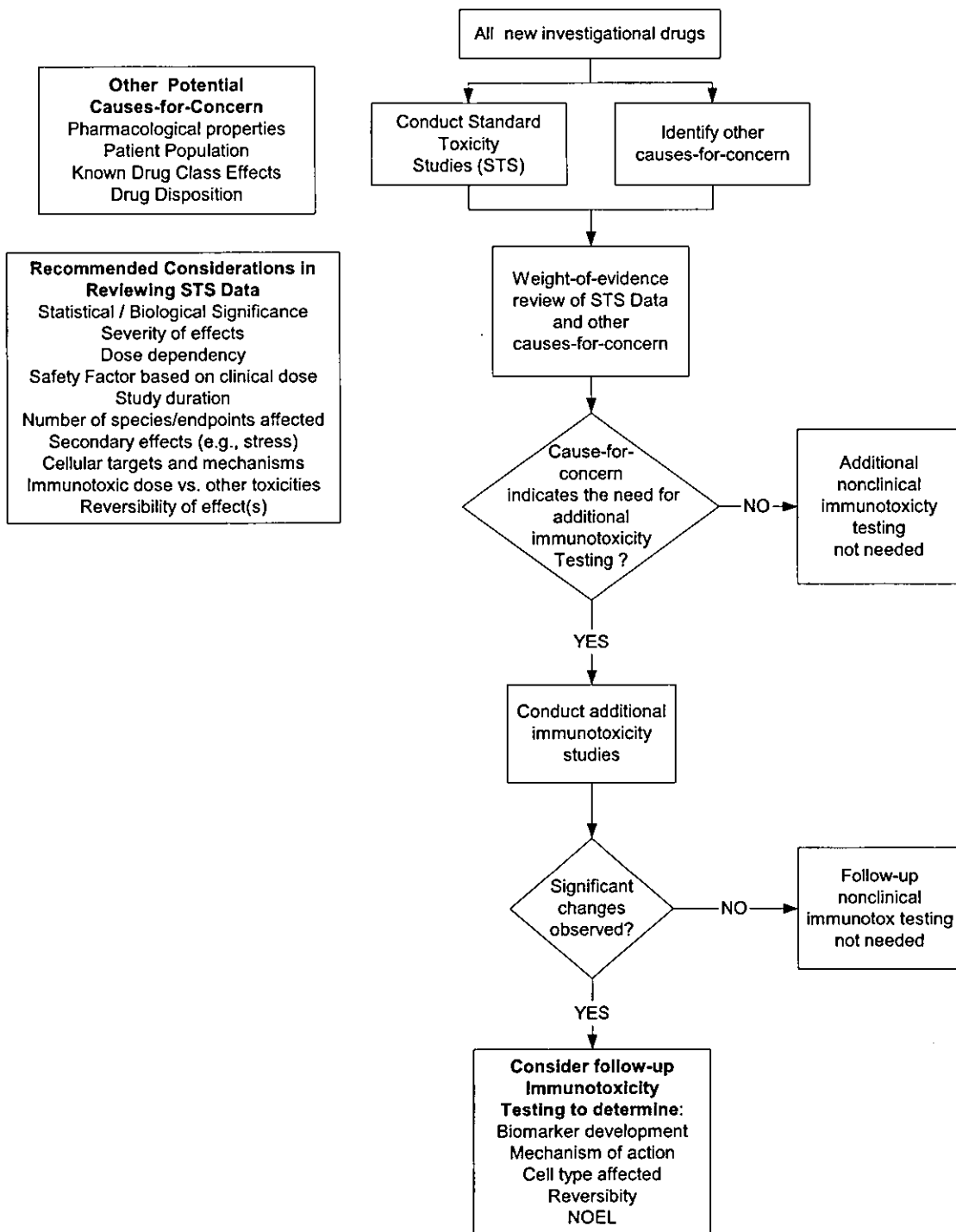
If changes are observed with immunotoxicity testing, further studies should be considered to help determine the cell type affected and the mechanism of action. This type of information can provide more insight into potential risk and possibly lead to biomarker selection for clinical studies. These assays can include natural killer cell, host resistance or macrophage function assays. The findings from the STS and/or additional nonclinical immunotoxicity testing will

help determine the need for, feasibility of, and type of clinical monitoring that is appropriate. In situations where the development candidate might have a pharmacological effect on the immune system, that specific component or associated function could be monitored. Additional guidance is beyond the scope of this guideline.

4. TIMING OF IMMUNOTOXICITY TESTING IN RELATION TO CLINICAL STUDIES

If the weight-of-evidence review indicates the need for additional immunotoxicity studies, these should be completed before exposure of a large population of patients to the drug. This will allow for the incorporation of immunotoxicity testing in the clinical studies if appropriate. The timing of the additional immunotoxicity testing might be determined by the nature of the effect by the test compound and the type of clinical testing that would be needed if a positive finding is observed with the additional immunotoxicity testing. If the target patient population is immunocompromised, immunotoxicity testing can be initiated at an earlier time point in the development of the drug.

Flow Diagram for Recommended Immunotoxicity Evaluation



Appendix 1

Methods to Evaluate Immunotoxicity

1. Standard Toxicity Studies

The following table lists the parameters that should be evaluated in standard toxicity studies for signs of immunotoxicity. These parameters (excluding hematology and serum chemistry) and methods in obtaining samples and evaluating tissue sections are described in more detail in documents from professional toxicological pathology societies.

Parameter	Specific Component
Hematology	Total leukocyte counts and absolute differential leukocyte counts
Clinical Chemistry	Globulin levels and A/G ratios
Gross pathology	Lymphoid organs / tissues
Organ weights	thymus, spleen, (optional: lymph nodes)
Histology	thymus, spleen, draining lymph node and at least one additional lymph node, bone marrow, Peyer's patch

1.1 Hematology and Clinical Chemistry

Total leukocyte counts (white blood cells) and absolute differential leukocyte counts are recommended to assess for immunotoxicity. When evaluating changes in globulin levels, other factors should be taken into account (e.g. nephrotoxicity). Changes in serum globulins can be an indication that there are changes in serum immunoglobulins. Although serum immunoglobulins are an insensitive indicator of immunosuppression, it can be useful in certain situations in order to better understand target cell populations or mechanism of action.

1.2 Gross Pathology and Organ Weights

All lymphoid tissues should be evaluated for gross changes at necropsy. However, this can be more difficult for the Peyer's patches of rats due to the small size. Spleen and thymus weights should be recorded. To minimize variability of spleen weights in dogs and monkeys, bleeding

the animals thoroughly at necropsy is recommended. Atrophy of the thymus with ageing may preclude obtaining accurate thymus weight.

1.3 Histopathological Examination

Histopathological changes of the spleen and thymus should be evaluated as an indicator of systemic immunosuppression. The lymphoid tissue that drains or contacts the site of drug administration (and therefore is exposed to the highest concentration of the drug) should be examined. These sites include the Peyer's patches and mesenteric lymph nodes for orally administered drugs, bronchus-associated lymphoid tissues (BALT) for drugs administered by the inhalation route, nasal-associated lymphoid tissues (NALT) for drugs administered by the inhalation or nasal route, and the most proximal regional draining lymph nodes for drugs administered by the dermal, intramuscular, intradermal, intrathecal, or subcutaneous routes. The specific node selected should be at the discretion of the sponsor based on the sponsor's experience with the nodes. For intravenously administered drugs, the spleen can be considered the draining lymphoid tissue.

It is recommended that a "semi-quantitative" description of changes in compartments of lymphoid tissues should be used in recording changes and reporting treatment-related changes in lymphoid tissues.

1.4 Interpretation of Stress Related Changes

With standard toxicity studies, doses near or at the maximum tolerated dose can result in changes to the immune system related to stress. These effects on the immune system are most likely mediated by increased corticosterone or cortisol release. Commonly observed stress-related immune changes include increases in circulating neutrophils, decreases in circulating lymphocytes, decreases in thymus weight, decreases in thymic cortical cellularity and associated histopathologic changes ("starry sky" appearance), and changes in spleen and lymph node cellularity. Increases in adrenal gland weight can also be observed. In situations with clear

clinical observations (eg. decrease body weight gain, decreased activity), some or all of the changes to lymphoid tissue and hematology parameters might be attributable to stress rather than to a direct immunotoxic effect. The evidence of stress should be compelling.

2. Additional Immunotoxicity Studies

2.1 Assay Characterization and Validation

In general, the immunotoxicity test selected should be widely used and have been demonstrated to be adequately sensitive and specific for known immunosuppressive agents. However, in certain situations, extensive validation might have not been completed and/or the assay might not be widely used. In these situations, a scientific / mechanistic basis for use of the assay is needed and if feasible, appropriate positive controls should be incorporated.

There can be variations of response for each type of immunotoxicity test used by different labs. In most situations, these changes do not affect the ability of the assay to assess immunotoxicity. However, to assure proper assay performance and lab proficiency, several standard technical validation parameters should be observed. These parameters can include determining intra- and inter-assay precision, technician-to-technician precision, limit of quantitation, linear region of quantitation and test sample stability. In addition, assay sensitivity to known immunosuppressive agents should be established. It is recommended that each laboratory conduct a positive control study periodically in order to demonstrate proficiency of performance, except for studies with non-human primates.

2.2 T-cell Dependent Antibody Response (TDAR)

The TDAR should be performed using a recognized T-cell dependent antigen (e.g. sheep red blood cells, SRBC or keyhole limpet hemocyanin, KLH) that result in a robust antibody response. The endpoint selected should be shown to be the most appropriate for the chosen assay. For the SRBC assay, IgM is considered the most appropriate

endpoint.

Antigens for immunization should not be used with adjuvants without justification. Alum might be acceptable for use only in non-human primate studies. The relative TDAR response can be strain-dependent, especially in mice. With outbred rats, there can be significant variability among rats within the same group. Inbred rat strains should not be used unless sufficient exposure data are provided.

Antibody can be measured by using an ELISA or other immunoassay methods. One advantage of this method over the antibody forming cell response is that samples can be collected serially during the study. In monkeys, serial blood collection can be important due to the high inter-animal variability in the kinetics of the response. For these studies, data may be expressed as the sum of the antibody response over several collection dates (eg. area under the curve).

ELISA results should be expressed either as concentration or titer, but expression as optical densities is not recommended.

When SRBC antigens are used for an ELISA, the preparation of the capture antigen that is coated on the plates is considered critical. SRBC capture antigen may be used as whole fixed erythrocytes or as membrane preparations.

For the rat TDAR and immunophenotyping assays, the addition of positive controls for each study with test compound might not be needed if the method used has been demonstrated to be adequately sensitive to immunosuppressive compounds.

2.3 Immunophenotyping

Immunophenotyping is the identification and/or enumeration of leukocyte subsets using antibodies. Immunophenotyping is usually conducted by flow cytometric analysis or by immunohistochemistry. With flow cytometry the percentage and absolute counts of a specific cell type or activation markers can be determined from large numbers of cells analyzed.

One of the advantages of immunohistochemistry over flow cytometry is that tissues from standard toxicity studies can

be analyzed retrospectively if signs of immunotoxicity are observed. In addition, changes in cell types within a specific compartment within the lymphoid tissue can be observed. Some of the lymphocyte markers for certain species are sensitive to formalin fixation and can only be localized in tissue that are either fixed with certain fixatives or flash frozen. In addition, quantitation of leukocytes among subsets and intensity of staining is much more difficult with immunohistochemistry.

When immunophenotyping studies are used to characterize or identify alterations in specific leukocyte populations, the choice of the lymphoid organs to be evaluated should be based on changes observed. Immunophenotyping can be easily added to standard repeat dose toxicity studies and changes can be followed during the dosing phase and periods without drug exposure (reversal period). When flow cytometry is employed to enumerate specific cell populations, it is not a functional assay. However, flow cytometry can be used to measure antigen-specific immune responses of lymphocytes. Data obtained from peripheral blood can be useful as a bridge for clinical studies in which peripheral blood leukocytes are also evaluated. It is recommended that absolute numbers of lymphocyte subsets rather than percentages be used in evaluating treatment-related changes.

2.4 Natural Killer Cell Activity Assays

Natural killer (NK) cell activity assays can be conducted if immunophenotyping studies demonstrate a decrease in number, or if STS studies demonstrate increased viral infection rates, or in response to other causes for concern. In general, all NK cell assays are *ex vivo* assay in which tissues (e.g. spleen) or blood are obtained from animals that have been treated with the test compound. Cell preparations are co-incubated with target cells that have been labeled with chromium. New methods that involve of non-radioactive labels can be used if adequately validated. Different effector to target cell ratios should be evaluated for each assay to obtain a sufficient level of cytotoxicity.

2.5 Host Resistance Studies

Host resistance studies involve challenging groups of mice or rats treated with the different doses of test compound with varying concentrations of a pathogen (bacteria, viral, parasitic) or tumor cells. Infectivity of the pathogens or tumor burden observed in vehicle versus test compound treated animals is used to determine if the test compound is able to alter host resistance. Models have been developed to evaluate a wide range of pathogens such as *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, influenza virus, cytomegalovirus, *Plasmodium yoelii* and *Trichinella spiralis*. Tumor host resistance models in mice have used the B16F10 melanoma and PYB6 sarcoma tumor cell lines. Since the host defense mechanisms in these models are relatively well understood, it is recommended to choose a host resistance assay suitable for a specific target affected in standard toxicity studies or other immune toxicity tests.

Host resistance assays have an important role in identifying or confirming the cell type affected by a test compound. Since the host defense mechanisms against some microbes or tumor cells are well defined, test compound-related changes in these host resistance models would demonstrate that those cells types are targets. In addition, host resistance assay involve innate immune mechanisms in which specific immune function assays have not been developed. In conducting host resistance studies, the investigator should carefully consider the direct or indirect (non-immune mediated) effects of the test compound on the growth and pathogenicity of the organism or tumor cell. For instance, compounds that inhibit the proliferation of certain tumor cells can seem to increase host resistance.

2.6 Macrophage / Neutrophil Function

In vitro macrophage and neutrophil function assays (phagocytosis, oxidative burst) have been published for several species. These assays assess macrophage/neutrophil function of cells exposed to the test compound *in vitro* or obtained from animals treated with the test compound (*ex vivo* assay). *In vitro* exposure to test compound can also be

investigated. An in vivo assay can also be used to assess the effects on the reticuloendothelial cell to phagocytize chromium-labeled sheep red blood cells. Animals should be treated with the test compound and injected with chromium-labeled sheep red blood cells. Animals should be necropsied and tissues (eg. liver, spleen, lung, kidney) removed and radioactivity is counted.

2.7 Assays to Measure Cell-Mediated Immunity

Assays to measure cell-mediated immunity have not been as well established as those used for the antibody response. Delayed-type hypersensitivity (DTH) reactions with KLH immunization and challenge have been reported for mice. Cytotoxic T cell response can be generated in mice, however, since these involve the administration of a tumor cells line or graft, these assays are not considered toxicological studies. Reports on monkey DTH reactions have also been reported. However, these reactions in monkeys are very difficult to consistently reproduce. In addition, one should make sure that the DTH response is not mistaken for an antibody and complement mediated arthus reaction. Models in which contact sensitizers are used have been explored in mice but have not been well validated or extensively used.

(資料2)

医薬品の免疫毒性試験に関するガイドライン (案)

(ICH S8 Draft Guideline)

Step 2文書

1. 序論

医薬品の免疫系に対する毒性の評価は、通常の医薬品開発に伴って行われるべきである。免疫系に対する毒性には多様な有害事象が含まれ、これらは免疫応答の抑制または亢進をもたらす。免疫応答の抑制は、病原体や腫瘍細胞に対する宿主抵抗性の低下を招く。一方、免疫応答の亢進は自己反応性の免疫細胞の増殖を促し、自己免疫疾患の原因となりうる。また、薬物または薬物-タンパク質付加体が外来異物として認識さ

れ、薬物に対する免疫応答が起こると、その後の薬物暴露に伴い過敏症（アレルギー）反応が惹起される。従来、医薬品の免疫毒性学的研究や試験法の開発とその評価においては、多くの場合、開発候補品の免疫抑制作用または接触（皮膚）感作性の評価に重点が置かれてきた。

1.1 ガイドラインの目的

本ガイドラインの目的は、(1) 免疫抑制作用を有する可能性のある化合物の検出を目的として行われる非臨床試験の望ましい進め方を示すこと、及び(2) 得られた知見の重要性 (weight-of-evidence) に基づいて、免疫毒性試験に関する方針を決定するための指針を示すことである。

1.2 背景

薬物の免疫機能に対する有害作用を評価する方法の中で、最も実用性が高いものは、免疫抑制作用の検出・評価に用いられる方法である。非意図的な免疫抑制としては、かつては、癌治療に用いられた細胞分裂阻害剤によるものがその主なものであった。この場合には、非臨床試験における毒性所見が比較的明瞭であり、ヒトでの免疫毒性の予知も容易である。すなわち、標的となる組織は、通常急速な増殖を行っている細胞、例えば骨髄由来の免疫系前駆細胞であるため、薬物のリスク評価という点からは、免疫毒性評価のために特別な試験を行う意義は、それほど高くないものと考えられる。このような場合、免疫機能に対する有害作用は、薬理学的活性に基づいて予知することができ、また、通常の動物試験により予測が可能である。

近年、他のタイプの薬剤にも、免疫抑制作用を有するものがあることが明らかになってきた。これらの薬剤は2つの異なるグループに分けることができる。1つは、治療を目的として意図的に使用される免疫調節剤（例えば、臓器移植拒絶反応を抑えるための薬剤）であり、副作用としての免疫抑制はその過度の薬理効果によるものと考えられる。もう1つは、免疫機能に影響を及ぼすことが目的でないものにも拘わらず、非意図的な免疫抑制を誘起しうる薬剤である。この中には、例えば、免疫系細胞の壊死やアポトーシスを引き起こ

す薬剤、その受容体が標的組織と非標的免疫系細胞の両者に共通して存在する薬剤などが含まれる。過度の免疫薬理効果と非意図的な免疫毒性との違いは比較的明瞭であるものの、ある種のクラスの薬物（例えば、抗炎症剤）のように、その区別が明瞭でない場合もある。

1.3 ガイドラインの適用範囲

本ガイドラインは、低分子薬物（生物学的製剤でないもの）により誘起される免疫抑制を検出するための非臨床試験の実施に当たって推奨される方法を述べたものである。本ガイドラインはヒトへの投与を意図した新規医薬品に適用される。また、既に市販されている製剤であって、現行の効能・効果と異なる疾患への適応拡大に伴い、新たな毒性学的な問題が生じる可能性がある場合にも適用される。さらに、臨床試験期間中や承認後に免疫抑制を疑わせる臨床的症状が認められた薬剤についても、本ガイドラインが適用される場合がありうる。なお、本ガイドラインにおける免疫毒性とは、主として免疫抑制、すなわち、感染や腫瘍に対する罹患性が増大した状態を指す。

個別の免疫毒性試験がどのように実施されるべきかについて細かく特定することは、本ガイドラインの目的ではなく、全般的な指針を別紙1に記載した。

1.4 概要

本ガイドライン全般に亘る一般原則は以下の通りである。

- 1) すべての新規治験薬について、その免疫抑制を誘起する可能性 (potential) を評価する。
- 2) 試験方法としては、標準的毒性試験 (standard toxicity studies : STS) と必要に応じて実施される追加免疫毒性試験 (以下、免疫毒性試験) がある。免疫毒性試験の実施が必要か否かの決定は、懸念される要因 (cause for concern) をその重要性に基づいて評価すること (weight-of-evidence review) により行う。

本ガイドラインの記述は、図1で示されたフローチャートに従っている。また、各試験方法の詳細は、別紙1に記述されている。

2. ガイドライン

2.1 免疫毒性の可能性の評価

免疫毒性の可能性をスクリーニングするための方法としては、まず標準的毒性試験があげられる。げっ歯類及び非げっ歯類を用いて実施される初期の短期反復投与毒性試験及びより長期の反復投与毒性試験において得られたデータを考慮する必要がある。評価すべきパラメータ及び病理組織学的所見の報告に関しては、詳しい補足説明を別紙1に記載した。

標準的毒性試験から得られた所見に加えて、免疫毒性試験の追加を考慮しなければならない要因は、以下の通りである：(1)薬物の薬理学的性質、(2)適用の対象となる患者集団、(3)薬物クラスの既知の作用 (class effect)、及び(4)薬物の分布 (disposition)。

図1のフローチャートは、免疫毒性の評価を行う上で推奨される手順を示す。

2.1.1 標準的毒性試験

標準的毒性試験から得られたデータについては、免疫毒性の可能性を示す所見 (徴候) の評価を行う必要がある。考慮すべき所見は以下の通りである。

- (1) 血液学的変化—骨髄抑制を示す所見。通常、末梢血液の変化により観察される (例えば、汎血球減少、白血球減少、リンパ球減少、またはその他の血液疾患)
- (2) 免疫系器官の重量及び組織像の変化 (胸腺、脾臓、リンパ節、骨髄などから)
- (3) 血清免疫グロブリン濃度の低下—血清グロブリンの半減期は長く、その免疫毒性の検出感度は低い。しかし、グロブリン量の変化が生じ、他に適切な理由がなければ、免疫毒性の可能性を示している。
- (4) 感染の発生率の増加
- (5) 発がん性を示す所見—特に、遺伝毒性が認められない場合

標準的毒性試験から得られた知見の中に免疫毒性の徴候が示された場合には、得られたデータをその重要性に基づいて評価し、免疫毒性試験を実施するか否かを決定する必要がある。他の器官への毒性のリスク評価と同様であるが、免疫毒性の評価に際して考慮すべき点は、以下の通りである。

- ・認められた変化の統計学的有意性及び生物学的意義
- ・変化の重篤性
- ・用量依存性
- ・想定される臨床用量に対する安全係数
- ・投与期間
- ・変化の認められた動物種の数及び所見 (endpoint) の数
- ・別の要因により二次的に発生したと思われる変化
(例：ストレス、別紙1参照)
- ・予想される標的細胞及び作用機序
- ・変化が認められた用量と他の毒性が認められた用量との関係
- ・認められた変化の回復性

2.1.2 重要性を評価すべきその他の懸念要因

その他の考慮すべき要因は以下の通りである：

- (1) 被験物質の薬理学的性質から、強い免疫抑制を示す可能性が考えられる場合には、免疫毒性試験の実施を考慮する必要がある。例えば、抗炎症剤は免疫系のある種の細胞の機能に影響を及ぼすことが知られている。しかし、獲得免疫または自然免疫の応答をどの程度抑制するかに関しては、明らかにされていない。候補化合物の免疫系への影響に関する情報は、化合物の探索段階あるいは開発の初期段階における薬理学的研究の中で得られることがある。これらのGLPが適用されなかった薬理学的研究の成績を、免疫毒性試験が必要か否かを決定する際に利用することができる場合がある。免疫毒性試験を実施するか否かは、得られた知見を重要性に基づき評価 (weight-of-evidence review) した上で決めるべきである。
- (2) 適用患者集団についても考慮する必要がある。例えば、適用患者集団の大部分が免疫不全の状態 (immunocompromised) にある場合には、免疫毒性試験が必要とされる場合がある。
- (3) 免疫抑制作用が知られている化合物と構造的に類似した化合物についても、免疫毒性試験の実施を考慮する必要がある。
- (4) 化合物またはその代謝物が免疫系細胞に高濃度で蓄積することが知られている場合にも、免疫毒性試験

の実施を考慮する必要がある。

標準的毒性試験において免疫毒性の可能性を示す所見が観察された場合、または上述の4つの要因のいずれかに該当する場合には、申請者が、免疫機能への当該薬物の作用を調べるための試験を行うか、またはこのような評価を行う必要がないことを示す正当な理由を提示することが推奨される。

2.2 免疫毒性試験の選択及びデザイン

2.2.1 試験法の選択

重要性に基づいた懸念要因の評価により免疫毒性試験の必要性が示された場合、使用しうる多くの動物モデルがある。標準的毒性試験で免疫抑制を示唆する変化がみられた場合、認められた免疫学的変化及び薬物クラスから想定される懸念に基づいて、適切な免疫毒性試験法を選択する。

免疫毒性試験としては、免疫機能試験の実施が望まれる。免疫毒性の標的が特定されていない場合には、T細胞依存性の抗体産生 (TDAR) のような機能試験を行うことが望まれる。標準的毒性試験においてある特定の免疫系細胞に影響がみられた時には、その細胞の機能を評価できる試験法を採用しうる (別紙1参照)。

白血球ポピュレーションのイムノフェノタイプング (抗体を用いた表現型の同定) による解析は、機能試験には該当しないものの、影響を受けた特定の細胞集団や有用な臨床的なバイオマーカーを同定するために実施されることがあろう。

2.2.2 試験デザイン

薬物により誘起される免疫抑制を評価する試験としては、ラットまたはマウスの28日間反復経口投与試験を用いることが一般的に受け入れられている。免疫機能試験で使用される動物種、投与用量、投与期間並びに投与経路に関しては、免疫毒性が認められた非臨床毒性試験に可能な限りあわせる必要がある。高用量は、無毒性量 (NOAEL) よりも高く、またストレスによる二次的変化が発現する用量よりも低く設定する必要がある。用量依存関係及び免疫毒性の無作用量を決定するためには、複数の投与用量を設定することが望まれる。げっ歯類を用いて開発された免疫機能試験法に関

しては、非げっ歯類への適用が報告されている。多くの場合、これらの試験法を適切に改変することにより、他の動物種へ適用することができる。

2.2.3 フォローアップ免疫毒性試験の必要性の評価

得られた全ての試験成績を基に、免疫毒性のリスクを合理的に決定する上で十分なデータが得られたか否かを評価することが必要とされる。リスク-ベネフィットを総合的に勘案した結果、免疫毒性のリスクが認容できると判断される場合には、フォローアップ試験が必要とされないことがある。

3. フォローアップ免疫毒性試験

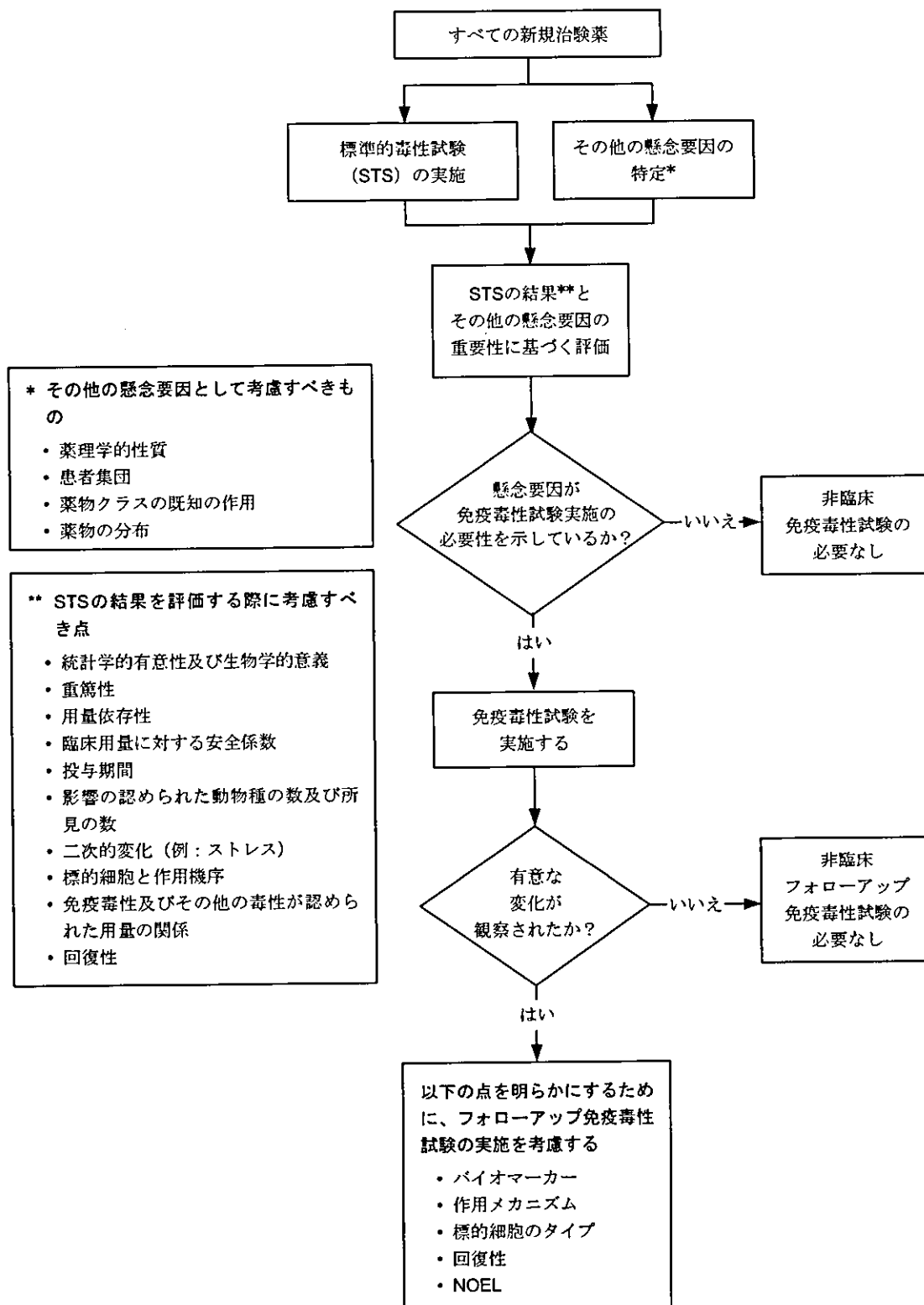
免疫毒性試験で変化が認められた場合には、影響を受けた細胞や作用機序の同定のために、フォローアップ試験の実施を考慮する必要がある。得られる情報は、可能性のあるリスクに対する理解を深めるとともに、臨床試験におけるバイオマーカーの選択に有用となる。このための試験には、ナチュラルキラー細胞、宿主抵抗性、マクロファージ機能などの検査がある。ま

た、標準的毒性試験及び追加して行われた非臨床免疫毒性試験から得られた所見は、適切な臨床モニタリングの必要性、実現性及び方法を検討する際に役立つであろう。開発候補品が免疫系に対する薬理学的作用を有する可能性がある場合には、影響を受けることが予想される免疫系の構成成分または関連する機能をモニターすることが可能であろう。しかし、本ガイドラインは、このような場合の指針を規定するものではない。

4. 免疫毒性試験の実施時期と臨床試験

重要性に基づく懸念要因の評価により、免疫毒性試験が必要とされた場合には、その薬物が多数の治験者に投薬されるまでに、免疫毒性試験が終了している必要がある。これにより、もし適切な免疫毒性評価項目があれば、臨床試験に含めることが可能となる。免疫毒性試験の実施時期の決定は、被験化合物の作用様式、免疫毒性試験の陽性所見から必要と考えられる臨床試験項目にもよるであろう。対象患者が免疫不全である場合には、その薬物の開発段階の早い時期に免疫毒性試験を開始する場合がある。

図1 免疫毒性評価のフローチャート



別紙 1

免疫毒性を評価するための検査法

1. 標準的毒性試験

標準的毒性試験において免疫毒性の徴候として評価すべきパラメータを下表に示す。これらのパラメータ（血液学的検査及び血液生化学的検査を除く）、試料の採取方法及び組織切片の評価方法については、専門の毒性病理の学会等から発行されている文書中により詳細な記載がある。

パラメータ	特定の項目
血液学的検査	総白血球数及び白血球型別絶対数
血液生化学的検査	グロブリン量及びA/G比
剖検	免疫系器官/組織
臓器重量	胸腺、脾臓（オブションとして、リンパ節）
病理組織学的検査	胸腺、脾臓、リンパ節（所属リンパ節及び1箇所以上の他のリンパ節）、骨髄、パイエル板

1.1 血液学的検査及び血液生化学的検査

総白血球数及び白血球型別絶対数が、免疫毒性評価項目として望ましい。グロブリン量の変化を評価するにあたっては、他の要因（腎毒性など）についても考慮しなければならない。血清グロブリンの変化は、血清中の免疫グロブリンレベルの変化を示す指標になりうる。血清免疫グロブリンの免疫抑制の指標としての感度は低い、免疫毒性の標的となる細胞集団の同定または作用機序の解明に、時として有用な場合もある。

1.2 剖検及び臓器重量

剖検時には、全ての免疫系組織について肉眼的変化を評価する必要がある。しかし、ラットのパイエル板はサイズが小さいため、観察が困難な場合がある。脾臓と胸腺については、重量を記録する必要がある。イヌ及びサルでは、脾臓重量のばらつきを抑えるため、剖検時に十分に放血することが望まれる。加齢に伴う胸腺の萎縮によって、胸腺重量の正確な測定ができない場合もありうる。

1.3 病理組織学的検査

脾臓及び胸腺の病理組織学的な変化は、全身性の免

疫抑制の指標として評価する必要がある。薬剤投与部位の所属リンパ組織または薬剤投与部位に接するリンパ組織（したがって、最も高濃度の薬剤に曝露されている）の検査を行う必要がある。これらの部位には、経口投与剤ではパイエル板や腸間膜リンパ節が、吸入投与剤では気管支関連リンパ組織（BALT）が、吸入あるいは経鼻投与剤では鼻咽頭関連リンパ組織（NALT）が、そして経皮、筋肉内、皮内、髄腔内あるいは皮下に投与される薬剤では最も近傍の所属リンパ節が、それぞれ該当する。リンパ節の選択は、そのリンパ節に関する経験に基づいて、申請者が判断すべきである。静脈内投与される薬剤では、脾臓を所属リンパ組織と考えることができる。

リンパ組織の所見の記録及び投薬関連変化の報告に当たっては、リンパ組織を領域（compartment）別に分け、“半定量的な”記述によりその変化を表すことが望まれる。

1.4 ストレス関連の変化の解釈

標準的毒性試験で、最大耐量あるいはそれに近い用量ではストレスによる免疫系の変化が生じうる。免疫系への影響は、おそらく、コルチコステロンあるいはコルチゾールの放出増加を介して生じるものと考えられる。ストレスに関連した免疫系の変化としては、末梢好中球の増加、末梢リンパ球の減少、胸腺重量の減少、胸腺皮質細胞数の減少とそれに関連した病理組織学的変化（“starry sky”の出現）、脾臓及びリンパ節の細胞数の変化がよく観察され、副腎重量の増加も認められる。臨床的観察で明らかな変化（例えば、体重増加の減少、活動性低下）が認められる場合には、リンパ系組織及び血液学的パラメータの一部あるいは全ての変化が、直接的な免疫毒性ではなく、むしろストレスに起因した可能性がある。ストレスが原因と考察する場合には、明瞭な根拠を提示する必要がある。

2. 免疫毒性試験

2.1 試験法の妥当性とバリデーション

一般に、選択する免疫毒性試験法は、広く使われているもので、既知の免疫抑制物質による変化を十分な感度で特異的に検出しうることを示されていないならば