

様々な法律が複雑に絡み合っていますが、探索的臨床試験を治験と定義し、治験の中で使用される RI 標識化合物についても放射性医薬品として法律的に定義することが、実際の臨床試験を実施しやすくするのに必要であると研究班では考えています。そうすべき理由は、探索型臨床試験の結果は申請時に医薬品の評価資料として使用されるとは限りませんので、「承認申請のための臨床試験データを作成する」との治験の定義にあてはまらないと判断される可能性があるからです。また、放射性治験薬の取扱いについても、薬事法及び医療法の厚生労働省の規制下で一元的管理を推進することが望ましいと考えます。放射性医薬品の製造及び取扱い規則第 1 条第 1 項での放射性医薬品の定義は「放射線を放出する医薬品であって、別表第一に掲げるもの及び法第 2 条第 15 項（又は第 80 条の 2）に規定する治験の対象とされる薬物」と改正し、その治験の対象とされている薬物についても放射性医薬品の定義に含めることにより、薬事法の範疇で使われるものについては障防法の適用外となり実施しやすくなります。

RI 標識化合物をヒトに投与する際には、被験者の安全を確保するため、第三者的立場で放射線暴露量とその安全性について評価する専門的な委員会

の審議を受けることが望ましいと考えています。なお、現在薬物動態学会と臨床薬理学会の協力によって作られた医薬品開発支援機構（APDD）が RI 暴露についての安全性評価を行うようになり、活動を開始しています。

6.3 被験者の安全性確保

6.3.1 探索的臨床試験の実施に必要な非臨床試験

従来の ICH-M3 ガイドライン^{1,2)}に基づき、初めてヒトに投与する前の基準に関して、Table 14 に示すように様々な試験が要求されています。しかし、探索的臨床試験では投与量や投与期間が限定されることから、別の基準が必要です。そこで研究班では、MD 臨床試験の際に必要な非臨床試験について、欧米の動向を調査してまとめました（Table 15）。

6.3.2 I 型探索的臨床試験

I 型探索的臨床試験、すなわち、マイクロドーズでの単回投与試験に関しては、欧米では拡大型の単回投与毒性試験が要求されています。ただし、2007 年 5 月に開催された ICH-M3 会議では、この MD 試験を 2 種類に分類しています。一つは MD 試験を 5 回までの反復投与を可能とし、投与量の総計が 100 µg 以内の場合と、もう一つは、投与毎の最高

Table 14 標準的な薬物における標準的なタイミング (ICH-M3, 1997, 2000)

毒性試験の種類	初めてヒトに投与する前	第 II 相試験の前	第 III 相試験の前
安全性薬理試験			
コアバッテリー	○		
薬物動態試験			
トキシコキネティクス	○		
その他		○	
単回投与毒性試験	○		
反復投与毒性試験	原則、臨床試験を超える長さの試験		
2 週間	○		
1 月以上			
局所刺激性試験	○		
遺伝毒性試験			
<i>in vitro</i> 変異原性試験	○		
<i>in vitro</i> 染色体異常試験	○		
標準バッテリー		○	
生殖毒性試験			
雄性繁殖能試験			○
胚胎児試験	妊娠可能女性に投与する前（日本，EU）		
雌性繁殖能試験	妊娠可能女性に投与する前（日本）		

Table 15 探索的臨床試験の実施に必要な非臨床試験 (欧米の動向*)

探索的臨床試験の形	毒性試験 / 安全性薬理試験の範囲	毒性試験での用量レベルと評価指標
I型探索的臨床試験 (マイクロドーズでの単回投与試験) **	適切な動物種を用いた臨床投与経路での拡大急性毒性試験***. (<i>in vitro</i> の代謝データで適切と判断されるならば, 通常, げっ歯類)	NOAEL (Allometricで100倍以上の安全域をとる). 用量は100 μ g以下でかつ薬効用量の1/100を超えない.
II型探索的臨床試験 (臨床用量以下での試験. 薬効発現機構探索試験(MOA)に相当)	臨床での開始用量と用量漸増スキーム設定のための代替法, 修飾毒性試験, 薬理試験, 遺伝毒性試験, 及び単回投与毒性試験**** (2種動物での試験, 最も適切な動物種が確立されたならば, その動物種のみで良い.)	ヒトでの最高暴露レベル (Cmax 又は AUC) から10倍以上の安全域を2種の動物で確認することで, ヒトにおける安全性を確保する.
III型探索的臨床試験 (臨床用量での単回投与試験)	1種目の動物で2週間の反復投与毒性試験 (通常, げっ歯類)	NOAEL (allometricで4倍以上, AUCで2倍以上の安全域を確保する). 毒性プロフィール
	2種目の動物でのTK, 組織病理, 臨床薬理データを伴う単回投与毒性試験. 用量は1番目の種でNOAEL相当の用量	最初の種の感度が十分であることを確認
	遺伝毒性試験	陽性又は陰性
	安全性薬理試験 (コアバッテリー)	生命維持に肝要な機能
III型探索的臨床試験 (臨床用量での7日間までの反復投与試験)	1種目の動物で2週間の反復投与毒性試験 (通常げっ歯類)	NOAEL (allometricで4倍以上の安全域, AUCで2倍以上の安全域を確認). 毒性プロフィール必要
	2種目の動物種で7日間の反復投与毒性試験. 用量は1番目の種でNOAEL相当の用量	
	遺伝毒性試験	陽性又は陰性
	安全性薬理試験 (コアバッテリー)	生命維持に肝要な機能

*: ICH-M3で検討中, **: ICH-M3会議(2007年5月)では2つに分類, ***: 日本では臓器毒性の懸念が無い場合は病理組織学的検査は不要, ****: ICHでは毒性が出ない時は暴露(AUC)の1/10まで.

用量を100 μ gとし, 5回の合計が500 μ g以内の二つです. ICHでは, それぞれについて必要な非臨床試験の範囲について検討した結果, 現在までの中間的な考え方では, 合計で100 μ gを超えないMD試験のためには, 静脈内投与あるいは臨床投与経路での拡大急性毒性試験を1種のげっ歯類で行い, Toxicokinetics (TK) データを集めること及び薬理作用の特性を適切な動物種で調べることを求めています. 遺伝毒性試験は不要としています. また, 臨床投与経路での拡大急性毒性試験でRI標識化合物を投与する場合はその放射線暴露レベルの適切性が求められます. この拡大急性毒性試験について, 日本は今のところ必ずしもその条件に合意しているわけではなく, 特に懸念が無ければ病理組織学的検査は不要としています.

5回の合計が500 μ g以内のMD試験の場合は, TKと組織検索を含む7日間の毒性試験を1種のげっ歯類で行い, 薬理作用の特性を適切な動物種で調べることを, Ames試験結果及び適切な受容体スクリーニング結果を求めることで暫定的に合意されています. RI標識化合物の場合の暴露評価は100 μ gまでの場合と同様です. MD試験で反復投与を可能であるように規定した背景には, MD試験をPETに応用する際に, 同一被験者で何回か繰り返し投与することが必要であると考えられた事によります.

6.3.3 II型探索的臨床試験

同様にICH-M3会議の中間的結果では, 薬効用量以下の臨床試験の単回投与試験では拡大急性毒性試験を2種の動物で行うこととTK測定による暴露データと*in vitro*での代謝の結果, 局所毒

性の検討, Ames 試験, 安全性薬理試験のコアバッテリーが要求されます。この臨床試験での可能な最高暴露レベルはここで示しましたが, ICH では投与可能最大量 (maximum feasible dose) まで投与して毒性が出なかった場合にはその時の暴露量 (AUC) の半分まで臨床試験であげられるとしており, それに関しては日本も同意しています。

6.3.4 III型探索的臨床試験

臨床用量での単回投与試験については, ほとんど現行の ICH-M3 の考え方と変わりません。ただ最大耐量を明らかにすることは目的としていませんので, 想定される臨床用量以上に用量を上げることはありません。なお, 毒性プロフィールを明らかにし, 臨床試験での用量レベルは毒性試験で得られた NOAEL 及びそのときの AUC との比較で, それぞれ 4 倍及び 2 倍以上の安全閾を確保することが適当であると考えています。投与可能最大量まで上げても毒性が出ないような場合には, AUC の半分まで臨床用量を上げて構わないと規定しています。

臨床用量で反復投与する場合, ICH では 14 日間までは, 2 週間の反復投与毒性試験の結果に基づいて行うことで良いと合意されています。

6.3.5 拡大型単回投与試験実施の必要性

経口投与で MD 試験を行う場合の拡大型単回投与毒性試験の必要性について, 検討しました。拡大型単回投与試験では, 投与の 2 日目と 14 日目に組織病理学的な検査を行うことが要求されていますが, 検査の実施には時間も経費もかかりますし, 100 μg という低用量ではほとんど毒性が出ないと考えられますので, その試験の実施の必要性について疑問があります。

そこで, 今まで経口投与での致死量 (LD) が MD 試験で使用される用量の約 1000 倍である 2 mg/kg 以下の薬物について RTECS 等のデータベースを用いて検索し, それらの毒性を通常の単回投与毒性試験で予想できるか検討しました。

その結果, Table 16 に示すように MD レベル以下の用量, 約 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ での経口投与で致死毒性を現す低分子量物質は, Botulinum toxin, MCD peptide, TCDD の三種のみでした。なお, MCD peptide はハチ毒ですので経口投与で強い毒性が現れるとは考えにくいのですが, 今のところこれを否定するデータはみあたりません。また, MD レベル

の 100 倍の 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ でも致死毒性を現すものも非常にわずかです。これらの毒性のほとんどは, 一般的な単回投与毒性試験での詳細な症状観察と薬理作用, 化学構造から予想されるものです (Table 17)。

一方, Table 18 は経口投与量の致死量の種差を示したものです。これはヒトで最も小さな LD を示した結果と動物で最も大きな LD を示した結果の比を表したものです。すなわち, 動物によって最大どの位致死量に差があるかを検討したもので, 中には 1000 倍を超えるものもあります。例えば, アプリントキシンはリシン類の一種ですが, ヒトと動物とでは約 100 万倍もの大きな差があります。ヒトでのデータが経口投与の値か否かは不明です。この値が事実とすれば, 動物実験からのヒト毒性の予測は不可能なため, 動物実験をいくら行っても意味がないこととなり, 毒性学に関する学識を基に化学構造と薬理作用から予測する他ありません。

Table 18 で 1000 倍以上の物質もありますが, 多くは 1000 倍以内に納まっています。したがって, MD 臨床試験の前に動物実験で 1000 倍までの用量で毒性を検討することが適切であると考えています。

すなわち, 経口投与での LD の種差については, 100 倍以上の場合もあるので, MD 臨床試験を行うための毒性試験の用量は, 動物実験で 1000 倍の 2 mg/kg まで投与し, それで作用があるかないかを検討した上で, ヒトで実施するかどうかを判断するのが重要ではないかと思えます。ただし, 高齢者, 幼児, 遺伝的欠損のある人などのハイリスク患者はなるべく避けた方が良く, 何か思いがけない事象が起きた場合のために ICU を備えた施設で実施すべきでしょう。

6.3.6 トキシン類の非経口投与での毒性

(Table 19, 20)

MD 臨床試験では静脈内投与の場合, かなり低い用量で毒性を示すものがありますので, その毒性を調べるために, トキシン類について検討しました。なお, TDLo とは Lowest Tolerable Dose のことです。Shiga toxin は, 0.0031 $\mu\text{g}/\text{kg}$ でかなり強い毒性が現れるものがあり, 致死量が 0.02 μg のものがあります。Shiga toxin A, B や Diphtheria toxin などの様々なトキシン類が MD レベル以下の非経口投与で腎毒性や消化器毒性, 呼吸器毒性, 肝毒性

Table 16 致死量が0.2mg/kg以下の物質

Substances		animals	route	LD(mg/kg)	Ref.
Botulinum toxin	LD50 ^{*1}		po (?)	0.00001	C&D ³⁾
MCD peptide	LD50	rat	po	0.000647	内藤 ⁴⁾
TCDD	LD50		po (?)	0.001	C&D ³⁾
Abrin A toxin	LDLo ^{*2}	human	po	0.007	Sigma ⁵⁾
Abrin C toxin	LDLo	human	po	0.007	Sigma ⁵⁾
Lectin, from Abrus precatorius (Abrin A, Abrin C も同様)	LDLo	human	po	0.007	Sigma ⁵⁾
Abrins	LDLo	human	po	0.007	RTECS ⁶⁾
Saxitoxin	LDLo	human	po	0.010	鶴飼 ⁷⁾
Tetrodotoxin	LDLo	human	po	0.010	鶴飼 ⁷⁾
TCDD-14C, 2,3,7,8-	LD50	rat	po	0.020	Sigma ⁵⁾
Tetrodotoxin	LD ^{*3}	human	po	0.040	吉村 ⁸⁾
Amanitin	eLD ^{*4}	human	po	0.10	鶴飼 ⁷⁾
Chlordane	LDLo	woman	po	0.12	Sigma ⁵⁾
Dinophysistoxin-1	LD	mouse	po	0.16	内藤 ⁴⁾
Digitoxin	LDLo	cat	po	0.18	RTECS ⁶⁾ , Merck ⁹⁾
Saxitoxin	LD50	dog	po	0.18	RTECS ⁶⁾
Saxitoxin	LD50	rat	po	0.19	RTECS ⁶⁾
Okadaic acid	LD	mouse	po	0.20	内藤 ⁴⁾
Tetrodotoxin	LD50	cat	po	0.20	鶴飼 ⁷⁾
Digoxin	eLD	human	po	0.20	吉村 ⁸⁾

*1: 50%致死量, *2: 最低致死量, *3: 致死量, *4: 推定致死量

等の毒性が現われます。

欧米で拡大型臨床の単回投与毒性試験が要求されているのは、臓器毒性の評価に必要なためですが、適切なタイミングで血中酵素、尿中酵素、血液像を調べることにより、肝臓、腎臓、血液毒性を検出できます。毒性が起こると懸念される場合には当然、病理組織学的検査が必要と考えます。

これらのトキシン類の多くはタンパク性のものです。新規作用機構の薬物やタンパク製剤の静脈内投与では、MD レベルでも強い毒性を現す場合がありますので、慎重な対応が必要です。一方、静脈内投与試験の場合は、経口投与の場合と比べ、種差はかなり小さいと思われれます。したがって、動物実験を行う際にはMD レベルの100倍くらいまで行えば十分な情報が得られると考えられます。

6.3.7 薬効用量の推定方法

探索的臨床試験では非臨床試験結果から薬効用量を推定し、それに基づいて試験実施用量が決まります。したがって、探索的臨床試験の前に科学的に妥当な薬効用量推定方法が定まっていなければなりま

せん。その推定方法は、① *in vitro* での薬理作用の発現濃度、②単回投与あるいは反復投与動物実験での薬理学的影響発現濃度、③類薬の情報、等を用いて体表面積あたりの換算や生理学的薬物動態理論に基づいて推定するのが良いと考えています。

6.3.8 MD 試験結果の臨床用量での PK 予測性 (Table 21)

MD 試験で得られた薬物動態データが本当に薬効用量でのヒトの薬物動態を反映しているかということに関して、日本薬物動態学会は、トランスポーターの Km 値や代謝酵素の Km 値など低いところでは線形となるのは当然なので、100倍ぐらいの差があっても外挿できるとコメントしています。ただし吸収段階のトランスポーターで飽和が起きてしまうなど、予想できない事態が生じることもあることも示され、その場合は線形性からはずれるとしています。

6.4 被験物質の品質確保

6.4.1 治験薬 GMP

医薬品開発を促進するための探索的臨床試験を意

Table 17 まとめと考察

- 0.02mg/kg 以下の経口投与で毒性を現すとの報告には信頼できないものが多い。
 - 致死量がマイクロドーズ試験の用量の約 100 倍である 0.2mg/kg 以下の物質は少ない。特に、2 μ g/kg 以下は TCDD と MCD peptide, および Botulinum toxin のみであった。2-20 μ g/kg は Abrin toxin と Saxitoxin, Tetrodotoxin のみであった。20-200 μ g/kg は Amanitin, Dinophysistoxin, Okadaic acid, Methylphenidate, Digoxin, 及び Digitoxin のみであった。
 - これらの多くは、詳細な症状観察を含む、通常の単回投与毒性試験あるいは安全性薬理試験で検出できる。
- 経口投与での MD 臨床試験のためには通常の単回投与試験で良い(?)。

味あるものにする、また、被験者の安全とデータの信頼性を確保するために、GCP 下で行われる臨床試験の被験物質は GMP 基準¹⁰⁾に則って、試験で用いられる被験物質の品質が保証されていなければなりません。治験薬 GMP の目的は、「治験の信頼性の保証」, 「将来の市販製品への一貫性, 同一性」であり、将来、その製品が市販された場合、治験薬

と市販後製品との間の一貫性及び同一性を保証し、製品の有効性や安全性を確保すること、そして「被験者の保護」, すなわち臨床試験段階で被験者を保護するために治験薬の品質を保証することです。

それぞれの目的の適用の可否を伝統的な臨床第 I 相から第 III 相試験で考えますと、「被験者の保護」と「治験の信頼性の保証」については、治験段階によらず必要ですが、「将来の市販製品への一貫性又は同一性」については、臨床第 II 相に用いられる被験物質は市販製品への高い類似性を求められ、第 III 相では、市販製品への同一性が求められます。しかし、探索的治験の目的は、開発候補の選定であり、その後の開発に直接つながるものではありませんので、探索的治験の被験物質においては「将来の市販製品への一貫性又は同一性」の保証は必要ないと考えられます。

研究班としては、医薬品開発の初期段階では被験物質の製造量は少なく、また製造方法が確定していない場合が多いため、今までの治験薬 GMP の考え方を一律に適用するのは望ましくないと考えています。治験薬の品質は臨床開発の段階を追って整備されていくものであり、特に探索的臨床試験の場合は、その後の臨床試験に直接つながるものではないことから、品質の一貫性に関する要求は不要と考えていま

Table 18 経口投与での致死量の種差

経口投与での致死量の種差 (mg/kg)	ヒト LDLo	マウス LD50	ラット LD50	イヌ LD50	動物/ ヒト
Botulinum toxin A*	2.14	81.4	96		44.86
Abrin A toxin	0.007	6638			948286
Digitoxin	0.071		56	0.5	789
Cantharidin	0.28	1		60	214
Colchicine	0.4	5.886	2.5		15
Methadone HCl	0.5	70	95		190
Aminopyridine 4-	0.59	658	1050	3700	6271
Alphaprodine HCl	1.4	68	90		64
Arsenic (III) oxide	1.429		40		28
Fluoroacetamide	2		5.75		2.9
Sodium metaarsenite	2		41		21
Thallium(I) sulfate	2.166	35	16	16	16
Emetine	2.941	12	12		4.1
Warfarin	6.667	323	1.6		48
Barium carbonate	11		418		38
Aconitin	28	1			0.04
Chlordane	29		283		9.8

*: Unit/kg

Table 19 トキシン類の経口及び非経口投与での毒性 (Table 16に記載したものを除く)

トキシン名	動物種	LDの種類	投与経路	LD($\mu\text{g}/\text{kg}$)	備考
Shiga toxin 2	Mouse (妊娠 5 日)	TDL ₀ * ¹	iv	0.0031	着床後死亡 (e.g., dead and or resorbed implants per total number of implants)
Shiga toxin 2	Rat	TDL ₀	iv	0.010	腎尿細管変化 (including acute renal failure, acute tubular necrosis). Urine volume increased. Weight loss or decreased weight gain
Shiga toxin 2	Rat	LD	iv	0.020	腎尿細管変化 (including acute renal failure, acute tubular necrosis)
Shiga toxin 1	Rat	TDL ₀	iv	0.040	Urine volume increased. Fluid intake. Weight loss or decreased weight gain
Shiga toxin 1	Rat	LD	iv	0.100	腎機能抑制
Toxin A, Clostridium difficile	Mouse	TDL ₀	po	0.240	消化器: Hypermotility, diarrhea
Clostridium difficile toxin B	Mouse	TDL ₀	po	0.240	消化器: Hypermotility, diarrhea
Diphtheria toxin	Child	LDL ₀	Parenteral	0.488	呼吸器: Consolidation. 腎尿細管変化 (including acute renal failure, acute tubular necrosis). 皮膚腐食
Toxin, aphanizomenon flos-aquae (algae)	Mouse	LD50	ip	10.0	呼吸器: Dyspnea
Toxin BE 4 (Microcystis aeruginosa)	Mouse	LD50	ip	25.0	血液凝固因子変化
Staphylococcal enterotoxin B	Monkey	LDL ₀	iv	25.0	消化器: Nausea or vomiting, 内分泌: 高血糖, 低血糖
Toxin, blue green alga, Microcystis aeruginosa	Mouse	LD50	ip	32.5	行動: Somnolence (general depressed activity)

*1: 最低耐量

す。また、探索的な臨床試験の場合には、ワンバッチの被験物質で行うということを前提としていますので、バッチの品質が一貫して同じものであることを証明することは、必ずしも必要ないということです。

以前より欧米では臨床開発段階の初期ではヒトに投与される薬剤の安全性を保証できれば良いとの考え方で、GMP 基準の柔軟な運用を行っています。一方、日本ではかなり厳格に適用されていますので、そのままでは MD 臨床試験や探索的臨床試験を行

う際に障害になると考えています。

6.4.2 RI 標識体の品質について

通常 MD 試験では、 10^{-18} という極めて少量の RI 標識体しか使用しません。PET の場合でも使われる量は少なく、標識体の寿命は長くても 2 時間以内と極めて短いものです。そのような標識体について GMP に則って品質を保証することは困難ですので、標識体の特性に応じて確認試験を行うということでも十分ではないかと考えています。もちろん被験者の安全確保は非常に重要ですので、それを保証するた

Table 20 強毒性トキシン類の毒性徴候

トキシン名	動物種	LDの種類	投与経路	LD(ug/kg)	備考
Toxin, blue green alga, Microcystis aeruginosa	Mouse	LDLo	ip	43.0	肝臓 Changes in liver weight, 血液 Changes in serum composition (e.g., TP, bilirubin, cholesterol), 生化学 Multiple enzyme effects
Gymnodimine	Mouse	TDLo	ip	44.5	末梢神経 Flaccid paralysis without anesthesia (usually neuromuscular blockage)
Toxin, blue green alga, Microcystis aeruginosa	Rat	LD50	ip	50	肝炎 (hepatocellular necrosis), zonal, 泌尿器 Changes in tubules (including acute renal failure, acute tubular necrosis)

Table 21 マイクロドーズ試験結果の臨床用量でのPK予測性

- 「薬物濃度が代謝酵素，トランスポーターなどへの Km 値に比べて十分に低いところでは，線形性が保たれる」ことは当然であり，それを否定する根拠はないと考えている。また，今日治療に用いられている医薬品の多くにおいて，臨床投与量では，溶解度が原因である以外を除けば薬物動態が原因で非線形性を生じる例は少ない。

(日本薬物動態学会：早期臨床試験による医薬品開発促進に関する意見書 2005より引用)

めの設備能力やその洗浄度が維持されること，また微生物汚染がないことを確認した上で試験を実施する必要があります。

6.4.3 治験薬 GMP への現状認識

現行の治験薬 GMP は医薬品 GMP と比較して不整合なところがあり，国際調和からも大きくはずれているといわれています。通常の治験においても，現行の治験薬 GMP を適用するのは困難であると研究班では認識しています。

6.4.4 治験薬 GMP 実行上の課題

日本での治験薬 GMP は，Table 22 に示すような問題が指摘されています。

例えば，治験段階によらない一律な適用が行われており，開発の初期の段階としては厳しすぎる規制となっていますが，開発の後期では緩過ぎるのではないかと指摘があります。

一般的な GMP 規制では，治験薬製造に関してバッチ毎の同一性を示すためのバリデーションを行う

Table 22 治験薬 GMP の実行上の課題

- 治験段階によらない一律な適用
- 治験薬 GMP 三役（治験薬品質管理者，同製造管理責任者，同品質管理責任者）の設置の義務づけと治験薬品質管理者による出荷承認
- 治験薬製品標準書の設定と固有名名称による SOP の設定
- 恒常性を伴わない治験薬製造に対する「バリデーション」の義務があるが，「ベリフィケーション」の概念の欠落
- その他の国際的不整合

必要があります。しかし，前述したようにワンバッチでしかないことや RI 標識化合物の特性などを考えれば「ベリフィケーション（確認）」といった概念を GMP の中に入れていくのが良いと指摘されています。

その他にも様々な国際的な不整合がありますので，それに対する対応がこれから求められると考えています。

7. 平成 19 年度の計画

本研究班は，平成 18 年度に 1 年の期間で特別研究のために組織されましたが，平成 19 年度も新たな計画としてテーマが採用されましたので，同じメンバーで研究班を組織し，Table 23 に示すような検討を行う予定です。

具体的には，国内での議論は ICH の議論と若干ずれているところがありますので，整合性を図ることを考えています。ICH では 5 月の会議のあと，

Table 23 平成19年度計画

- MD 試験ガイドライン案の作成
(適用範囲についての検討)
- 探索的臨床試験ガイドライン素案の作成
- 治験薬 GMP についての検討

今回は10月に横浜で開催される予定ですので、横浜でステップ2に達することを目標に作業を進めています。ステップ2の段階で最終的に探索的臨床試験そのものの定義や分類が確定し、そのために必要な非臨床試験の範囲が確定しますので、それに合わせて国内の指針も変えるべきと考えています。

3項で述べたように、総合科学技術会議で2007年夏を目途に検討することを指示されましたので、それまでにMD臨床試験のガイドラインの案の作成を進めていく予定です。今のところ、どこまで探索的臨床試験の考え方を適用するかについて、研究班としての結論はまだ出ていません。ICHのM3のガイドラインではバイオテクノロジー産物はその適用外で、一般的な医薬品及び低分子のタンパク化合物について適用するとの考え方で検討を進めています。米国のe-INDのガイドラインのようにバイオテク産物にも適用するかは今後の検討課題です。

ガイドライン素案に関しては、東京大学杉山雄一

先生らのグループに精力的に検討していただき、作成していただきました。感謝します。

文 献

- 1) 厚生省医薬局審査管理課長：医薬品の臨床試験のための非臨床安全性試験の実施時期についてのガイドラインの改正について、医薬審第1019号，平成10年11月13日。
- 2) 厚生省医薬安全局審査管理課長：医薬品の臨床試験のための非臨床安全性試験の実施時期についてのガイドラインについて、医薬発第1831号，平成12年12月27日。
- 3) Casarett & Douls 5th ed. (2001).
- 4) 内藤裕史著：中毒百科，南江堂 (2001)。
- 5) The Sigma Aldrich Library of Chemical Safety data, ed II. (1988).
- 6) Registry of Toxic Effects of Chemical Substances (RTECS).
- 7) 鶴飼 卓：急性中毒処置の手引き第3版，日本中毒情報センター編，薬業時報社 (1999)。
- 8) 吉村正一郎：急性中毒情報ファイル第3，廣川書店 (1996)。
- 9) Merck Index 13th ed. (2001).
- 10) 厚生省薬務局長：治験薬の製造管理及び品質管理基準及び治験薬の製造施設の構造設備基準(治験薬GMP)について，薬発第480号，平成9年3月31日。

動物実験代替法の国際動向

大野 泰雄

Abstract : There were several international and national institutes for the promotion of 3Rs. Those were ECVAM, ICCVAM, NCA, ZEBET, JaCVAM and etc. FRAME, 3R Research Foundation, and NC3Rs are agencies that support research on alternatives. This article introduced those institutes and agencies outside Japan and explained situation of regulatory acceptance of alternatives by OECD, EU, and US. Scientific association for the promotion of 3Rs were also established in Europe, Japan, and Korea. 6th World Congress on Alternatives and Animal Use gathered more than 1000 attendents from every continents. 3Rs is now globally accepted to harmonize the need of life science and ethical requirement to respect life.

3Rs declaration was agreed by EU governments and industries in 2005. They promised to establish partnership among them to promote 3Rs. REACH project was accepted in 2006 to improve the protection of human health and the environment while maintaining competitiveness. About 30,000 chemicals, produced more than 1 ton/year, are to be registered with some kinds of safety data. This implies conduct of a lot of animal experiments. Therefore, the use of alternative methods are recommended where appropriate methods are available.

Key words : alternatives, ECVAM, ICCVAM, 3Rs declaration, REACH

1. はじめに

動物を用いる生命科学研究が社会に受け入れられ、その支持を得、意味のない摩擦を避けるためには、不必要な動物実験を止め、やむを得ず行う動物実験においては適切な手続きに従い、動物使用数と動物に与える苦痛を最小限にする必要がある。

欧米ではこのような認識は古くからあり、

“Current situation of alternatives to animal experiments outside Japan.”



Yasuo Ohno (National Institute of Health Sciences, 国立医薬品食品衛生研究所—158-8501 東京都世田谷区上用賀1-18-1)

1976年国立衛生試験所入所。現在、国立医薬品食品衛生研究所副所長、日本薬理学会評議員、日本動物実験代替法学会評議員、HAB協議会評議員、日本薬物動態学会監事。薬学博士。

1954年にはRusselとBurchにより動物実験代替法(代替法)についての3Rsの原則が提案された。また、イギリスでは医学分野における実験動物を他のものに置き換えるための基金(FRAME)が1969年に、米国では1981年にジョンズホプキンス大学に代替法センターが開設され代替法の開発や評価が行われてきた。新たに開発された動物実験代替法を科学的に評価し、可能なものについては取り入れていこうという考えの下、EUは代替法開発の拠点とし、代替法についてのデータベースを設置・維持するため、また、行政、産業、生物・医学分野の科学者、消費者、および動物愛護運動グループの対話を促進することを目的に1991年に代替法バリデーションセンター(European Center for the Validation of Alternative Methods: ECVAM)を設立した。米国は毒性試験法の開発、バリデーション、受け入

れ、および国内・国際レベルでのハーモナイゼーションに関する問題を連邦政府内で調整するためにNICEATM (NTP Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods) の下にNIEHS (National Institute of Environmental Health Sciences) の機関としてICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods) を1993年に設置した。ICCVAMは15の行政機関および研究機関からの代表により構成され、米国内外から提供されたバリデーションデータのPeer Reviewによる代替法評価を行っている。

1996年には安全性評価のための動物実験代替法のバリデーションと行政的受け入れに関するOECDの会議が開催され、それらの基準が示された²⁾。その要点については、先に解説した³⁾。要約すると、代替法はリスクアセスメントの目的のために、既存の方法と比較し同等以上、望むらくはそれ以上の価値を有するデータが得られ、堅牢かつ経済的であり、科学的、倫理的に妥当なものでなくてはならない。また、それらが、code化された被験物質を用い、GLP原則に準じて行われた適切なバリデーションに基づく公開データで裏付けられたものでなくてはならない。また、施設内外での反復性や再現性についての情報が提供されなければならない。

なお、ECVAMやICCVAMでは従来の安全性試験の代替法のみならず、定量的構造活性相関や内分泌かく乱化学物質検索のような新たな毒性評価の要請やトキシコゲノミクスのような新しい技術を取り入れるための検討も行っている。また、ECVAMとICCVAMは評価結果の相互承認や共同バリデーションの実施などの協力を行っている。

本稿では代替法の受け入れ状況と、それを巡る最近の国際情勢について述べる。

2. 動物実験代替法を巡る最近の国際状況

2-1. OECDの状況

医薬品や農薬、化学物質の安全性評価においては、行政やOECDのような国際機関の定めた毒性試験法ガイドラインに基づいて各種の試験が実施されることが多い。これらの試験法についても、

動物福祉への配慮が求められ、2002年よりOECD安全性試験法専門家会議に動物福祉団体代表で構築されたInternational Council on Animal Protection in OECD Programmes (ICAPO) の代表が参加するようになった。最近承認された動物福祉を考慮した試験法ガイドラインを表1に示した。皮膚感作性試験法 (OECDガイドライン429: Local Lymph Node Assay (LLNA)) が1998年に採用された。これはモルモットを用いるMaximization法に完全に替わるものではないが、動物の使用数や動物に与える苦痛が少ない方法である。2000年には動物実験に関する人道的なエンドポイントに関するガイドライン⁵⁾を通知した。また、単回投与毒性試験においては統計的に厳密なLD50値を求めないとし、従来の多数の動物を用いてLD50値を求める試験法(401)を廃止し、10匹程度の動物でLD50を推定する試験法(420: Fixed Dose Method, 423: Acute Toxic Class Method, 425: Up-and-Down Procedure)を採用した(2001)。また、2002年には皮膚腐食性試験として皮膚の導電度を測定する方法(TER法)や培養細胞を用いて作成した皮膚三次元モデルを用いる試験法(430: Transcutaneous Electrical Resistance Test, 431: Human Skin Model Test))が⁶⁾、2004年には皮膚吸収性試験のためのヒトやブタの皮膚を用いた試験法(同428: Skin Absorption: *in vitro* Method)や光毒性試験ガイドライン(432: *In Vitro* 3T3 NRU phototoxicity test)が採用された。これらの試験法については別に解説した⁴⁾。

最近の動きとして、2006年には皮膚腐食性のための*In vitro*膜バリアー試験法(435: *In Vitro* Membrane Barrier Test Method for Skin Corrosion)が記載された。また、ガイドライン案として、2006年度に*In vitro*小核試験(Draft Proposal for 487: *In Vitro* Micronucleus Test)、並びに、hER-HeLa-9903 Cell Lineを用いたStably Transfected Transcriptional Activation (TA) Assayがエストロゲン様作用の検出試験法として記載された⁶⁾。今後も*in vitro*の眼刺激性試験や皮膚刺激性試験、感作性試験などの開発が期待されている。

表1 代替法の行政的受け入れ状況 (http://ecvam.jrc.it/index.htmに一部追加)

1) EpiSkin™ skin corrosivity test (67/548/EEC 2000, OECD 2002)
2) 3T3 NRU phototoxicity test (67/548/EEC 2000, OECD 2002)
3) EpiDerm™ skin corrosivity test (67/548/EEC 2000, OECD 2002)
4) Rat TER skin corrosivity test (67/548/EEC 2000, OECD 2002)
5) In vitro tests for percutaneous absorption (OECD 2002)
6) Deletion of the acute oral toxicity test, Lethal Dose (LD50) (67/548/EEC 2001, OECD 2001)
7) Local Lymph Node Assay for skin sensitisation (LLNA) (OECD 1998, updated 2002, U.S. EPA OPPTS 1998)
8) ELISA test for batch potency testing of erysipelas vaccines (EDQM/European Pharmacopoeia 2004)
9) ELISA test for batch potency testing of tetanus vaccines for human use (EDQM/European Pharmacopoeia 2003)
10) Toxin Binding Inhibition (ToBI) test for batch potency testing of tetanus vaccines for human use (EDQM/European Pharmacopoeia, 2003)
11) In Vitro Membrane Barrier Test Method for Skin Corrosion (OECD 2006)

括弧の中はそれぞれの機関で承認された年を示した。

EDQM : European Directorate of the Quality of Medicines & HealthCare

2-2. EUにおける状況

2-2-1. EUにおける化粧品安全性評価と代替法の受け入れ状況

EUでは1993年の化粧品の安全性評価に関する指令⁷⁾において、適切な代替法があればとの前提つきではあるが、1998年までには実験動物を用いて安全性を評価した化粧品原料および最終製品の販売を禁止することを決めた。しかし、代替法の開発・バリデーションが充分でなかったことから、その施行を2000年6月30日まで延期した。その後、2002年6月末まで再度延期された。その再再延長に関する調停会議での合意結果を踏まえ、化粧品およびその原料の安全性評価に関する化粧品指令第7次改正がEU政府および議会で認められ、2003年3月11日付けで公布された⁸⁾。その内容は①ECVAMやOECDで承認された代替法があるものはすべて即時禁止、②2009年までに動物を用いるすべての安全性試験を全面的に禁止、および動物実験を行った化粧品の販売禁止、また、動物を用いて安全性評価を行った化粧品のEU域内への輸入を禁止、ただし、③薬物動態試験や生殖発生毒性、反復投与毒性試験などの全身的な作用を検討する試験については2013年まで猶予する、というものである。

第七改正が成立したことを受け、ECVAMは重点課題を以下の11項目に整理した⁹⁾。1) 全身毒

性(単回投与毒性、反復投与毒性、神経毒性、肺毒性、腎毒性、肝毒性、免疫毒性、血液毒性)、2) 局所毒性(光毒性、皮膚腐食性、皮膚刺激性、眼刺激性)、3) 感作性(皮膚感作性、吸入感作性)、4) 発がん性、5) 生殖毒性、6) トキシコキネティクス、7) 環境毒性、8) 科学的な情報サービス、9) 定量的構造活性相関、10) 生物学材料(発熱性物質試験)、11) 戦略開発(*in vitro* 毒性試験やバリデーションにおけるGLP, Good Cell Culture Practice (GCCP) のガイドライン、トキシコゲノミクス)。

これらのうち、光毒性試験、皮膚腐食性試験、皮膚感作性試験、および経皮吸収試験についてはOECDレベルあるいはEUレベルでのガイドラインあるいはその案が存在する(表1)。また、ECVAMの諮問委員会であるESAC (ECVAM Scientific Advisory Committee)は1997年には3T3 NRU 光毒性試験、1998年には皮膚腐食性試験としてヒト皮膚三次元モデルであるEPISKIN™とTER法を、2000年には皮膚感作性のためのLLNA試験、EpiDerm™皮膚腐食性試験、CORROSITEX™皮膚腐食性試験を確立された代替試験法として承認した(表2)。生殖毒性試験については2002年には生殖発生毒性評価のための胚性幹細胞試験、全胚培養試験、マイクロマス試験を科学的にバリデーションされた方法として

ESACより報告された。このESACの結論を受けてEUはこれらの代替試験から得られたデータを化粧品の安全性評価に用いることに合意した。

EUの化粧品および非食品に関する健康および消費者保護担当機関であるSCCNFP (Scientific Committee for Cosmetic Products, and Non-food Products intended for Consumers) は光毒性試験 (3T3 NRU PT法) および皮膚腐食性試験 (TER, EPISKIN™, EpiDerm™法) を公的に validation された試験法として認めた。また、経皮吸収試験 (ヒトあるいはブタ皮膚を用いる *in vitro* Skin Absorption法) および皮膚感作性試験 (LLNA法) を認めた (2002)¹⁰⁾。なお、フランスは眼刺激性試験法としてアガロースゲル拡散細胞毒性試験法とウサギ角膜線維芽細胞法 (NR) を公示した (1999.12.30)。

ECVAMは現在単回投与毒性試験と皮膚刺激性試験、および眼刺激性試験についてはバリデーシ

ョン中、あるいはその準備中である。また、*in vitro* 胎児毒性試験、皮膚刺激性試験、急性毒性試験、免疫毒性試験、トキシコゲノミクスについて ECVAM 主催の Workshop を開催し、検討を進めている。なお、ECVAM は 2004 年の “Report for establishing the timetable for phasing out animal testing for the purpose of the Cosmetic Directive” において、皮膚腐食性、皮膚刺激性、光毒性、光遺伝毒性を除く多くの試験法は、化粧品指令第 7 次改正の禁止年には完全代替は困難と予測している。このため、ECVAM は、第 6 次 Framework Programme on Research and Development として、急性毒性試験、生殖発生毒性試験、感作性試験に関する検討プロジェクトを組織した。また、2002 年より NICEATM (The NTP Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods) と共同で急性経口毒性を評価するための *in vitro* 細胞毒性試験のバリデ

表 2 ESAC (ECVAM Scientific Advisory Committee) により科学的にバリデーションされた代替法として報告された試験法 (<http://ecvam.jrc.it/index.htm>)

- 1) Artificial skin models (EPISKIN®, EpiDerm®) for skin irritation testing (27 April 2007)
- 2) Reduced Local Lymph Node Assay (rLLNA) for skin sensitisation (27 April 2007)
- 3) Statement on the conclusion of the ICCVAM retrospective study on Organotypic *in vitro* assays as screening tests to identify potential ocular corrosives and severe eye irritants. (27 April 2007)
- 4) Micronucleus Test as an Alternative to the *In Vitro* Chromosome Abberation Assay for Genotoxicity Testing (17 November 2006)
- 5) SkinEthic™ Human Skin Model for Skin Corrosivity Testing (17 November 2006)
- 6) Five *In Vitro* Pyrogen Tests (21 March 2006)
- 7) Testing Strategy to Reduce the Use of Fish in Acute Aquatic Toxicity Testing (21 March 2006)
- 8) The Colony Forming Unit-Granulocyte/Macrophage (CFU-GM) Assay for Predicting Acute Neutropenia in Humans (21 March 2006)
- 9) ELISA test for batch potency testing of erysipelas vaccines (28 June 2002)
- 10) Embryonic stem cell test for embryotoxicity (01 May 2002)
- 11) Micromass embryotoxicity assay (01 May 2002)
- 12) Whole rat embryo embryotoxicity assay (01 May 2002)
- 13) CORROSITEX assay for skin corrosivity (06 December 2000)
- 14) ELISA test for batch potency testing of tetanus vaccines for human use (06 December 2000)
- 15) Toxin Binding Inhibition (ToBI) test for batch potency testing of tetanus vaccines for human use (06 December 2000)
- 16) Local Lymph Node Assay for skin sensitisation (LLNA) (21 March 1999)
- 17) 3T3 Neutral Red Uptake (NRU) phototoxicity test (1997)
- 18) *In vitro* production of monoclonal antibodies (14 May 1998)
- 19) EpiSkin™ skin corrosivity test (03 April 1998)
- 20) Rat Transcutaneous Electrical Resistance (TER) skin corrosivity test (03 April 1998)
- 21) EpiDerm™ skin corrosivity test (21 March 1998)

ーション研究を実施した。

2-2-2. EUにおけるECVAM以外の代替法関連機関の活動

EUにはドイツのZEBET (Centre for Documentation and Evaluation of Alternatives to Animal Experiments, 1989設立) やオランダのNCA (Netherlands Centre for Alternatives to Animal Use) のような国レベルの代替法研究機関がある。また、イギリスにおけるFRAME (Fund for the Replacement of Animals in Medical Experiments: 1969年設立) やスイスにおける3R Research Foundation (1987設立) のような代替法研究支援のための民間の財団が以前から存在し、代替法に関する情報の収集や研究、バリデーション、あるいはそれらの支援活動を行ってきた。最近では2004年にイギリスにおいて動物試験、研究における3Rsの推進、開発、実施を目的にNC3Rs (National Centre for the Replacement, Refinement and Reduction of Animals in Research)²⁰⁾が設立された。質の高い3Rs研究に資金を提供し、3Rsを広めるためのセミナーやシンポジウムを組織し、また、3Rsの情報ソースやガイドラインを開発している。これには英国内務省やMRC (Medical Research Council), BBSRC (Biotechnology and Biological Sciences Research Council), ABPI (The Association of the British Pharmaceutical Industry) およびThe Wellcome Trustより資金が提供されている。

代替法に関連する学会として、ESTIV (European Society of Toxicology *in Vitro*) があり、*in vitro*毒物学を促進することを目的に活動し、「Toxicology *in Vitro*」を発刊している。また、MEGAT (Middle European Society for Alternative Methods to Animal Testing) も、代替法の普及とバリデーション、3Rsの分野での研究の推進、メディアへの情報提供などを目的に活動している。

2-2-3. 化粧品業界の活動

COLIPA (欧州化粧品工業連合会) は動物試験代替法の開発と受け入れに向けたコーディネートを目的に、1992年にSCAAT (Steering

Committee on Alternatives to Animal testing) を常設の委員会として設置した。現在、眼刺激性、感作性・皮膚刺激性、光毒性および変異・遺伝毒性に関する代替法検討のための4つのTask Force (TF) があり、それぞれ積極的に活動が進められている^{11) 12)}。

このうち感作性・皮膚刺激性TFにおいては、日本企業により開発されたヒト単球由来細胞株であるTHP-1細胞を用いた*in vitro*皮膚感作性試験h-CLAT (human Cell Line Activation Test) のring studyが2004年6月から開始された。また、同様のU937細胞を用いた試験法やグルタチオンや合成システインペプチドとの結合性を評価するpeptide reactivity assayなどが評価されている。

2-2-4. 3Rs宣言

2005年11月に行われた欧州委員会主催のワークショップ「EU goes Alternatives」において、今後、EUの各産業分野において、効果と安全性の両面に関する代替法の開発を促進することが宣言された(3Rs宣言)。これには代替法開発に関するパートナーシップ (EPAA: European Partnership for Alternative Approaches to Animal Testing) として¹³⁾、欧州委員会からは企業、研究、健康と消費者保護、環境、共同研究センターのそれぞれに関わる常任理事会およびECVAMの6機関が参加している。工業会からもCEFIC (欧州化学品工業会)、EFPIA (欧州製薬団体連合会)、COLIPA (欧州化粧品工業会)、Euro BIO (欧州バイオテクノロジー工業会)、AISE (石鹼洗剤協会)、ECPA (欧州農薬工業会) など6団体が参加している。また、医薬品、化粧品、化学品メーカーなど27企業が参加している。

3Rs宣言においては以下のような基本認識が示されている。

- 1) 政策の策定・施行にあたり、動物の福祉要件を全面的に尊重する。
- 2) 大部分の産業部門は動物実験抜きでは充足し得ない規制・行政上の義務を負っている。
- 3) 動物試験の置き換えが可能な分野ではそのための研究を、いまだ達成できない分野では、動物実験の削減と洗練に関する研究を加速化するように努力すべきである。

- 4) いくつかの分野では置換代替法の使用により既に評価できるようになっている。その他でも、より少数の実験動物を用い、また実験動物の苦痛を緩和した方法で評価することが可能となっている。
- 5) 3Rs促進のために、更に、探求する余地が多く残されている。
- 6) 動物実験への依存性の低い安全性評価への革新的取組みにプロテオミクスやゲノミクス、バイオインフォマティクスのような先端技術を活用できる。
- 7) 会議参加者は、実験動物の福祉および3Rsへの新しい取組みを連携・強化する必要性がある。
- 8) 新試験法の開発は動物実験を減らすだけでなく、EU企業の競争力を高めるものである。

また、EU政府と関連機関および団体・企業は以下の点について合意した。

- 1) 企業団体とEU委員会が動物試験の削減を目的とした代替法を用いた対応を促進するための協力関係を構築する。
- 2) 短期・中期・長期的活動および応分の責任範囲を特定する「行動計画」の策定、およびその年次改正・更新に寄与する。
- 3) 適切な資源と資金提供を通して代替法の開発、妥当性検証、実施を促進し、かつ、規制当局による承認の迅速化を目指す。

この合意に基づき、1年後の2006年12月にBrusselsでEPAA年次大会が開催され、EPAAの進捗状況とステークホルダーによる評価が報告された。

2-2-5. REACH (Registration, Evaluation, and Authorisation of Chemicals) の施行と代替法

REACHはヒトの健康と環境保護を改善するとともに、EUの化学産業の競争力を維持し、イノベーション能力を高めることを目的とし、化学物質によるリスクを管理し、流通経路の各段階で、安全性に関する情報を提供する責任を課すものである。

この規制は2006年12月18日にEU委員会の環境閣僚理事会で承認され、2007年6月1日から発効することになった^{14)~16)}。REACHは、EU域内で年間1トン以上製造・輸入されるすべての化学物質の登録を既存物質と新規物質を区別せずに義務付けるものであり、3万種の化学物質が対象となる。既存物質の登録期限は物質の製造・輸入量や有害性への懸念によって分けられるが、2018年までに段階的に登録される。年間1トン以上の物質の登録には、製造・輸入量に応じて物理化学的性状、ヒトの健康への有害性、生態毒性の情報が必要となる。動物試験が行われる場合、重複を避けるために関係書類の事前審査が義務づけられる。ヒトに対する毒性に関する情報は、可能なら代替手段を用いて入手する。これらの代替手段は欧州委員会によって確認され、さらに化学物質庁または国際的な機関によって認定されなくてはならない。EU委員会は代替法の使用に関し3年ごとに報告書を提出し、必要なら新たな法的提案を行うことになっている。

安全性評価のために提出が義務付けられているデータを表3に示した。

表3 REACHにより要求される安全性に関するデータ

<p>年間1トン以上：<u>皮膚刺激性または皮膚腐食性試験</u>、<u>眼刺激性試験</u>、<u>皮膚感作性試験</u>、<u>バクテリアを用いるin vitro変異原性試験</u>、<u>経口投与急性毒性試験</u></p> <p>年間10トン以上：<u>in vivo皮膚刺激性試験</u>、<u>in vivo眼刺激性試験</u>、<u>哺乳類細胞を用いるin vitro細胞遺伝学試験またはin vitro小核試験</u>、<u>哺乳類細胞を用いるin vitro遺伝子突然変異試験</u>（ただし、バクテリアを用いるin vitro試験と哺乳類細胞を用いるin vitro細胞遺伝学試験またはin vitro小核試験が陰性の場合）、<u>吸入または皮膚経路による急性毒性試験</u>、<u>短期反復投与毒性試験</u>（28日間、場合によって90日間）、<u>生殖/発生毒性に関するスクリーニング</u>、<u>トキシコキネティクス試験</u>、<u>リスクアセスメント</u></p> <p>年間100トン以上：<u>亜慢性毒性</u>（90日）、<u>出生前発生毒性試験</u>、<u>二世代生殖毒性試験</u></p> <p>年間1,000トン以上：<u>慢性毒性</u>（>12カ月）や<u>追加評価</u>、<u>発がん性試験</u></p>
--

下線はESACにより科学的にバリデーションされた代替法が報告されているもの。

2-3. 米国の状況

2-3-1. ICCVAMによる検討

ICCVAMは1998年に皮膚腐食性試験法としてのCorrositex[®]についてPeer Reviewを行い、本方法が動物愛護の点で問題はないこと、また、すべての化学物質に有用とは言えないが、Department of Transport (DOT) で必要とされる状況においては有用であると評価した¹⁷⁾。また、本試験で陰性の場合には皮膚刺激性試験により確認の必要があるが、false positiveを許容するならば陽性の場合の動物試験は不要とした。同様の検討により、モルモットを用いたMaximization法の代替試験法としてLLNA法について、マウスを用いることから完全な代替法ではないが、妥当な方法であるとして認知した¹⁸⁾。また、皮膚腐食性試験としてEpiDerm[™]、およびEPISKIN[™]法およびTER法について評価し、皮膚腐食/刺激性評価のためのスキームにおいてweight-of-evidence評価のための一つとして使用できるとした。また、これらの試験で陽性とされたものは、そのまま陽性として分類やラベリングして良いとしている。

ICCVAMはECVAMと密接な協力関係を結び、お互いが承認した試験法については、簡易の評価促進プロセスを採用している¹⁹⁾。また、急性全身毒性を評価するための細胞毒性試験 (BALB/c 3T3または正常ヒト角化細胞 (NHK) を用いるNeutral Red 取り込み (NRU) 試験法) についての共同バリデーションを実施し、2006年10月にはほぼ最終化されたバックグラウンドレビュー文書 (BRD) 並びにICCVAMによる試験法評価報告書が公表された。本報告書でICCVAMは、「これら2種の細胞毒性試験は法規制におけるハザード分類という目的には精度は十分ではないが、現在の急性毒性プロトコールであるUp-and-Down Procedure (UDP) およびAcute Toxic Class (ATC) 法の開始用量を設定するために使用することができる」と勧告した²⁰⁾。

4種の眼刺激性試験代替法 (BCOP法、HET-CAM法、ICE (Isolated Chicken Eye Test) 法およびIRE (Isolated Rabbit Eye Test) 法) の専門家による評価を行い、2006年3月にそれらの最終BRD^{21) ~ 24)} が公表された。本文書では、(1)

4法はいずれも*in vivo*試験法を代替する方法とはならないこと、(2) ICCVAMが推奨する限定的に使用でき、眼腐食性など強い眼刺激性物質のスクリーニングに使用できる方法としてBCOP試験およびICE試験が挙げられること、(3) HET-CAM試験およびIRE試験については、現時点では推奨できず、眼腐食性や強い眼刺激性物質を同定するためにはプロトコールや判断基準の最適化、追加バリデーションが必要であることを報告している。

ICCVAMは、生殖毒性試験としてカエルの胚を用いたFETAX試験 (Frog Embryo Teratogenesis Assay-Xenopus) を、内分泌かく乱化学物質評価系として*in vitro* estrogen receptor and androgen receptor binding and transcriptional activation (TA) 法の評価の依頼をEPAから受けており、その一環としてJaCVAMやECVAMとの共同バリデーション計画を進めている。また、LLNA法の評価もPeer Reviewを近い時期に行う予定である。

2006年11月にNICEATMとICCVAMは代替法の5カ年計画案を発表した²⁵⁾。この計画では、(1) 連邦政府機関試験計画に、適切で信頼性のある方法を統合するための、新規および改良された非動物および他の代替試験の研究開発、解釈および検証、(2) 3Rs推進のための新規および改良された非動物試験と代替試験に関する最優先分野の確認、の2点に取り組むとした。また、試験開発の優先分野としては、①急性眼刺激性、腐食性、②Biologics/Vaccines、③急性皮膚毒性 (刺激性・腐食性、感作性と吸収を含む)、④急性全身毒性 (経口、経皮、吸入)、⑤慢性毒性・発がん性、⑥生殖・発達毒性、⑦内分泌攪乱物質、⑧神経毒性、⑨免疫毒性の9項目を挙げている。

2-3-2. CTFAの状況

CTFA (米国化粧品工業会) は化粧品の原料および最終製品について、安全性を立証する方法としての前臨床試験および臨床試験の使用に関するガイダンスの広範な改訂作業に取り組んでいる。1991年に作成した現行ガイドラインとの大きな相違点の一つは動物実験代替法の追加であり、細胞、組織、器官培養を用いる*in vitro*代替法や構

表4 代替法に関連したICHでの検討

- | |
|--|
| <ol style="list-style-type: none"> 1) 単回投与毒性試験において統計学的に厳密なLD50値を要求しない。
非齧歯類では必ずしも死亡するまで用量を上げなくとも良い。 2) 反復投与毒性試験において12カ月試験を要求しない。 3) 雄性生殖臓器毒性検出系としての2週間反復投与毒性試験で良いとした。 4) 発がん性試験における動物種数を1種に削減し、代替法で補足しても良い。 5) 臨床試験との関係における非臨床試験実施タイミングについて合意 |
|--|

造活性相関を用いてコンピュータによる予測を行う *in silico* 法も含まれる可能性がある。

2-4. アジアの状況

日本においては、日本動物実験代替法学会の前身である日本動物実験研究会が1982年に発足して以来、代替法の開発やバリデーション、並びに市民との交流を行ってきた。中国や韓国においても代替法関連研究が行われ、昨年には韓国にも代替法学会が設立された。2007年8月に東京で開催された第6回国際動物実験代替法会議にはこれらの国をはじめとし、台湾、タイ、インドなどからも多くの研究者が参加し、今までで最も多くの参加者があった。動物福祉と代替法に関する研究が発表された。韓国および北京においてサテライトシンポジウムも開催され、多くの参加者を集め、関心の高さが示された。

3. おわりに

動物実験は近未来において不要となるとは思えない。一方、3Rsの原則は欧米や日本だけでなく、世界的に広く受け入れられている。今後も、生命科学研究における動物利用の適性化を計る必要があるとともに、可能なものについては、積極的に代替法に置き換える努力が必要である。なお、医薬品の承認申請に添付すべき資料の国際的ハーモナイゼーションのための会議 (ICH) では表4に示したような安全性試験法ガイドラインの変更がなされ、我が国のガイドラインにも導入された。これらは3Rsの原則を念頭に入れてはいたが、必ずしもそれを意図したものではなかったが、結果として、ICHは3Rsの原則に貢献したと言える。

謝辞

本稿をまとめるに際し、厚生労働科学研究費補助

金 (医薬安全総合研究事業) 「安全性評価のための動物実験代替法の開発および評価体制の確立に関する研究 (主任研究者: 大野泰雄)」において、分担研究者の板垣宏氏が、日本化粧品工業連合会・動物実験代替専門委員会委員とともに作成した「代替法についての国際情勢の調査」報告を利用させていただいた。ここに感謝する。

参考文献

- 1) Russel W.M.S, Burtch R.L., The principles of Human Experimental Technique (Methuen, London) (1959)
- 2) OECD (1996) Final report of the OECD workshop on harmonization of validation and acceptance criteria for alternative toxicological test methods, OECD : ENV/MC/CHEM/TG (96) 9.
- 3) 大野泰雄, 動物実験代替法のバリデーション方法と行政的受け入れの現状, 国立医薬品食品衛生研究所報告1~12 (2004)
- 4) 大野泰雄, 皮膚と美容, **35**, 2~8 (2003)
- 5) OECD (2000) Guidance document on the recognition, assessment and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment No.19.
- 6) OECD (2006) Draft Guideline for the Testing of Chemicals : Stably Transfected Transcriptional Activation (TA) Assay for Detecting Estrogenic Activity of Chemicals—The Human Estrogen Receptor Alpha Mediated Reporter Gene Assay Using HeLa-hER-9903 Cell Line—Ver. 2006. Oct. 12
- 7) EU (1993) Council Directive 93/35/EEC
- 8) EU (2003) Directive 2003/15/EC of the European Parliament and of the Council, February 27, 2003 ; Official Journal of the European Union, L66, 11/03/2003, P0026~0035
- 9) Hartung T. et al., *ATLA*, **31**, 473~481 (2003)

- 10) SCCNFP (2002) SCCNFP/0546/02, final June 4, 2003, Memorandum concerning of the actual status of alternative methods to the use of animals in the safety testing of cosmetic ingredients.
- 11) De Silva, O. et al., *ALTEX*, **22**, Special Issue, 255 (2005)
- 12) Basketter, D. et al., *ALTEX*, **22**, Special Issue, 139 (2005)
- 13) EU (2005) European Partnership to Promote Alternative Approaches to Animal Testing. 3Rs Declaration. (http://ec.europa.eu/enterprise/epaa/index_en.htm)
- 14) EU (2006) Regulation (EC) No1907/2006 of the European Parliament and of the Council of 18 December 2006 concerning the Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals (REACH), establishing a European Chemicals Agency, amending Directive 1999/45/EC and repealing Council Regulation (EEC) No793/93 and Commission Regulation (EC) No1488/94 as well as Council Directive 76/769/EEC and Commission Directives 91/155/EEC, 93/67/EEC, 93/105/EC and 2000/21/EC, Official Journal of the European Union, L396, Volume 49.
- 15) EU (2006) Directive 2006/121/EC of the European Parliament and of the Council of 18 December 2006 amending Council Directive 67/548/EEC on the approximation of laws, regulations and administrative provisions relating to the classification, packaging and labelling of dangerous substances in order to adapt it to Regulation (EC) No 1907/2006 concerning the Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals (REACH) and establishing a European Chemicals Agency.
- 16) EU (2006) Q and A on the new Chemicals policy, REACH (<http://europa.eu/rapid/pressReleasesAction.do?reference=MEMO/06/488&format=HTML&aged=0&language=EN&guiLanguage=fr>)
- 17) ICCVAM (1999) Corrositex[®] : An *in vitro* test method for assessing dermal corrosivity potential of chemicals. NIH Publication No : 99-4495.
- 18) ICCVAM (1999) The Murine Local Lymph Node Assay : A Test Method for Assessing the Allergic Contact Dermatitis Potential of Chemicals/Compounds. NIH Publication No.99-4494.
- 19) Federal Register Vol.67, No.147, 31/07/2002, p49706-49707.
- 20) ICCVAM (2006) Background Review Document : In Vitro Cytotoxicity Test Methods for Estimating Acute Oral Systemic Toxicity. NIH Publication No : 07-4518.
- 21) ICCVAM (2006) Background Review Document for BCOP : *In Vitro* Test Methods for Detecting Ocular Corrosives and Severe Irritants. NIH Publication No : 06-4512.
- 22) ICCVAM (2006) Background Review Document for Isolated Chicken Eye (ICE) Test, NIH Publication No : 06-4513.
- 23) ICCVAM (2006) Background Review Document for Hen's Egg Test - Chorioallantoic Membrane (HET-CAM) Test, NIH Publication No : 06-4515.
- 24) ICCVAM (2006) Background Review Document for Isolated Rabbit Eye (IRE) Test, NIH Publication No : 06-4514 NIH Publication No : 06-4514
- 25) NICEATM/ICCVAM (2006) Federal Register notice requesting comments on the development of the Five-Year Plan. Federal Register/Vol.71, No.218, pp.66172-66173, November 13, 2006

医薬品開発における代謝物の安全性評価についての考え方

内藤 真策*¹, 古田 盛*¹, 吉田 武美*², 北田 光一*³,
 笛木 修*⁴, 海野 隆*⁵, 大野 泰雄*⁶, 小野寺博志*⁴,
 川村 信之*⁷, 黒川美佐男*¹, 佐神 文郎*¹, 篠田 和俊*⁴,
 中澤 隆弘*¹, 山崎 恒義*⁸

(受付:平成19年6月1日, 受理:平成19年9月21日)

1. はじめに

医薬品開発の過程で得られる実験動物やヒトでの薬物動態に関する情報は、毒性試験や薬理試験の結果をヒトに外挿し有効性や安全性を予測するのに役立つ。しかし、代謝物がヒトと大きく異なる動物種での結果の解釈は注意を要する。代謝物の安全性評価について、本邦では通知¹⁾及びICH-1²⁾において、主要代謝物の毒性や薬理作用に関する情報の必要性が示された。米国では、米国食品医薬品局 (FDA) と米国研究製薬工業協会 (PhRMA) により代謝物の安全性試験について評価すべき代謝物の生成割合等が議論された³⁻⁵⁾。これらの経緯も踏まえ、本邦では医薬品医療機器審査センターの毒性担当者から個人的な見解として、ヒト特異的な代謝物の毒性学的評価についての考え方が提示された⁶⁾。更に、日本製薬工業協会 (製薬協) の加盟企業に対するアンケート調査で、代謝物の毒性試験は高い関心事であることが明らかにされた⁷⁾。また、2005年にFDAからドラフトガイダンス⁸⁾が発出され、臨床試験で認められた代謝物の安全性試験についての考え方が示され、ヒト特異的、又はヒトで実験動物より多く生成し、投与量あるいは全身曝露量 (どちらか少な

い方)の10%を超える代謝物について安全性評価が必要とされ、その実施時期や方法が示された。このドラフトガイダンスに対し、製薬協は加盟企業の意見をまとめて、主要代謝物の定義基準や毒性標的部位での曝露を反映していない場合等に関するパブリックコメントを提出している。また、欧州医薬品庁 (EMA) の薬物相互作用のガイダンス⁹⁾では、全身クリアランスの30%以上の割合を占める代謝経路については、*in vitro* や *in vivo* の薬物相互作用試験の実施が必要であることを示唆しており、曝露がそれ以下の代謝物であっても、毒性や薬理活性を示す場合は、試験を必要とする可能性を示唆している。現状において、代謝物の安全性評価について参考とすべき論文^{2-5,10,11)}や各国のガイダンス^{8,9,12,13)}では代謝物の取扱いに関する考え方が異なり、毒性試験の必要な代謝物の基準について一致していない。

2006年度の日本薬物動態学会年会¹⁴⁾では、薬物動態研究と毒性研究の連携をテーマに代謝物試験について討議された。このような議論において、医薬品開発にレギュラトリーサイエンスが果たす役割の重要性が認識された。同時に日本薬学会レギュラトリーサイエンス部会において2007年度より、産、

*1 日本製薬工業協会医薬品評価委員会基礎研究部会 東京都日本橋本町3-4-1 (〒103-0023)

*2 昭和大学薬学部 東京都品川区旗の台1-5-8 (〒142-8555)

*3 千葉大学医学部附属病院薬剤部 千葉県千葉市中央区亥鼻1-8-1 (〒260-8677)

*4 独立行政法人医薬品医療機器総合機構 東京都千代田区霞ヶ関3-3-2 (〒103-0013)

*5 米国研究製薬工業協会 東京都港区虎ノ門3-7-8 ランディック第2虎ノ門ビル4F (〒105-0001)

*6 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)

*7 欧州製薬団体連合会日本支部技術委員会 東京都渋谷区千駄ヶ谷4-6-15 GSKビル (〒151-8566)

*8 共立薬科大学 東京都港区芝公園1-5-30 (〒105-8512)

官、学が集う「医薬品評価フォーラム」が設けられ、討論の場にアカデミアが参加することにより、新薬の承認審査に関して中立性・公平性を保ちながら、製薬企業と医薬品医療機器総合機構の担当者が実務面について議論できることとなった。この医薬品評価フォーラムのキックオフミーティングとして、2007年1月に代謝物の安全性評価をテーマとした意義深い討議が行われた¹⁵⁾。今回、本キックオフミーティングで討議された内容を中心に、今後の代謝物の安全性試験についての考え方と課題点を要約した。ただし、本稿は現時点での課題に対する考え方をまとめたものであり、科学の発展により考え方に更なる進歩が必要であることはいうまでもない。なお、Journal of Toxicological Scienceにミーティングの詳細を報告する予定である。

2. 代謝物の非臨床安全性評価

医薬品の代謝物に関する毒性試験の実施について、現在のところ、本邦にガイドラインはなく、いわゆるケースバイケースの対応が行われている。そこで、代謝物の毒性試験が必要となるケースを検討した。

例えば、第2相反応の抱合代謝物のうち、グルクロン酸抱合体はアグリコンに大きな分子修飾がされることから、ほとんどの場合で親化合物より活性が低下する。そのため、抱合代謝物を用いた代謝物毒性試験の実施は一般的に不要と考えられる。

また、親化合物と同質の薬理作用を持ち、薬理活性が親化合物と比べ同等又は低い活性代謝物は、薬理効果の延長上にある毒性に関して親化合物の毒性試験で安全性の情報が得られていると考えられる。しかし、活性代謝物の持つ薬理活性が親化合物より強い場合あるいは親化合物と異なる薬理作用を有する場合は、「該当する薬理作用から想定される毒性は何か」、「ヒトで十分な曝露があるか」、「活性代謝物の血中濃度推移にヒトと実験動物で差があるか」などを考察する必要がある。更に、臨床的に、親化合物から予測できない副作用が認められ、代謝物との関連が強く懸念された場合には、代謝物の毒性プロファイルを見直す必要があるだろう。一方、反応性代謝物は毒性学上、活性代謝物の一種であり、代謝過程で生成する中間代謝物等で、他の生理的物質(タンパク質等)に共有結合を示すような反応性に富む代謝物を指す。このような反応性代謝物の安全

性評価では、最終代謝物の抱合体を実験動物に投与しても毒性を考える上では意味がないことがあり、代謝中間体として生成される反応性代謝物は化学合成も難しい。そのためマイクロソーム等の代謝系を組んだ *in vitro* 毒性試験等も含め、目的に沿った試験を行う必要がある。しかし、臨床での有害事象と反応性代謝物の関連を推定することはなかなか難しいので、臨床での情報には十分注意する必要がある。

一般に親化合物の毒性試験で代謝物の曝露が既に確認されている場合は、基本的に追加の代謝物毒性試験は不要と思われる。しかし、代謝物の安全性評価を目的とした代謝物投与の動物試験において親化合物の臨床投与経路で投与しても十分な曝露量が得られない場合や、静脈内投与しても一過性の曝露しか得られない場合もあるので、投与経路、投与量、投与回数等を変更する等の曝露量を大きくする工夫も必要となる。一方、体循環血での曝露がみられたとしても、血漿タンパク結合、膜透過性又はトランスポーターへの親和性等に関連して組織移行性を変化させる要因により、標的毒性部位の組織における曝露量が低下し、毒性を過小評価する恐れがある。そのため、代謝物の安全性評価に資する実行可能な試験を行う必要がある。

ヒト特異的代謝物については、親化合物の非臨床毒性試験の中ではその安全性を確認できない。しかし、ヒト特異的代謝物を検出した臨床試験での投与期間と曝露量までの範囲における安全性が示唆されたことになる。そのため、ヒト特異的代謝物の安全性評価は親化合物と異なる経緯をたどることとなる。見出されたヒト特異的代謝物は化学構造を同定し、ヒト血中濃度を測定する。この段階で構造-活性相関のデータから *in silico* による毒性予測を行うことも有用な場合がある。また、臨床試験の副作用情報からのフィードバックも重要であり、その結果を勘案して代謝物の安全性試験の追加も検討すべきであろう。

良質な医薬品を医療の現場に速やかに提供することは、患者さんにとって最も重要なことである。一方、臨床試験を安全に進めるためにも、非臨床試験は不可欠である。そのため、医薬品開発を行う上で、非臨床試験の実施のタイミングは重要である。初めてヒトに投与(First in Human/第I相臨床試験)する前では、探索段階として代謝安定性や活性代謝物

のスクリーニングを行い、頻度の低い、例えば、特異体質性薬物毒性 (IDT: Idiosyncratic drug toxicity)¹⁶⁾を引き起こすようなリスクを含めて、これらを軽減するようにすべきかも知れない。第I相臨床試験では、ヒト試料を用いてヒトの主要代謝物を検索し、ヒト特異的代謝物の存在の有無を確認することが重要である。この場合、ヒトRI試験は代謝物に関する有用な情報をもたらす。ヒトにおいて代謝物が関与する毒性が強く懸念される場合には、大規模臨床試験 (Phase III) 開始前までに代謝物の安全性に関する情報を精査しておく必要があると考えられる。また、毒性学的に問題となるヒト特異的代謝物が認められた場合には、第II相臨床試験の前までに代謝物の安全性を実験動物で確認し、申請までには、ヒト主要代謝物についての代謝酵素及び代謝経路の推定、構造の推定又は同定、ヒト及び実験動物での血中曝露の確認、薬理活性の推定、ヒト特異的であるか否かの確認と対応が必要である。

更に、市販後 (新薬発売後) 調査においては、日常診療下での医薬品の有効性、安全性の確認とともに、市販前 (治験) では得られなかった医薬品の適正使用についての情報の収集も注意深く行う必要がある。臨床現場で認められた有害事象については、公表されていない成績及び申請時に注目されていなかった成績についても関連性を精査する必要があると考えられる。

以上のように、代謝物の安全性評価は複雑な要因を考慮する必要があるため、たとえ代謝物の安全性試験が不要と判断される場合であっても、十分な説明が必要となるであろう。

3. まとめ

代謝物の安全性評価はひとつの理論的枠組みでの判断は困難であり、基本的にはケースバイケース的な対応が必要となるが、やはり何らかの共通の認識が必要と思われる。そのためには、コンセプトペーパーのような概念を作ることも有用であり、ある程度の柔軟性を持たせた考え方が医薬品開発、ひいては社会にとっても役に立つのではないか。また、このような考え方を集約することは、ガイダンスの必要性に関する議論にもつながる。代謝物の安全性を的確に評価して、臨床試験において親化合物から予測できない副作用や代謝物に起因すると考えられる

症状も考慮しながら、代謝物の正確なプロファイルを把握する必要がある。また、代謝物の安全性評価については科学的に無意味な試験は省くことにより、良質な医薬品を医療の現場に速やかに提供することが重要と考える。

最後に、医薬品評価フォーラムの世話人の先生方、製薬協基礎研究部会タスクフォース11、EFPIA、PhRMAの関係者の方々及び事務局の共立薬科大学の皆様にご挨拶申し上げます。

文 献

- 1) 新医薬品の製造 (輸入) 承認申請に際しての留意事項について、薬審第526号、昭和50年3月28日。
- 2) Ohno, Y.: Toxicity testing: Regulatory Perspectives. Proceedings of The First International Conference on Harmonisation. 1991 Nov.; Brussels, Belgium. Ed D'Arcy PFD and Harron DWG. The Queen's University of Belfast. 186-188 (1992).
- 3) Baillie, T. A., Cayen, M. N., Fouda, H., Gerson, R. J., Green, J. D., Grossman, S. J., Klunk, L. J., LeBlanc, B., Perkins, D. G., Shipley, L. A.: *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **182**(3), 188-196 (2002).
- 4) Hastings, K. L., El-Hage, J., Jacobs, A., Leighton, J., Morse, D., Osterberg, R. E.: *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **190**(1), 91-92 (2003).
- 5) Baillie, T. A., Cayen, M. N., Fouda, H., Gerson, R. J., Green, J. D., Grossman, S. J., Klunk, L. J., LeBlanc, B., Perkins, D. G., Shipley, L. A.: *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **190**(1), 93-94 (2003).
- 6) 医薬品研究, **34**(12), 794-795 (2003).
- 7) 井上忠志, 原田喜充, 古田 盛, 河村泰仁, 栗原厚, 黒川美佐男, 中澤隆弘, 佐神文郎: 医薬品研究, **36**(9), 388-397 (2005).
- 8) Guidance for Industry, Safety Testing of Drug Metabolites. FDA CDER Draft Guidance, Published in Federal Register, June (2005).
- 9) The note of guidance on investigation of drug interactions, Committee for Proprietary Medicinal Products, CPMP/EWP/560/95, 17, December, 1997.
- 10) Smith, D. A. Obach, R. S.: *Drug Metab. Dispos.*, **33**, 1409-1417 (2005).