

ならない。しかし、時として、十分なバリデーションが完了していない場合やその試験法が広く用いられていない場合もある。このような場合には、その試験法を使用する妥当性に関する科学的・機序的な根拠が必要とされ、また実施可能であれば、適切な陽性対照を試験系に含める必要がある。

あるタイプの免疫毒性試験が異なる研究施設で 사용되는場合、応答性が異なることがありうる。多くの場合、これらの相違は免疫毒性試験法としての評価能には影響を及ぼさないが、試験が適切に実施されていることや研究施設の技術的水準を保証するためには、標準とされる手技的なバリデーション項目を、いくつか検討することが必要とされる。これらのバリデーション項目には、併行精度、試験間精度、試験者間精度、定量限界、定量の直線性を与える範囲、試験物質の安定性が含まれる。さらに、既知の免疫抑制物質に対する試験法の検出感度を求めておく必要がある。ヒト以外の霊長類を用いる試験を除き、試験法に関する技術水準を保証するため、各研究施設が定期的に陽性対照物質を用いる試験を実施することが望まれる。

2.2 T細胞依存性抗体産生 (TDAR)

T細胞依存性抗体産生 (TDAR) の試験は、確実な抗体産生を引き起こすことが知られているT細胞依存性抗原 (例えば、ヒツジ赤血球 (SRBC) またはkeyhole limpet hemocyanin (KLH)) を用いて実施される必要がある。選択した抗体産生の評価指標 (endpoint) は、用いた試験法で最適なものを用いる必要がある。SRBC法では、IgMが最適な評価指標と考えられる。

正当な理由がない場合は、免疫の際、抗原とアジュバントを併用すべきではない。アラム (alum) の使用は、ヒト以外の霊長類においてのみ認められる場合がある。特にマウスにおいては、TDARの応答性に系統差がみられることがある。非近交系ラットでは、同一群の個体間で明らかなばらつきを認めることがある。近交系ラットは、十分な暴露データが得られていない限り、使用すべきではない。

抗体は、ELISAまたはその他の免疫学的アッセイ法で測定することができる。抗体産生細胞数の測定に比べてELISAが優れている点の一つとして、試験期間中

に連続してサンプルの採取ができることがある。サルでは、抗体産生の経時変化に大きな動物個体間差があるため、経時的な血液採取が重要となろう。この場合には、数回の採血によって得られた抗体量などの総計を、データとして用いることができる (例えば、曲線下面積)。

ELISAの結果は吸光度 (OD値) ではなく、濃度または抗体価として表示することが望ましい。

被覆抗原としてSRBCを用いるELISAでは、抗原の調製方法が重要である。SRBC抗原としては、固定した赤血球や細胞膜分画を使用することができる。

ラットTDARとイムノフェノタイピングにおいて、複数の免疫抑制物質に対する試験法の感度が十分であることが示されている場合には、被験物質を用いる試験毎に陽性対照を加えることは、必ずしも必要とされない。

2.3 イムノフェノタイピング

イムノフェノタイピング (immunophenotyping) とは、抗体を用いる白血球サブセットの同定や計数を指す。通常、イムノフェノタイピングはフローサイトメーターによる解析 (フローサイトメトリー法) または免疫組織化学的手法により行われる。フローサイトメトリー法を用いると、分析に用いた試料に含まれる多数の細胞の中から、特定の細胞群や活性化のマーカーを発現する細胞の割合と絶対数を測定することができる。

フローサイトメトリー法に比して免疫組織化学的手法が優れている点の一つは、免疫毒性の所見がみられた場合に、標準的毒性試験で採取された組織を使い、遡った (retrospective) 解析ができることである。加えて、リンパ系組織のある特定な領域 (compartment) 内での細胞のタイプの変化を観察することも可能である。ある動物種のリンパ球マーカーの中には、ホルマリン固定により抗原性を失うものがあり、特定の固定液を使用した場合や瞬間凍結した組織でのみ、組織中の局在の観察が可能である。さらに、白血球サブセットの計数及び染色強度の定量的評価は、免疫組織化学的手法においては非常に難しい。

イムノフェノタイピングを、ある特定の白血球ポピュレーションの変化の同定や特徴の検討に利用する場

合、検討の対象とする免疫系器官は、既に観察された変化に基づいて選択すべきである。免疫フェノタイプは、標準的毒性試験に容易に加えることができ、投与期間及び無投薬期間（回復期間）における変化を追跡することができる。フローサイトメトリー法をある特定の細胞集団の計数に用いる場合は、機能試験とはみなされない。しかし、フローサイトメトリー法は、リンパ球の抗原特異的な免疫応答の測定に用いることが可能である。臨床試験においても末梢白血球の計数などが行われるため、末梢の血球データは臨床試験と非臨床試験の橋渡しとして役立つことができる。薬物投与による変化を評価するためには、リンパ球サブセットの百分率よりも絶対数を用いることが望まれる。

2.4 ナチュラルキラー細胞活性検査

ナチュラルキラー（NK）細胞活性検査は、免疫フェノタイプにおいてNK細胞数の減少がみられる場合、標準的毒性試験でウイルス感染の発生率が増加した場合、あるいは他に懸念される要因がある場合に実施することが可能である。一般に、全てのNK細胞検査は*ex vivo*試験であり、被験物質の投与を受けた動物の組織（脾臓など）や血液を使用する。組織や血液から調製された細胞は、放射性クロミウムで標識された標的細胞と混合培養される。適切なバリデーションが行われていれば、非放射性標識による新しい方法を使用してもよい。十分なレベルの細胞障害性を得るためには、検査毎に、複数の標的細胞／エフェクター細胞の比率を用いて検査を行う必要がある。

2.5 宿主抵抗性試験

宿主抵抗性試験では、被験物質を複数の投与用量で投与されたマウスやラットに、種々の濃度の病原体（細菌、ウイルス、寄生虫）や腫瘍細胞を接種する。溶媒投与群と被験物質投与群との間で感染率や腫瘍増殖率を比べ、被験物質が宿主抵抗性の変化をもたらしたか否かを判定する。*Listeria monocytogenes*、*Streptococcus pneumoniae*、インフルエンザウイルス、サイトメガロウイルス、*Plasmodium yoelii*、*Trichinella spiralis*など、様々な病原体を用いて評価モデルが開発されている。マウスの腫瘍宿主抵抗性モデルでは、B16F10メラノー

マ株及びPYB6肉腫細胞株が使用されてきた。ここに示した宿主抵抗性モデルの防御機構は比較的よく理解されており、宿主抵抗性モデルとしては、標準的毒性試験や他の免疫毒性検査で影響が認められた標的細胞に応じたものを選択することが望まれる。

宿主抵抗性試験は、被験物質により影響を受けた細胞のタイプを明らかにする上で、重要である。ある種の細菌または腫瘍に対する宿主の防御機構はかなり明らかにされており、これらの宿主抵抗性モデルで投薬に起因する変化が認められれば、免疫毒性の標的がどの細胞であるかを示しうる場合がある。さらに、宿主抵抗性試験には自然免疫の防御機構が関与しているが、そのための免疫機能検査はまだ開発されていない。宿主抵抗性試験を実施する際に、試験担当者は、病原体または腫瘍細胞の増殖や病原性に対する被験物質の直接的または間接的（非免疫的な機構による）な作用を、注意深く考察する必要がある。例えば、ある腫瘍細胞の増殖を抑制する化合物は、見かけ上宿主抵抗性を増加させる。

2.6 マクロファージ／好中球機能

マクロファージ及び好中球の*in vitro*機能検査（食作用、活性酸素生成（oxidative burst））は、数種の動物種において報告されている。これらの試験では、被験物質により*in vitro*処理された細胞、または被験物質を投与された動物から得られた細胞（*ex vivo*）を用いて、マクロファージや好中球の機能検査を行う。被験物質の*in vitro*暴露も評価に利用することが可能である。*In vivo*の検査として、網内系細胞（reticuloendothelial cell）による放射性クロミウム標識ヒツジ赤血球の食食への影響を評価する方法もある。この場合、被験物質を投与された動物にクロミウム標識ヒツジ赤血球を注入する。解剖して組織（例えば、肝臓、脾臓、肺、腎臓）を取り出し、組織中の放射能を測定する。

2.7 細胞性免疫の機能検査

細胞性免疫活性の測定法は、抗体産生の検査法ほど十分に確立されていない。KLHによる免疫及び惹起を用いる遅延型過敏症反応（DTH）がマウスで報告されている。細胞障害性T細胞の応答をマウスで誘導する

ことができるが、腫瘍細胞株の投与や移植を伴うため、この検査法は（いわゆる）毒性試験とは考えられていない。サルのDTHも報告されているが、その反応をサルで常に再現させることは非常に難しい。さらに、DTH反応に関しては、抗体と補体によるアルツス

（Arthus）反応の見誤りではないことを確認する必要がある。接触感作性物質を利用したモデルがマウスにおいて検討されているが、バリデーションはまだ不十分であり、汎用されるに至っていない。

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

安全性薬理試験（ICH-S7B：ヒト医薬品の再分極過程に関連した
頻脈性心室不整脈評価に関する非臨床試験ガイドライン）の
国際的ハーモナイゼーションに関する研究

合同研究項目：1、2

- (1) インビボ電気生理学的測定法による心臓不整脈の評価法に関する研究
(2) インビトロ電気生理学的測定法による心臓不整脈の評価法に関する研究

分担研究者：

- 1班：藤森観之助（医薬品医療機器総合機構顧問、昭和大学薬学部客員教授）
2班：中澤 憲一（国立医薬品食品衛生研究所・薬理部長）

協力研究者：班員（50音順）

- 東 純一（大阪大学薬学部臨床薬効解析学教授）
遠藤 仁（杏林大学医学部薬理学教室名誉教授）
尾崎 幸紘（国立医薬品食品衛生研究所生薬部・室長）
佐神 文郎（エーザイ、製薬協）
橋本 宗弘（ファイザー、製薬協）
橋本敬太郎（山梨医科大学薬理学教室教授）
本坊 敏保（藤沢薬品工業株式会社 薬理研究所・主任研究員、製薬協）
柳田 知司（慈恵医大薬理客員教授）
山本 恵司（武田薬品工業、製薬協、QTPRODUCTプロジェクト責任者）
渡辺 和夫（千葉大学薬学部、名誉教授）

協力機関

- 厚生労働省薬務局審査課
医薬品医療機器総合機構（宇山佳明、安藤剛）

研究要旨：

本研究は致死的不整脈（Torsade de Points；TdP等）の前兆であるQT間隔延長リスクを予測的に評価するための医薬品等国際ハーモナイゼーション会議（ICH）非臨床QT評価試験ガイドライン（S7B）作成を目的としている。S7Bは3極間の違い（Regional Difference）の容認に基づき、平成16年6月のICHワシントン会議で臨床QT評価E14と共に改めてステップ2となり、現在国内のコメント収集が終了したところである。本年度の研究として、S7B専門作業班（EWG）はインビボQTアッセイおよびインビトロアッセイ（hERGおよび活動電位持続時間APD）に関するデータの精査による最終解析および評価を行い、推奨するインビボおよびインビトロアッセイ系の結果の組み合わせは、QTリスクを有する陽性物質に対して十分なQT延長の検出感度と信頼性を有していることを再度認識し、非臨床QT評価の臨床QT評価戦略における活用を主張したが、FDAは申請資料の精査により臨床QT

評価の陽性基準から陽性と判断した4品目中の2品目が非臨床QT評価試験で陰性であったことから、非臨床QT評価試験ではヒトQT/QTc延長を予測できないと判断し、非臨床QT評価結果を臨床QT評価試験のデザインに活用出来ないとの判断は変わらなかった。しかしながら、E14およびS7BにRegional Difference（地域差）の容認を導入し、ステップ2化を図るとのFDAから提議があり、E14/S7B EWG及びICH運営委員会（ICH-SC）はFDA独自のガイダンス化よりもICH活動下での整合の方が将来的にも得策であるとの判断から合意し、両ドキュメントはステップ2（S7Bは改訂ステップ2）となり、現在Publicコメント収集が終了した状況にある。今後、日米欧3極の行政上の実施に伴う問題の討議と将来の国際整合に則った改正等によるRegional Differenceの解決が必要と考える。平成17年の活動としては、5月のICHブリュッセルでE14と共に更なる整合を図る予定である。

キーワード：安全性薬理試験、ICHガイドライン、非臨床QTリスク評価、試験法、統合的リスク評価、Regional Difference

A. 研究目的

本研究の目的は医薬品の重篤な副作用として近年注目されている心臓の致死的不整脈であるTorsade de Pointes（TdP）誘発を予測的に評価するための非臨床試験法について国際的ハーモナイズした安全性薬理試験のガイドラインを開発するために検討研究を行うことである。本年度の目的は臨床E14に整合した形でS7Bの改訂ステップ2への到達を目指すことであった。現在まで、日米欧3極によるICH会議においてTdP等の前兆であるQT間隔延長リスクを予測的に評価するための試験ガイドライン作成を目指した非臨床（S7B）及び臨床（E14）QT評価法の検討が行われている。その背景には欧米でのTdP死亡による医薬品の販売中止及びリスク評価試験法の要求がある。現S7B案はインビボ心電図QT測定とインビトロIKrイオン電流等の非臨床試験の測定結果を軸にクラス情報等の情報を加えた統合的リスク評価によりQT延長リスクを予想することを目的としたものである。S7B EWGは、当初非臨床QT評価試験法ガイドラインとして、ステップ2-S7B案を平成14年2月に先行作成していたが、非臨床QT評価と臨床QT評価は緊密にリンクしており、臨床E14と共に同一歩調を取ることがICH-SC会議で決定された。この決定に従い、S7B-EWGは非臨床QT評価結果を臨床QT評価試験のデザインに活用することを期待して作業を継続し、かつ非臨床アッセイ系のQT測定感度、リスク予測性に関するデータ収集を進め、非臨床QT評

価結果を臨床QT評価試験のデザインに反映しうるかどうかの解析と討議を進めている。

B. 研究方法

本研究班は評価試験法がインビボおよびインビトロの多岐に涉っていることを考慮し、インビボ試験法およびインビトロ試験法に関する2つの研究班（藤森班および中澤班）を構成し、合同研究班会議において、問題点を詳細に討議、検討し、ICH作業会議での意見調整およびStep 4への達成のために、共同してICHの活動を推進した。

本年度の研究方法は、臨床QT評価戦略における非臨床QT評価戦略の活用を目指して、前年度に引き続いて、日本製薬協のQTPRODUCTプロジェクト（山本恵司代表、44製薬企業＋6委託試験機関が参加）により陽性および陰性対照薬物を用いて実施、検討されたアッセイ系のうち、特にイヌ、サルTelemetryおよび活動電位持続時間（APD）Triangular（APD30-90）アッセイに関するデータについて、より詳細な解析によりQTリスク予測性のバリデーションを行った。ICH-E14/S7B合同会議ではその結果を基に、非臨床QT評価の信頼性と活用を日本側として主張することであった。詳細な解析に関しては、例えばTelemetryアッセイ系では心機能パラメータと経時的パターン（作用時間曲線）のデータを比較検討した。APDアッセイの検討に関しては各イオン電流構成画分を詳細に比較検討した。用いた薬物

はQTリスクが認められないとした薬物として、Amoxicillin、Aspirin、Captopril、Ciprofloxacin、Diphenhydramine、Flecainide、Lidocaine、Nifedipine、dl-Propranolol、Verapamilの10薬物、リスクがあるとした薬物として、Astemizole、Bepridil、Cisapride、Disopyramide、E-4031、Haloperidol、MK-499、Pimozide、Quinidine、Terfenadine、Thioridazine、の11薬物を取り上げ、同時に陰性対照として溶媒、陽性対照としてdl-Sotalolについて少なくとも3用量に関し1Hzで刺激した摘出モルモット乳頭筋標本を用いて検討した。

なお本報告中に引用したデータは主にQTPRODUCTプロジェクトにより作成された速報から引用した。これらのデータは最終解析が終了次第、日本製薬協メンバーにより論文化される予定である。従って、本文中のデータ内容および考察は藤森が本研究報告者としての考えからまとめたものであり、正確あるいは適正でない場合があることをお断りする。

C. 研究結果

1. データ解析

(1) APDパラメータ (Triangularアッセイ) に関する最終検討

活動電位を構成するパラメータをおおまかに活動電位Durationから分画すると、APD30 (APD at 30% of 再分極) は主に内向きCaイオン電流 (ICa)、APD60はICaと外向きK電流IKの一部の和、APD90はICaと大部分のIKの和として表され、従ってAPD30-90が主に再分極に関与するIKrとIKsからなる遅延整流IK画分に相当することになる。IKrもしくはIKsがブロックされると、結果としてAPD30-90 (APD Triangulation) が延長することになる。ちなみにAction potential amplitude (APA) は主に内向きNa電流INaの活性化 (脱分極電位) であり、Maximal rate of rise of action potential (Vmax) はNaイオンに対する開口および流入速度に相当し、Resting membrane potential (RMP) は内向きK電流IK1に相当すると考えている。%は (ベースラインからの%変化) を表す。

1) QTリスク陰性10薬物Amoxicillin, Aspirin, Captopril, Ciprofloxacin, Diphenhydramine, Flecainide, Lidocaine, Nifedipine, dl-Propranolol, Verapamil : Triangulation

(APD30-90 : Ik電流) に関しては、Ciprofloxacinが100 μ Mで5.7%有意の延長、Flecainideが3 μ Mで7%有意、30 μ Mで15.1%有意の延長 (Ik電流の抑制 : 再分極時間延長)、dl-Propranololが30 μ Mで9.5%有意の延長、Nifedipineは30 μ Mで9.5%の短縮、Verapamilは1 μ Mで13.2%有意、10 μ Mで32.9%有意、100 μ Mで30.5%有意の延長を示したが、他薬物は有意の変化を示さなかった。Vmax (Naイオン流入速度) に関してはAspirinが10,000 μ Mで9.9%の抑制、Flecainideは3 μ Mで13.3%有意、10 μ Mで35.1%有意の抑制、dl-Propranololは30 μ Mで19.3%有意の抑制、Verapamilは100 μ Mで25.3%有意の抑制を示した。他薬物はいずれも10%以下であり、かつ有意ではなかった。APD30 (Caイオン電流) に関しては、Diphenhydramineは30 μ Mで14.4%の短縮 (ICa抑制)、Lidocaineは100 μ Mで20.5%の短縮、Nifedipineは3 μ Mで33.5%、30 μ Mで55.4%の短縮、dl-Propranololは30 μ Mで33.2%の短縮、Verapamilは10 μ Mで19.9%、100 μ Mで51.6%の短縮を示した。APA (活動電位) に関してはVerapamilの100 μ Mで11.6%の抑制を示した以外には他のいずれの薬物においてもほとんど変化を起こさなかった。

2) QTリスク陽性11薬物Astemizole, Bepridil, Cisapride, Disopyramide, E-4031, Haloperidol, MK-499, Pimozide, Quinidine, Terfenadine, Thioridazine : APD30-90 (Ik電流) に関しては、Astemizoleは1 μ Mで9.8%の有意、10 μ Mで16.3%の有意の増加 (再分極時間延長)、Bepridilは10 μ Mで18.5%有意、100 μ Mで28.6%の有意の延長、Cisaprideは0.1 μ Mで11.6%有意、1 μ Mで38.1%有意の延長、Disopyramideは3 μ Mで21.4%有意、30 μ Mで36.4%有意の延長、E-4031は0.01 μ Mで12.9%有意、0.1 μ Mで58.7%有意の延長、Haloperidolは1 μ Mで9.4%、10 μ Mで42.5%の有意の延長、MK-499は0.1 μ Mで20.2%有意、1 μ Mで49.2%有意の延長、Pimozideは1 μ Mで3.8%、10 μ Mで9.2%の有意の延長、Quinidineは10 μ Mで34.7%有意、100 μ Mで39.2%有意の延長、Thioridazineは1 μ Mで8.4%、10 μ Mで33.8%の有意の延長を示した。Terfenadineは20 μ Mでも2.3%の延長しか示さなかった。Vmax (Naイオン電流) に関しては、Bepridilの100 μ Mで18.6%

の抑制、Disopyramideの30 μ Mで13.5%の抑制、Haloperidolは10 μ Mで8.1%、Quinidineは10 μ Mで6.9%、100 μ Mで51.1%の抑制を示したが、他薬物は有意の変化は示さなかった。APD30 (Caイオン電流) に関しては、Bepridilは10 μ Mで5.0%の短縮 (ICa抑制)、100 μ Mで14.9%の短縮、Disopyramideは3 μ Mで10.1%の延長 (ICa増加)、30 μ Mで逆に6.2%の短縮、E-4031は0.01 μ Mで4.6%、0.1 μ Mで14.1%の延長、Haloperidolは1 μ Mで11.6%、10 μ Mで12.9%の延長、MK-499は0.1 μ Mで9.9%、1 μ Mで12.1%の延長、Quinidineは100 μ Mで16.2%の短縮を示した。APAに関してはQuinidineの10 μ Mで8.9%の減少が認められたのみであり、他のいずれの薬物においてもほとんど変化はなかった。

なお全21薬物と同時に検討した溶媒によるAPD30-90の%変動は-2.7から2.8%以内に収まっており、一方陽性対照の30 μ MのSotalolでは最少25.2%、最大値54.0%であり、アッセイ間にばらつきが認められており、最少値はPimozideの試験時においてであり、標本の反応が若干低い可能性もある。一方最大を示したケースはNifedipine試験時であった。ちなみにFlecainide試験時では32.2%、dl-Propranolol試験時では38.3%であった。

本QT評価の焦点であるIK_rを含むIK画分に相当するAPD30-90の測定結果を10%以上かつ有意な増加を再分極の遅延作用における陽性と判断すると、陰性10薬物のうち7薬物は明白な陰性を示したが、Flecainideが3 μ M以上で、Verapamilが10 μ M以上で10%以上の陽性と判断される延長 (Ik抑制) を示し、dl-Propranololが30 μ Mで9.5%の擬陽性を示した。Naイオン電流流入に関しては、Flecainide、dl-PropranololおよびVerapamilが明白な抑制を示した。Caイオン電流 (APD30) はDiphenhydramine、Lidocaine、Nifedipine、dl-Propranolol、Verapamilが明白な短縮 (ICa抑制) を示していた。

一方、陽性11薬物のうち、Astemizoleが10 μ M、Bepridilは10 μ M、Cisaprideは0.1 μ M、Disopyramideは3 μ M、E-4031は0.01 μ M、Haloperidolは10 μ M、MK-499は0.1 μ M、Quinidineは10 μ M、Thioridazineは10 μ MでAPD30-90の10%以上の延長 (Ik抑制陽性)

を示した。Pimozide、Terfenadineを除く9薬物は明白な陽性を示した。Pimozideは10 μ Mで9.2%と擬陽性を示し、Terfenadineは20 μ Mでも陰性であった。Naイオン電流に関しては、Bepridilの100 μ M、Disopyramideの30 μ M、Quinidine 100 μ Mで明白なINaの抑制を示した。Ca電流に対してはBepridilは100 μ M、E-4031は0.1 μ M、Haloperidolは1 μ M、MK-499は1 μ Mで10%以上の延長、一方、Quinidineは100 μ Mで10%を越す短縮 (ICa抑制) を示した。PimozideもTerfenadineもNa電流およびCa電流に対しては影響を示していない。

QTPRODUCT (JPMAプロジェクト) およびLSI/HESIのデータを解析した最終的な結論としてhERGアッセイと同様に、APDアッセイには偽陽性及び擬陽性として3/10 (Flecainide、propranololとVerapamil：共に強いINa抑制がある。)、およびfalse negativeが2/11 (PimozideとTerfenadine：INaおよびICaに特に影響なし) あったが、これまでの研究結果からhERGアッセイはfalse negativeが10/11 (dl-Sotalol) と若干低い、false positiveは5/10 (Ciprofloxacin、Diphenhydramine、Flecainide、Propranolol、Verapamil) であり、APD Triangularアッセイより高い。従ってhERG擬陽性の場合にFollow upアッセイとして有効と考えられる。さらにAPDアッセイは関連するイオン電流に関する情報を同時に得ることが出来、結果の解釈に有用であるとのS7B-EWGの結論に達した。

(2) In Vivo QTアッセイ

1) Telemetryイヌと麻酔イヌでの反応について

覚醒動物と麻酔動物における心電図測定は明らかに麻酔動物のほうが安定した心電図が得られる。一方、投与薬物の血中濃度はほとんどの薬物において明らかに覚醒動物の方が麻酔動物よりも被験物質の消失速度は速いことが知られている。本プロジェクトにおけるプロトコールではTelemetry覚醒イヌには経口投与、麻酔イヌには静脈投与 (10分間) とし、経口投与におけるTotal被験物質の血中濃度C_{max}を静脈投与終了直後のTotal被験物質の血中濃度 (C_{max}) に近似する用量を含めるように、各3用量を設定し、QTcFへの作用を比較しうるように計画してある。単純には比較できない

が同程度のCmax濃度を示すPO/IV用量比は、陽性薬物に関して、Astemizoleで100、Bepridilで30、Cisaprideで3、E4031で130、MK-499で5、Quinidineで4000-8000、Terfenadineで200、Thioridazineで10-15であり、薬物により大きく異なった。

陰性10薬物 Amoxicillin、Aspirin、Captopril、Ciprofloxacin、Diphenhydramine、Flecainide、Lidocaine、Nifedipine、dl-Propranolol、Verapamil：Telemetry覚醒イヌでの結果はNifedipineの3mg/kgでQTcFが同時に検討した溶媒群に比し、10.8%増加（遅延）を示した。他の9薬物は全て10%以下の変動であり、陰性を示した。しかしながら心電図・心拍数および血圧の経時的変化を検討すると増加を示した投与2時間直前に急激な心拍数の増加および血圧の低下が認められており、QT間隔そのものは一過性の短縮を示している。麻酔イヌで検討するとNifedipineは100mg/kgでは安定した心拍数増加および安定したQT間隔の低下を示し、QTcFは安定かつ持続的に低下を示し、QTリスクとしては陰性であることを示していた。陽性11薬物Astemizole、Bepridil、Cisapride、Disopyramide、E-4031、Haloperidol、MK-499、Pimozide、Quinidine、Terfenadine、Thioridazine、に関して、Telemetry覚醒イヌでの結果は、Astemizoleの3mg/kg（Cmax=10ng/ml）で9.1%、10mg/kg（Cmax=70ng/ml）で11.8%、30mg/kg（Cmax=180ng/ml）で15.2%、Bepridilの30mg/kg（Cmax=996ng/ml）で9.0%、100mg/kg（Cmax=1520ng/ml）で12.6%、Cisaprideの0.6mg/kg（Cmax=143）で11.4%、2mg/kg（Cmax=625）で10.3%、6mg/kg（Cmax=2348）で17.6%、E-4031の0.3mg/kg（Cmax=7.9ng/ml）で9.1%、1mg/kg（Cmax=37.1ng/ml）で19.9%、3mg/kg（Cmax=146.5）で20.8%、Haloperidolの1mg/kgで18.5%、3mg/kgで10.6%、MK-499の0.1mg/kg（Cmax=5.64）で20%、0.3mg/kg（Cmax=19.7ng/ml）で21%、Pimozide、の1mg/kgで13.8%、10mg/kgで19.5%、Quinidineの10mg/kg（Cmax=3.2ng/ml）で12.0%、50mg/kg（Cmax=6.4）で13.8%、Terfenadineの10mg/kg（Cmax=22.1）で8.4%、30ng/kg（Cmax=71.2）で13.3%、100mg/kg（Cmax=180.9）で10.6%、Thioridazineの5mg/kg（Cmax=162.8）で11.8%、10mg/kg（Cmax=401.6）で15.8%、20mg/kg（Cmax=614.2）で18.4%のQTcFの延長を示した。一方、麻酔イヌの結果

は、Astemizoleの0.1mg/kg（Cmax=42.5ng/ml）で8.6%、0.3mg/kg（Cmax=147ng/ml）で40.6%、Bepridilの1mg/kg（Cmax=1128.7ng/ml）で14.5%、3mg/kg（Cmax=2303ng/ml）で22.5%、Cisaprideの0.1mg/kg（Cmax=105.8）で6.7%、1mg/kg（Cmax=1192.8）で27.7%、E-4031の0.005mg/kg（Cmax=4.6ng/ml）で24.6%、1mg/kg（Cmax=37.1ng/ml）で19.9%、Haloperidolの0.3mg/kgで18.8%、1mg/kgで41.2%、MK-499の0.003mg/kg（Cmax=3.4）で10.4%、0.01mg/kg（Cmax=10.8ng/ml）で32.7%、0.03mg/kg（Cmax=38.2ng/ml）で40.1%、Pimozide、の0.06mg/kgで6.9%、0.3mg/kgで40.1%、Quinidineの1mg/kg（Cmax=1350ng/ml）で8.7%、3mg/kg（Cmax=3500）で19.1%、Terfenadineの1mg/kg（Cmax=455.5）で11.1%、3ng/kg（Cmax=1176.9）で14.2%、Thioridazineの1mg/kg（Cmax=521.3）で10.2%、3mg/kg（Cmax=1246）で16.5%のQTcFの延長を示した。QTcの延長（有意かつ10%以上）を引き起こした血中濃度が覚醒イヌと麻酔イヌで近い薬物はAstemizole、Bepridil、Cisapride、MK-499であり、E-4031は麻酔イヌでより低濃度で延長が認められ、Quinidine、Terfenadine、Thioridazineは覚醒イヌでより低濃度で延長が認められた。麻酔イヌでは未変化体濃度の高暴露、覚醒イヌでは代謝物濃度の高暴露が可能性としては考えられる。

Telemetry覚醒イヌにおける溶媒群の投与前より変動した最大QTcFは陰性薬物群で0、0、1、0、1、2、1、1、Propranolol（-1-3）、0と安定しており、陽性薬物群でAstemizole（-2-4）、Bepridil（-3-6）、0、3、Haloperidol（-6-8）、MK-499（5）、Pimozide（-3-4）、Quinidine 4、1、（-4-1）と比較的大きく変動した。恐らく薬物投与群の薬理作用の行動への影響による環境変化ではないかと思われる。いずれにせよ、溶媒群では8msec以上のQTcF変化を示すことはなかった。各Negative drugの最少用量での溶媒群との間の最大%QTc変化はAmoxicillin（1.5%）、Captopril（2.4%）、Ciprofloxacin（5.4%）、Diphenhydramine（3.5%）、Nifedipine（5.1%）、dl-Propranolol（2.8%）、Verapamil（3.4%）であった。一方、麻酔イヌでは陰性薬物群で0、0、1、1、（-1-0）、1、2、0と安定しており、陽性薬物群でも0、0、0、（-1-0）、（-2-1）、0、（-2-1）、0、0、0と極めて安定している。

結論として、麻酔イヌにおける反応は未変化体を検討する限り、Telemetry覚醒イヌよりも安定した結果とより高い感度（反応）が得られる。検討した11の陽性薬物に関して麻酔イヌ静脈内投与により100%の陽性を示した。Telemetry覚醒イヌ経口投与においてはHaloperidolを除く10薬物で陽性を示した。Haloperidolは溶媒群との差を引くと10%以上の陽性となる。

2) 血中濃度のTmaxとQT間隔延長の経時変化

Telemetry覚醒イヌ経口投与における陽性薬物Astemizoleの血漿濃度のTmaxは2-3hr前後であり、主活性代謝物DesastemizoleのTmaxは8hr前後、%QTcF変化の最大は1-3hr前後であった。心拍数は2hr後わずかに上昇、8-12hr前後で大きな増加を示し、血圧は2-12hrの間不安定であった。BepriidilのTmaxは1-4hr前後であり、%QTcF変化の最大は1hr前後と8hr前後の2相性を示した。CisaprideのTmaxは1-4hr前後であり、%QTcF変化の最大は2hr前後であった。一方、心拍数は2hr前後と8hr前後、血圧は2hr前後で低下、8hr前後で上昇を示した。E-4031のTmaxは0.5-1hr前後であり、%QTcF変化の最大は0.5-2hr前後であった。MK-499のTmaxは2-6hr前後であり、%QTcF変化の最大は2hr前後と8hr前後の2相性を示した。一方、心拍数、血圧は2-8hrの間に低下を示した。QuinidineのTmaxは1-4hr前後であり、%QTcF変化の最大は2hr前後と8hr前後の2相性を示した。一方、心拍数は4hr前後で最大の増加を示した。TerfenadineのTmaxは4hr前後であり、持続あるいは増加傾向を示す。一方%QTcF変化のピークは2hr前後とより大きい7-8hr前後の2相性を示した。一方心拍数が2hr前後が最もした、ThioridazineのTmaxは1-4hr前後であり、%QTcF変化の最大は1-8hr前後であった。結果はTerfenadineを除くAstemizole、Bepriidil、Cisapride、E-4031、MK-499、Quinidine、Thioridazineでは未変化のTmax前後にQTcの延長が生じ、Terfenadineでは未変化体の吸収に従い、あるいは標的臓器への分配速度に従い、QTcの延長が生じることが考えられる。

結果から、原則的には未変化体のtmax前後のQTcおよび代謝物を考慮した時点でのQTcを検討すること必要と思われる。

3) CmaxとhERGおよびAPD抑制発現濃度について (Totalおよびunbound濃度との関係

Astemizole : MW=459、Bepriidil : MW=403、Cisapride : MW=484、E-4031 : MW=510、MK-499 : MW=504、Quinidine : MW=379、Terfenadine : MW=472、Thioridazine : MW=407の8薬物に関して検討した。Telemetry覚醒イヌ経口投与における陽性薬物に関し、それぞれQTcF変化で陽性を示した用量におけるCmaxのtotalおよびunbound血漿濃度とhERGで陽性を示した濃度およびAPD30-90で陽性を示した濃度を比較すると、Astemizole : QTcFでは3mg/kg (Cmax=10ng/ml : 22nM) で9.1%、10mg/kg (Cmax=70ng/ml : total 153nM、unbound 5nM) で11.8%、30mg/kg (Cmax=180ng/ml : total 392nM、unbound 12.9nM) で15.2%、hERGでは0.9 - 26nM、APD30-90では2.5 μ Mで陽性を示した。Bepriidil : QTcFでは30mg/kg (Cmax=996ng/ml : 2.47 μ M) で9.0%、100mg/kg (Cmax=1520ng/ml : total 3.77 μ M、unbound 37.7nM) で12.6%、hERGでは0.6 - 1.3 μ Mであり、APD30-90では3.8 μ M以上で陽性を示した。Cisapride : QTcFでは0.6mg/kg (Cmax=143 : total 295nM、unbound 15nM) で11.4%、2mg/kg (Cmax=625 : 1.29 μ M) で10.3%、6mg/kg (Cmax=2348 : total 4.85 μ M、unbound 242nM) で17.6%、hERGでは2 - 45nMで、APD30-90では90nMで陽性を示した。E-4031 : QTcFでは0.3mg/kg (Cmax=7.9ng/ml : total 15.5nM、unbound 4.7nM) で9.1%、1mg/kg (Cmax=37.1ng/ml : total 72.7nM、unbound 22.5nM) で19.9%、3mg/kg (Cmax=146.5 : 287.3nM) で20.8%、hERGでは5 - 20nM、APD30-90では7nMで陽性を示した。Haloperidol : QTcFでは1mg/kg (?) で18.5%、3mg/kg (?) で10.6%、hERGでは27nMで、APD30-90では130nMで陽性を示した。MK-499 : QTcFでは0.1mg/kg (Cmax=5.64 : total nM、unbound nM) で20%、0.3mg/kg (Cmax=19.7ng/ml : nM) で21%、hERGで10 nM、APD30-90では22nMであり陽性を示した。Quinidine : QTcFでは10mg/kg (Cmax=3.2ng/ml : total 8.4nM、unbound 1.1nM) で12.0%、50mg/kg (Cmax=6.4 : 16.9nM) で13.8%、hERGでは15 - 55 nMで陽性を示し、APD30-90では16.3 μ Mでも9.2%の延長であった。Terfenadine : QTcFでは10mg/kg (Cmax=22.1 : 46.8nM) で8.4%、30ng/kg (Cmax=71.2 : total 150.8nM、unbound 4.4nM) で13.3%、100mg/kg (Cmax=180.9 : total 383nM、unbound 11.4nM) で10.6%、hERGでは20 - 200 nMで陽性、APD30-90では

20 μ M以上でも陰性であった。Thioridazine : QTcFではの5mg/kg (Cmax=162.8 : total 400nM, unbound 3, 9nM) で11.8%、10mg/kg (Cmax=401.6 : 987nM) で15.8%、20mg/kg (Cmax=614.2 : 1.51 μ M) で18.4%、hERGでは39 - 1250 nMで、APD30-90では0.84 μ Mで陽性を示した。

In vivo unbound血漿濃度とIn vitro濃度に相関性が高い可能性のある薬物は、hERGの場合、Astemizole、Cisapride、E-4031、Thioridazineの4陽性薬物(4/8)であり、APD30-90の場合にはE-4031だけ(1/8)であった。一方、total血漿濃度とIn vitro濃度に相関性が可能性として考えられる薬物は、hERGの場合、Astemizole、Bepidil、Terfenadine、Thioridazineの4薬物(4/8)であり、APD30-90の場合にはBepidil、Thioridazineの2薬物(2/8)である。従って、In vitroアッセイの場合血中濃度を考慮した安全域でリスクを考えることにはあまり意味はないものと考えられる。

2. S7BガイドラインとICH会議の進行

S7Bは平成14年2月にブリュッセルでステップ2に到達し、それ以降、S7B EWGのラポーターはMHLWサイド(藤森)が務めている。このS7B案は各極でコメント対応を終了し、平成14年9月EWGワシントン会議でコメントに基づく修正を行ったが、平成15年2月EWG東京会議において臨床QT評価メンバーとの合同EWG会議により臨床と連結した形でQTリスクの評価を進めることでICH-SCで合意され、臨床評価試験法のステップ2化を待ち、S7Bも改定ステップ2としてICHプロセス上、整合することとなった。S7B EWGは非臨床QT評価結果を臨床QT評価試験のデザインに活用することを期待し、国内では製薬協を中心にプロジェクト(QTPRODUCT)による基礎データ作成、国外ではILSI/HESIなどによる背景データの収集などを積極的に進めていた。その結果は平成15年7月ブリュッセル、同11月大阪EWG会議で解析、討議し、非臨床評価試験としては十分であるとS7Bメンバーは判断したが、臨床FDAメンバーより、臨床におけるQT延長(QTリスク)を予測する程の信頼性は得られていないとされた。本年度はさらにデータ、特にQTPRODUCTのデータを精査し、4月にE14との合同Teleconferenceで報告、討議した。6月のワシントン会議ではその結果を元に、S7B-EWGの全体論として、個々のアッセイ法では

100%のQT延長リスク検出は出来ないが、In vivoとIn vitroアッセイを組み合わせることにより、検討した代表的な11陽性薬物に関して100%陽性として検出できる(逆に言えば、両アッセイにおいて全て陰性の場合には100%陰性と判断できる)ことを主張した。しかしながら、FDAは申請資料の精査により、現時点で7品目中4品目が臨床試験で5msec以上の陽性判断で陽性を示し、そのうち2品目が非臨床アッセイ(In vivo QTおよびhERGアッセイ)で非臨床評価判断で陰性であり、非臨床QT評価結果を臨床QT評価試験のデザインに活用することは出来ないとの判断を変えなかった。この時点でS7B EWGはE14がステップ2になるまで討議を凍結することを論議した。その直後、FDAは臨床QT評価試験の試験デザインにおいて、非臨床QT評価結果を活用しうる地域を認めるとの判断を示し、その上でE14のステップ2化を図った。S7B EWGではE14だけがステップ2に進むことは望ましくないとし、現実の実行面ではこれ以外に打開の道はないと判断した。その結果、両E14/S7B EWGメンバーの合意の後、ステップ2 S7Bそのものは一度3極で合意されていることから改めてS7Bを改訂ステップ2 S7Bとして、E14との文意の整合のための修正後、ICH-SCの最終判断の下で正式に合意に達した。しかしながらS7B-EWGは非臨床安全性評価試験としてはS7Bは十分と考えていること、および認識の差の原因として、臨床における陽性判断の基準および測定条件による評価が非臨床評価と異なると考えており、かつ決定的な判断データはないのが現状であることをSCで説明した。なお改訂ステップ2-S7Bにおける非臨床QT評価はIn vivoとIn vitroアッセイの組み合わせであり、コア試験はIn vivo ECG測定によるQTアッセイとIn vitro IKr (hERG) から構成されている。APD (APD30-90) は同等のQTリスク予測力があり、informativeであると認識されたが、follow up試験として利用することになった。このAPDアッセイに対する拒否反応は恐らく3極間(特にUS)でのAPD試験におけるこれまでの経験の差によるものと思われる。

表15は本年度のS7B-EWGメンバーである。なお本年度のICHワシントン会議およびS7B/E14合同電話あるいはWeb会議にもDr. Templeが必ず同席し、発言している。S7B EWGのFDAエキスパートはその後公式の席で

はほとんど意見を述べなくなった。表16はこれまでのS7B活動状況と平成16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出席メンバー

| | |
|----------|--|
| MHLW | K. Fujimori (PMDA), K. Nakazawa (NIHS), T. Ando (PMDA) |
| EU | K. Olejniczak (CPMP) |
| US-FDA | J. Koener (CDER), D. Morse (CDER) |
| JPMA | M. Hashimoto, H. Honbo, K. Yamamoto |
| EFPIA | G Bode, A.T. Sullivan |
| US-PhRMA | J. Green, P. Siegle |
| 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

| | |
|----------------|-----------------------------|
| (これまでのS7B活動経過) | |
| 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-Tokyo会議 |
| 平成15年7月 | Step 3 : Brussels会議 |
| 平成15年11月 | Step 3 : Osaka会議 |
| (平成16年度の活動状況) | |
| 平成16年4月 | S7B/E14合同電話 |
| 平成16年5月 | 第一回研究班会議 |
| 平成16年6月 | 改訂Step 2 : ICH-Washington会議 |
| 平成16年11月 | S7B/E14合同Web会議 |
| 平成17年1月 | 第二回研究班会議 |

D. 考察

1. データ解析

(1) APDパラメータに関する最終検討

APDアッセイにより活動電位を構成するパラメータ内向きCaイオン電流 (ICa)、IKrとIKsからなる遅延整流IK画分、内向きNa電流INaおよび内向きK電流IK1を検討することが可能であり、詳細な解析により、関連するイオン電流に関する情報を同時に得ることが出来る。10陰性薬物および11陽性薬物の結果を総括すると、APDアッセイは、同時に各イオン電流に関する情報が得られることが他のin vitroアッセイに比べ利点である。なお溶媒によるAPD30-90の%変動は-2.7から2.8%以内で安定しており、陽性対照薬のSotalolでは最少25.2、

最大値54.0%と大きなばらつきが認められ、組織内への浸透あるいは標的部位への到達に標本間で差があることが可能性として考えられる。これまでのhERGアッセイの解析結果と比較すると、hERGアッセイはfalse negativeは低い、false positiveはAPD Triangularアッセイ (APD30-90) より高い。一方、APD TriangularアッセイはFalse positiveおよびfalse negativeが20%程度あるが、hERGあるいはin vivoアッセイ擬陽性の場合にFollow upアッセイとして有効と考えられる。

In vivo ECGの測定によるIn vivo QTアッセイの検討の結果、麻酔イヌにおける陽性薬物に対するQTcF延長反応はTelemetry覚醒イヌよりも安定した結果とより高い感度が得られると考えられる。麻酔イヌでは静脈注射、覚醒イヌでは経口投与との差はあるが、検討した11の陽性薬物に関して麻酔イヌ静脈内投与により100%の陽性を示し、Telemetry覚醒イヌ経口投与においてはHaloperidolを除く10薬物で陽性を示した。Haloperidolは溶媒群との差を引くと10%以上の陽性となる。覚醒イヌでは行動に対する薬理作用が周囲に影響する可能性がある。麻酔状態では覚醒状態に比べ、薬物の消失が遅く、代謝も低下することが考えられるが、変化体を検討する場合には、麻酔イヌの方が適しているといえる。

In vivo unbound (free) 血漿濃度とIn vitro濃度間あるいはtotal血漿濃度とIn vitro濃度間の相関性は共通していない。In vivo unbound血漿濃度とIn vitro濃度に相関性が可能性として考えられる薬物は、hERGの場合7品目中4薬物であり、APD30-90の場合には1品目だけであった。一方、total血漿濃度とIn vitro濃度に相関性が可能性として考えられる薬物は、hERGの場合7品目中4薬物であり、APD30-90の場合には2薬物である。Cisaprideの場合にはIn vitroの方がin vivoより感度が高く、Quinidineに関してはIn vivo QTcFアッセイの方がIn vitroアッセイよりはるかに感度が高かった。hERGアッセイはQuinidineを除き、In vivoアッセイで認められたCmaxとほぼ同じオーダーの濃度で陽性を示したが、APD30-90アッセイはIn vivoアッセイよりかなり高濃度まで検討する必要がある。In vitroでの結果をIn vivo血漿濃度に比してSafety Marginを取るのには問題がある。言い換えれば、in vitroアッセイに関してはtotalあ

るいは非結合であろうが、血中濃度を用いての概括的な安全域の範囲の設定はあまり意味はないと考えられる。単純に設定すると、hERGに関しては少なくともTotal血漿濃度の10倍、APDに関しては少なくとも100倍のsafety marginが必要と思われる。

結論として、QTcの検討は血中被験物質あるいはその代謝物濃度の時間的推移(動態、特にそれぞれのtmax時点の計測)を考慮して、解析する必要があると思われる。また覚醒イヌでは薬物処理イヌの薬理作用による影響と共に、処理イヌにおける行動が同室溶媒群のベースラインにも影響している可能性が示唆されており、より正確にQTc延長を予測するためには溶媒群を同時に行い、対応する時点での差を取ることが必要と思われる。

2. S7Bガイドラインの進展

1. 臨床QT評価の進め方に非臨床QT評価は活用できるとS7B EWGメンバーは考えているが、現時点では臨床QT評価の進め方に非臨床QT評価は活用できないというFDAの認識は変わっていない。E14において、急遽FDAの提案でRegional Difference (地域差)の容認によるステップ2到達という案が浮上し、S7Bも拒否するよりもUSの現状を考慮し、合意するほうが現時点では得策と考え合意し、E14に整合する形で改正ステップ2を作成した。地域差の内容は「非臨床データがQT/QTc延長のリスクを除外出来ると見なさない地域ではほとんど全ての場合にThorough QT/QTc試験の実施が必要となる。一方、非非臨床データがヒトにおいてQT/QTc延長のリスクに関して十分な情報提供しうると見なす地域に対してはQT/QTcの臨床評価に対する本ガイダンス中の勧告は修正しうることがある」。Regional differenceの案はICHの理念とはかけ離れているが、USの一人歩きよりもbetterとの判断である。

E. 結論

本年度の成果はRegional differenceの容認により臨床E14に整合した形でS7Bの改訂ステップ2に到達したことである。前年度、平成15年11月の大阪会議の合同E14/S7BEWG会議において、臨床QT評価戦略における非臨床QT評価戦略の役割に関する合意が得られず、臨床E14はステップ2に達することが出来なかった。

S7B-EWGでは非臨床QT評価と臨床QT評価は緊密にリンクしており、臨床E14と共に同一歩調を取らざるをえないと考え、S7Bはステップ4にすることはなかった。本年度には、非臨床QTアッセイデータの精査による最終解析評価の結果、S7B-EWGとして非臨床アッセイはQT延長の検出感度と信頼性を十分有していると再確認し、非臨床QT評価結果の臨床QT評価戦略における活用を再度主張した。一方、FDAは7品目の審査資料の調査により臨床QT評価基準に則り、陽性と判断した4品目中の2品目が非臨床QT評価(hERGおよびIn vivo QTアッセイ)試験で陰性であったことから、非臨床QT評価試験ではヒトQT/QTc延長を予測できないと再び判断した。ここに整合した形でのステップ2到達の可能性が一旦なくなったが、US国内規制の緊急性の問題かも知れないが、FDAによりE14およびS7BにRegional Difference (地域差)の容認の導入の提案があり、ICH整合の継続の理由もあり、両EWGおよびSCの合意の下に、両E14/S7Bドキュメントはステップ2となり、現在コメント対応下にある。今後、各日米欧内あるいは間の規制上の実施に伴う問題の討議と解決が大きな問題になる可能性がある。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. 藤森観之助：安全性に関わるトピックの動向。医薬品研究35, 603-616, 2004
2. 中澤憲一、重信弘毅：特集医薬品開発－非臨床から臨床へ；QT延長（心毒性）ファルマシア、40, 409-418, 2004

2. 学会発表

1. 藤森観之助：QT延長に関するICHの動向。シンポジウム世界心電図学会（平成16年6.30）
2. 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16年7.8）
3. 藤森観之助：安全性薬理試験ガイドライン、制定の経緯、実施に関する解説。GLP研修会（平成16年9.13, 17）
4. 藤森観之助：創薬におけるQT延長の意味と危険性について「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17年3.22）

H. 参考資料

1. EU-CPMP Point to consider: The assessment of the potential for QT interval prolongation by non-cardiovascular medicinal products. CPMP/986/96 (1997)
2. 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
3. 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
4. 改定ICHステップ2-S7Bガイドライン : The Nonclinical Evaluation of the Potential for Delayed Ventricular Repolarization (QT Interval Prolongation) by Human Pharmaceuticals. June, 2004
5. ICHステップ2-E14ガイダンス: Clinical Evaluation of QT/QTc Interval Prolongation and Proarrhythmic Potential for Non-Antiarrhythmic Drugs. June, 2004

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年度分担総括研究報告書

非臨床有効性評価一般

分担研究者：豊島 聰（独立行政法人医薬品医療機器総合機構 理事・審査センター長）
奥田 晴宏（国立医薬品食品衛生研究所有機化学 部長）
研究協力者：嶋沢るみ子（独立行政法人医薬品医療機器総合機構 主任審査専門員）

研究要旨

本研究では、国際的動向を踏まえた医薬品の新たな有効性及び安全性評価等を検討するため、製剤開発における品質・有効性と安全性評価に関する非臨床研究とキラル医薬品の品質、有効性と安全性評価に関する非臨床研究を遂行した。

・製剤開発における品質・有効性と安全性評価に関する非臨床研究：高品質の医薬品を継続的に製造するために、新薬の開発過程において、製剤開発研究が実施されるが、ICHにおいて製剤開発研究のありかたが検討され（ICH Q8）、2004年横浜EWG会合でステップ2に達した。本ガイドラインでは、製剤開発研究の一般原則についても検討する。製剤開発研究によって、品質保持が保証されるプロセスパラメータのセットとそのパラメータ巾（設計領域）が明らかになった場合には、柔軟な審査・査察が可能となる。一方、国内においては、2005年4月より改正薬事法が完全施行になり、製造方法・工程管理が承認要件に組み込まれ、さらに品質に影響を与える可能性の小さい製造方法の変更は届出でよいとする制度に変更されることにより、Q8ガイドラインを活用することが可能になるとともに、軽微変更届の範囲を決定する際の有力なツールになることが期待される。

・キラル医薬品の品質、有効性と安全性評価に関する非臨床研究：国内において医薬品のキラリティーに関する検討事項を言及しているガイドラインは現在のところICH-Q6Aのみであるが、今後の新化学合成医薬品を開発する場合のキラリティーに関する適切な検討事項の設定に役立てることを目的として、本研究では既承認化学合成医薬品のキラリティーに関する情報を収集し、医薬品の性質に応じて、どのような物理的・化学的及び生物学的性質が検討されているかの整理、分析を行った。調査の結果、近年承認品目数に占めるラセミ医薬品の割合は減少し、キラル医薬品は増加してきていることが明らかになった。キラル医薬品は、その製造方法などに応じてキラリティーに関する構造決定、規格設定が検討され、ラセミ医薬品は、ラセミ体として開発することの妥当性を説明するための生物学的検討が実施されていた。

キーワード：製剤開発研究、薬事法、規制緩和、キラル医薬品、ラセミ体、
エナンチオマー

A. 研究目的

1. 製剤開発における品質・有効性と安全性評価に関

する非臨床研究：高品質の医薬品が継続的に生産・市場に供給されることは、医薬品の有効性と安全性

が確保されるための必須条件である。そのため、医薬品製造メーカーは新薬開発時に各種の製剤開発研究を行い、医薬品の品質と製造の頑健性を確認する必要がある。具体的な製剤開発研究に関するあり方がICHガイドラインQ8として2003年11月の大阪会合から開始され、昨年秋の横浜での専門家作業グループ (EWG) 会合でステップ2に達した。

本研究では、ICHガイドラインQ8のステップ2文書を対象にして、その内容を分析し、特に重要な概念である設計領域についてその意義を明らかにすることを目的とする。さらに、2005年4月より完全施行される改正薬事法について、大きく変化する承認書記載事項について分析し、Q8ガイドラインの我が国に及ぼす影響に関して考察する。

2. キラル医薬品の品質、有効性と安全性評価に関する非臨床研究：光学異性体間では生物学的作用に違いが認められることがあることから、ラセミ体を医薬品として開発するには、ラセミ体として投与されても有効性・安全性上問題がないことを薬理作用及び毒性などの観点から明らかにする必要があると一般的に考えられるようになってきた。

一方、光学活性な化学合成医薬品について、ICHガイドラインQ6Aにおいては、有効成分ではない光学異性体を不純物とみなし、光学特異的な試験による厳密な品質管理が求められるようになってきている。さらに、米国食品医薬品庁 (FDA) 及び欧州医薬品庁 (EMA) においては既に光学活性な医薬品を開発する場合のガイドライン (それぞれFDA's Policy Statement for the Development of New Stereoisomeric Drugs, Investigation of Chiral Active Substances) が存在し、光学活性な医薬品を開発する場合に、ラセミ体あるいは単一エナンチオマーとして開発するのにかかわらず、その指針が示されている。

本研究は、今後の新化学合成医薬品をラセミ体または単一エナンチオマーとして開発する場合の適切な検討事項の設定に役立てることを目的として行う。

今年度は、既承認化学合成医薬品のキラリティーに関する情報を収集し、医薬品の性質に応じて、どのような物理的・化学的及び生物学的性質が検討されているのか整理、分析を行った。

B. 研究方法

1. 製剤開発における品質・有効性と安全性評価に関する非臨床研究：2004年11月横浜ICH EWGでステップ2に達したQ8ガイドライン、平成16年7月9日薬食発0709005号「薬事法及び採血及び供血あっせん業取締法の一部を改正する法律等の施行について」および平成16年8月2日厚生労働省食品局審査管理課「改正薬事法に基づく医薬品の承認申請書における製造方法等に係る記載要領及び記載変更に関する取扱い (案)」に関する意見募集について」を調査検討の対象とした。

2. キラル医薬品の品質、有効性と安全性評価に関する非臨床研究：調査対象は、既承認化学合成医薬品の中で、新有効成分含有医薬品として承認されICHガイドラインQ6Aの対象とされているものとし (医療用具殺菌・消毒薬及び体内診断薬は除く)、今回の調査における分類は以下のようにした。①キラル医薬品：単一エナンチオマーとして承認されているもの (必要に応じて不斉中心が1つのものと2つ以上のものを区別した)。②ラセミ医薬品：2つのエナンチオマーの1：1の混合物 (=ラセミ体) として承認されているもの。③アキラル医薬品：分子内に不斉中心をもたないもの。

C. 研究結果

・製剤開発における品質・有効性と安全性評価に関する非臨床研究：

1. Q8ガイドラインの目的、背景、適用範囲及び製剤開発の一般原則。

① 目的及び背景

本ガイドラインの直接的な目的は、CTD様式で規制当局に承認申請をする際の添付資料3.2.P2「製剤開発」の項の内容を明確にすることである。3.2.P2は単に個々の製剤開発研究試験を記述することではなく、当該医薬品の品質及び製造方法に関して広範な知識を審査あるいは査察当局に示すためのものであり、そのことにより、医薬品科学や製造科学に理解が十分に行き届いているような領域では、柔軟な方法の規制が可能となることを本ガイドラインは目指している。

② 適用範囲

本ガイドラインの適用範囲は、ICHCTDの適用範囲即ち、新薬の規格及び試験方法に関するガイドラインICHQ6AおよびQ6Bの範囲に適用される。

③ 製剤開発の一般原則

製剤開発の目的は「高品質な医薬品を設計し、継続的に医薬品を供給する製造方法を確立すること」である。本ガイドラインは製剤開発研究のあり方を最小限必要な事項と追加的に実施する事項に分類している。

最小限必要な事項は、原薬、添加物の特徴、重要工程を特定し、考察すること。そして重要な処方特性やプロセスパラメータに関しては、変更時の医薬品の品質に与える影響の程度を評価し、特定することが必要であるとしている。

一方、追加的に実施する事項として、本ガイドラインは、一層深い知識を得るための製剤研究について論究している。そこでは、さらに広範な原薬や添加物の特性、選択しうる様々な工程やプロセスコントロールにおける製品の機能に関する知識が求められる。そして、製造工程と工程管理に関して高次元の理解を示すことにより、設計領域が確立し、柔軟な規制システムが構築されると本ガイドラインは強調している。

2. 設計領域

設計領域 (design space) は本ガイドラインの用語集では以下のように定義されている。即ち、

- ・品質を保証することが明らかなプロセスパラメータの領域である。
- ・設計領域は処方特性に関しても適用可能な場合もある。
- ・設計領域内における値の更新はプロセスパラメータや処方特性に関する承認の変更とはみなさない。
- ・設計領域外への値の移動は変更とみなし、規制当局による承認事項変更の手続きがとられる。

3. 国内における状況

我が国は欧米とはかなり異なる承認制度を有している。我が国の承認制度で特徴的なことは以下の3点である

- ・欧米では、審査当局に提出された製造方法や品質に関する事項が、程度の差こそあれ、全て規

制の対象となるのに対して、我が国では、提出された事項の内、品質保持に特に重要な事項のみが承認申請書に記載され、承認事項となること。

- ・承認事項からの逸脱は許されないこと。
- ・我が国は最終製剤の品質を最終製剤の規格を厳格に設定することで保証していること。

2. キラル医薬品の品質、有効性と安全性評価に関する非臨床研究

承認品目におけるアキラル医薬品、ラセミ医薬品、キラル医薬品の推移を、1988-2002年を3年ごとにまとめたところ、ラセミ医薬品の承認数は減少し、キラル医薬品が増えてきており、ラセミ医薬品の開発は減少傾向にあることがわかった。また、キラル医薬品37品目について①製造方法、②キラリティーに関する構造決定の方法、③キラリティーに関する規格、④キラリティーに関する薬物動態評価について調査した。さらに、ラセミ医薬品10品目について①ラセミ体であることの確認方法、②薬効薬理評価、③単回投与毒性評価、④キラリティーに関する薬物動態評価を検討した。

D. 考 察

1. 製剤開発における品質・有効性と安全性評価に関する非臨床研究

Q8ガイドラインは、十分な製剤開発研究が実施された場合の規制緩和を意図している。一方、従来我が国は最終製剤の規格を厳重に管理することで品質の恒常性を保証する方策をとる反面、製剤の製造方法に関しては、殆ど承認要件となっていなかったため、製剤開発研究の成果を規制制度に活用する道がなかった。今回の薬事法の改正で、製造方法が承認要件化したことと、承認事項が、その変更の程度によって、一変承認申請対象と軽微変更届出対象とにわけられたことから、Q8を実質的に運用する基本的な条件が整ったといえよう。

また、プロセスパラメータの変更が軽微変更届出の範囲内か一変承認申請の対象事項かの切り分けに今後製剤開発研究の成果が利用できることが期待される。

しかし、Q8ガイドラインは設計領域内での極めて広範な製造メーカーの裁量を認める可能性がある。

現在我が国では最終製剤の承認規格の変更は一変承認申請が必要であるなど、処方特性に関して設計領域の運用が困難な問題もある。各極においても、それぞれの規制制度により、想定している運用が異なっている部分もあると思われる。お互いの規制制度の違いを十分に認識してQ8ガイドラインの検討をすることが今後一層必要である。

2. キラル医薬品の品質、有効性と安全性評価に関する非臨床研究：キラル医薬品については品目によって、検討内容に差が認められた。特にキラリティーに関する構造決定や規格設定は、その製造方法によって検討・設定の有無に差がみられた。キラル医薬品には天然物（抗生物質など）を原料とした半合成品もかなり含まれることから、検討すべき内容に品目毎の差が生じると考える。キラリティーに関する検討の内容は、それぞれの物性や製造方法などにより適宜選択されるものであり、キラル医薬品の開発は今後も増加が予想されることから、適切な検討事項の設定はより重要になると考える。

ラセミ医薬品に関しては、調査対象が10品目ではあったが、ラセミ体として開発することの妥当性を説明する必要があることから、エナンチオマーごとの生物学的作用（薬理作用、毒性、薬物動態評価）に関しての検討がかなりなされていたと考える。

E. 結論

1. 製剤開発における品質・有効性と安全性評価に関する非臨床研究：高品質の医薬品を継続的に製造するために、新薬の開発過程において、製剤開発研究が実施される。ICHにおいて製剤開発研究のありかたが検討され、Q8ガイドラインとしてまとめられつ

つある。本ガイドラインは、十分な製剤開発研究の結果、各極における医薬品承認審査・査察に関わる規制が軽減されることを目的としている。我が国も改正薬事法で品質に関する規制のフレームワークを変更しつつあり、今後Q8ガイドラインの成果を適格に取り入れて、効果的な薬事規制の運用を図ることが期待される。

2. キラル医薬品の品質、有効性と安全性評価に関する非臨床研究：医薬品既承認新化学合成医薬品に関する調査から、ラセミ医薬品の承認数は減少し、キラル医薬品の承認数が増えてきていることが明らかになった。キラル医薬品及びラセミ医薬品とも、それぞれ単一エナンチオマー及びラセミ体として開発することの妥当性を説明するための検討が実施されていた。検討内容をより適切なものにしていくためには、医薬品のキラリティーに関する研究状況の把握などが必要である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし。

2. 学会発表

嶋澤るみ子、奥田晴弘、永井尚美、豊島聡。新化学合成医薬品のキラリティーに関する検討事項について。日本薬学会第124年会（大阪）

H. 知的財産権の出願・登録状況

キラル医薬品の品質、有効性と安全性評価に関する非臨床研究

分担研究者：豊島 聡（医薬品医療機器総合機構 理事）
分担研究者：奥田 晴宏（国立医薬品食品衛生研究所 有機化学部長）
研究協力者：嶋澤るみ子（医薬品医療機器総合機構 主任専門員）

研究要旨

医薬品には、分子内に不斉中心を有する光学活性な化合物は多く、特にエナンチオマー同士は物理的、化学的性質が類似していることから、ラセミ体として開発される場合も多かった。国内において医薬品のキラリティーに関する検討事項を言及しているガイドラインは現在のところICH-Q6Aのみである。今後の新化学合成医薬品を開発する場合のキラリティーに関する適切な検討事項の設定に役立てることを目的として、既承認化学合成医薬品のキラリティーに関する情報を収集し、医薬品の性質に応じて、どのような物理的・化学的及び生物学的性質が検討されているのか整理、分析を行った。調査の結果、承認品目数に占めるラセミ医薬品の割合は減少し、キラル医薬品は増加してきていることが明らかになった。キラル医薬品は、その製造方法などに応じてキラリティーに関する構造決定、規格設定が検討されていた。ラセミ医薬品は、ラセミ体として開発することの妥当性を説明するために生物学的検討が実施されていた。検討内容をより適切なものにしていくためには、医薬品のキラリティーに関する研究状況の把握が必要である。

キーワード：化学合成医薬品、キラリティー、エナンチオマー、ラセミ体

A. 研究目的

医薬品には、分子内に不斉中心を有する光学活性な化合物は少なくない。光学異性体は原子の3次元構造は異なっているが、原子組成や結合は同じであり、特にエナンチオマー（対掌体、鏡像体）は旋光度を除く物理的、化学的性質が非常に似通っている。近年まで一方のエナンチオマーのみを製造する不斉合成や光学分割が工業生産規模では難しく、コストもかかったため、単一エナンチオマーの医薬品を生産し、品質管理を行うことは一般に困難であった。これら技術的、経済的理由から、これまでかなりの数の光学活性な医薬品が、2つのエナンチオマーの1：1の混合物、すなわちラセミ体として開発されてきた。

ラセミ体で開発された医薬品の中には、エナンチオ

マー間で薬理作用（図1）あるいは薬物動態（図2）に差がある医薬品も存在する。

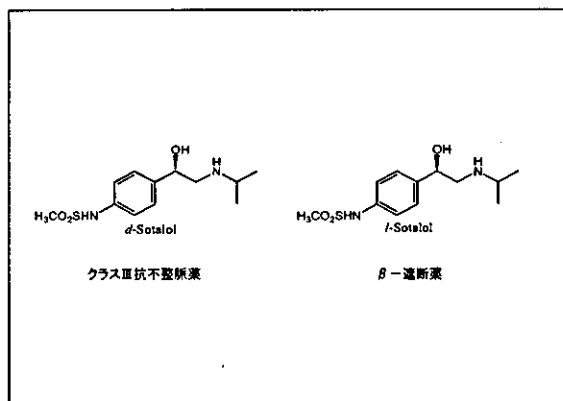


図1 ソタロールの鏡像体間での薬理活性の違い

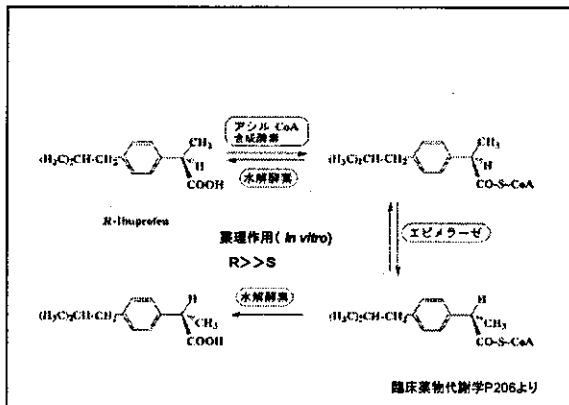


図2 イブプロフェン（抗炎症薬）のキラル反転機構

このように光学異性体間では特に生物学的作用に違いが認められることから、ラセミ体を医薬品として開発するには、ラセミ体として投与されても有効性・安全性上問題がないことを薬理作用及び毒性などの観点から明らかにする必要があると一般的に考えられるようになってきた。

一方、光学活性な化学合成医薬品について、ICHガイドラインQ6Aにおいては、有効成分ではない光学異性体を不純物とみなし、光学特異的な試験による厳密な品質管理が求められるようになってきている。さらに、米国食品医薬品庁（FDA）及び欧州医薬品庁（EMA）においては既に光学活性な医薬品を開発する場合のガイドライン（それぞれFDA's Policy Statement for the Development of New Stereoisomeric Drugs、Investigation of Chiral Active Substances）が存在し、光学活性な医薬品を開発する場合に、ラセミ体あるいは単一エナンチオマーとして開発するのかわからず、その指針が示されている。

本研究では、国内既承認の化学合成医薬品のキラリティーに関する情報、海外のガイドラインを含む国内外における医薬品のキラリティーに関する研究状況を整理、分析することとした。これらの結果に基づき、今後の新化学合成医薬品をラセミ体または単一エナンチオマーとして開発する場合の適切な検討事項の設定に役立てることを目的とする。

今年度は、既承認化学合成医薬品のキラリティーに関する情報を収集し、医薬品の性質に応じて、どのような物理的・化学的及び生物学的性質が検討されているのか整理、分析を行った。

B. 研究方法

調査対象は、既承認化学合成医薬品の中で、新有効成分含有医薬品として承認されICHガイドラインQ6Aの対象とされているものとした。なお、医療用具殺菌・消毒薬及び体内診断薬は除いた。今回の調査における分類は以下のようにした。①キラル医薬品：単一エナンチオマーとして承認されているもの。必要に応じて不斉中心が1つのもので2つ以上のものを区別した。②ラセミ医薬品：2つのエナンチオマーの1：1の混合物（＝ラセミ体）として承認されているもの。③アキラル医薬品：分子内に不斉中心をもたないもの。

C. 研究結果

1. 承認品目におけるアキラル医薬品、ラセミ医薬品、キラル医薬品の推移を、1988-2002年を3年ごとにまとめて示した（図3）。

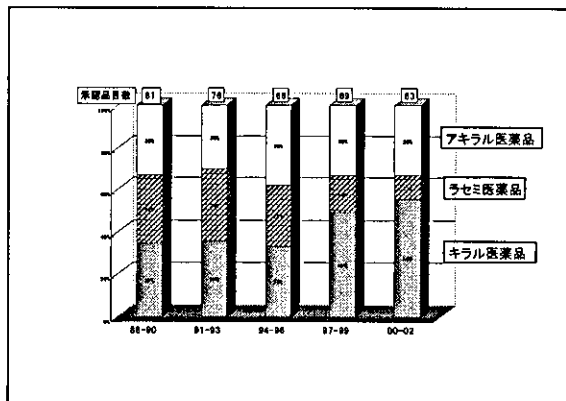


図3 新化学合成医薬品の内訳 (1988-2002年承認)

ラセミ医薬品の承認数は減少し、キラル医薬品が増えてきており、ラセミ医薬品の開発は減少傾向にあることがわかる。

2. キラリティーに関する研究内容の調査

2000年1月から2003年7月までに承認された新化学合成医薬品75品目を対象として、キラリティーに関する品質、薬理作用、薬物動態についての情報を収集、分析した。75品目の内訳は図4の結果となった。