

Fig. 1. The protective effect of ATRA on OGD/Rep-induced damage of neurons in the organotypic hippocampal slice culture. (A) A schematic diagram of the experimental protocol. Hippocampal slices were treated with ATRA 24 h before OGD and during Rep. The slices were subjected to OGD for 40 min followed by 24 h Rep. (B) The protective effect of ATRA on neurons in hippocampal slices. (a) NeuN staining of control slices. Incubation period for 12 days did not affect the NeuN staining of hippocampal slices. (b) OGD/Rep-induced neuronal loss. OGD/Rep dramatically decreased NeuN staining in hippocampal slices. (c–e) Effect of ATRA on the OGD/Rep-induced decrease of NeuN staining in hippocampal slices. At 1 nM, ATRA did not have a significant effect on NeuN staining decreased by OGD/Rep (c). At ≥ 10 nM ATRA prevented the decrease in NeuN by OGD/Rep (d, 10 nM; e, 100 nM). (f) The protective effect of ATRA after OGD. ATRA (100 nM) after OGD also had protective effects. Scale bar = 500 μ m. (C) DNA damage associated with the OGD/Rep-induced decrease in NeuN. In control, ssDNA signals were hardly detected (left, upper panel). OGD/Rep increased ssDNA signals (center, upper panel), which were shrunken and merged with NeuN signals (center, lower panel, arrows). ATRA prevented the changes in NeuN signals (right, middle panel) and reversed the increased ssDNA signals (right, upper panel). (D) OGD/Rep activates caspase-3 in neuronal cells. In control, the signals for active caspase-3 were barely detected (left, upper panel). OGD/Rep induced an increase in active caspase-3 (center, upper panel), which was colocalized with NeuN signals (center, arrows). ATRA prevented the OGD/Rep-induced changes in NeuN and active caspase-3 (right, middle and upper panels). Scale bar = 20 μ m.

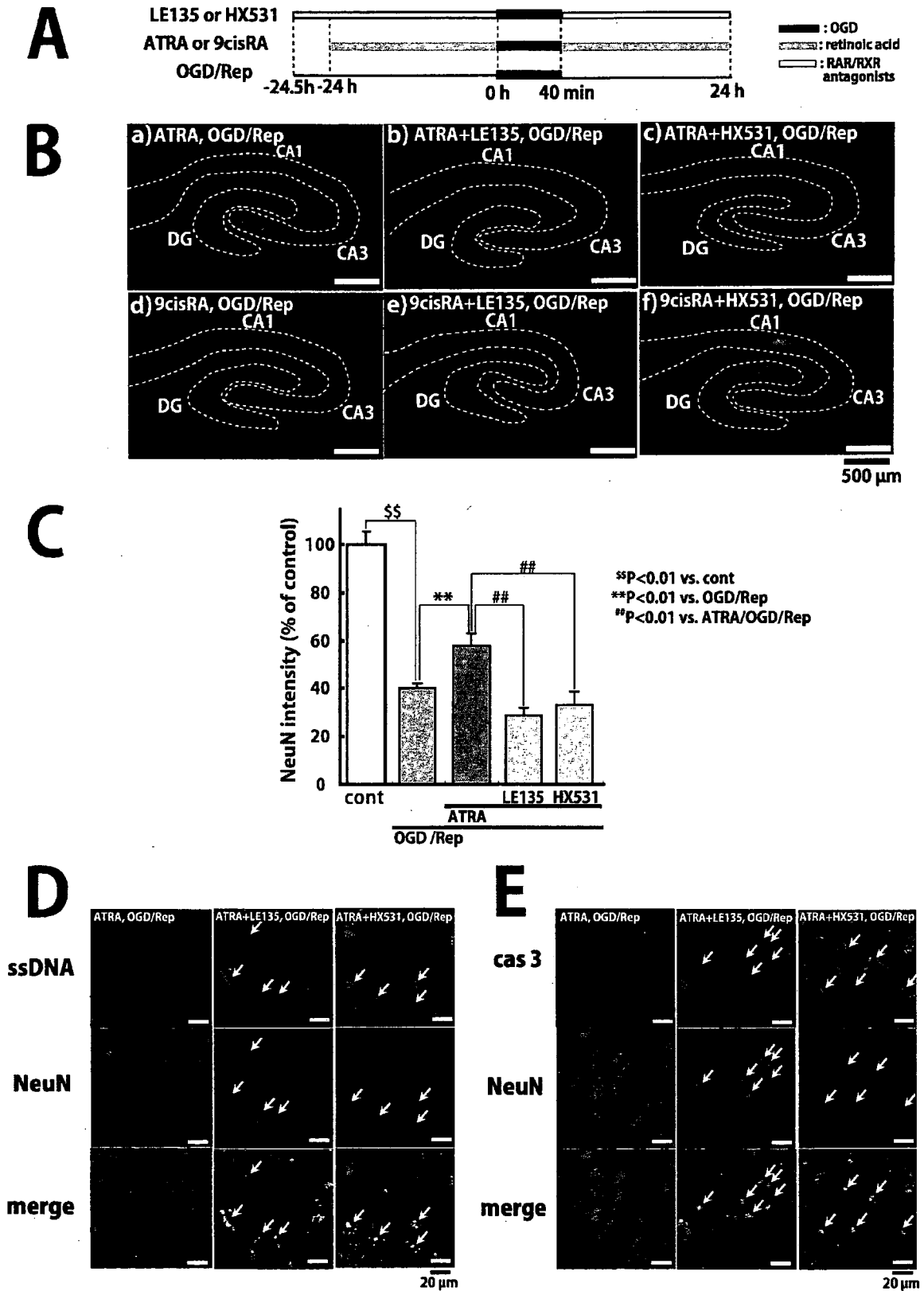


Fig. 2. The inhibitory effect of RAR/RXR antagonists on the RA-induced protective effect. (A) A schematic diagram of the experimental protocol. Hippocampal slices were treated with RAs (ATRA or 9-*cis* RA) 24 h before OGD and during Rep. Antagonists for RAR and RXR were added to the culture medium 30 min before and during RA treatment. The slices were subjected to OGD for 40 min and Rep for 24 h. (B) RAR/RXR antagonists inhibit the neuroprotective effect of RA. The effect of ATRA (a) was inhibited by both RAR antagonist LE135 (1 μ M) (b) and RXR antagonist HX531

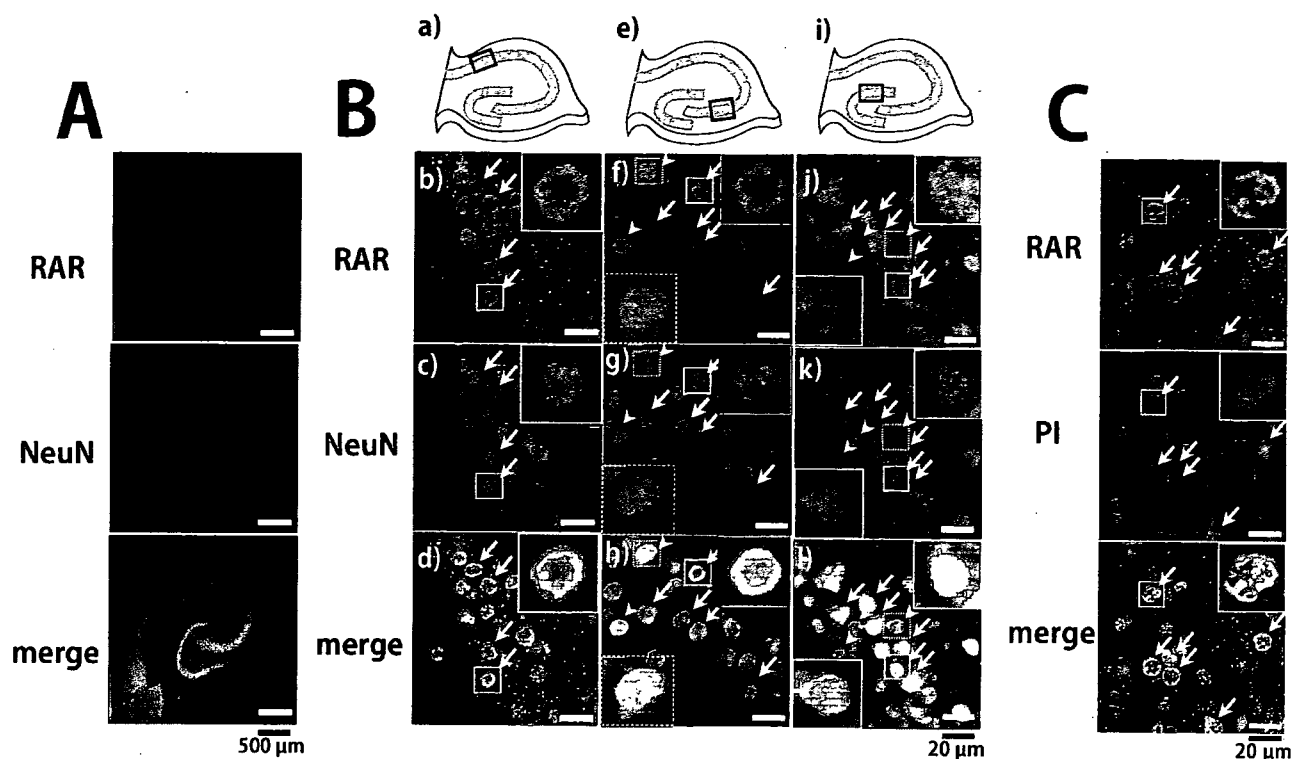


Fig. 3. Subregional expression pattern of RAR in the hippocampus. (A) Immunostaining for RAR showed a neuronal cell layer-like pattern in CA1 to CA3 and in DG (upper panel). The RAR signals were clearly colocalized with those for NeuN (lower panel). Scale bar=500 μm. (B) Differences in the expression pattern of RAR between subregions of the hippocampus. Images in b–d were obtained from the CA1 region indicated by the square in a. The signals for RAR appeared in ring-forms in CA1 (b; arrows). The signals for NeuN (c) were colocalized with those for RAR (d). Images in f–h were obtained from the CA3 region indicated by the square in e. In the CA3 region, RAR signals were mainly in ring-forms (f; arrows) but a few were in diffusion-forms (f; arrowheads), which were colocalized with those for NeuN (g, h). Images in j–l were obtained from the DG region indicated by the square in i. The RAR signals in DG were observed mainly in diffusion-forms (j; arrows) with a few RARs in ring-forms (j; arrowheads), which were colocalized with the NeuN signals (k, l). (C) RARs exist in the nucleus. RARs in CA1 were colocalized with PI signals (arrows). The insets show high-magnified images of square-selected region. Scale bar=20 μm.

Quantification of the immunostaining

The intensity of NeuN, which is not only a marker for neuronal nuclei but also for neuronal viability in hippocampus (Nakatomi et al., 2002; Liu et al., 2004; Gao et al., 2005), was quantified using Image J software (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) (Lyuksytova, 2003; MacDonald, 2006). The center parts of the neuronal cell layers from CA1 to CA3 or dentate gyrus (DG) were traced and analyzed (analysis-measure) by "line selection from tool bar" and the NeuN intensity was measured by "Analysis-measure" from the menu bar. The mean value was employed as the intensity of the signal.

Statistics

Data were expressed mean±S.E.M. unless otherwise indicated. Data were analyzed for statistical significance by ANOVA followed by Student-Neuman-Keuls post hoc test. Significance was imparted at the $P<0.05$ level.

RESULTS

The protective effect of RA on OGD/Rep-induced neuronal loss of hippocampal slice

Fig. 1A shows the experimental procedure in the present study. The neuronal cell layer of hippocampal slice cultures 12 days after dissection from 11-day-old rats is shown in Fig. 1B(a). The neuronal cell layer was confirmed by immunohistochemistry using an antibody against NeuN. OGD for 40 min and Rep for 24 h shrank the NeuN signal, which also decreased its intensity significantly (Fig. 1B(b)). Hippocampal slices were treated with ATRA 24 h before OGD/Rep. The decrease in the NeuN signal intensity by OGD/Rep was prevented by ATRA at ≥ 10 nM (Fig. 1B(c–e)). In addition to the pre-treatment, post-treatment with ATRA

(1 μM) (c). 9-*cis* RA also showed the protective effect on neuronal cells against OGD/Rep-induced damage (d). The protective effect of 9-*cis* RA was inhibited by LE135 (1 μM) (e) and HX531 (1 μM) (f). Scale bar=500 μm. (C) Quantification of the signals for NeuN. OGD/Rep decreased the NeuN intensity to 40% of the controls, which was restored to 60% by ATRA (100 nM, 24 h). The effect of ATRA was offset by LE135 (1 μM) or HX531 (1 μM). Values were expressed as mean±S.E.M. ($n=6-8$). $^{**}P<0.01$ vs. control. $^{**}P<0.01$ vs. OGD/Rep. $^{***}P<0.01$ vs. ATRA/OGD/Rep. (D) RAR/RXR antagonists aggravate DNA damage of neurons. The ATRA-mediated inhibition of the OGD/Rep-increased ssDNA signals (left, upper panel) as well as on the shrinkage of NeuN (left, middle panel), was diminished in the presence of LE135 (1 μM; center) or HX531 (1 μM; right). Signals for NeuN were colocalized with ssDNA signals (lower panels, arrows). (E) RAR/RXR antagonists aggravate caspase-3 activation by OGD/Rep. The inhibitory effect of ATRA on the OGD/Rep-induced increase in active caspase-3 (left, upper panel) was diminished in the presence of LE135 (1 μM; center) or HX531 (1 μM; right). NeuN (middle panels) was colocalized with active caspase-3 (lower panels). Scale bar=20 μm.

after OGD was also cytoprotective (Fig. 1B(f)). As DNA damage is a marker of ischemia-induced neuronal cell death (Kawase et al., 1999) and caspase-3 activation (Chen et al., 1998), we employed antibodies for ssDNA and active caspase-3. In the negative controls without OGD/Rep, immunostaining for ssDNA was hardly detected (Fig. 1C left, upper panel). After the OGD/Rep, the immunostaining for ssDNA was significantly enhanced (Fig. 1C center, upper panel). The NeuN signals were detected in ssDNA-positive cells and shrunken (Fig. 1C center, arrows). ATRA prevented not only the increases in ssDNA signals but also the decrease in NeuN and its shrinkage (Fig. 1C right). Cells positive for active caspase-3 were detected after OGD/Rep but not in the controls without OGD/Rep (Fig. 1D, upper panels). The signals for active caspase-3 in the OGD/Rep group were colocalized with the NeuN signals. ATRA prevented caspase-3 activation, as well as the shrinkage of NeuN signals (Fig. 1D, right).

The inhibitory effect of selective RAR and RXR antagonists on the ATRA-induced neuroprotection against OGD/Rep

We next examined whether the protective effect of ATRA was mediated by RAR and/or RXR. Hippocampal slices were treated with ATRA 24 h before OGD and during Rep

(Fig. 2A). Antagonists for RAR and RXR were added to the culture medium 30 min before ATRA treatment. As shown in Fig. 2B, both a specific RAR antagonist LE135 (1 μ M) and a specific RXR antagonist HX531 (1 μ M) inhibited the protective effect of ATRA (100 nM, 24 h) (Fig. 2B(b, c)). In addition, 9-*cis* RA (100 nM) had a protective effect against OGD/Rep-induced neuronal death (Fig. 2B(d)), which was reversed by LE135 (1 μ M) or HX531 (1 μ M) (Fig. 2B(e, f)). LE135 and HX531 alone did not attenuate the NeuN signal in hippocampal slices (data not shown). Based on quantitative analyses using the Image J program, OGD/Rep appeared to decrease the intensity of the NeuN signal to 40% of the controls (Fig. 2C). ATRA (100 nM) significantly inhibited the effect of OGD/Rep on the NeuN intensity, which was reversed by LE135 (1 μ M) and HX531 (1 μ M). To confirm that the effect on NeuN reflected the cytoprotective activity of ATRA, hippocampal slices were simultaneously stained with specific antibodies for NeuN, ssDNA and active caspase-3. As shown in Fig. 2D and E, LE135 and HX531 also offset the inhibitory effect of ATRA on the signal intensities for ssDNA and active caspase-3 in the slices treated with OGD/Rep. Thus, the intensities for ssDNA and active caspase-3 were negatively associated with the abundance of NeuN.

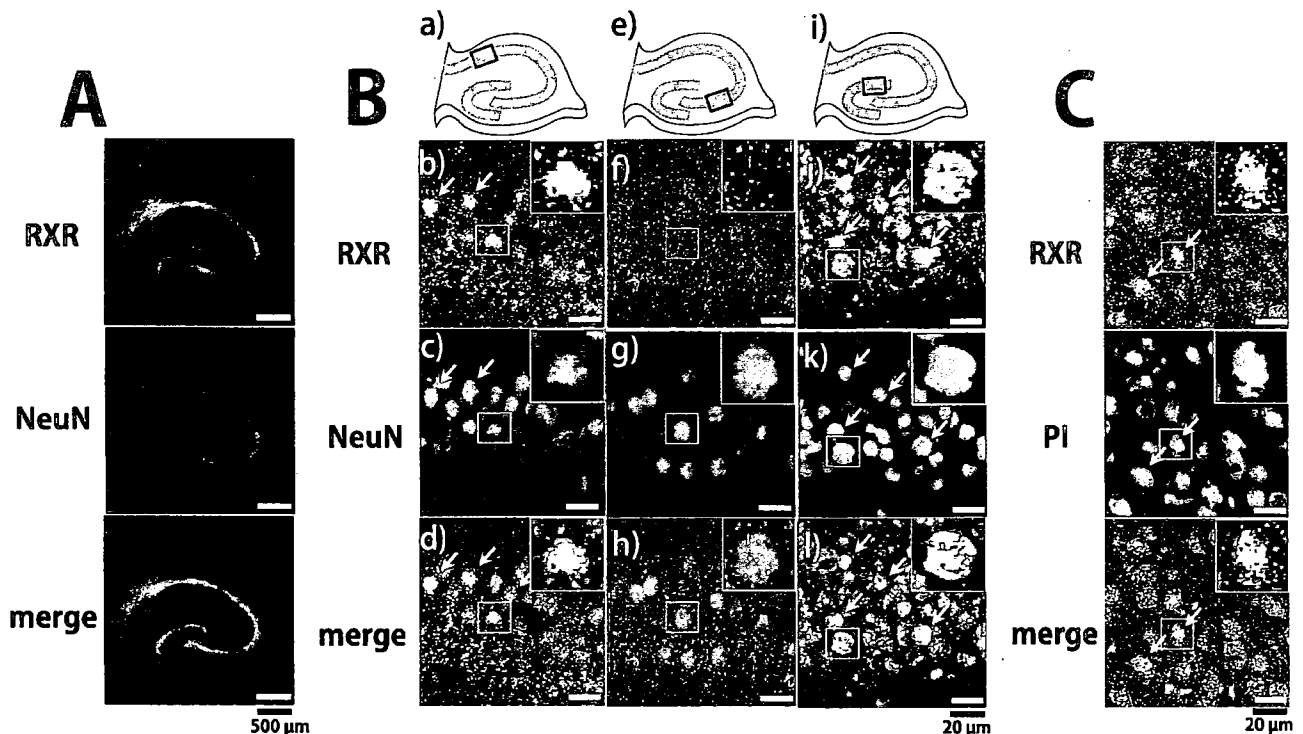


Fig. 4. Subregional expression pattern of RXR in the hippocampus. (A) Immunostaining for RXR showed neuronal cell layer-like pattern in CA1 to CA3 and in DG (upper panel). The signals for RXR were colocalized with those for NeuN (lower panel). Scale bar=500 μ m. (B) Differences in the expression pattern of RXR between subregions of hippocampus. Images in b–d were obtained from the CA1 region indicated by the square in a. The signals for RXR appeared in diffusion-forms in CA1 (b; arrows). The signals for NeuN signals (c) were colocalized with those for RXR (d). Images of f–h were obtained from the CA3 region indicated by the square in e. In contrast to CA1, the RXR signals were barely detectable in CA3 (f), though they were colocalized with the NeuN signals (g, h). Images in j–l were obtained from the DG region indicated by the square in i. The RXR signals in DG were colocalized with those for NeuN (j–l, arrows). RXR-positive neurons were more frequent in DG, compared with CA1. (C) RXRs exist in the nucleus. RXRs in CA1 were colocalized with PI signals (arrows). The insets show highly magnified images of the square-selected region. Scale bar=20 μ m.

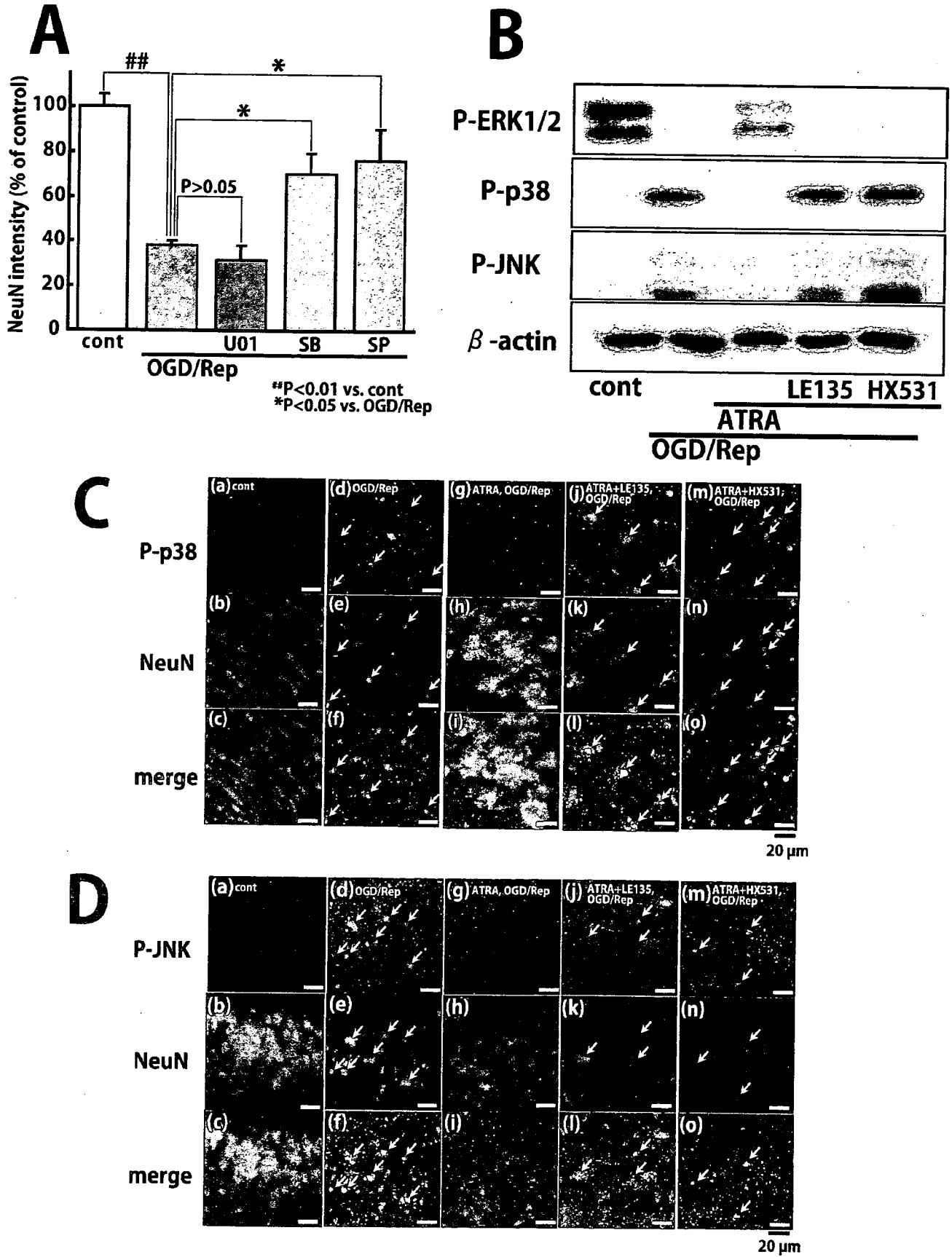


Fig. 5. (Caption overleaf)

Subregional differences of RAR and RXR expression in the hippocampus

To determine the expression of RAR and RXR in the hippocampus, we performed immunohistochemical analyses of the tissue slices using specific antibodies for RAR and RXR. In hippocampal slices fixed right after dissection from rat hippocampus, RAR was expressed in CA1 to CA3 and DG (Fig. 3A) and was colocalized with NeuN. Misner et al. (2001) have shown RA signaling activity in CA1, CA2, CA3 and DG of hippocampus, consistent with our results. RXR was also expressed in CA1 to CA3 and DG, and colocalized with NeuN (Fig. 4A). At higher magnification, subregional differences of RAR and RXR expression were observed in the hippocampus (Figs. 3 and 4). Diffused signals of RAR were observed in DG (Fig. 3B(j), arrows), and parts of them were in ring-formation (Fig. 3B(j), arrowheads). Almost all of RAR in square-selected region of CA3 (Fig. 3B(e)) were in ring-formation (Fig. 3B(f), arrows), and parts of them were in diffusion-forms (Fig. 3B(f), arrowheads). In the CA1 region, almost all of RARs were in ring-formation (Fig. 3B(b), arrows). The RXR signals from cells in CA1 and DG were dots diffused in the nucleus (Fig. 4B, arrows) and those in CA3 subregions were barely detectable (Fig. 4B, center). RAR and RXR were also colocalized with DNA-binding dye PI (Fig. 3C and Fig. 4C, arrows).

Inhibitory effect of ATRA on OGD/Rep-induced MAPK activation

As MAPKs have been associated with various physiological and pathological events including ischemia-induced neuronal cell death (Xia et al., 1995), we examined the role of MAPKs in the OGD/Rep-induced neuronal death, using specific inhibitors for subgroups of MAPK signaling. As shown in Fig. 5A, MEK1/2 (ERK kinase) inhibitor U0126 (10 μ M) had no effect on the decrease in NeuN after OGD/Rep. In contrast, both a p38 inhibitor, SB203580 (20 μ M), and a JNK inhibitor, SP600125 (20 μ M), significantly prevented the OGD/Rep-induced decrease in NeuN. Both inhibitors protected not only CA1 but also CA3 neurons (data not shown), suggesting that the two kinases were activated in both subregions after OGD/Rep. West-

ern blot analyses revealed that the OGD/Rep led to a decrease in P-ERK1/2 and increases in P-p38 and P-JNK. Pretreatment with ATRA (100 nM) prevented these changes in phosphorylated MAPKs, which were abolished in the presence of LE135 (1 μ M) or HX531 (1 μ M). To confirm whether OGD/Rep increased P-p38 and P-JNK in neuronal cells, immunohistochemical analyses were performed. In controls, signals for P-p38 and P-JNK were hardly detectable (Fig. 5C(a–c), 5D(a–c)), but seemed to exist in the cytoplasmic region. OGD/Rep enhanced the signals for both P-p38 and P-JNK, which were colocalized with the signals for NeuN (Fig. 5C(d–f), 5D(d–f), arrows). The NeuN signals were shrunk in OGD/Rep-treated slices, compared with the controls (Fig. 5C(b) and (e), 5D(b) and (e)). Pretreatment with ATRA (100 nM, 24 h) decreased the P-p38 and P-JNK signals, which were faintly detected around the NeuN signals (Fig. 5C(g–i) and 5D(g–i)). The shrinkage of the NeuN signal was also prevented by ATRA treatment. LE135 (1 μ M) and HX531 (1 μ M) inhibited the effects of ATRA (Fig. 5C(j–o), arrows and Fig. 5D(j–o), arrows).

DISCUSSION

In the present study, we demonstrated that ATRA induces a protective effect against OGD/Rep-induced damage in neurons from cultured hippocampal slices. The effect of ATRA was inhibited not only by a RAR antagonist but also by a RXR antagonist, indicating that ATRA-induced protection was mediated by RAR/RXR heterodimer. Selective RXR agonists and antagonists are known to synergistically enhance and inhibit activity of RAR in RAR/RXR heterodimers, respectively, and the opposite is observed in the case of RAR agonists and antagonists (Ebisawa et al., 1999). In the CA3 region, where ATRA had no neuroprotective activity, both a ring-formed and diffusion-formed distribution of RARs in the nucleus was found. However, a ring-formed as well as a diffuse-formed distribution of RARs mediated neuroprotection of ATRA in CA1 and DG, respectively, suggesting that the neuroprotective effect is independent of the pattern of RAR distribution. The signals for RXR were dots diffused in the nucleus. Unlike RAR that forms a heterodimer with RXR, RXR forms not only homo/heterodimers but also a homotetramer (Kersten et al.,

Fig. 5. The role of MAPK activation in the OGD/Rep-induced cell death of hippocampal neurons. (A) The effect of MAPK inhibitors on the OGD/Rep-induced decrease in NeuN. MEK1/2 inhibitor U0126 (10 μ M) had no effect on the decrease in NeuN by OGD/Rep. Both p38 inhibitor, SB203580 (20 μ M), and JNK inhibitor, SP600125 (20 μ M), significantly inhibited the OGD/Rep-induced decrease in NeuN. All the MAPK inhibitors were added to the culture medium during Rep. Values were expressed as means \pm S.E.M. of the fluorescent signal intensities for NeuN ($n=3$). (B) The effect of ATRA on OGD/Rep-induced changes in the levels of phosphorylated MAPKs. P-ERK1/2 was decreased by OGD/Rep, which was prevented by ATRA (100 nM, 24 h). The effect of ATRA on P-ERK1/2 was inhibited by LE135 (1 μ M) or HX531 (1 μ M). The increases in P-p38 and P-JNK, induced by OGD/Rep, were prevented by ATRA (100 nM, 24 h). The effects of ATRA on P-p38 and P-JNK levels were inhibited by LE135 (1 μ M) or HX531 (1 μ M). (C) Immunohistochemical analyses of p38 activation by OGD/Rep. In the controls, P-p38 was hardly detectable (a–c). The OGD/Rep led to an increase in the signals for P-p38 (d), as well as a shrinkage of the signals for NeuN (e; arrows). The P-p38 signals were colocalized with those for NeuN (f; arrows). The OGD/Rep resulted in the shrinkage of the NeuN signals (e; arrows). ATRA (100 nM, 24 h) prevented the increase in the P-p38 signals (g) and the shrinkage of the NeuN signals (h) after OGD/Rep. The effects of ATRA were inhibited by LE135 (1 μ M) (j–l) or HX531 (1 μ M) (m–o). The P-p38 signals were colocalized with signals for NeuN (l, o; arrows). (D) Immunohistochemical analysis of JNK activation by OGD/Rep. In the controls, P-JNK was hardly detectable in the NeuN-positive regions (a–c). In the areas of surrounding the NeuN signals, P-JNK signals were sparsely observed. P-JNK signals were significantly increased by OGD/Rep, which were colocalized with those for NeuN (d–f; arrows). ATRA (100 nM, 24 h) prevented the increase in P-JNK by OGD/Rep (g–i). The effect of ATRA was inhibited by LE135 (1 μ M) (j–l) or HX531 (1 μ M) (m–o). The P-JNK signals were colocalized with those for NeuN (arrows). ATRA (100 nM) was added to the slices 24 h before OGD and during Rep. LE135 (1 μ M) and HX531 (1 μ M) were added to the culture medium 30 min before ATRA treatment. Scale bar=20 μ m.

1995). Such differences in the multimeric structure may lead to the difference in the pattern of receptor distribution. In contrast to RAR, RXR was barely expressed in the CA3 region. Therefore, the lack of the synergistic effect of RXR in CA3 may explain the subregional difference in the cytoprotective effect of ATRA. In addition, 9-*cis* RA, an agonist for both RAR and RXR, also showed no protective effect on CA3, suggesting a deficiency in the receptor heterodimer activity in this region. Furthermore, degradation rates of RAs in CA3 may also contribute to their subregion-selective effects, because the RA degrading enzyme CYP26B1 is known to be strongly expressed in the CA3 region (Abu-Abed et al., 2002). According to the report of Misner et al. (2001), endogenous retinoid signaling is active throughout the hippocampus (i.e. CA1–CA3 and DG). However, they also showed that the retinoid signaling activity is the most potent in the DG, followed by CA1 and hilus, and relatively low in CA3, which is consistent with our results.

We found that ATRA potently inhibited the increases in activated forms of p38 (P-p38) and JNK (P-JNK) after OGD/Rep, which was offset by RAR or RXR inhibitors. In addition, inhibition of JNK and p38 activity by their specific inhibitors prevented neuronal damage by OGD/Rep, indicating the death-promoting functions of JNK and p38 in OGD/Rep. These findings suggest that ATRA, acting through RAR/RXR, protects hippocampal neurons from OGD/Rep stress, at least partly, by preventing the activation of JNK and p38. ATRA is known to increase the expression of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 (MKP-1), protecting mesangial cells from H₂O₂-induced cell death by dephosphorylation and inactivation of JNK and p38 (Konta et al., 2001). Recently, MKP-1 was found to primarily dephosphorylate JNK and p38, but not ERK1/2 (Wu and Bennett, 2005). Therefore, upregulation of MKP-1 is one possible mechanism in the neuroprotective effects of ATRA, observed in the present study. Recent studies have shown that molecules generally called “nuclear receptors” (i.e. RXR, TR and steroid hormone receptors) elicit non-genomic effects in response to their agonists (Hiroi et al., 2006; Wehling and Losel, 2006; Moraes et al., 2007). Additionally, ATRA is known to phosphorylate neuronal ERK in a nongenomic manner (Canon et al., 2004), which is consistent with its inhibitory effect on OGD/Rep-mediated ERK dephosphorylation. In the present study, selective RAR or RXR antagonists inhibited the neuroprotection by ATRA. Furthermore, ATRA applied after OGD was also neuroprotective. Therefore, it is also possible that ATRA protected hippocampal slices from OGD/Rep-induced cell injuries via the non-genomic action of RAR or RXR.

In contrast to JNK and p38, ERK1/2 mediates the pro-survival functions in staurosporine-treated neurons (Zhu et al., 2002). It has been suggested that BDNF is the mediator for the pro-survival effect of ERK1/2 (Han and Holtzman, 2000). ATRA is known to upregulate Trk B, the receptor for BDNF, NT-3 and NT-4/5, facilitating BDNF signaling (Kaplan et al., 1993; Kobayashi et al., 1994). Although the inhibition of endogenous ERK1/2 activity by a

MEK inhibitor did not facilitate cell death by OGD/Rep, ATRA inhibited an OGD/Rep-induced decrease in P-ERK1/2. Therefore, it is still possible that P-ERK1/2 also contributes to the neuroprotection of ATRA under OGD/Rep.

CONCLUSION

In conclusion, our results suggest that ATRA has a protective effect on hippocampal neurons against OGD/Rep-induced damages, by inactivating JNK and p38 via RAR/RXR heterodimers. As ATRA is a lipophilic molecule, orally applied ATRA can easily reach the CNS through blood–brain barrier (Crandall et al., 2004). Although relatively high concentrations of ATRA (10–100 nM) were necessary for the neuroprotection in our *ex vivo* model, they are achievable by an oral administration of ATRA not only in rats but also in humans in a clinical setting (Saadeddin et al., 2004; Muindi et al., 1992). Therefore, our findings provide new insights into clinical applications of ATRA for the treatment of CNS diseases such as stroke.

Acknowledgments—We thank Dr. Koichi Shudo for the gracious gift of LE135 and HX531, and we thank Tomoko Obama for technical assistance. We are grateful to Dr. Helen Kiriazis for critical reading of the manuscript. This study was partly supported by grants from National Institute of Biomedical Innovation (MF-16), from the Uehara Memorial Foundation, and from the Ministry of Health, Labor and Welfare of Japan, and grants-in-aid for Scientific Research (B) and (C), for Young Scientists (A) and on Priority Areas (A) from the Ministry of Education, Science, Sports and Culture of Japan.

REFERENCES

- Abu-Abed S, MacLean G, Fraulob V, Chambon P, Petkovich M, Dolle P (2002) Differential expression of the retinoic acid-metabolizing enzymes CYP26A1 and CYP26B1 during murine organogenesis. *Mech Dev* 110:173–177.
- Ahlemeyer B, Kriegstein J (1998) Retinoic acid reduces staurosporine-induced apoptotic damage in chick embryonic neurons by suppressing reactive oxygen species production. *Neurosci Lett* 246:93–96.
- Behrens A, Sibilio M, Wagner EF (1999) Amino-terminal phosphorylation of c-Jun regulates stress-induced apoptosis and cellular proliferation. *Nat Genet* 21:326–329.
- Boulton TG, Nye SH, Robbins DJ, Ip NY, Radziejewska E, Morgenbesser SD, DePinho RA, Panayotatos N, Cobb MH, Yancopoulos GD (1991) ERKs: a family of protein-serine/threonine kinases that are activated and tyrosine phosphorylated in response to insulin and NGF. *Cell* 65:663–675.
- Canon E, Cosgaya JM, Scsucova S, Aranda A (2004) Rapid effects of retinoic acid on CREB and ERK phosphorylation in neuronal cells. *Mol Biol Cell* 15:5583–5592.
- Chambon P (1994) The retinoid signaling pathway: molecular and genetic analyses. *Semin Cell Biol* 5:115–125.
- Chambon P (1996) A decade of molecular biology of retinoic acid receptors. *FASEB J* 10:940–954.
- Chen J, Nagayama T, Jin K, Stetter RA, Zhu RL, Graham SH, Simon RP (1998) Induction of caspase-3-like protease may mediate delayed neuronal death in the hippocampus after transient cerebral ischemia. *J Neurosci* 18:4914–4928.
- Chiang MY, Misner D, Kempermann G, Schikorski T, Giguere V, Sucov HM, Gage FH, Stevens CF, Evans RM (1998) An essential

- role for retinoid receptors RARbeta and RXRgamma in long-term potentiation and depression. *Neuron* 21:1353–1361.
- Corcoran J, So PL, Maden M (2002) Absence of retinoids can induce motoneuron disease in the adult rat and a retinoid defect is present in motoneuron disease patients. *J Cell Sci* 115:4735–4741.
- Crandall J, Sakai Y, Zhang J, Koul O, Mineur Y, Crusio WE, McCaffery P (2004) 13-cis-retinoic acid suppresses hippocampal cell division and hippocampal-dependent learning in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:5111–5116.
- de Urquiza AM, Liu S, Sjoberg M, Zetterstrom RH, Griffiths W, Sjovall J, Perlmann T (2000) Docosahexaenoic acid, a ligand for the retinoid X receptor in mouse brain. *Science* 290:2140–2144.
- Ebisawa M, Umeyama H, Ohta K, Fukasawa H, Kawachi E, Christoffel G, Gronemeyer H, Tsuji M, Hashimoto Y, Shudo K, Kagechika H (1999) Retinoid X receptor-antagonistic diazepinylbenzoic acids. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 47:1778–1786.
- Gao J, Duan B, Wang DG, Deng XH, Zhanf GY, Xu L, Xu TL (2005) Coupling between NMDA receptor and acid-sensing ion channel contributes to ischemic neuronal death. *Neuron* 48:635–646.
- Goodman AB, Pardee AB (2003) Evidence for defective retinoid transport and function in late onset Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:2901–2905.
- Guyton KZ, Liu Y, Gorospe M, Xu Q, Holbrook NJ (1996) Activation of mitogen-activated protein kinase by H₂O₂. Role in cell survival following oxidant injury. *J Biol Chem* 271:4138–4142.
- Han BH, Holtzman DM (2000) BDNF protects the neonatal brain from hypoxic-ischemic injury in vivo via the ERK pathway. *J Neurosci* 20:5775–5781.
- Haskell GT, LaMantia AS (2005) Retinoic acid signaling identifies a distinct precursor population in the developing and adult forebrain. *J Neurosci* 25:7636–7647.
- Herdegen T, Claret FX, Kallunki T, Martin-Villalba A, Winter C, Hunter T, Karin M (1998) Lasting N-terminal phosphorylation of c-Jun and activation of c-Jun N-terminal kinases after neuronal injury. *J Neurosci* 18:5124–5135.
- Hiroi Y, Kim HH, Ying H, Furuya F, Huang Z, Simoncini T, Noma K, Ueki K, Nguyen NH, Scanlan TS, Moskowitz MA, Cheng SY, Liao JK (2006) Rapid nongenomic actions of thyroid hormone. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:14104–14109.
- Hu BR, Wieloch T (1994) Tyrosine phosphorylation and activation of mitogen-activated protein kinase in the rat brain following transient cerebral ischemia. *J Neurochem* 62:1357–1367.
- Ishikawa Y, Yokoo T, Kitamura M (1997) c-Jun/AP-1, but not NF-kappa B, is a mediator for oxidant-initiated apoptosis in glomerular mesangial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 240:496–501.
- Jacobs S, Lie DC, DeCicco KL, Shi Y, DeLuca LM, Gage FH, Evans RM (2006) Retinoic acid is required early during adult neurogenesis in the dentate gyrus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:3902–3907.
- Kaplan DR, Matsumoto K, Lucarelli E, Thiele CJ (1993) Induction of TrkB by retinoic acid mediates biologic responsiveness to BDNF and differentiation of human neuroblastoma cells. *Eukaryotic Signal Transduction Group. Neuron* 11:321–331.
- Kastner P, Mark M, Ghyselinck N, Krezel W, Dupe V, Grondona JM, Chambon P (1997) Genetic evidence that the retinoid signal is transduced by heterodimeric RXR/RAR functional units during mouse development. *Development* 124:313–326.
- Kawase M, Fujimura M, Morita-Fujimura Y, Chan PH (1999) Reduction of apurinic/apyrimidinic endonuclease expression after transient global cerebral ischemia in rats: implication of the failure of DNA repair in neuronal apoptosis. *Stroke* 30:441–448; discussion 449.
- Kersten S, Kelleher D, Chambon P, Gronemeyer H, Noy N (1995) Retinoid X receptor alpha forms tetramers in solution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:8645–8649.
- Kobayashi M, Kurihara K, Matsuoka I (1994) Retinoic acid induces BDNF responsiveness of sympathetic neurons by alteration of Trk neurotrophin receptor expression. *FEBS Lett* 356:60–65.
- Konta T, Xu Q, Furusu A, Nakayama K, Kitamura M (2001) Selective roles of retinoic acid receptor and retinoid X receptor in the suppression of apoptosis by all-trans-retinoic acid. *J Biol Chem* 276:12697–12701.
- Kuan CY, Whitmarsh AJ, Yang DD, Liao G, Schloemer AJ, Dong C, Bao J, Banasiak KJ, Haddad GG, Flavell RA, Davis RJ, Rakic P (2003) A critical role of neural-specific JNK3 for ischemic apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:15184–15189.
- Lee SR, Lo EH (2003) Interactions between p38 mitogen-activated protein kinase and caspase-3 in cerebral endothelial cell death after hypoxia-reoxygenation. *Stroke* 34:2704–2709.
- Li Y, Hashimoto Y, Agadir A, Kagechika H, Zhang X (1999) Identification of a novel class of retinoic acid receptor beta-selective retinoid antagonists and their inhibitory effects on AP-1 activity and retinoic acid-induced apoptosis in human breast cancer cells. *J Biol Chem* 274:15360–15366.
- Liu SH, Lau L, Wei JS, Zhu DY, Zou S, Sun HS, Fu YP, Liu F, Lu YM (2004) Expression of Ca²⁺-permeable AMPA receptor channels primes cell death in transient forebrain ischemia. *Neuron* 43:43–55.
- Lyukyutora AI, Lu CC, Milanesio N, King LA, Guo N, Wang Y, Nathans J, Tessier NM, Zou Y (2003) Anterior-posterior guidance of commissural axons by wnt-frizzled signaling. *Science* 302:1984–1988.
- MacDonald JM, Beach MG, Porgiglia E, Cheehan AE, Watts RJ, Freeman MR (2006) The Drosophila cell corpse engulfment receptor draper mediates glial clearance of severed axons. *Neuron* 50:869–881.
- Maden M (2001) Role and distribution of retinoic acid during CNS development. *Int Rev Cytol* 209:1–77.
- Marshall CJ (1995) Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. *Cell* 80:179–185.
- Misner DL, Jacobs S, Shimizu Y, de Urquiza AM, Solomin L, Perlmann T, De Luca LM, Stevens CF, Evans RM (2001) Vitamin A deprivation results in reversible loss of hippocampal long-term synaptic plasticity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:11714–11719.
- Mizukami Y, Yoshioka K, Morimoto S, Yoshida K (1997) A novel mechanism of JNK1 activation. Nuclear translocation and activation of JNK1 during ischemia and reperfusion. *J Biol Chem* 272:16657–16662.
- Moraes LA, Swales KE, Wray JA, Damazo A, Gibbins JM, Warner TD, Bishop-Bailey D (2002) Non-genomic signalling of the retinoid X receptor through binding and inhibiting Gq in human platelets. *Blood* 109:3741–3744.
- Muindi JR, Frankel SR, Huselton C, DeGrazia F, Garland WA, Young CW, Warrell RP Jr (1992) Clinical pharmacology of oral all-trans retinoic acid in patients with acute promyelocytic leukemia. *Cancer Res* 52:2138–2142.
- Namgung U, Xia Z (2000) Arsenite-induced apoptosis in cortical neurons is mediated by c-Jun N-terminal protein kinase 3 and p38 mitogen-activated protein kinase. *J Neurosci* 20:6442–6451.
- Okuno S, Saito A, Hayashi T, Chan PH (2004) The c-Jun N-terminal protein kinase signaling pathway mediates Bax activation and subsequent neuronal apoptosis through interaction with Bim after transient focal cerebral ischemia. *J Neurosci* 24:7879–7887.
- Saadeddin A, Torres-Molina F, Carcel-Trullols J, Araico A, Peris JE (2004) Pharmacokinetics of the time-dependent elimination of all-trans-retinoic acid in rats. *AAPS PharmSci* 6:E1.
- Sahin M, Karazum SB, Perry G, Smith MA, Aliciguzel Y (2005) Retinoic acid isomers protect hippocampal neurons from amyloid-beta induced neurodegeneration. *Neurotox Res* 7:243–250.
- Segal RA, Greenberg ME (1996) Intracellular signaling pathways activated by neurotrophic factors. *Annu Rev Neurosci* 19:463–489.
- Skrede KK, Westgaard RH (1971) The transverse hippocampal slice: a well-defined cortical structure maintained in vitro. *Brain Res* 35:589–593.
- Strahan JE, Raimer S (2006) Isotretinoin and the controversy of psychiatric adverse effects. *Int J Dermatol* 45:789–799.

- Walton KM, DiRocco R, Bartlett BA, Koury E, Marcy VR, Jarvis B, Schaefer EM, Bhat RV (1998) Activation of p38MAPK in microglia after ischemia. *J Neurochem* 70:1764–1767.
- Wang X, Martindale JL, Liu Y, Holbrook NJ (1998) The cellular response to oxidative stress: influences of mitogen-activated protein kinase signalling pathways on cell survival. *Biochem J* 333(Pt 2):291–300.
- Wang X, Xu L, Wang H, Young PR, Gaestel M, Feuerstein GZ (2002) Mitogen-activated protein kinase-activated protein (MAPKAP) kinase 2 deficiency protects brain from ischemic injury in mice. *J Biol Chem* 277:43968–43972.
- Watson A, Eilers A, Lallemand D, Kyriakis J, Rubin LL, Ham J (1998) Phosphorylation of c-Jun is necessary for apoptosis induced by survival signal withdrawal in cerebellar granule neurons. *J Neurosci* 18:751–762.
- Wehling M, Losel R (2006) Non-genomic steroid hormone effects: membrane or intracellular receptors? *J Steroid Biochem Mol Biol* 102:180–183.
- Wu JJ, Bennett AM (2005) Essential role for mitogen-activated protein (MAP) kinase phosphatase-1 in stress-responsive MAP kinase and cell survival signaling. *J Biol Chem* 280:16461–16466.
- Xia Z, Dickens M, Raingeaud J, Davis RJ, Greenberg ME (1995) Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science* 270:1326–1331.
- Xu Q, Konta T, Furusu A, Nakayama K, Lucio-Cazana J, Fine LG, Kitamura M (2002) Transcriptional induction of mitogen-activated protein kinase phosphatase 1 by retinoids. Selective roles of nuclear receptors and contribution to the antiapoptotic effect. *J Biol Chem* 277:41693–41700.
- Yin T, Sandhu G, Wolfgang CD, Burrier A, Webb RL, Rigel DF, Hai T, Whelan J (1997) Tissue-specific pattern of stress kinase activation in ischemic/reperfused heart and kidney. *J Biol Chem* 272:19943–19950.
- Yokoo T, Kitamura M (1997) Unexpected protection of glomerular mesangial cells from oxidant-triggered apoptosis by bioflavonoid quercetin. *Am J Physiol* 273:F206–F212.
- Zhu Y, Yang GY, Ahlemeyer B, Pang L, Che XM, Culmsee C, Klumpp S, Kriegstein J (2002) Transforming growth factor-beta 1 increases bad phosphorylation and protects neurons against damage. *J Neurosci* 22:3898–3909.

(Accepted 17 April 2007)
(Available online 22 May 2007)

生命科学の未来を考える

Biophilia

季刊 ビオフィリア

10

Vol.3 No.2 2007

別刷

株式会社アドスリー

〒164-0003 東京都中野区東中野 4-27-37 TEL: 03-5925-2840 FAX: 03-5925-2913

E-Mail: info@adthree.com URL: <http://www.adthree.com>

動物福祉と動物実験代替法への 考慮の必要性について

巻頭言 生命科学の進展に寄せて

国立医薬品食品衛生研究所

大野 泰雄



大野 泰雄

国立医薬品食品衛生研究所 副所長

東京大学薬学系大学院博士課程修了(薬害作用部門)。薬学博士。薬剤師。日本トキシコロジー学会認定トキシコロジスト。国立衛生試験所薬理部厚生技官、国立衛生試験所安全性生物試験研究センター薬理部長を経て、2005年より現職。おもに、薬物代謝と肝腎毒性に関する研究、動物実験代替法に関する研究、ヒト組織を用いた薬物動態研究を進めている。この間、カロリンスカ研究所法医学教室(Prof. Sten Orrenius)に1年間留学し、肝腎遊離細胞を用いた毒性学的研究を取得。日本薬理学会評議員、日本トキシコロジー学会生涯教育小委員会委員長、日本動物実験代替法学会理事、HAB研究機構評議員、全国衛生化学技術者協議会副会長、薬事・食品衛生審議会委員、食品安全委員会専門委員を歴任。また、2007年8月に開催予定の第6回国際動物実験代替法会議会長を務める。

社会へ向けて 実験の意義を示さなければならない

生命科学の研究や教育、医薬品等の有効性及び安全性評価において、培養細胞等を用いるin vitro研究が増加している。しかし、さまざまな生体機構の統合としての個体への科学的理解を深め、それへの化学物質等の作用を明らかにするためには、依然として、動物実験や実験動物から採取した試料を用いた研究は不可欠であるし(表1)、近未来において、動物実験が不要となるとは思われない。一方、動物福祉や権利に対する社会の関心が高まり、動物実験への反対運動も度々報道されている。欧米には、Humane Society of the US(HSUS)のように、毎年100億円以上の寄付を集める動物福祉団体もあり、大きな政治力を持っている。

現在の科学研究には多額の費用が必要であり、公的な資金なしに研究を進めることできない。科学者はこのような状況に適切に対応しなければならない。すなわち、生命科学の研究における動物実験の意義を社会に示し、科学的に必要なかつ倫理的に妥当な実験を行うことにより、我々の研究への社会の支持を得ることが不可欠である。図1に示したように、動物実験の必要性についての説明が十分になされることにより、科学的に必要な動物実験に賛同する者が確実に増加する。動物実験を計画する際は、研究の目的とそれに必要な方法を精査し、不必要な動物実験を避け、やむ得ず行う動物実験においても、使用する動物数と動物に与える苦痛を最少限にしなければならない。これは動物実験における3つの原則(3R: Replacement, Reduction, Refinement)として、平成17年6月に改訂された「動物の愛護及び管理に関する法律」(動愛法)に組み込まれた法的な義務である。この法を補足するため、文部科学省、厚生労働省、および環境省は、それぞれ所管する分野を対象に動物実験指針を作成し、平成18年4月から6月にかけて通知した(「実験動物の飼育及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準(環境省告示 第88号)」、「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針(文部科学省告示 第71号)」、「厚生労働省の所管する動物実験等の実施に関する基本指針(厚生労働省通知 科発0601002号)」)。日本学術会議も動物実験に関する詳細指針「動物実験の適正な実施に向けたガイドライン」を作成し、通知した。

これからの取り組みに向けて

研究者が「動物が命あるものであることにかんがみ、何人も動物をみだりに殺し、傷つけ、又は苦しめることのないようにするのみでなく、人と動物の共生に配慮しつつ、その習性を考慮して適正に取り扱うようにしなければならない」という動愛法第2条に示された基本原則を理解し、前記の3Rの原則を満たし、倫理的に妥当な動物実験を行う上で、施設を運営管理す

表1 第77回日本薬理学会で用いられた試験系*

試験系の種類	例数		
in vivo実験	185	335	69.6%
薬物等で処理した動物から組織試料を採取して研究	32		
動物から摘出した試料を用いて研究	118		
in vitro研究(細胞株等を用いた研究)	95	138	28.7%
屠殺場から入手した試料を用いた研究	17		
ヒト試料を用いた研究	19		
アフリカツメガエル卵母細胞を用いた研究	7		
その他(臨床試験、情報研究等)	8	8	1.7%
合計	481	481	

*: 第77回日本薬理学会でのポスター発表(2005年3月8日及び9日)の調査結果

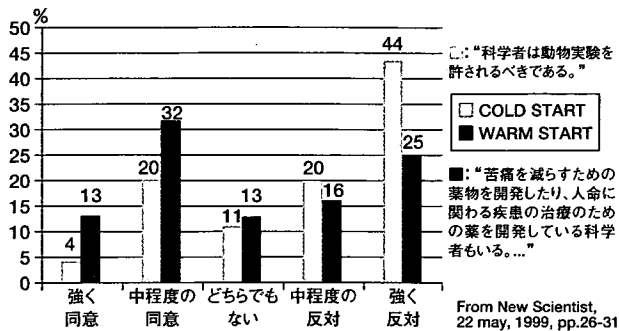


図1 動物実験への反応

表2 動物実験倫理に関する薬学系大学の教育内容

教育内容*	教えている大学の割合
動愛法	80.8 %
実験動物の生理、生態、習性	65.4 %
実験動物の飼育、管理方法	84.6 %
動物実験における3Rの原則	69.2 %
動物の苦痛の評価	69.2 %
苦痛の軽減方法	73.1 %
安楽死の方法	80.8 %
動物実験代替法	57.7 %
その他	42.3 %

文部科学省等の指針から教えることが望ましいと思われるもの。
平成19年2-3月にアンケート調査した結果の集計(回答数29、回答施設数24)。

表3 第6回国際動物実験代替法会議での特別講演等

Plenary lecture Judy MacArthur Clark, IACLAM, USA	Alternative research and practice supported by international veterinary professionals such as IACLAM
Julia Fentem, Unilever, UK	Exploring new approaches to assess safety without animal testing
Paul Flecknell, Newcastle Univ., UK	Assessment and alleviation of pain and distress of laboratory animals
Makoto Hayashi, NIHS, Japan	3Rs in Mutation Research--from in vivo to in silico evaluation
Special Lecture Alan Goldberg, Johns Hopkins Univ., USA	The Science of Alternatives - The last 25 years and tomorrow
Baroness Perry of Southwark, House of Lord, UK	A British Example of Balanced Inquiry into the Ethics of Animal Experiment
Next President Special Lecture Herman Koëter, EFSA, Italy	Globalization of animal welfare concepts integrated in the scientific agenda of international agencies for regulatory risk assessment
Animal Welfare Memorial Lecture Michael Balls, FRAME, UK	Professor William Russell (1925-2006): Doyen of the Three Rs

る者の責任は重い。適正な動物実験施設を確保するとともに、動物実験委員会を適正に運用し、適正な動物実験を行うための教育を行なうことにより、研究者の動物福祉に関する意識と関連技術を高めなければならない。しかし、平成19年2月-3月に行った薬学系大学について行った調査においては、動物実験における3Rの原則や動物実験代替法(代替法)や苦痛の削減方法に関する教育(表2)や動物実験委員会の委員構成に不十分と思われるところがあり、今後の改善が望まれる。

なお、代替法や動物福祉に関する情報を得るよい機会がある。すなわち、第6回国際動物実験代替法会議が2007年8月21日から25日にかけて、東京都江東区のホテルイースト21東京で開催される。この会議は日本動物実験代替法学会と日本学術会議、および国際動物実験代替法会議信託基金(The Alternative Congress Trust: ACT)の主催で、1)教育・研究・試験のための動物実験における3Rの進展を概観し、代替法についての現実的な理解を醸成する、2)科学の進展や生物や疾患への理解を深めるとともに、そのために動物実験が必要であるとの認識を醸成する、また、3)科学者と社会とのコミュニケーションを促進することを目的で開催される。国際トキシコロジー連合、日本環境変異原学会、日本実験動物医学会、日本実験動物学会、日本組織培養学会、日本実験動物環境研究会、日本トキシコロジー学会など、多くの学会が協賛している。

この会議では、動物実験や代替法、また、in vitroトキシコロジー分野で著名な科学者8名によるプレナリーレクチャーや特別講演等が行われる(表3)。また、10の主テーマ(表4)の

表4 第6回国際動物実験代替法会議でのシンポジウムテーマ

テーマ 1: 動物福祉
テーマ 2: 動物使用におけるモラル・倫理・文化
テーマ 3: 教育と訓練における3R
テーマ 4: 知識管理と情報サービス
テーマ 5: トキシコロジー/バリデーション
テーマ 6: 環境トキシコロジー
テーマ 7: バイオロジクスの開発・生産・品質管理における3R
テーマ 8: 3Rへの新科学技術の応用
テーマ 9: 3Rのグローバル化
テーマ10: リスクアセスメントとリスク管理

と、約40のシンポジウムが行われ、それぞれの分野で著名な実績のある講演者が招待されている。ポスター発表と若手を中心の口頭発表も行われる。現在、500近くの要旨が集まっている。なお、小グループの議論の場も提供される予定である。

2009年にはEU化粧品指令第7次改正により、化粧品の安全性評価のための動物実験が原則禁止される。これに対応するためには、今回の会議で代替法開発の現状を十分に議論し、理解を深めておく必要がある。また、今回の会議は欧米における関連分野における欧米の状況を知るよい機会であるが、中国や韓国、インド、その他のアジア諸国から多くの講師を招待しており、アジア諸国における動物福祉や代替法開発についても、情報を集めるよい機会である。また、動物福祉活動家との対話を目的としてシンポジウムや市民を対象にした公開シンポジウムも開催される。会議の公用語は英語であるが、公開シンポジウムは通訳が付く。詳細は日本動物実験代替法学会のホームページ(<http://wwwsoc.nii.ac.jp/jsaae/>)および国際代替法会議のホームページ(<http://www.ech.co.jp/wc6/>)に記載されている。

マイクロドーズ試験ガイドランスの検討について***

大野 泰雄*, 小野 俊介**

本稿のタイトルは、「マイクロドーズ試験ガイドランスの検討について」ですが、厚生労働省から委託を受けた時の研究テーマ名は、「我が国における探索的臨床試験等のあり方に関する研究」でした。マイクロドーズ試験は探索的な臨床試験の一部であり、マイクロドーズ試験も含めてこの研究班で検討することとなり、後にタイトルが変更となりました。そこで、本稿ではマイクロドーズ試験のことだけではなく、もう少し広い範囲で説明いたします。

1. マイクロドーズ臨床試験 (MD 試験) の概略

MD 試験は、2003年にEUのポジションペーパーで初めて紹介されました。その内容を要約しますと、「MD 試験とは、健康人に対して、毒性も薬効も現れないと考えられる極低用量の開発候補物質を単回投与し、薬物動態や体内分布を調べることを目的とした探索型の臨床試験」です。また、用量は100 µg (約2 µg/kg 体重) 以下とされていましたが、その後示されたFDAのガイドランスでは、タンパク製剤の場合は30 nmole/human 以下と規定されています。そして、薬理作用発現量の100分の1より低い用量と規定されています。更に実施するための条件として、拡大型単回投与毒性試験、局所毒性及び遺伝毒性試験結果に基づいて検討することと規定されています。ただし、FDAは遺伝毒性については実施しなくて良いと規定しています。

2. MD 試験導入の背景

MD 試験を導入することとなった背景として、医

薬品開発の費用が増大していること、競争激化に伴い開発のスピードアップと経費削減及び臨床段階での成功率の上昇が望まれているなどの理由があります。なるべく早い段階で最適化合物を選択し、早期にヒトでの試験を行い、ヒトに効かないものや安全性等の問題で不適切なものは落として絞り込みをする必要があります。

二つ目は、ICH-M3のガイドライン¹⁾では、米国のみが単回投与毒性試験結果に基づいて単回投与臨床試験を行っても良いとされていますが、その実施が困難であり、その対応のためと聞いています。

三つ目は、加速器質量分析法 (AMS)²⁾や高感度LC/MS/MSなどの分析機械が開発されたことにより、分析感度が非常に上昇し、毒性的に問題とならないような低用量でも血中濃度測定が可能となり、薬物動態を検討できるようになったことです。

四つ目は、PETが導入され、ヒトで体内分布が見られるようになり、第I相臨床試験の前にヒトの薬物動態特性を明らかにし、その後の開発の効率化を計ることができるようになったことです。

3. MD 試験導入の経緯 (Table 1)

前述したように、2003年にEMEAがMD試験についてのポジションペーパーを出してから、日本でも薬物動態学会やトキシコロジー学会などの様々な学会でその意義や安全性について検討され、その有用性が確認されました。そして2005年には日本薬物動態学会から、「早期臨床試験による医薬品開発促進に関する意見書」が公表されました。一方、

* 国立医薬品食品衛生研究所 東京都世田谷区上用賀 1-18-1 (〒158-8501)

** 東京大学大学院薬学系研究科 東京都文京区本郷 7-3-1 (〒113-0033)

*** 当協会主催の第24回新薬審査部門定期説明会 (平成19年5月29日:東京, 6月5日:大阪) における講演による。

Table 1 MD試験導入の経緯

2003年1月: EMEAがmicrodose studyに関するposition paper採用
2004年11月: 日本薬物動態学会フォーラム「早期ヒト試験に向けて薬物動態から考える」実施
2005年7月: 日本トキシコロジー学会がマイクロドーズ試験の安全性に関するシンポジウム開催
2005年12月: 日本薬物動態学会が「早期臨床試験による医薬品開発促進に関する意見書」公表
2006年1月: FDA Exploratory IND Studiesのガイドランスを通知
2006年7月: 総合科学技術会議・基本政策推進専門調査会中間報告
2006年秋: ICHでM3ガイドランスの見直し開始。
同: 杉山ら, マイクロドーズ臨床試験の実施基盤—指針作成への提言—

2006年1月にはFDAからMD試験を含むe-INDのガイドランスが通知されました。更に2006年7月には、総合科学技術会議・基本政策推進専門調査会でMD試験の重要性が認識され、中間報告としてその促進を求める報告書が提出されました。

その中間報告のサマリーによりますと、「臨床研究を効率的に進めるための新しい手法、マイクロドージングやクリティカルパスリサーチ等の研究が欧米を中心に進められている。我が国ではマイクロドージング等の治験の迅速化・効率化につながる新しい技術の位置づけは定まっていない。マイクロドージングについては導入に向けて欧州のような指針を早急に検討すべきである」としています。

日本における医薬品開発の促進を図るための政策の一つとして、厚生労働省でも医薬品を少しでも早く国民に提供するために「有効で安全な医薬品を迅速に提供するための検討会」を設置し (Table 2)、承認審査に関わる制度的課題や体制的課題について

Table 2 有効で安全な医薬品を迅速に提供するための検討会

厚生労働省が設置
目的: 有効で安全な医薬品を迅速に提供するため、医薬品の承認審査のあり方や実施体制、安全対策等に係る事項等について幅広く検討するため、発足(2006年10月)
目標: 制度的課題、体制的課題を含め、2007年の夏を目途に検討を行う

幅広く検討を始め、その一環として、筆者が担当している検討班が組織されました。

4. MD試験の問題点

MD試験の問題点の一つ目は極めて低用量であるため、AMS等の超高感度の分析方法が必要となり、そのための経費や時間がかかることです。

二つ目は、MD試験は通常放射性同位元素 (RI) 標識化合物をヒトに投与して実行するため、日本特有の問題があることです。

三つ目は、欧米では拡大型単回投与試験を要求しているため、それに必要な時間や経費が今までのICH-M3で合意された2週間の反復投与試験と比べ、被験物質の量は少なくなりますが、実際にかかる手間や費用は増加すると思われることです。拡大型単回投与試験を実施するのであれば、2週間の反復投与試験を実施してより高用量の臨床試験もできるようにしたほうが効率的であるといった考えもあります。

四つ目は、低用量での薬物動態を薬効用量へ正しく外挿できるのか疑問を呈する指摘が多くあることです。

五つ目は、被験物質をGMP下で生産することに非常に手間がかかることです。欧米では治験薬のGMPに関してはフレキシブルに応用されていますが、日本では必ずしもそうではないことが問題です。

以上のような問題点を、今後検討班で検討すべきと考え、日本ではEU型のMD試験に留めるか、FDA型の探索的臨床試験にするかについて事前に検討し、MDレベルより高用量で行われる探索的臨床試験についても検討するとの合意のもと、「我が国における探索的臨床試験等のあり方に関する研究班 (主任研究者: 大野泰雄)」が2007年1月に発足しました。

5. 我が国における探索的臨床試験等のあり方に関する研究班

5.1 具体的検討課題

研究班での具体的な検討課題は、MD試験の具体的な実施手順や指針 (案) の作成です。研究班は2007年1月に発足し、3月までに指針を作成するのは不可能ですので、その枠組みを検討することとなりました。

Table 3 検討班の班員と研究協力者

分担研究者 ・大野泰雄（国立衛研） 総括，安全性，実施手順 ・小野俊介（東大薬） 規制，倫理 ・檜山行雄（国立衛研） 品質
研究協力者(1)全般 池田敏彦（三共），位田隆一（京大法），井上登美夫（横浜市大医），清原孝雄（総合機構），小林真一（聖マリアンナ医大），佐神文郎（エーザイ），杉山雄一（東大薬），中澤憲一（国立衛研），丸山英二（神戸大法），山本恵司（武田薬品），吉田武美（昭和大薬）
研究協力者(2)安全性分野（ICH-M3 検討WG） 伊藤真紀（塩野義製薬），小野寺博志（総合機構），大橋京一（大分大医），佐藤洋一（総合機構），佐神文郎（エーザイ），中澤憲一（国立衛研），高橋道人（病理ピアレビューセンター），馬屋原宏（国際医薬品臨床開発研究所），三浦慎一（第一三共製薬），三好出（総合機構），山本恵司（武田薬品工業），吉田緑（放医研）
研究協力者(3)被験物質の品質分野 清原孝雄（総合機構），古田土真一（田辺製薬），残華淳彦（武田薬品工業），松木滋（キリンビール）

更に，例えば，タンパク製剤に対しても適応するのかといった試験の適応範囲についての検討，MD試験を実施するために必要な非臨床試験の範囲の検討，試験に伴う法的，倫理的な問題についての整理，MD試験以外の「探索的臨床試験」に関する検討，及び被験物質に求められる品質管理の考え方についての検討です。

5.2 検討班の構成

検討班は，筆者及び東京大学の小野先生，更に国立医薬品食品衛生研究所薬品部の檜山室長の3人が分担研究者となり，その他 Table 3に示すような多くの協力者のもとで検討を続けています。

また，一般的な協力だけでなく，安全性に関してはICH-M3で検討中ですので，それに関与するトキシコロジーや臨床の専門家の協力も得ました。更に被験物質の品質に関しても製薬会社や総合機構の方々の協力を得て検討を進めています。

6. 探索的臨床試験

6.1 探索的臨床試験の定義と意義

6.1.1 定義

探索的な臨床試験とは，医薬品開発のための初期段階で，開発候補物質の絞り込みを行うための臨床試験です。ただし，ヒトに毒性が現れないと想定される用量以下に限定されます。それにより，ヒトに

初めて投与する前に必要な毒性試験の範囲を縮小でき，また，試験に必要な被験物質を削減することができます。すなわち，非臨床試験と最初の段階の探索的臨床試験の段階をワンバッチの被験物質で実施することを可能とするものです。

6.1.2 暫定分類

探索的臨床試験は Table 4に示すようにI型からIII型の三つに分類されます。なお，名前の付け方は暫定的なものですので，今後変更される予定です。

I型は極めて低い用量を用いて薬物動態を検討するMD試験です。II型はMD試験で用いる用量よりは高く，臨床用量以下の用量を用い，毒性・薬効のいずれも現れないと想定される準薬効用量探索的臨床試験です。III型は毒性は現れないけれども薬効

Table 4 探索的臨床試験の暫定分類*

- | |
|---|
| 1) 極めて低い用量を用いて薬物動態を検討するMD試験（I型探索的臨床試験） |
| 2) MD試験よりは高いが，臨床用量以下の用量を用い，毒性・薬効のいずれも現れないと想定される準薬効用量探索的臨床試験（II型探索的臨床試験） |
| 3) 毒性は現れないが，薬効は現れると想定される用量での「III型探索的臨床試験」 |

*：Namingは暫定的なもの，分類もICHの議論で変更される予定

は現れると想定される用量です。

6.1.3 期待する情報

探索的臨床試験で期待する情報は、①ヒトでの薬物動態情報、②イメージング技術を用いたヒト体内分布に関する情報、③ *in vivo* あるいは *in vitro* のスクリーニング系から期待される薬効がヒトでも得られるか否かに関する情報、すなわち、想定された薬理作用がヒトで明確に現れて薬効につながる可能性に関する情報、④薬効につながるバイオマーカーの妥当性に関する情報、⑤その他、様々な目的に利用できる情報が得られるものと期待されています。

Table 5は、ICH型及びMD型開発を実施するために必要な動物のcostです。単純に計算すると従来のICH型に必要な動物数は約134匹なのに対し、MD型では約48匹に減ると考えられます。薬物量につきましても、従来は441g必要であるものが、1g以下で実施できます。更に試験期間はICH型では6週間、MD型で4週間、組織検査では2週間で実施できると考えていますが、実際はもっとか

かると思われます。いずれにしましても、従来のICH型と比べて非常に少ない動物と薬物量で試験できます。

6.1.4 探索的臨床試験のメリット

日本製薬工業協会がまとめた探索的臨床試験のメリットをTable 6に示します。一つ目は、探索的臨床試験を実施することにより、前臨床試験期間の短縮及び開発速度の上昇が見込まれます。従来と比較して、開発から臨床移行の決定に8~9カ月、化合物選定まで6~9カ月、更に開発方針の決定までに3~4カ月も時間が短縮できます。ただし、従来は直接Phase Iを開始していましたので、そのプラスアルファとして探索的臨床試験を実施するため、実際の開発期間で考えますと、必ずしも短縮になるとは限らないと考えられます。しかし、多くの候補物質について全てPhase Iを行い、更にスクリーニングすることを考えますと、総合的には短くなると考えています。

二つ目は、開発に必要な化合物量について、探索

Table 5 ICH型及びMD型開発を実施するために必要な動物実験のcost

	ICH型	Microdose型#1	Microdose提案型#1
動物使用数	約134匹	約48匹	約26匹
単回投与試験			
げっ歯類	<20匹 (<10×雄雌)	30匹 (1用量で雌雄)#2	20匹 (1用量で雌雄)
非げっ歯類#3	<10匹	18匹 (1用量で雌雄)#2	6匹 (1用量で雌雄)
反復投与試験(2-4週間)			
げっ歯類	80匹 (10匹/群×4群×雌雄)		
非げっ歯類	24匹 (3匹/群×4群×雌雄)		
薬物量(g) *1	441	0.106	0.106
試験期間 *2	6週間	4週間	1週間

#1: 投与量で毒性が出た場合はNOAELを決めるため、より低用量の試験が必要。MD提案型とは詳細な症状観察を含む、通常の単回投与毒性試験を意味する。

#2: 拡張型単回投与試験（げっ歯類は1群5匹、非げっ歯類は1群3匹で、対照群と翌日解剖群、14日解剖群の3群とした。変法では非げっ歯類に対照群をおいていない。）

#3: 非げっ歯類は必要に応じて実施

*1: ラットを0.3kg、イヌを5kgとした。投与量はICH型では0.5g/kgを、MD試験では2mg/kgを最高用量とした。

*2: 反復投与試験においては投与期間を2週間、病理検査に4週間、拡大型単回投与試験においては病理検査に2週間かかるとした。

Table 6 探索臨床試験のメリット (製薬協の意見)

- 前臨床試験期間の短縮/開発速度の上昇
 - ・ 前臨床試験の開始から臨床移行の決定に 8-9 ヶ月
 - ・ 化合物選定まで 6-9 ヶ月の時間短縮
 - ・ 開発方針決定まで 3-4 ヶ月の短縮
 開発期間全体では必ずしも短縮になるとは限らない
- 必要とする化合物量, 動物の減少, 費用の削減
 - ・ 大量合成の必要がない
 - ・ 2.5kg (traditional IND) ⇒ 300~600g (e-IND)
 - ・ 2kg 減少
 - ・ げっ歯類 96 匹 ⇒ 18 匹
 - ・ 非げっ歯類 40 匹減少

的臨床試験より広い条件での検討で, 従来は約 2.5 kg の薬物を合成する必要があったものが, 300~600 g で済みます。これはワンバッチの合成で賅えますので, かなりの減少です。また, げっ歯類動物を 96 匹必要としたのが 18 匹に減少できますし, 非げっ歯類は 40 匹程度減らすことができます。

6.1.5 探索的臨床試験の意義 (Table 7)

探索的臨床試験の意義は, 1) 早期に最適化合物を選択することによって新薬開発の効率化とコストの削減ができる, 2) 薬効標的の妥当性の早期の確認により, 合理的な医薬品開発を進めることができる, 3) 薬効発現における種差及び個人差による問題への早期対応が可能となる, 4) 失敗に終わる臨床試験への協力者を削減できる, これはボランティアの協力を無にすることが少なくなることです。5) 第 I 相以後における医薬品開発の成功確率の向上につながる, 6) 動物使用数を削減できる, 7) 結果として患者への新薬供給の迅速化につながる等があげられます。

その他にも, ヒト代謝物の早期評価, 被験物質の標的受容体との結合性の検討, 薬物動態プロファイル, 薬物相互作用の検討, PK/PD モデリングのシミュレーション, 非臨床病態モデルでの検討など, 探索的臨床試験として用量範囲を広げることにより, 非常に広い範囲で検討が行えると考えられます。

6.2 探索的臨床試験の法的, 倫理的課題

探索的な臨床試験を行う際に法的, 倫理的な問題

Table 7 探索的臨床試験の意義

- 1) 早期に最適化合物を選択することによる, 新薬開発の効率化とコスト削減
- 2) 薬効標的の妥当性の早期確認による合理的な医薬品開発の推進
- 3) 薬効発現における種差及び個人差による問題への早期対応
- 4) 失敗に終わる臨床試験への協力者の削減
- 5) 第 I 相以後における医薬品開発の成功確率の向上
- 6) 動物使用数の削減
- 7) 患者への新薬供給の迅速化
- 8) ヒト薬物動態パラメータを複数化合物で比較する。
- 9) ヒト代謝物の早期評価
- 10) 被験物質の標的受容体との結合性
- 11) 薬効用量における薬物動態プロファイル
- 12) 薬物相互作用の確認
- 13) 結合性と作用の関連づけ, 並びに PK/PD モデリングとシミュレーション
- 14) 利用している非臨床病態モデルのヒト疾患への外挿性のバリデーション
- 15) ヒトにおける, 生物学的なパスウェイの確認/薬効メカニズム活性
- 16) ヒトでの疾患バイオマーカー及び薬力学的反応を軽症患者で調べる。
- 17) 健常人を用いた臨床モデル (恐らく負荷モデル) のバリデーション
- 18) 潜在的な治療標的の新規性の確認 (他の既に確立済みの治療標的に比べて)
- 19) 医薬品開発戦略の妥当性確認
- 20) 健常人と患者における, 薬力学的反応感受性の差の同定

にはどのようなものがあるかも研究班で検討しました。

6.2.1 探索的臨床試験を実施する時期

探索的臨床試験は臨床研究で行うべきか, 治験で行うべきかといった問題は, 最初に MD 試験が提案された時から問題となっていました。研究班は, 医薬品開発のために行われるヒト試験であるという点により, いわゆる今までの第 I 相試験以後の臨床開発と変わらないと考えました。治験として実施することにより, 公的な審査を経て GCP の枠組みのなかで行われることとなり, その結果として被験者の安全や権利が保証されると共に, 思いがけない事故が起きた場合においても, その適切な対応が可能となります。このような理由により, 研究班として

は治験で行うべきと結論しました。

なお、探索的臨床試験を治験というかたちで実施するのであれば、厚生労働省があらかじめ意思表示をしておくべきと指摘がありました。

6.2.2 規制当局の治験届出の確認のあり方 (Table 8)

探索的臨床試験が治験としての扱いになれば通常の治験と同様に治験届の対象となりますので、総合機構に届け出る必要があります。その場合、総合機構がどういった基準で評価するかが問題となります。現在、ICH で臨床試験に必要な非臨床試験に対する考え方を検討しており、探索的臨床試験についての内容も含まれていますので、その検討結果が審査に反映されると考えています。

また、探索的臨床試験の場合、候補物質の複数の成分を同時に投与し、その中から良いものを選ぶといった考え方 (cassette dosing) を行う可能性もありますが、その扱い等を決める必要があると思われませんが、今のところ ICH では検討されていません。

6.2.3 探索的臨床試験の計画・実施

探索的臨床試験の実施について、GCP 省令がどれだけ厳しく適用されるかが問題になると思われま。例えば、治験薬 GMP をどの程度適用させるか、治験薬概要書の書き方、当局への安全性報告や総括報告書を作成する場合の質や量、更に記録の保管等が問題となります。また、規制当局が臨床試験実施者やスポンサーに何をどこまで望むか、更に薬事法、GCP の他関連規制の適用の仕方及びそうした試験を当局がどのように使うかを事前にどうやってアナウンスするかが問題となります。これらについては、現在、厚生労働省、医薬品医療機器総合機構が前向

Table 8 規制当局の治験届出の確認のあり方

- 初回届出は、全て通常の 30 日調査 (治験届出に添付された試験の計画を確認する作業) の対象となるか。
- 当局は、何に基づいて、何を確認するか。
根拠となるガイドライン (通知) は、いつの時点の、どのガイドラインか。(ICH M3 の進行状況も関係)
- N 回届 (2 回目以降の届出) の扱いは?
複数の成分を同時に投与する場合 (cassette dosing) 等の n 回の位置づけはどうか。

きに検討しているところです。

6.2.4 探索的臨床試験に対する当局のスタンス (Table 9)

探索的臨床試験を治験として扱う場合、申請資料中における扱いは、提出「して良い」のか、「しなければならぬ」のかといった何をどこまでしなければいけないかの考え方や、治験相談を受けるのか、更に GCP や GMP 等薬事法上の規制についても、どの程度適応するか今後厚生労働省や総合機構で検討しなければいけない事項と考えています。

6.2.5 被験者募集等のあり方における論点 (Table 10)

被験者の募集については、従来の第 I 相試験と同

Table 9 探索的臨床試験に対する当局のスタンス

- 探索的臨床試験を薬事法上の「治験」として扱うとして
 - ・申請資料中における扱い (提出「して良い」のか、提出「しなければならぬ」のか)
 - ・治験相談の受け方、アドバイスの仕方 (そもそもアドバイスの対象とするか否か)
 - ・薬事法関連規制 (GCP・GMP を含む) の適用の仕方の程度
 - ・どのくらい厳しく・甘く適用するか
 - ・あらかじめ行うべき毒性試験等の種類・範囲だけでなく、試験の実施の仕方、申請に際しての事後的な確認の仕方を含む。
 - ・GCP 実地調査・書面調査の対象とするか等

Table 10 探索型臨床試験の計画における被験者募集等のあり方における論点

従来型の第 I 相試験における健康人ボランティアの場合と同様の倫理的・実務的配慮が必要。

- 被験者の募集のあり方
 - ・想定される状況 (例えば、製薬企業によるモノのスクリーニングに活用される) の文脈で、影響を受けやすい者 vulnerable people (研究者、学生、製薬企業社員、その部下等) に対する配慮をどうするか。
- 被験者への支払いのあり方
 - ・英国流でいくか? (実費のみであるべき) 通常の第 I 相試験流か (自律・自己決定 or リバタリアニズム 等)? 等
- 保険の対応 (への関与)

じ考えで良いのではないかと思います。ただし、スクリーニング的な色彩が強い臨床試験であることや、被験者の安全確保のためにどのような非臨床試験が行われたかについて、いかに一般の人に分かりやすく伝えるかといった配慮が必要です。

Table 11 に示すように、例えば、極めて低い危険性ということをごどのように伝達するか、「極めて低い」の程度を説明することはなかなか難しいので、その説明の様式を決めた方が良く指摘されています。

6.2.6 利益相反に係る論点 (Table 12)

利益相反に関して、治験審査委員会や倫理委員会、実際に治験を実施する研究者またスポンサーとの間の関係について、他の臨床試験と同様に注意する必要があります。なお、治験審査委員会や倫理委員会が特殊な試験であることを理解し、治験の妥当性について正しく判断できることが必要です (Table 13)。

6.2.7 放射性同位元素 (RI) を使う試験での論点

探索的臨床試験では RI をヒトに投与することがありますが、RI をヒトに投与することについて日

Table 11 インフォームドコンセントについて

- 通常の臨床試験・研究におけるインフォームドコンセントの要件に加えて・・・
 - ・ 高度に専門的な試験の内容を、一般人に (のレベルで) 分かり易く伝えるための配慮が必要。
 - ・ 予想される利益と危険性の伝え方の工夫。
 - ・ 例えば、きわめて低い危険性をどう伝えるのが適切か (ヒトの不確実性認識の特性を踏まえつつ)。

Table 12 利益相反に係る論点 (の例)

- (製薬企業がスポンサーの場合) スポンサーと研究者の関係は、通常の臨床試験と同様。
- 研究成果の利益配分 (の公平性) の論点も、通常の臨床試験と同様か。
発表する場合には、その方法等の配慮は必要
- 審査委員会 / 倫理委員会と研究者の関係には注意が必要。
特定の (少数の) 施設でのみ試験が実施され、特定の (少数の) 委員会でのみ審議されることが想定されるため。

Table 13 治験審査委員会 / 倫理委員会

- 通常の臨床試験・研究における論点・留意点に加えて：
- 特殊な試験計画書、特殊な内容を理解し、被験者におけるリスク・ベネフィットを評価できる委員が必要。
 - ・ 委員の要件は? 委員会の構成は? 何名くらい?
 - ・ 先述の利益相反の論点： 特定の (少数の) 施設でのみ試験が実施され、特定の (少数の) 委員会でのみ審議されることに対する配慮は? 情報公開はどこまで?
 - ・ 同意に係る意思決定に影響を受け易い者 vulnerable people (研究者、学生、製薬企業社員、その部下等) に対する考え方の整理

本では特殊な感情と事情があります。

放射性同位元素を用いた試験から得られる結果の価値の評価の仕方、安全性を論じる前提となる科学的知見については、何があれば十分かについて合意が必要です。また、現行の法規制が RI 投与の場合に障害となっていないか、障害になっているとすれば、いかにそれを回避するかを明確にする必要があります。なお、欧米では、RI 使用臨床研究に固有の懸念を審査する機関、例えばアメリカで RDRC、イギリスの ARSAC があり、その妥当性を検討し、その結果に基づいて臨床試験が行われていますので、そのような機関が日本でも必要であります。また安全性が確認された試験であることを、インフォームドコンセントの段階でいかに適切に協力者に説明するかが問題です。

Fig. 1 及び 2 は、RI 標識化合物を治験薬として用いた場合に関係してくる法規制についてまとめたもので、放射線障害防止法 (障防法)、薬事法及び医療法が複雑に絡みあっています。使用する RI 標識化合物の濃度や量によって法的に RI としての定義に該当するかどうかによっても扱いが異なりますし、使用する施設がどの法律のカテゴリーに属するかによっても異なります。法的に RI として定義されないレベルの標識化合物であっても RI 使用施設として登録されている機関で試験を実施する場合は、障防法が適用され、RI として定義される標識化合物に準じた扱いが要求されています。例えば、使用する病院が障防法で許可されている事業所か、医療

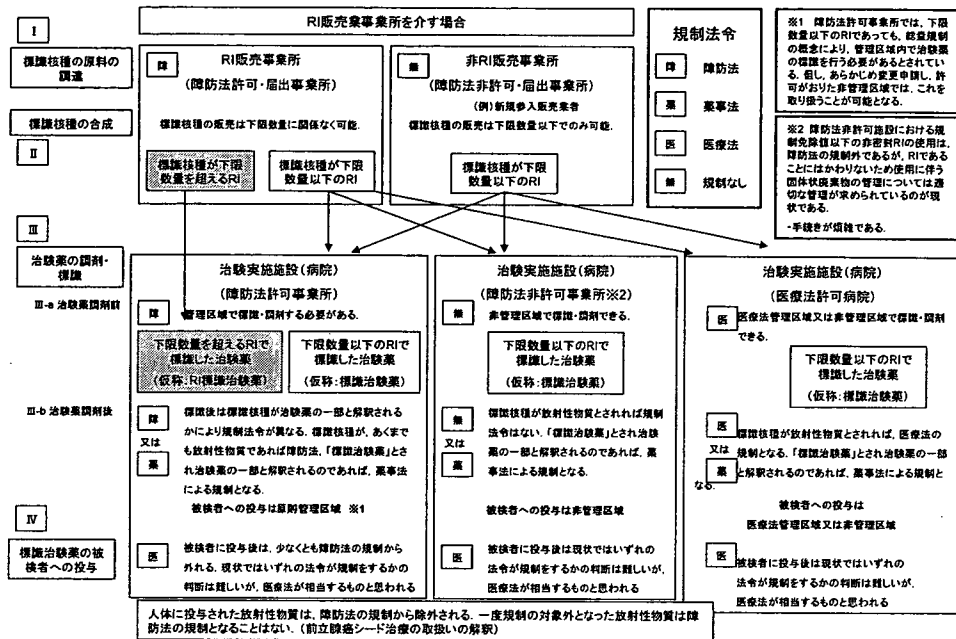


Fig. 1 探索的臨床試験用 RI 標識治験薬と法規制 (1)

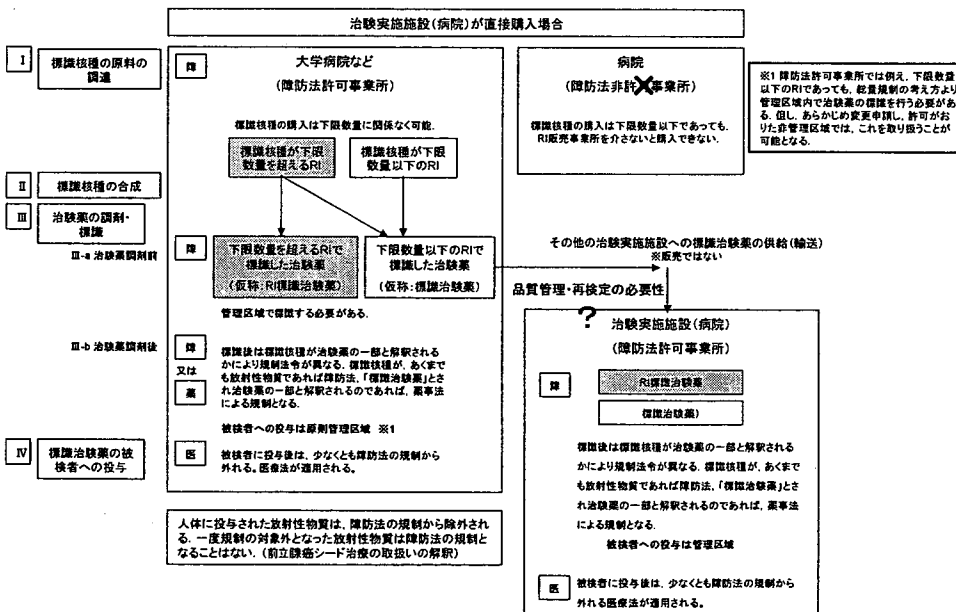


Fig. 2 探索的臨床試験 RI 標識治験薬と法規制 (2)

法の許可における病院であるかによって法律上の扱いが異なります。一方、試験が治験として見なされれば、薬事法の範疇に入り、放射線障害防止法の規

制からはずれるとの考えもあります。

6.2.8 RI 標識化合物を用いた臨床試験(まとめ)
このように、RI を用いた臨床試験に関しては