

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17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 主幹研究員）
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（あすか製薬株式会社川崎研究所安全性・代謝研究部 部長）
牧 栄二（財団法人食品農医薬品安全性評価センター 常務理事）
笛木 修（医薬品医療機器総合機構新薬審査第一部 主任専門員）
山口 光峰（医薬品医療機器総合機構一般薬等審査部 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、医薬品等の免疫毒性に関する追加調査を行った。また、昨年度作成されたICH免疫毒性試験ガイドライン案（Step 2文書）に対するパブリックコメントに基づき修正を加え、ガイドライン（Step 4文書）を作成した。

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

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の収集及び解析を行う。得られた情報を基に、医薬品等に関する免疫毒性試験ガイドラインを作成する。

B. 研究方法

平成17年度においては、ICH S8 Expert Working Group（EWG）と共同して、三極のガイダンスの調和を目的として、ICH免疫毒性試験法ガイドラインを作成した。また、医薬品等の免疫毒性及び薬物アレルギーに関する文献調査及び国内外の動向調査等を行った。

（倫理面への配慮）

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. ICH免疫毒性試験法ガイドライン作成

ICH免疫毒性試験ガイドライン案（Step 2文書）に対する和文コメントを項目別に整理し、その英訳を行った。次いで、ICH S8 EWGと共同して、Step 2文書へのコメントを検討した。平成17年5月にブリュッセルで開催されたEWG会議において、寄せられたコメントに基づき、Step 2文書の修正を行い、ほぼ最終的なガイドライン案を作成した。その後、電話会議及び電子メール交換等により最終調整を行い、8月末にEWGにおい

てStep 4文書（英文ガイドライン案）とされ、9月に英文ガイドライン案は最終化された（資料1）。さらに、同英文ガイドライン案を、邦文化する作業を継続して行った。

2. 免疫毒性試験データの収集及び解析

前年度に引き続き、公開されている免疫毒性及び薬物アレルギーに関する文献調査を行った。

D. 考察

今回のICHガイドラインの対象から除外された薬物アレルギー関連の試験法に関しても、現行国内ガイドラインの改訂に向けて、今後、さらに調査を継続する必要がある。

E. 結論

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、免疫毒性試験データの追加収集を継続した。また、ICHの免疫毒性試験ガイドライン案（Step 4文書）の作成を行った。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

- 1) 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. *J. Immunotoxicol.*, 2, 171-180, 2005.
- 2) 澤田純一、笛木修、山口光峰、中村和市、筒井尚久、久田茂：ICH S8（免疫毒性）ガイドラインについて。 *ImmunoTox Letter*, 10(2), 8-9, 2005.
- 3) 中村和市：安全性に関するトピックの動向－S8－。 *医薬品研究*, 36(8), 353-359, 2005

H. 知的財産権等の出願・発明状況（予定を含む）

なし

（資料1）

IMMUNOTOXICITY STUDIES FOR HUMAN PHARMACEUTICALS

ICH Harmonised Tripartite Guideline

1. INTRODUCTION

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 immunotoxic, and (2) guidance on a weight-of-evidence decision making approach for immunotoxicity testing. Immunotoxicity is, for the purpose of this guideline, defined as unintended immunosuppression or enhancement. Drug-induced hypersensitivity and autoimmunity are excluded.

1.2 Background

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. Enhancing the immune response can exaggerate autoimmune diseases or hypersensitivity. 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 for either immunosuppression or contact sensitization. No standard approaches for human pharmaceuticals are currently available for testing for respiratory or systemic allergenicity (antigenicity) or drug-specific autoimmunity; testing for these endpoints is not currently required in any

region. There are no regional differences in testing approaches of skin sensitization.

Immunosuppression or enhancement can be associated with two distinct groups:

- 1) Drugs intended to modulate immune function for therapeutic purposes(e.g. to prevent organ transplant rejection) where adverse immunosuppression can be considered exaggerated pharmacodynamics.
- 2) Drugs not intended to affect immune function but cause immunotoxicity due, for instance, to necrosis or apoptosis of immune cells or interaction with cellular receptors shared by both target tissues and non-target immune system cells.

Anti-proliferative agents used to treat cancer are an example of drugs that produce unintended immunosuppression. 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 evaluated in non-clinical studies. For other types of compounds not intended to suppress the immune response, distinction between exaggerated pharmacodynamics and non-target effects can be less obvious. As an example, some anti-inflammatory compounds have an effect on certain innate immune functions but do not necessarily affect the adaptive immune response.

1.3 Scope of the Guideline

This guideline is focused on providing recommendations on nonclinical testing for immunotoxicity induced by human pharmaceuticals. It is restricted to unintended immunosuppression and immunoenhancement, excluding

allergenicity or drug-specific autoimmunity.

This guideline applies to new pharmaceuticals intended for use in humans, as well as to marketed pharmaceuticals proposed for different indications or other variations on the current product label in which the change could result in unaddressed and relevant immunotoxicity issues. In addition, the guideline might also apply to drugs for which clinical signs of immunotoxicity are observed during clinical trials and following approval to market. The guideline does not apply to biotechnology-derived pharmaceutical products covered by ICH S6 Guideline¹ and other biologicals.

Existing guidance documents on sensitization or hypersensitivity remain in force and are not affected by this document. It is beyond the scope of this guideline to provide specific guidance on how each immunotoxicity study should be performed. General methodology guidance is provided in the Appendix.

1.4 Overview

The general principles that apply to this guideline are:

- 1) All new human pharmaceuticals should be evaluated for the potential to produce immunotoxicity.
- 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 factor(s) in section 2.1.

The description of the guideline below will follow the recommended decision process in immunotoxicity evaluation as shown in the flow diagram(Figure 1). More detailed descriptions of the testing methods are in the Appendix.

2. GUIDELINE

2.1 Factors to Consider in the Evaluation of Potential Immunotoxicity

Factors to consider that might prompt additional immunotoxicity studies can be identified in the following areas: (1) findings from STS, (2) the pharmacological properties of the drug, (3) the intended patient population, (4) structural similarities to known immunomodulators, (5) the disposition of the drug, and (6) clinical information.

The initial screen for potential immunotoxicity involves 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 the Appendix.

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 such as leukocytopenia/leukocytosis, granulocytopenia/granulocytosis, or lymphopenia/lymphocytosis;
- 2) Alterations in immune system organ weights and/or histology (e.g. changes in thymus, spleen, lymph nodes, and/or bone marrow);
- 3) Changes in serum globulins that occur without a plausible explanation, such as effects on the liver or kidney, can be an indication that there are changes in serum immunoglobulins;
- 4) Increased incidence of infections;
- 5) Increased occurrence of tumors can be viewed as a sign of immunosuppression in the absence of other plausible causes such as genotoxicity, hormonal effects, or liver enzyme induction.

Changes in these parameters could reflect immunosuppression or enhanced activation of the immune system. Immunosuppression is usually reflected by reduced values of immune parameters, whereas immunoenhancement is usually reflected by increased values. However, these relationships are not absolute and can be inverted in some cases.

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/exposure relationship,
- Safety factor above the expected clinical dose,
- Treatment duration,
- Number of species and endpoints affected,
- Changes that may occur secondarily to other factors (e.g. stress, see the Appendix, section 1.4),
- 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 Pharmacological Properties

If the pharmacological properties of a test compound indicate it has the potential to affect immune function (e.g. anti-inflammatory drugs), additional immunotoxicity testing should be considered. Information obtained from the nonclinical pharmacology studies on the ability of the compound to affect the immune system could be used in a weight of evidence approach to decide if additional immunotoxicity studies are needed.

2.1.3 Intended Patient Population

Additional immunotoxicity studies might be warranted if the majority of the patient population for whom the drug is intended is immunocompromised by a disease state or concurrent therapy.

2.1.4 Structural Similarity

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

2.1.5 Disposition of the Drug

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

2.1.6 Signs Observed in Clinical Trials or Clinical Use

Clinical findings suggestive of immunotoxicity in patients exposed to the drug could call for additional nonclinical immunotoxicity testing.

2.2 Weight of Evidence Review

A weight of evidence review should be performed on information from all the factors outlined above to determine whether a cause for concern exists. A finding of sufficient magnitude in a single area should trigger additional immunotoxicity studies. Findings from two or more factors, each one of which would not be sufficient on its own, could trigger additional studies. If additional immunotoxicity studies are not performed, the sponsor should provide justification.

3. SELECTION AND DESIGN OF ADDITIONAL IMMUNOTOXICITY STUDIES

3.1 Objectives

If a cause for concern is identified, additional immunotoxicity studies should be performed to verify the immunotoxic potential of the compound. These studies can also help determine the cell type affected reversibility, and the mechanism of action. This type of information can also provide more insight into potential risk and possibly lead to biomarker selection for clinical studies.

3.2 Selection of assays

If the weight-of-evidence review indicates that additional immunotoxicity studies are called for, there are a number of assays which can be used. If there are changes in standard toxicity testing data suggesting immunotoxicity, the type of additional immunotoxicity testing that is considered appropriate will depend on the nature of the immunological changes observed and the concerns raised by the class of compound. It is recommended that an immune function study be conducted, such as a T-cell dependent antibody response(TDAR). If specific cell types that are affected in STS are not known to participate in a TDAR, assays that measure function of that specific affected cell type might be conducted(see the Appendix). Where a specific target is not identified, an immune function study such as the TDAR is recommended.

In addition, immunophenotyping of leukocyte populations, a non-functional assay, can be conducted to identify the specific cell populations affected and might provide useful clinical biomarkers.

3.3 Study Design

To assess drug-induced immunotoxicity, a generally accepted study design in rodents is a 28 day study with consecutive daily dosing. Adaptations of immunotoxicity assays have been described using non-rodent species. The species, strain, dose, duration, and route of administration used in additional immunotoxicity studies should be consistent, where possible, with the standard toxicity study in which an adverse immune effect was observed. Usually both sexes should be used in these studies, excluding nonhuman primates. Rationale should be given when one sex is used in other species. The high dose should be above the no observed adverse effect level(NOAE) but below a level inducing changes secondary to stress(see Appendix, section 1.4). Multiple dose levels are recommended in order to determine dose-response relationships and the dose at which no immunotoxicity is observed.

3.4 Evaluation of Additional Immunotoxicity Studies

and Need for Further Studies

Results from additional immunotoxicity studies should be evaluated as to whether sufficient data are available to reasonably determine the risk of immunotoxicity.

1. Additional studies might show that no risk of immunotoxicity can be detected and no further testing is called for.
2. Additional studies might demonstrate a risk of immunotoxicity but fail to provide sufficient data to make a reasonable risk-benefit decision. In this case further testing might help provide sufficient information for the risk-benefit decision.
3. If the overall risk-benefit analysis suggests that the risk of immunotoxicity is considered acceptable and/or can be addressed in a risk management plan(see ICH E2E Guideline²), then no further testing in animals might be called for.

4. TIMING OF IMMUNOTOXICITY TESTING IN RELATION TO CLINICAL STUDIES

If the weight-of-evidence review indicates that additional immunotoxicity studies are appropriate, these should be completed before exposure of a large population of patients, usually Phase III. This will allow for the incorporation of monitoring immune system parameters 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 called for 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.

5. REFERENCES

1. ICH Harmonized Tripartite Guideline(S6)
"Preclinical Safety Evaluation of
Biotechnology-Derived Pharmaceuticals"
2. ICH Harmonized Tripartite Guideline(E2E)
"Pharmacovigilance Planning"

APPENDIX: 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 clinical chemistry) and methods for obtaining samples and evaluating tissue sections are described in more detail in documents from professional toxicological pathology societies.

Parameter	Specific Component
Hematology	Total and absolute differential leukocyte counts
Clinical Chemistry	Globulin levels ¹ 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 ² , Peyer's patch ³ , BALT ⁴ , NALT ⁴

¹Unexplained alterations in globulin levels could call for measurement of immunoglobulins.

²Unexplained alterations in peripheral blood cell lines or histopathologic findings might suggest that cytologic evaluation of the bone marrow would be appropriate.

³Oral administration only.

⁴For inhalation or nasal route only. BALT: bronchus-associated lymphoid tissues. NALT: nasal-associated lymphoid tissues

1.1 Hematology and Clinical Chemistry

Total leukocyte counts and absolute differential leukocyte counts are recommended to assess immunotoxicity. When evaluating changes in globulin levels, other factors should be taken into account(e.g. liver toxicity, 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, changes in immunoglobulins levels

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 rodents 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 aging can preclude obtaining accurate thymus weight.

1.3 Histopathological Examination

Histopathological changes of the spleen and thymus should be evaluated as an indicator of systemic immunotoxicity. 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(if possible), and the most proximal regional draining lymph nodes for drugs administered by the dermal, intramuscular, intradermal, intrathecal, or subcutaneous routes. The specific node selected and the additional lymph node should be at the discretion of the sponsor based on the sponsor's experience. 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 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(e.g. by exaggerated pharmacodynamic action). These effects on the immune system might be mediated by increased corticosterone or cortisol release or other mediators. 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, and changes in spleen and lymph node cellularity. Increases in adrenal gland weight and/or histologic evidence of adrenal cortical hyperplasia can also be observed. Thymic weight decreases in the presence of clinical signs, such as decreased body weight and physical activity, are too often attributed to stress. These findings on their own should not be considered sufficient evidence of stress-related immunotoxicity. The evidence of stress should be compelling in order to justify not conducting additional immunotoxicity studies.

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 called for 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 ensure 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 test a positive control concomitantly with an investigational compound or periodically in order to demonstrate proficiency of performance, except for studies with non-human primates. For immunophenotyping, if properly validated technically, the addition of positive controls for each study might not be needed.

Immunotoxicity studies are expected to be performed in compliance with Good Laboratory Practice(GLP). It is recognized that some specialized assays, such as those described below, might not comply fully with GLP.

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 results in a robust antibody response. The endpoint selected should be justified as the most appropriate for the chosen assay and the selected species.

Antigens for immunization should not be used with adjuvants without justification. Alum might be considered 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 could be used with provision of sufficient exposure data to bridge to the strain used in the STS.

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 can be expressed as the sum of the antibody response over several collection dates(e.g. area under the curve).

When SRBC antigens are used for an ELISA, the preparation of the capture antigen that is coated on the plates is considered critical. Whole fixed erythrocytes or membrane preparations can be used as the SRBC capture antigen. ELISA results should be expressed either as concentration or as titer, but expression as optical densities is not recommended.

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.

Flow cytometry, when employed to enumerate specific cell populations, 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 as well as percentages be used in evaluating treatment-related changes.

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. Quantitation of leukocytes 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 and/or peripheral blood 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).

2.4 Natural Killer Cell Activity Assays

Natural killer(NK) cell activity assays can be conducted if immunophenotyping studies demonstrate a change in number, or if STS studies demonstrate increased viral infection rates, or in response to other factors. In general, all NK cell assays are *ex vivo* assays 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 ⁵¹Cr. New methods that involve 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 and generate a curve.

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, fungal, 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*, *Candida albicans*, 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.

Host resistance assays can provide information on the

susceptibility to particular classes of infectious agents or tumor cells and can have an impact on the risk management plan. In addition, they can have an important role in identifying or confirming the cell type affected by a test compound. Moreover, host resistance assays involve innate immune mechanisms for 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. An *in vitro* assay to test direct effects on the organism is recommended.

2.6 Macrophage/Neutrophil Function

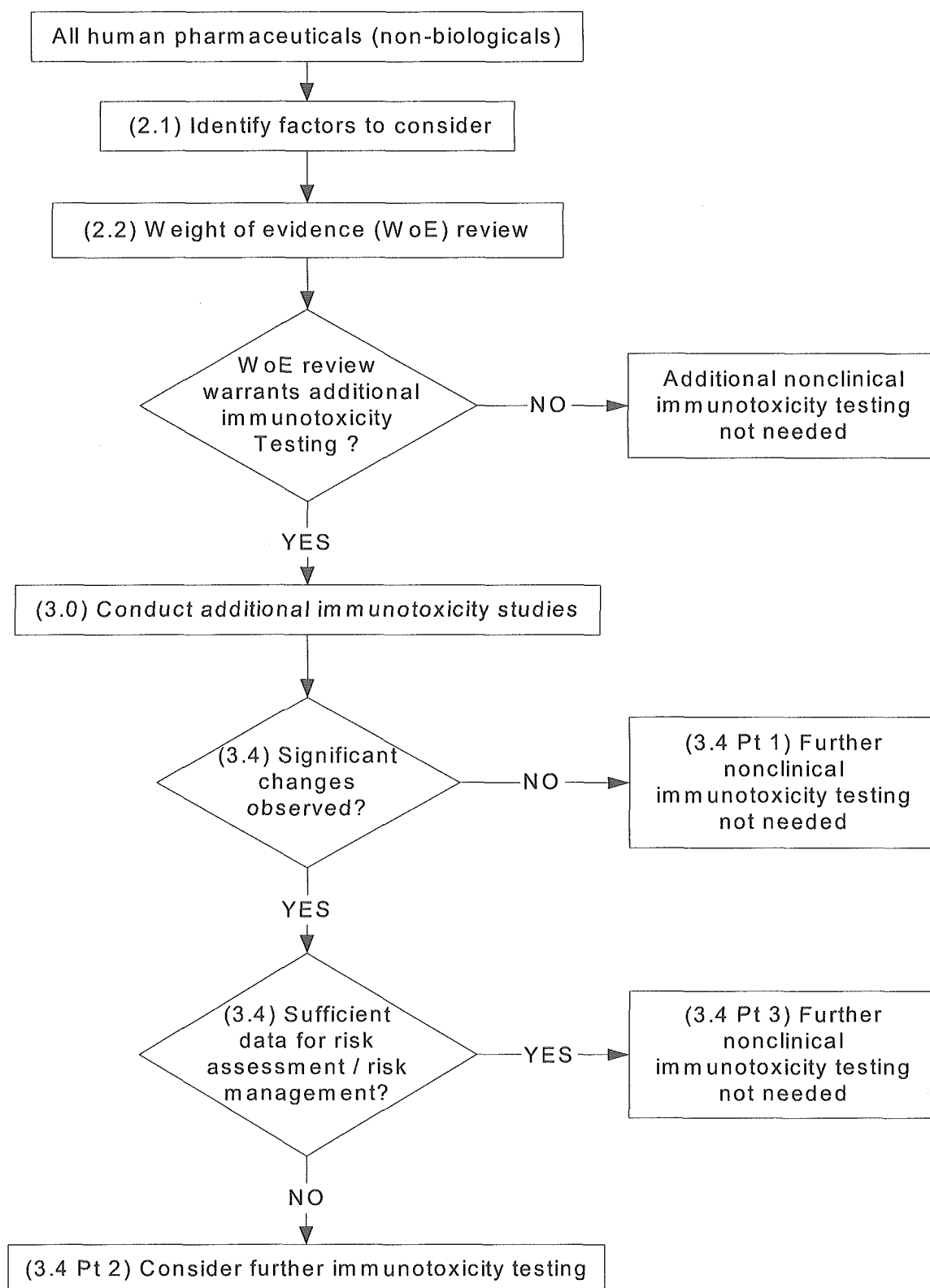
In vitro macrophage and neutrophil function assays(phagocytosis, oxidative burst, chemotaxis, and cytolytic activity) have been published for several species. These assays assess macrophage/neutrophil function of cells exposed to the test compound *in vitro* or obtained from animals treated with the 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 radioactively or fluorescently labeled targets.

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. These are *in vivo* assays where antigens are used for sensitization. The endpoint is the ability of drugs to modulate the response to challenge. Delayed-type hypersensitivity(DTH) reactions with protein immunization and challenge have been reported for mice and rats. Models in which contact sensitizers are used have been explored in mice but have not been well validated or extensively used. Cytotoxic T cell response can be generated in mice using a virus, tumor cell line, or allograft as the antigenic challenge. 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.

Figure 1: Flow Diagram for Recommended Immunotoxicity Evaluation



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17年度分担研究報告書

安全性薬理試験（ICH-S7B：ヒト医薬品の心室再分極遅延
（QT間隔延長）の潜在的可能性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

研究協力者：

- 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・安全性生物試験研究センター・薬理部室長）

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）
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）

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非臨床QT評価試験に関する医薬品等国際ハーモナイゼーション会議（ICH）ガイドライン（S7B）作成を目的としている。S7Bは本年度、平成17年5月のICHブリュッセル会議で臨床QT評価E14と共にステップ4となり、現在、和訳も終了している。今後の問題としては、臨床/非臨床QT評価の実施に伴い、日米欧で生じることが予想される実施上の問題について、実施のための作業グループ（IWG）において討議し、解決が図られる予定である。

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、ステップ4、S7B

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関する国際的にハーモナイズした安全性薬理試験ガイドラインの開発を支援することであり、本年度の目的は臨床E14に整合した形で非臨床ガイドラインのステップ4への到達を目指すことである。現在までに、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評価法の検討が合同会議の形で行われている。S7Bに関しては、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を行う非臨床QT評価ガイドラインとして、ステップ2-S7B案が平成14年2月に先行作成されていたが、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運営会議で勧告された。この決定に従い、以降、S7B専門家会議では非臨床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、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行い、非臨床QT評価結果を臨床QT評価戦略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きた。

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Step4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、アリゾナ大学CERT分類等^{1,2)}により分類された陽性および陰性対照薬物を用いて実施された日本製薬協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)によるインビボ及びインビトロ試験成績および

ILSI-HESIでのインビトロ試験成績を基に検出感度に関して精査した。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した。ステップ4達成以降ではE14との兼ね合いによる実施上の問題について研究班において討議した。

C. 研究結果

1. ステップ4非臨床評価(ICH-S7B)の概要

ステップ4 S7B文書は心室性再分極を遅延する作用を評価する非臨床試験戦略を記載したもので、非臨床アッセイと統合的リスク評価に関する情報を含む。非臨床評価試験の目的は心室再分極を遅延させる潜在的可能性を検出することであり、物質の濃度と遅延作用の程度の関連性を捉えることである。薬理及び毒性試験から得られた情報を加えた統合的評価結果は非臨床統合的リスク評価の目的に述べるように臨床試験のデザインとその成績の解釈に役立てることを期待している。S7Bガイドラインの構成は序論、ガイドライン、試験系から構成され、序論には背景、経過と理念、ガイドライン部には非臨床試験の戦略と統合的リスク評価、試験系にはアッセイの選択と施行に関する実行上の情報、将来有用となる新技術に関する記述も含む。

非臨床QT評価に用いられる測定法の選択に関しては、ヒトと共通する心室の再分極を構成する電気生理学レベルに基づいており、非臨床試験の方法として、イオンチャネル、活動電位持続時間及びインビボQT間隔の測定の検討を挙げることが出来る。催不整脈モデルは現時点では関連する情報が少なく、将来の方法と考えられている。被験物質のQTリスク評価の進め方は得られる情報全てを用いる統合的なリスク評価を基とする。非臨床試験の進め方および統合的リスク評価の進め方に関しては基本的には改正ステップ2と異なるところはなく(資料内図)、インビトロIKrアッセイ及びインビボQTアッセイの結果が評価の中心である。なお感度の確立のために陽性対照物質の使用が必要であり、インビボQTアッセイでは必ずしも全てでなくてもよいが、インビトロIKrアッセイでは全ての試験に陽性対照を含める必要がある。心室再分極遅延が報告されているクラスに属する被験物質の場合には比較対照物質の同時使用により作用の潜在的可能性を検討するこ

とが必要とされており、被験物質が化学的/薬理的にヒトでQT間隔延長を起こす可能性があるクラスに属している場合にはそのクラスの化合物を対照物質として同時に検討することを考慮する必要がある。上記の2アッセイの結果が一致しない場合あるいは臨床試験結果が非臨床試験結果と異なる場合、Follow up試験がその矛盾の理解のために用いられる。Follow up試験の選択としてインビトロ活動電位 (APD) パラメータの測定、インビボ活動電位における電気生理学的パラメータの測定等を考慮する。他の非臨床及び臨床情報には既に得られている薬動学的試験、毒性/安全性試験、薬物動態学的試験及び薬物相互作用に関する試験、市販後調査の結果を含む。統合的リスク評価はアッセイ感度と特異性、比較対照物質に対する被験物質の効力比、代謝物の問題及び再分極における作用を生じる曝露と試験動物における薬効薬理作用あるいはヒト治療効果を生じる曝露との関連 (曝露比) について考察する。被験物質のヒトにおける再分極遅延及びQT間隔延長の潜在的な作用を統合的にリスク評価した総合的結論がEvidence of riskに相当する。非臨床試験の実施時期に関し、非臨床試験の結果は統合的リスク評価の一部として、その後の臨床試験の計画や解釈を支えるものとなりうるという認識から、ヒトに初めて投与する前に試験を行うことを考慮すべきとされている。主要な試験であるインビトロIkrアッセイとインビボQTアッセイは、行政に提出する場合にはGLPに従う必要があり、Follow up試験は出来るだけGLPに従うこととなった。インビトロIkrアッセイのように、薬力学的作用のスクリーニングあるいは安全性モニタリング等、他の目的がある場合で、安全性薬理試験として申請しない試験にはGLPは適用しない。

ヒトでのTdPのリスクを非臨床試験により予測可能なのかということがS7Bの論議の焦点であった。ヒトでTdPリスクの可能性のある化合物とない化合物についての日本製薬協QTPRODUCT及びILSI/HESIによる非臨床データ解析を基に、インビボQTアッセイにおける10%以上のQTcを陽性、インビトロIkrアッセイ (hERG) における10 μ M以下の濃度でIC50を示す場合を陽性、APDアッセイ (APD30-90) における有意な濃度依存的なIC10増加を陽性と見なすことが可能と考え

ており³⁾、インビトロIkrアッセイ及びインビボQTアッセイの相補的評価によりTdPリスクの潜在的な可能性のある医薬品を予測可能との認識で合意された。

非臨床試験の結果は一概にヒトにおけるリスク陰性とか陽性を意味するものではなく、統合的評価が重要である。非臨床評価の役割を考慮すると、主要アッセイ系で両結果共に明らかに効果を示さず、クラス効果を含め他に懸念がない化合物の場合は臨床においてもTdPリスクの可能性はほとんどないと主張できると考えている。

2. 本年度の活動

本年度S7B EWGのリーダーはこれまで同様、MHLWサイド (藤森) である。表1は本年度の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。

本年度は、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基に、S7B-EWGインビボおよび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延長作用の検出感度と信頼性を有していることを4月のワシントンにおけるE14に関する公聴会で再度主張した。FDAは非臨床QT評価の価値そのものは認め、非臨床QT評価結果を臨床QT評価試験の評価において活用出来ないとのE14記載をブリュッセル会議で削除したため、S7Bもステップ4に至った。E14/S7B EWG及びICH運営委員会 (ICH-SC) は依然3極間に非臨床QT評価に対する価値の認識差があり、実施面で差が生じることを認識し、実施面で残る問題は今後Implementation Working Group (IWG) 会議で整合することに合意し、両ドキュメントはステップ4となった。将来、非臨床QT評価に関して、各アッセイの結果に対する陰性、陽性の基準の検討並びに日米欧3極間で予想されるS7B/E14ガイドライン適用の差を解消するための行政間の話し合いが必要と考える。

表1 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 F. Sagami
EFPIA	G. Bode, A.T. Sullivan, T. Hammond
US-PhRMA	J. Green, P. Siegle
EFTA	B. P. Schmidt (Swissmed.)

表2 これまでのS7B活動状況と平成17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 : ICH-Brussels会議
平成15年7月	S7B/E14合同会議開始 : ICH-Brussels
平成15年11月	Step 3 : ICH-Osaka会議
平成16年6月	改訂Step2 : ICH-Washington会議
(平成17年度の活動状況)	
平成17年4月	Public meeting, Washington会議
平成17年5月	Step 4 : ICH-Brussels会議
平成17年10月	平成17年度第一回研究班会議

D. 考察

平成17年度における研究課題には、QT延長評価試験の医薬品開発過程における実際の進め方と今後推測されている行政上の問題についての検討が行われた。

本非臨床評価ガイドラインS7BはICHでの安全性薬理試験ガイドラインS7A⁴⁾で検討された心血管系に関する医薬品の安全性評価に伴って浮上した課題であり、平成13年より5年に涉ってICHで論議されたことになる。その最大の理由は臨床評価の進め方との整合と同時進行が必要とされたからである。S7Bは平成14年に一時はステップ2になったが、改めて平成16年にE14と共にステップ2となり、今回ステップ4となった。しかしながらステップ4 E14でもQT延長評価に関し、臨床評価の方が非臨床評価よりも重きを置かれていることは否めない。臨床QT評価の構成は、開発初期(通常、薬物動態&忍容性データ入手後)に行う徹底的なThorough QT/QTc試験とその後の試験からなる。その後

の試験(II相以降に行われる試験)はThorough QT/QTc試験結果が陽性ならば、重点的なQT/QTc試験、陰性ならばperiodicなECG評価を行うとしている。Thorough QT/QTc試験の目的は薬剤がQT/QTc延長により検出される心室再分極における閾値を越す作用があるかどうか決定することであり、薬剤に催不整脈があることを特定することではない、即ち陽性であることが催不整脈陽性と決定することではないとしている。一方、非臨床評価との関連性に関しての記載に関しては「Thorough QT/QTc study」が陰性であるが、利用しうる非臨床データが強い陽性であるという極めて異例なケースがありうる。もしこの矛盾が他のデータによって説明出来ない場合で、かつ本薬の薬理的懸念のあるクラスの場合、その後の医薬品開発段階に拡大ECG安全性評価が必要とされるであろう。」以外は記載していない。この意味は最終的に非臨床評価の(陰性に関する予測性に関して懸念が拭えないが)陽性に関しては信頼できるとの判断と取れる。ステップ4のE14では、Thorough QT/QTc試験の前にあるべき非臨床QT評価試験については触れていない。QT延長評価に関するICHガイドラインは臨床E14と非臨床S7Bからなっており、両ICHガイドラインは当初から密接に関連したものとされていたが、本来S7BガイドラインはQT延長に基づく致死的不整脈リスクの潜在的可能性の評価を目的としており、その成績から臨床におけるQT延長リスクに関して陽性、陰性を判断する評価法ではない。従ってICHステップ4 S7B文書をE14とは独立した文書と見なして作成した。S7Bガイドラインの開発は当初医薬品によるTdP等の心臓の致死的不整脈誘発リスクの予測的評価を目的に検討が行われたものであり、背景には、テルフェナジン等によるTdP惹起による死亡事例等の発生がある。これらの薬剤には心臓の再分極を遅延させる作用があることが報告されている。非抗不整脈薬の心臓の再分極を遅延させる作用は体表心電図のQT間隔の延長として測定される。心臓の再分極の遅延により、不整脈、その最も顕著なものとしては(心室細動に変化し、続いて突然死に至る可能性のある)TdPを発生させやすく、他の心室性不整脈をも引き起こす可能性がある。QT延長の程度は催不整脈性のリスクに対する不完全なバイオマーカーの一つであるが、QT延

長とTdPのリスクとの間には、特にQT/QTc間隔の真の延長をきたす薬剤においては定性的な関連性があるとされている。薬物性TdPの発症頻度は極めて低く、患者の内因性及び外因性因子が関与していると考えられており、臨床試験によりリスク評価を行う必要があるとの議論には、このような背景がある。平成16年の改定ステップ2 S7B⁵⁾における最大の問題は臨床評価における非臨床試験の役割におけるRegional differenceの容認であり、PublicコメントもRegional differenceおよびそれから生じる実施上の問題に集中していた。今回ステップ4に進めた理由はステップ2 E14における非臨床データの取り扱いに関するRegional differenceの記載が削除されたことにある。非臨床データの取り扱いに関するRegional differenceは非臨床試験が臨床におけるQT間隔延長のリスクを予測、除外できるか、出来ないか、S7B EWGとE14FDA間に、実質的には日本およびEUの2極とUS-FDA間に大きな認識の差により生じたものである。今回も、FDAの認識は変わらなかったと思うが、ステップ4 E14文書では否定的な文章は削除された。本会議ではS7B EWGは非臨床データの科学的解析に基づき、非臨床試験はヒトにおいてTdPを起こす可能性のある薬剤のQT延長を検出するに十分な感度を有していることを再度主張した。またワシントンでの公聴会における反応からもQTリスク評価についての非臨床安全性試験ガイドラインは必要であるという認識の基に3極から収集したコメントを論議し、ステップ4文書としての完成作業を遂行した。最終的なE14文書では“Thorough QT/QTc試験が陰性であり、非臨床データがstrongly陽性である極めて特異な状況の場合には”と限っているが、言い換えれば“Thorough QT/QTc試験が陰性の場合には非臨床試験の結果が必要であることになり、臨床評価において、非臨床試験が必要であることを認めているとS7B EWGは解釈した。その結果、S7B EWGは直ちにS7B文書中のRegional differenceに触れる部分を削除あるいは修正しステップ4文書を完成した。

本会議で討議したPublic commentからの主要な項目を挙げるとRegional differenceに関わる重要な項目として非臨床試験のtimingがある。S7B EWGは非臨床結果は統合的リスク評価の一部として、その後の臨床試験

の計画や解釈を支えるものとなりうるという考えから、ヒトに初めて投与する前に試験を行うことを配慮すべきとした。次にRegional differenceに関わるもう一つの重要な項目としてGLPの適用がある。QT間隔延長リスクは生命維持機能における医薬品の重篤な作用の評価であり、かつ十分に管理された試験が必要であるとの考えから、S7BEWGは原則GLPの適用が望ましいと考えており、GLPの理念と推奨についてはS7Aと同様に考えるものとした。コメントでは更にGLPに関して具体的に示すことを望んでいたもので、インビトロIkrとインビボQTアッセイに関しては行政への提出を行う場合にはGLPに従う必要があり、Follow up試験に関しては出来るだけ従うとした。文中に「規制上提出するために遂行する場合には」という難解な表現があるが、申請用の非臨床安全性試験はGLPに従う必要があるということである。目的がQT評価以外の例えば、In vitro Ikrアッセイ等によくあるように、薬力学的作用のスクリーニングあるいは安全性モニタリング等、他の目的がある場合で、安全性薬理試験として申請しない試験はGLPに従って行う必要はないということである。もう一つ意味があり、その意味は非臨床QT評価試験を行政が要求する場合（地域）があり、その場合はGLP試験であるべきであり、別に行政が要求しないことがはっきりしている場合（地域）ではどちらでも良いという解釈も含んでいる。他に主な修正として、統合的リスク評価における考察項目であるSafety marginがある、非臨床試験における再分極作用を引き起こす用量もしくは血中濃度と推定治療用量もしくは血中濃度の比をsafety marginと称するのには疑問があるとし、より、事実に近い再分極作用に関連する曝露と非臨床試験動物における主たる薬力学作用あるいはヒトにおける計画治療効果に関連する曝露との間の相関性に変更した。QT補正に関してもコメントでは具体的指定が望まれたが、一概に指定することは出来ないとし、補正における注意を記載した。その他のPublic commentも討議し、その討議およびE14でのS7Bに関する最終的記述に基づいて、S7Bドキュメント中の記述を削除、修正しステップ4として合意に至った。

E14におけるS7Bデータの価値として、S7B試験の目的には、被験物質の再分極遅延の可能性の検出と共に、

その濃度と遅延作用の度合いを関連づけることとしており、薬効薬理および毒性試験から得られた情報と共にこの情報をヒトリスクの見積りに用いることが出来、臨床試験デザインを先導するものと記述した。ICH QT延長評価ガイドラインはそのままに受け取ると、インビボ並びにインビトロアッセイからなる非臨床試験および非臨床評価とThorough QT/QTc試験およびその後のECG試験からなる臨床評価によるQT評価を推奨している形になっている。臨床E14と非臨床S7Bは密接に関連しているが、根底に臨床評価が主、非臨床評価は従という認識がある。ICHステップ4では非臨床および臨床QT延長評価ガイドラインは、意図的に地域差を受け入れられる妥協表現にしている。QT延長評価に関わる試験について実施上の問題が残っている。QT延長評価に関して、非臨床評価の役割を認めるか、認めないかにより、実施上の解釈の自由が残っている。日本およびEUは非臨床QT評価の役割を認め、“Thorough QT/QTc study”が不必要なケースありとし、非臨床評価が場合により臨床試験の一部を軽減しうる場合がある、あるいは将来軽減しうると考えている。FDAは臨床評価を非臨床評価よりもはるかに重きを置いており、Through QT/QTc試験は全てのケースに必要であり、非臨床QT評価試験が不必要あるいは不必要なケースがあると解釈する可能性が高い。この評価試験の実行(Implementation)上の問題に関しては今後IWG(Implementation Working Group)で調整し、Q&Aの形で解決することになっている。今後の問題としては実施上での3極での摺り合せがあるが、主に臨床E14についてIWG会議におけるQ&Aで対応することが合意されており、非臨床メンバーも参加する。日本の立場では非臨床試験が一部の臨床試験の代替となることが望ましく、Follow up試験法を含め、非臨床試験法の進展に繋がるデータの作成が期待される。QT評価の分野は医薬品開発における近年の大きな関心も加わり、実用的な技術進歩が期待される状況であり、将来、追加データの蓄積により評価戦略の見直しと改訂をICHでは考慮に入れている。他に残された問題としては、非臨床評価試験系におけるリスク判断基準、特に心室再分極遅延リスク陰性基準に関する学会における検討、臨床評価におけるQT延長リスクの陰性および陽性基

準に関する学会における検討が必要である。非臨床試験のTdPリスク予測性と感度について日本製薬協QTPRODUCTプロジェクトおよびILSI/HESIのデータを中心として検討しており、その際に用いた薬物のTdPリスクに基づくクラス分け²⁾を基として評価している。結果から、TdPリスクの可能性はあるとされるカテゴリー2から恐らくあるとされる3までの陽性薬物はほとんどがIn vitro系で陽性であり、In vivoアッセイでは全て陽性という結果である。TdPリスクの可能性はないことはないが極めて弱いと予想されるカテゴリー4およびカテゴリー外の陰性物質は少なくともIn vivoでは陰性であり、一部がIn vitro系で陽性である。結論として、In vitro系ではQT延長リスクを高い感度で検出でき、In vivoアッセイではTdPリスクを高い感度で検出できる。In vivoアッセイで結果が陰性ならば、TdPリスクはほとんどないと考えられる。しかし、E14で重要なのはQT延長効果の陰性判断であり、今回の非臨床試験法の検討ではカテゴリー4以下の化合物の検討例が少ない。しかしながら、さらに例数を増やすあるいは研究結果を積み重ねることにより、陰性基準が明確になってくることが期待される結果が得られている。ICHでは両ガイドライン共に将来改訂の余地があることを認めており、将来の改訂にはこれらの(非臨床および臨床)追加的データの蓄積が期待されている。

E. 結論

本年度の成果はRegional differenceの容認により臨床E14に矛盾しない形で非臨床S7B文書がステップ4に到達したことである。本ICH(日米EU医薬品規制調和国際会議)薬剤性QT延長症候群に関する安全性評価法ガイドラインの検討は、平成13年から「医薬品に関する非臨床安全性薬理試験(S7A)」における心機能の非臨床評価試験の追加検討(ICH-S7B)として開始し、平成14年度から、臨床評価の検討(E14)が開始されると共に、相互の役割を合同で協議してきた。その結果、本年、平成17年5月のICHブリュッセル会議にて、それぞれICHステップ4文書(「ヒト医薬品の心室再分極時間遅延(QT間隔延長)作用の潜在的可能性に関する非臨床評価」(S7B)及び「非抗不整脈薬のQT/QTc間隔の延長及び催不整脈作用の潜在的可能性の臨床評

価」(E14))として合意に至ったものである。しかしながらステップ4に至ったとはいえ、臨床QT評価戦略における非臨床QT評価戦略の役割に関して、必ずしも3極間の見解は一致していない。日本とEUは臨床評価における非臨床評価成績の活用について比較的重視しているが、FDAは重視していない。とはいえ、近い将来、臨床および非臨床QT評価ガイドラインに基づいた評価が実施される。その際に臨床および非臨床評価試験成績提出要求に3極間で差がある可能性があるが、国内においては非臨床試験は要求される予定である。日米欧で予想される実施上の問題については、申請資料作成等において問題が起こる可能性は残されており、今後IWGでQ&Aの形で解決すべく協議を行うことが決定している。

G. 研究発表：

1. 論文発表

1. 藤森観之助、坂本純：薬剤性QT延長症候群に関する行政の国際動向。心臓、投稿中
2. Jean-Pierre Valentin, Alan S. Bass, Aisar Atrakchi, Klaus Olejniczak and Kannosuke Fujimori : Challenges and lessons learned since implementation of the safety pharmacology guidance ICH S7A. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods*, 52 (2005) 22-26
3. Nakazawa, K. and Ohno, Y. Characterization of Voltage-dependent Gating of P2X2 Receptor/channel. *Eur. J. Pharmacol.* 508, 23-30 (2005)

2. 学会発表

1. 藤森観之助：非臨床QT評価ガイドライン (S7B) について。ICH即時報告会 (平成17年6.21)
2. 藤森観之助：ミニシンポジウム創薬におけるQT延長の評価法と今後の展望：QT延長の評価法について評価の進め方と今後の問題。第113回日本薬理学会 関東部会 (平成17年10.1)

H. 参考資料

1. 2002 Arizona CERT: www.Torsades.Org
2. Redfen W. S., L. Carlson, A.S.Davis, W.G.Lynch, L. MacKenzie, S. Palethorpe, P.K.S. Siegl, L.Strang, A.T.Sullivan, R.Wallis, A.J.Camm, T.G.Hammond: Relationships between preclinical cardiac electrophysiology, clinical QT interval prolongation and torsadw de pointes for a broad range of drugs: evidence for a provisional safety margin in drug development. *Cardiovascular Res.* 58, 32-45, 2003
3. 特集QTPRODUCT、*J. Pharmacol. Sci* 99, 421-541, 2005
4. 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
5. 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

(資料1)

ヒト用医薬品の心室再分極遅延 (QT間隔延長) の潜在的可能性に関する非臨床的評価

目次

1. 序論

- 1.1 ガイドラインの目的
- 1.2 背景
- 1.3 ガイドラインの適用範囲
- 1.4 一般原則

2. ガイドライン

- 2.1 S7B試験の目的
- 2.2 試験の選択および計画における配慮
- 2.3 非臨床試験の計画
 - 2.3.1 *In vitro* I_{Kr} 測定
 - 2.3.2 *In vivo* QT測定
 - 2.3.3 化学的/薬理学的分類
 - 2.3.4 適切な臨床・非臨床情報
 - 2.3.5 フォローアップ試験
 - 2.3.6 統合的リスク評価
 - 2.3.7 リスクの裏付け
- 2.4 臨床開発に関連したS7B非臨床試験および統合的リスク評価の実施時期

3. 試験系

- 3.1 試験系に関する配慮事項
 - 3.1.1 陽性対照物質及び比較対照化合物の使用
 - 3.1.2 *In vitro*電気生理学的試験
 - 3.1.3 *In vivo*電気生理学的試験
 - 3.1.4 病態モデルと不整脈

1. 序論

医薬品が心室再分極、および催不整脈リスクに及ぼす影響の評価については、活発に研究が行われている。今後、非臨床および臨床のデータが追加的に蓄積されれば、それらを経験の上、本ガイドラインは改訂されることがある。

1.1 ガイドラインの目的

本ガイドラインでは、被験物質が心室再分極を遅延

させる可能性を評価するための、非臨床試験の計画 (strategy) について述べる。本ガイドラインには、非臨床試験法および統合的リスク評価に関する情報が含まれる。

1.2 背景

心電図のQT間隔 (QRS complexの開始からT波終了までの時間) は心室の脱分極および再分極の持続時間を表す指標である。QT間隔の延長は先天的あるいは後天的 (例えば医薬品誘発性) に起こり得る。心室再分極が遅延しQT間隔が延長すると、特に他の危険因子 (例えば、低カリウム血症、器質的変化を伴う心疾患、徐脈) と合併した場合には、トルサード・ドゥ・ポワンを含む心室性頻拍発生のリスクが増加する。そのため、QT間隔の延長に関連する医薬品の潜在的な催不整脈作用が重要視されている。

心臓の活動電位の持続時間として求められる心室の再分極は、複合的な生理学的過程により形成されている。それは多くの膜イオンチャネルおよびトランスポーターの活動の総和として現れる結果である。生理的条件下において、これらイオンチャネルおよびトランスポーターの機能は高度に相互依存している。それぞれのイオンチャネルあるいはトランスポーターの活性は、細胞内外のイオン濃度、膜電位、細胞間電氣的共役、心拍数、自律神経系活動を含む様々な要因によって影響を受ける。代謝状態 (例えば酸-塩基バランス) や心筋細胞の位置する部位、および種類もまた重要である。ヒトの心室の活動電位は連続する5つの相から形成される：

- ・第0相：活動電位の立ち上がりに相当し、主にナトリウムチャネルを介したナトリウムイオン (Na^+) の急速な一過性の流入 (I_{Na}) による。
- ・第1相：活動電位の立ち上がりの終わりから早期再分極相に相当し、ナトリウムチャネルの不活性化とカリウムチャネルを介した一過性のカリウムイオン (K^+) の流出 (I_{to}) の結果として生じる。
- ・第2相：活動電位のプラトー相に相当し、Lタイプのカルシウムチャネルを介したカルシウムイオン (Ca^{2+}) の流入 (I_{Ca}) と外向き再分極 K^+ 電流との間の均衡を反映する。

- ・第3相：活動電位の持続的な下向き波形と後期再分極相に相当し、遅延整流カリウムチャンネルを介した K^+ 流出 (I_{Kr} および I_{Ks})の結果として生じる。
- ・第4相：内向き整流カリウム電流 (I_{K1})による静止電位の維持

活動電位を延長させ得る要因として、内向きのナトリウムあるいはカルシウム電流の不活性化の減少、カルシウム電流の活性化の増大、あるいは一つ以上の外向きのカリウム電流の抑制がある。急速並びに緩徐に活性化する遅延整流カリウム電流すなわち I_{Kr} と I_{Ks} は、活動電位の持続時間、つまりQT間隔の決定に最も影響を与える要因であると考えられる。ヒトether-a-go-go関連遺伝子 (hERG) およびKvLQT1遺伝子は、チャンネル孔を構成するタンパク質KCNH2およびKCNQ1をそれぞれコードしており、それらのタンパク質はそれぞれ、 I_{Kr} および I_{Ks} 電流の経路となるヒトカリウムチャンネルの α サブユニットに相当すると考えられる。これらの α サブユニットタンパク質は、チャンネルタンパク質のゲート開閉特性を調節すると考えられている補助的な β サブユニット (すなわちMiRPおよびMinK遺伝子産物) と共にヘテロオリゴマー複合体を形成する。医薬品によるQT間隔延長の最も一般的な機構は、 I_{Kr} を発生させる遅延整流カリウムチャンネルの抑制である。

1.3 ガイドラインの適用範囲

このガイドラインは、「ヒト医薬品のためのICH安全性薬理試験ガイドライン (ICH S7A) を拡大適用し、補完するものである。本ガイドラインは、ヒトに使用される新しい化学物質、および該当する場合には (例えば、临床上の有害事象、新しい患者集団、あるいは新たな投与経路により、それまで対処されたことのない問題が浮上した場合) 市販後の医薬品にも適用する。試験が不要とされる条件については、ICH S7Aに記載されている。

1.4 一般原則

ICH S7Aに記載されている理念と推奨事項は、本ガイドラインに従って実施される試験にも適用される。規制当局へ提出するために、2.3.1節の*In vitro* I_{Kr} 測定および2.3.2節の*In vivo* QT測定を行う場合は、医薬品の安

全性に関する非臨床試験の実施の基準 (GLP) に従うべきである。2.3.5節に記載されたフォローアップ試験の実施においても、GLPには可能な限り最大限従うべきである。

*In vitro*および*In vivo*試験は相補的アプローチである。そのため、現在の知見に基づいて考えれば、両方のタイプの試験が実施されるべきである。

研究アプローチおよびリスクの裏付けは、被験物質の薬力学、薬物動態学、および安全性プロファイルに基づいて、被験物質ごとに個別に検討されるべきである。

2. ガイドライン

1.5 S7B試験の目的

試験の目的は、1) 被験物質とその代謝物の心室再分極を遅延させる可能性を検出すること、並びに2) 親化合物およびその代謝物の濃度と心室再分極遅延の程度を関連づけることである。この試験結果は、それらの作用機序を明らかにするため、並びに他の情報も考慮に入れた場合には、ヒトにおける心室再分極遅延およびQT間隔延長のリスクを算定するために使用することが可能である。

1.6 試験の選択および計画における配慮

非臨床試験では、以下の事項を検討することができる：

- ・動物あるいはヒトから単離された心筋細胞、培養心筋細胞、またはクローン化されたヒトのイオンチャンネルの異種発現系において測定されるイオン電流
- ・摘出された心臓標本における活動電位パラメータあるいは麻酔下動物における活動電位持続時間を示す特定の電気生理学的パラメータ
- ・覚醒下あるいは麻酔下動物において記録される心電図パラメータ
- ・摘出心臓標本あるいは動物で測定される催不整脈作用

上述の通り、これら4つの機能レベルは*In vitro*試験あるいは*In vivo*試験、またはその両者を用いて検討することができる。上記の機能レベルから得られた知見は有用で相補的なものと考えられる。