



London, 27 June 2002  
 CPMP/SWP/398/01

**COMMITTEE FOR PROPRIETARY MEDICINAL PRODUCTS  
 (CPMP)**

**NOTE FOR GUIDANCE ON PHOTOSAFETY TESTING**

DISCUSSION IN THE SWP	November 2000 – February 2001
TRANSMISSION TO CPMP	February 2001
RELEASE FOR CONSULTATION	February 2001
DEADLINE FOR COMMENTS	August 2001
RE-DISCUSSION IN THE SWP	October 2001 – June 2002
RE-TRANSMISSION TO CPMP	June 2002
ADOPTION BY CPMP	June 2002
DATE FOR COMING INTO OPERATION	December 2002

## NOTE FOR GUIDANCE ON PHOTOSAFETY TESTING

### 1. INTRODUCTION

The goal of photosafety testing is to detect the adverse effects of pharmaceutical products in the presence of light. This type of testing is relevant for medicinal products that enter the skin via dermal penetration or systemic circulation. Photobiological reactions normally occur when a chemical is able to absorb UV or visible light. Four different endpoints of concern should be specifically addressed in photosafety testing:

- Phototoxicity (photoirritation), which is an acute light-induced skin response to a photoreactive chemical.
- Photoallergy, which is an immunologically mediated reaction to a chemical initiated by the formation of photoproducts (for example, the photoproducts produce an antigen).
- Photogenotoxicity, which is a genotoxic response observed after exposure to a chemical photoactivated by UV or visible light.
- Photocarcinogenicity focuses on the potential of a drug to induce skin tumours in combination with UV. This may be either an indirect enhancement of UV-induced carcinogenic effects (also termed photo co-carcinogenicity) or a carcinogenic effect of a drug photoactivated under UV irradiation (also termed photochemical carcinogenesis).

This note for guidance should be read in conjunction with the Note for Guidance on non-clinical local tolerance testing of medicinal products (Eudra/S/90/024 adopted 1990).

#### 1.1 Objectives

The objective of this guideline is to define the conditions under which photosafety evaluation of pharmaceuticals should be conducted. Additionally, this document provides guidance on approaches for evaluating the photosafety of pharmaceuticals.

#### 1.2 Scope

This guideline generally applies to new chemical entities and biotechnology-derived pharmaceuticals for human use. This guideline may be applied to marketed pharmaceuticals when appropriate (e.g. when adverse clinical events, route of administration raise concerns not previously addressed.)

### 2. NEED FOR PHOTOSAFETY TESTING

Photosafety testing is warranted for those chemicals that absorb light in the wavelength of 290 - 700 nm and are either

- topically/locally applied or
- reach skin or eyes following systemic exposure.

### 3. TEST PROCEDURES

#### 3.1 General considerations concerning experimental design

The basic principle of preclinical photosafety testing is to determine whether effects regarding phototoxicity, photoallergy, photogenotoxicity or photocarcinogenicity are produced or enhanced when animals or cell cultures are exposed to the test material plus UV radiation (i.e. sunlight simulation) compared with exposure to the test material without UV irradiation (and, where appropriate, compared with exposure to the same dose of UV radiation alone).

For some areas of photosafety testing (in particular, phototoxicity & photogenotoxicity) appropriate *in vitro* test methods are available. In compliance with *Council Directive 86/609/EEC of 24 November 1986 on protection of animals used for experimental and other scientific purposes* the use of *in vitro* tests instead of animal studies is highly encouraged if adequate. In general, alternative methods which may provide more insight into mechanisms and information on the relevance of *in vitro* or animal data relative to humans are expected to be developed in the future. When shown to be scientifically valid such tests could replace or supplement currently used tests for regulatory purposes.

#### 3.2 Light source/irradiation conditions

Normally, the irradiation spectrum should approximate the solar spectrum. Solar simulators, e.g., containing xenon arc lamps plus appropriate filters to remove the UVC and attenuate the UVB part of the emission spectrum to the levels of ambient sunlight are generally used. The characteristics of the irradiation source should be described in detail.

The irradiation dose used should have no or only slightly deleterious effects but should be high enough to ensure an efficient activation of a broad spectrum of potential photosensitizers. The rationale for the selection of doses should be given in the test report.

For *in vitro* methods additional factors affecting the irradiation spectrum and dose, like plastic lids of culture flasks, coloured pH indicators, precipitation of test compound, density of cells etc have to be carefully considered. The actual amount of UV light received by the target cells under experimental conditions should be controlled using a suitable UV-meter.

#### 3.3 Metabolic activation

The use of metabolising systems, such as rat liver S9 mix, is a general requirement for *in vitro* tests which have limited metabolic capacity. Although up to now no chemical is known for which metabolic transformation is needed for the chemical to act as a photosensitizer, the possibility of generation of photoreactive metabolites should be considered in the general toxicological evaluation (i.e. to evaluate whether main human metabolites reaching skin or eyes show structural alert with respect to photoreactivity, Note 1). Omission of S9 mix in *in vitro* phototoxicity tests may be justified due to technical reasons since it has been shown that addition of material with a high protein content such as S9 to the cell cultures can absorb or scatter light in the UV region and thus may protect the target cells from possible phototoxic and photogenotoxic effects (Gocke et al. 2000).

#### 3.4 Phototoxicity testing

For phototoxicity testing a thoroughly validated *in vitro* method is available. The 3T3 NRU PT phototoxicity test has been officially accepted by the EU Commission and the EU member states *Annex V to Directive 67/548/EEC on the Classification, Packaging and Labelling of Dangerous Substances: Testing Method B.41 Phototoxicity – In vitro 3T3 NRU Phototoxicity Test*) and is also available as an OECD guideline draft (<http://www.oecd.org/ehs/test/3t3nru.doc>).

The 3T3 NRU phototoxicity test is based on a comparison of the cytotoxicity of a chemical when tested in the presence and in the absence of exposure to a non-cytotoxic dose of UVA/vis light. Cytotoxicity in this test is expressed as a concentration dependent reduction of the uptake of the vital dye, Neutral Red. While the use of the permanent mouse fibroblast cell line Balb/c 3T3 is recommended in the standard protocol of the EU and OECD guideline, other cells or cell lines may be used with the same test protocol, if the culture conditions are adapted to the specific needs of the cells.

For dermally applied drug products testing with the finished product formulation may be advantageous since some vehicles may affect the photosensitizing properties of the active substance. Since this may not be possible in cell cultures due to solubility problems, the conduct of *in vivo* studies in experimental animals should be taken into consideration until *in vitro* models (e.g. 3-D Skin models) for such requirements have been validated.

In most cases, data from *in vitro* tests like 3T3 NRU PT may provide sufficient information for the preclinical assessment of the phototoxic potential of a drug product and thus *in vivo* nonclinical studies are normally not warranted. For a possible clinical follow-up testing on potential risks, controlled clinical studies e.g. determination of the minimal erythema dose (MED) in volunteers are encouraged. In case of potential risks identified either *in vitro* or in phototoxicity testing in human, an appropriate clinical safety survey should be performed both before and after marketing authorisation.

### 3.5 Photoallergy testing

At present, photoallergy testing is mainly conducted using guinea pig models. Alternative test methods which may take into consideration a better objectivity in photoallergic hazard identification and animal welfare are currently under development. *In vitro* tests monitoring photochemical reactions, i.e. photoadduct formation and photooxidation of biomolecules, can be useful screening tools. *In vivo* models under development (modified LLNA-assays and MEST-assay) may become valuable in the future. However, the validation of all these tests is still limited. Photoallergy testing should be performed according to the state of the art.

### 3.6 Photogenotoxicity testing

The main purpose of photogenotoxicity testing is to make an assessment of the potential of a compound to turn into a photochemical carcinogen upon activation with UV or visible radiation.

Recommendations regarding the conduct of tests for photochemical genotoxicity have been recently elaborated by an international expert working group (Gocke et al. 2000).

Several different *in vitro* genotoxicity tests have been adapted for testing of the consequences of photoactivation of chemicals to damage the DNA. For safety testing purposes it is recommended to focus on those *in vitro* systems, which are currently used as standard tests in regulatory testing strategies. As no genotoxic photochemical is known to date which is exclusively positive for gene mutations, and the recognized photochemical reaction mechanisms are strongly clastogenic it is suggested that a test for photochemical clastogenicity (chromosomal aberration or micronucleus *in vitro* test) should have first priority.

Standard *in vivo* genotoxicity tests currently used for routine testing (bone marrow micronucleus or chromosome aberration test, rat liver UDS test) are obviously not applicable for *in vivo* photogenotoxicity testing. From a technical point of view the *in vivo* Comet assay or transgenic mutagenicity models may be appropriate for the determination of genotoxic effects (DNA strand breaks or gene mutations, respectively) in skin cells. However, experiences with these models for photogenotoxicity testing are at present very limited.

### 3.7 Photocarcinogenicity testing

The most widely used model to assess photocarcinogenesis in animals and the only model that is currently available in compliance with GLP rules is the SKH1 (hr/hr) albino hairless mouse model. However, this model has not been validated so far and the mechanistic understanding that is provided by this model is limited (Forbes 1996). Thus, the predictivity of the rodent photocarcinogenicity model for the human situation is at present unclear (Note 2).

As an alternative, *in vitro* mechanistic studies (see flow chart) including photogenotoxicity studies may be used to assess the photocarcinogenic potential of a test compound thus obviating the need for a separate mouse photocarcinogenicity study. For drugs which are positive in such *in vitro* tests warning statements with regard to photocarcinogenic potential is an adequate option and further testing in chronic rodent studies is not warranted.

It should be noted that drugs exist that may enhance UV carcinogenicity by other mechanisms than photoactivation and thus will not be detected using *in vitro* photo(geno)toxicity studies. A major class with known human relevance are immunosuppressants such as methotrexate or cyclosporin. The photo co-carcinogenic potential of immunosuppressants is believed to be directly related to the pharmacology of the drugs. Thus, potent candidate drugs of this class could be classified as potential enhancer of UV-induced skin carcinogenesis without further testing in rodent photocarcinogenicity studies.

Other mechanisms by which non-photosensitizing compounds have been shown to enhance UV-associated tumours in rodents involve changes in the optical properties of the skin or alterations in the protective layers of the epidermis induced by some topically applied vehicles and emollients. However, whether such animal findings can be extrapolated to the clinical situation and are relevant to predict human risk is questionable. Instead of testing such indirect photoeffects i.e. drug-induced changes in the UV penetration properties of the skin in albino hairless mice photocarcinogenicity studies, investigations in controlled clinical studies measuring effects in human skin (e.g. increased sensitivity to UVB) appear to be much more appropriate.

## 4. TEST STRATEGIES / PROPOSED APPROACHES TO PHOTOSAFETY TESTING

The testing scheme depicted in the flow chart is intended to give guidance on the decision-making process whether and how photosafety testing of drug products should be conducted.

As a first step of photosafety assessment of any new active substance the evaluation of the photochemical properties of the drug product is essential in making a testing decision. Only those compounds that do absorb within the 290 – 700 nm range of the electromagnetic spectrum and reach skin or eyes need to be tested. The current experiences do not allow for definition of specific levels of either the molar absorbance or the compound concentration in the skin below which photosafety testing would not be required. Findings from photostability testing and consideration of structure-activity relationship may give further valuable information concerning a possible adverse photoeffects and may help to determine whether testing is warranted. As an exception, agents used for photodynamic therapy may need to be tested even if not bioavailable in skin or eyes. If the photochemical/toxicokinetic assessment identifies a need for testing, a basic photosafety testing should include studies for the evaluation of the phototoxic, photogenotoxic and photoallergy potential. Positive findings in these studies should trigger the incorporation of phototoxicity endpoints into safety monitoring in clinical trials.

Compounds found to be clearly photogenotoxic can be considered as potential photocarcinogens and a specific testing in rodent photocarcinogenicity studies is normally not required. Accordingly, compounds devoid of photogenotoxic potential are according to present knowledge not expected to be photocarcinogenic if tested in the long-term photobioassay (with the exception of mechanisms of photo-cocarcinogenesis not depending on photoreactivity which are described in section 3.7). However, whether this assessment is acceptable without conducting a photobioassay has to be decided on a case-by-case basis taking into consideration all information such as the photochemical/photobiological data of the test compound, the clinical benefits and also information on chemically/pharmaceutically related compounds (Note 3).

## 5. REGULATORY IMPLICATIONS

The overall risk benefit assessment of a drug product which induces adverse photoeffects will depend on considerations of the following factors:

- The quality and potency of the effects detected in the preclinical and clinical studies.
- The safety risks presented by the drug relative to its therapeutic potential.
- The availability of clinically effective alternatives with a more favourable safety profile.

If a drug with clinically relevant findings in photosafety testing is granted a marketing authorization appropriate warning statements have to be included in the SPC/PIL. These should indicate that the drug may cause adverse photoeffects (effect to be specified) and users of the drug should avoid unprotected exposure to the sun while treated with the drug.

## 6. REFERENCES

Forbes P.D., Relevance of animal models of photocarcinogenesis to humans, *Photochem Photobiol* 63, 357-362, 1996.

Gocke E., Müller L., Guzzie P.J., Brendler-Schwaab S., Bulera S., Chignell C.F., Henderson L.M., Jacobs A., Murli H., Snyder R.D., Tanaka N., Considerations on photochemical genotoxicity: Report of the IWGTP working group, *Environ Molec Mutagen* 35, 173-184, 2000.

Stern R.S., Nichols K.T., Väkevä L.H., Malignant melanoma in patients treated for psoriasis with methoxsalen (psoralen) and ultraviolet A radiation (PUVA), *New Eng J Med* 336, 1041-1045, 1997.

## Notes

### Note 1

Molecular characteristics of many photosensitizing agents include a relatively low molecular weight and a planar, tricyclic, or polycyclic configuration that is highly conjugated.

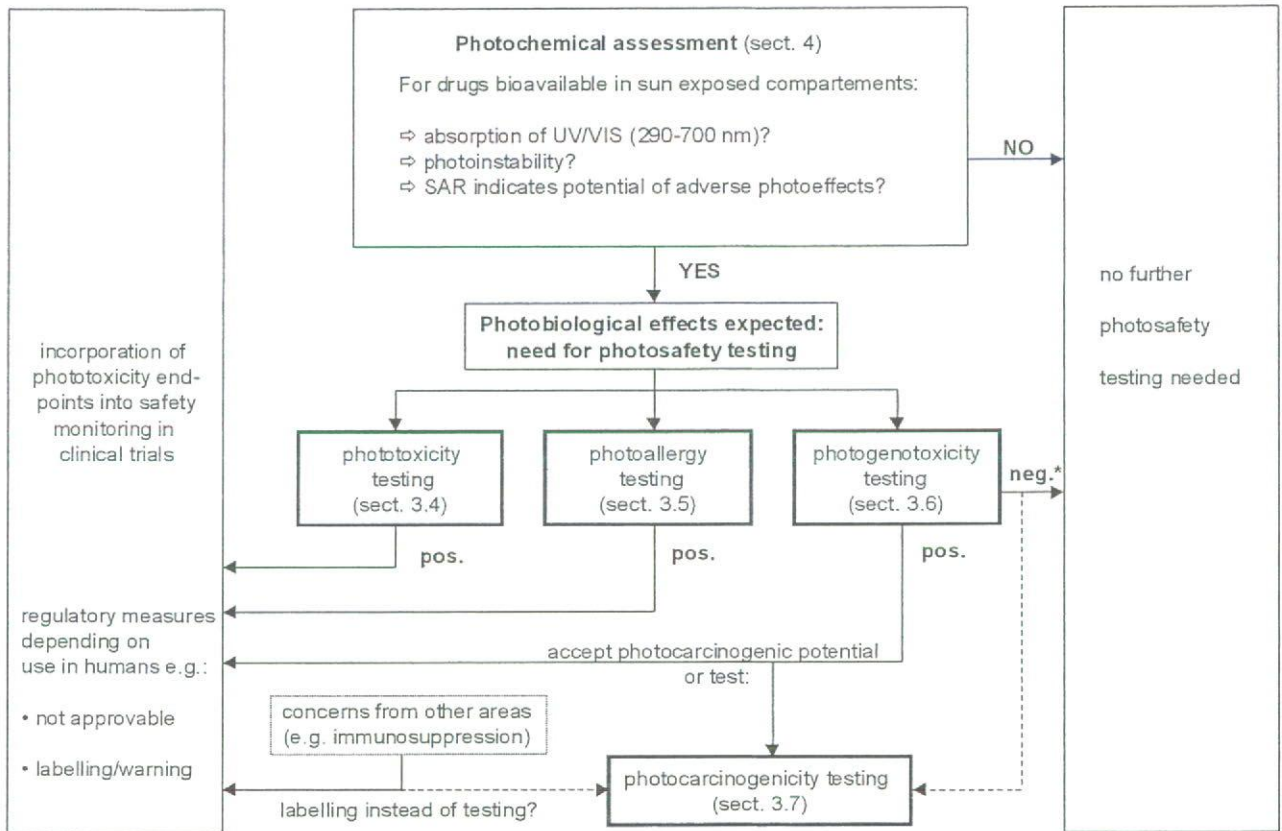
### Note 2

The main problem for evaluating the predictivity of the chronic rodent photocarcinogenicity study is the lack of established human photocarcinogens. Presently, the only proven positive human example of a photoactivated carcinogen is the psoriasis treatment 8-methoxypsoralen (8-MOP) plus UV radiation, i.e. PUVA (Stern et al. 1994). So far, only for PUVA the rodent proved to be a sensitive predictor of the human response. To further substantiate findings from rodent photocarcinogenicity studies for humans, mechanistic and supportive data are essential.

### Note 3

E.g., experimental data for the class of the fluoroquinolones show a good qualitative and quantitative correlation between the effects found in photogenotoxicity studies and the potential as photocarcinogenes in the hairless mouse model. Thus, a new fluoroquinolone found to be negative when tested in comparison with known photogenotoxic/photocarcinogenic fluoroquinolones may be evaluated as non-photocarcinogenic without conducting a photobioassay.

## Flow Chart: Assessment of photosafety of new active substances



\* approach to be justified (sect. 4)



平成 19 年度  
第 1 回「光毒性試験に関する調査研究」班会議  
議事録

日 時：平成 19 年 12 月 19 日 10：00～12：40

場 所：(独)医薬品医療機器総合機構 会議室 4

出席者： 分担研究者：小野寺 博志 (医薬品医療機器総合機構 新薬審査第一部)  
協力研究者：小島 肇 (医薬品食品衛生研究所 薬理部)  
：佐神 文郎 (エ・ザイ株式会社 創薬研究本部)  
：中村 和希 (塩野義製薬株式会社 新薬研究所)  
：細井 一弘 (参天製薬株式会社 研究開発センター)  
：篠田 和俊 (医薬品医療機器総合機構 新薬審査第四部)

議 事：

1. 開会の辞 (小野寺分担研究者)

(略)

2. 班員紹介

(略)

3. 目的と経緯説明

小野寺分担研究者から以下の説明がなされた。

- ・ 当研究班は、「国際的整合性を旨とする医薬品等の品質・有効性及び安全性に関する研究」(総括責任者：井上達・国立衛研 安全性試験研究センター長、分担責任者：国立衛研 林真・変異遺伝部長)の「非臨床毒性試験ガイドライン改訂のための調査研究」の研究班の一つ。
- ・ 調査研究期間は 3 年。
- ・ 協力研究者として田中憲保先生(食薬センター)に打診する予定。
- ・ 光化学などの領域については専門家にオブザーバーを依頼する予定。  
(静岡県立大学薬物動態学分野 講師 尾上誠良)
- ・ 初年度は光毒性に関する現状について情報を収集分析し、最終的にはガイドライン案や通知等の作成を目標とする。
- ・ H20 年 1 月 22 日に各研究班の報告会が予定されている。

4. 資料等の説明等

- ・ 資料 1 ICH-M3(R2)における光毒性の扱いについて (佐神協力研究員)
- ・ 資料 2 「光毒性」に関する製薬協 TF の活動について (細井協力研究員)
- ・ 資料 3 欧米ガイドラインの比較について (細井協力研究員)
- ・ 資料 4 EMEA ガイドライン
- ・ 資料 5 FDA ガイドライン

☞問題点の指摘 (中村協力研究員)

- 光吸収の程度について言及されていない
- 皮膚への分布の程度について言及されていない
- FDA は in vivo 試験を推奨、EMEA は in vitro 試験を推奨
- ヒトでのフォローアップ試験について
- 光遺伝毒性は偽陽性が多い

- 光がん原性の実施可能性について
- その他

- ・ DIA (2007/Oct) での光毒性に関する議論の紹介 (中村協力研究員)
- ・ EfPIA における光毒性に関する調査結果の紹介 (中村協力研究員)
- ・ EPAA(2007/Nov)における議論の紹介 (小島協力研究員)
- ・ 資料6、7 光毒性試験代替法評価委員会活動内容の紹介 (小島協力研究員)

#### 5. 今後の予定

- ・ 国内製薬企業及び CRO に対して光毒性に関するアンケートによる現状調査する。
- ・ 研究班としてのアンケート実施の可否・方法については確認が必要
- ・ EMEA、FDA ガイドライン翻訳し内容比較
- ・ アンケート内容については次回の班会議で議論する。
- ・ 班会議は年2回とし、次回開催予定：4月下旬

#### 6. その他

- ・ 配布資料、説明資料等のうち、製薬協 TF からの資料2、3は未公表のため原則班外秘とする。(H20—1月現在)
- ・ 協力研究員の交通費等の支払いについて。謝金は不要とする。

以上

### III. 分担研究報告（非臨床安全性部門 2）

厚生労働科学研究費補助金（医薬品・医療機器等レギュトリーサイエンス総合研究事業）  
平成19年度小括研究報告書

－非臨床試験の国際的ハーモナイゼーションに関する研究－

- 分担研究者：大野 泰雄（国立医薬品食品衛生研究所 副所長）  
中澤 憲一（国立医薬品食品衛生研究所・安全性生物試験研究センター・薬理部長）  
小島 肇（国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター 薬理部）  
新規試験法評価室・室長）
- 研究協力者：小野寺博志（医薬品医療機器総合機構）  
篠田 和俊（医薬品医療機器総合機構）  
中村 治雅（医薬品医療機器総合機構）  
佐神 文郎（エーザイ）  
山本 恵司（武田薬品工業）  
伊藤 眞紀（塩野義製薬）  
吉田 緑（国立医薬品食品衛生研究所）  
高橋 道人（病理ピアレビューセンタ）  
大橋 京一（大分大学医学部）  
馬屋原 宏（国際医薬品臨床開発研究所）  
岩崎 甫（グラクソ・スミスクライン）

研究要旨

本研究は非臨床試験の医薬品等国際ハーモナイゼーション会議（ICH）ガイドライン作成を目的としている。非臨床試験のタイミングに関する部門（M3）において、すでに作成されているガイドラインに見直しの必要が生じたため、昨年度これに対応する作業グループ（EWG）が作られ、ガイドラインの修正作業がスタートした。今年度は昨年度に引き続き、ブリュッセルおよび横浜での会合を通じて修正作業が進められた。妊娠可能な女性を臨床試験に組み込むために必要な非臨床試験の設定範囲については、現行の反復投与毒性試験の一部改変によって卵巣への影響を検出可能であるかを検証するために、文献調査等による反復投与毒性試験における卵巣毒性検出の可能性と検証試験への可能性を検討した。その結果、ラットを用いた4週間反復投与毒性試験を一部改変することにより、既知の毒性発現機序を示す卵巣毒性物質については検出できる可能性が高いと思われた。また日本製薬協の協力を得て、ラットを用いた4週間反復投与毒性試験を行い卵巣毒性検出の可能性を確認する検証試験を開始した。試験は実施中である。動物実験の3Rsに関する研究については、医薬品開発においても動物実験代替法の利用が注目されつつある中、ICHにおいても、これらの問題を議論する会議が、2007年5月6日、ブリュッセル（ベルギー）にて開催された。本会議にはM3（R1）およびS2（R1）のメンバーとCVAM（Centers for the Validation of Alternative Methods）の代表が参加した。その結果、*in vitro*試験で動物実験を完全代替できないことから、さらなる試験法の確立が必要であることが確認された。また、CVAMや

規制官、業界による定期的な会議の必要性はないと結論された。

キーワード：非臨床試験、ガイドライン、国際ハーモナイゼーション、タイミング、卵巣毒性、受胎能試験、動物実験代替法

## A. 研究目的

本研究は国際的にハーモナイズした非臨床試験に関するガイドラインを作成すること目的とする。非臨床試験のタイミングについてのガイドライン (M3) について、現状にそぐわない点が見いだされたおり、これを新たな議題として取り上げるための専門ワーキンググループ (EWG) が昨年度よりスタートしている。今年度は引き続きM3の修正案の作成を進めることを目的とした。

このガイドラインにおいては、日米欧の三極間で相違が存在する。日本では、いずれの臨床試験においても妊娠可能な女性の臨床試験の組み入れ前には、避妊処置をしている場合であっても、雌受胎能と胚/胎児への影響評価を完了しておくべきであると規定されている。また、EUにおいては、胚/胎児への影響の評価は妊娠可能女性での第I相試験の前、および雌受胎能試験は第III相試験の前に完了しておくべきとされている。米国では、妊娠の可能性を最小限にするための適切な処置を払っている限り、生殖発生毒性試験を実施しなくても、妊娠可能な女性を初期の注意深くモニターされた試験に組み入れても良いとされている。このように、妊娠可能な女性の臨床試験に組み入れるために必要な非臨床試験の設定は、三極間での相違が大きい。妊娠可能な女性の臨床試験の組み入れるようガイドラインを修正するにあたり、修正可能と判断できる科学的根拠を得ることは重要である。日本において今まで実施されてきたげっ歯類を用いた雌受胎能試験の目的は、受精後の影響だけでなく、卵巣への影響も受胎能という機能的側面から検出するためである。ヒト胚/胎児への影響については、適切な避妊処置によって防ぐことが可能と思われるが、卵巣への影響を非臨床試験段階で予測することは非常に有意義である。しかし、卵巣への影響評価検出法が十分に確立されていない現行の反復投与毒性試験のみで卵巣への影響が検出可能か不明であり、また卵巣毒性の評価方法につい

ても基準となるべき方法は確立されていない。よって現行の反復投与毒性試験の一部改変によって卵巣への影響を検出可能であるかを検証するために以下の2つの検索を行った：1) 文献調査等による反復投与毒性試験における卵巣毒性検出の可能性、2) 反復投与毒性試験による卵巣毒性検出の検証試験。

また、昨今、動物福祉を巡る動向が欧米を中心に活発であるが、安全性評価の分野においても、化粧品成分の開発や動物実験を用いて開発した化粧品の販売禁止などが2009年を目標に進んでいる。化学物質の安全性再評価である REACH (REACH : Registration, Evaluation and Authorization of Chemicals) が施行される一方、この安全性試験は*in vitro*試験中心と謳われている。以上の状況下、医薬品開発においても動物実験代替法の利用が注目されつつあり、これについての国際ハーモナイゼーションについても検討を行った。

## B. 研究方法

昨年度、この部門を含む安全性のガイドラインのすべての見直しが行われ、修正の必要性について協議がなされた。その結果、修正の必要性のプライオリティが高いと判断されたM3はICHの議題としてEWGで話し合いが進められることとなった。このEWGには日本の行政側のメンバーとして国立医薬品食品衛生研究所より中澤および大野が参加しており、また、非臨床試験のうちの動物実験の代替法についての意見を述べるために小島が随時加わっている。今年度も欧米のメンバーとともに国際的な会合を持ち、ガイドラインに関する協議を行った。さらに、ガイドライン修正をスムーズに進めることを目的とし、この分野に関わる国内の専門家である上記研究協力者とともに国際的な会合に向けての班会議を開催し意見を交換した。

妊娠可能な女性を臨床試験に組み込むために必要な非臨床試験の設定範囲については、文献調査等による反復投与毒性試験における卵巣毒性検出の可能性に関

して毒性関連の成書および文献に報告されている既知の卵巣毒性物質を検索した。これらの物質を、毒性発現メカニズムごとに分類し、げっ歯類を用いた*in vivo*試験あるいは反復投与毒性試験で卵巣への影響が検出できる可能性について考察を行った。また卵巣毒性の評価方法についても検討を行った。また、反復投与毒性試験による卵巣毒性検出の検証試験では、既知または毒性発現機序から卵巣毒性発現が予想される医薬品、化学物質を選択し、ラットを用いた2あるいは4週間反復投与毒性試験を実施して、卵巣毒性を検出できるか検証試験を行った。この検証試験は、現行の反復投与毒性試験を基礎としているが、卵巣毒性検出のための改良項目も検討した。この検証試験は、後述のように製薬協の協力を得て現在実施中であり、平成20年春に試験を終了する予定である。

動物実験の3Rsに関する研究については、ICHにおいても、これらの問題を議論する会議が2007年5月6日、ブリュッセル（ベルギー）にて開催された。ICHの安全性専門家からM3（R1）およびS2（R1）のメンバーとCVAM（Centers for the Validation of Alternative Methods）の代表が集い、半日にわたる会議となった。まず、各CVAMの代表者が各センターの取り組みについて説明した。米国からは、動物実験代替法バリデーションの省庁間調整委員会ICCVAM（Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods）およびFDA（米国医薬食品局）のAbby Jacob氏が、欧州からは欧州動物実験代替法バリデーションセンターECVAM（European Center for the Validation of Alternative Methods）のThomas Hartung氏が講演した。日本からは日本動物実験代替法バリデーションセンターJaCVAM（Japanese Center for the Validation of Alternative Methods）の代表として大野がその組織と活動について説明した後、意見交換を行った。

## C. 研究結果

### 1. 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関する研究-概説

昨年度10月に行われたICHシカゴ会合において、今後対応が必要とされる項目として挙げられたのは以下の通りであった：

- 1) 生殖毒性のリスクを特定できる非臨床発生毒性試験、およびその用量設定試験から得られる知見との比較(用量設定試験の予測性を理解するため)について、企業側は情報を集める。
  - 2) 慢性毒性試験の期間について協議するため、3、6、9、12か月間の非げっ歯類試験についての情報を行政側は集める。
  - 3) 日本側は、非臨床試験による発生リスクを調べる前に、臨床第II相試験に子供を産む能力のある女性を加えることができるかどうかを確認する。
  - 4) 臨床試験中に必要となる妊娠ラットの情報について。
  - 5) 閉経の定義の必要性。
  - 6) M3に新しいトピックとして加えられる免疫毒性および安全性薬理試験のタイミング。
  - 7) 用量設定のための発生毒性試験の実施については、確定的な発生毒性試験の実施を臨床第III相前まで延期できるかどうかについてのさらなる協議。
  - 8) 日本において女性の受胎能に対する影響を確認するためには、4週間（あるいは他の期間）の非臨床試験においてどのような評価が必要であり、また、何種類の動物が必要とされるか。
- これらの事柄については今年の1月に日本で臨時会合を開いて協議される予定であったが、FDAのメンバーの参加が不可能となったため見送られ、今年5月の定例のブリュッセル会合で話し合われることとなった。
- 5月のブリュッセル会合を前に、4月27日に電話会議が開かれ、上記の検討事項について事前確認が行われた。この会議で製薬協側からは生殖毒性についての解析結果の中間報告を事前配布し、ブリュッセルで協議することが確認された。他の確認としては：
- 1) 初日と2日目に探索的臨床試験の枠組みについて1日半かけて討議する。このセッションでは、EFPIAよりBill Robinson博士を招き討議を行う。
  - 2) 3日目と4日目は、生殖発生毒性試験と非げっ歯類の長期安全性試験のアンケート結果を基にした議論を行う。
  - 3) 新たに、M3ガイドラインの11章（小児を用いる臨床試験）についての議題も加える。
  - 4) シカゴ会議で合意された部分（ガイドラインの適

用範囲、単回投与毒性試験、変異原性試験)については、残りの部分の議論の終了まで再議論を行わない。などがなされた。

ICHブリュッセル会合は5月6日の午後から10日にかけて行われた。

#### 第1日目(6日)

午後より、探索的臨床試験について討議が持たれた。まず、FDAの探索型試験であるeINDおよびEFPIAの提案する過大評価型(overage)アプローチについて紹介があり、引き続き、JPMAが提出した案を基に、探索的臨床試験に必要な非臨床安全性試験パッケージについての議論がなされた。

#### 第2日目(7日)

前日に続き探索的臨床試験の非臨床安全性試験のパッケージについて議論を行い、期間と用量、目的により5つのカテゴリーに分けた上で、各カテゴリーに必要な非臨床試験についての検討を行った。各カテゴリーは以下の通りである：

- 1) 最大5回の投与で、各用量は毒性試験のNOAELあるいは予測薬効量の1/100でかつ5回の総投与量が100 $\mu$ g/人までのマイクロドーズ試験。
- 2) 最大5回の投与で、各投与の洗浄期間が半減期の6倍以上。各投与が毒性試験のNOAELあるいは予測薬効量の1/100でかつ投与量が100 $\mu$ g/人までのマイクロドーズ試験。
- 3) 薬効用量以下の単回投与探索型臨床試験。
- 4) 薬効用量域での最長14日間の反復投与探索型臨床試験。最大耐量は求めない。
- 5) 薬効用量域での反復投与探索型臨床試験。期間はげっ歯類の毒性試験期間まで(最長14日間)。最大耐量は求めない。

#### 第3日目(8日)

最初に2日目までの探索的臨床試験の非臨床試験パッケージの確認を行い、げっ歯類の慢性毒性試験の投与期間別による毒性所見についての調査結果について検討した。

#### 第4日目(9日)

反復投与毒性試験の投与期間について確認を行った。また、慢性毒性試験の投与期間について、9か月ではほぼ合意に達した。ただし、FDA内の了承を得る必要が

あるため、アンケートで集めたデータについて解析を行うことになった。また、局所刺激性試験の必要性については、マイクロドーズ試験を例外とすること、遺伝毒性試験については、S2のEWGとの調整が必要であること、が合意された。

#### 第5日目(10日)

S2 EWGと合同の議論を行った。しかし、探索的臨床試験に必要とされる安全性試験としての染色体異常試験については、*in vivo*試験を毒性試験に組み込む場合における用量について合意が得られなかった。また、JPMAが収集し調査・解析を行った胚胎児発生試験のnon-GLP用量設定試験の検出力についての紹介があり、議論がなされた。

以下に、ブリュッセル会合で合意されたM3ガイドラインの主な内容をまとめる(ただし、細部については各局で主張が分かれる箇所も残された)：

#### A. 探索的臨床試験に必要とされる非臨床安全性試験

##### 0) 従来のM3ガイドラインで必要とされる単回、反復投与試験

- ・臨床の投与期間と同期間(最短2週間)の反復投与毒性試験

- ・2週間以上の反復投与毒性試験

(げっ歯類および非げっ歯類、局所刺激性の評価を含む)

- ・遺伝毒性試験(Ames試験、染色体異常試験)

- ・日本においては、妊娠可能な女性を対象とする場合、雌の妊孕性試験もしくはげっ歯類の1か月反復投与毒性試験が必要

- ・安全性薬理試験(コアバッテリー)

- 1) 最大5回の投与で、各用量は毒性試験のNOAELあるいは予測薬効量の1/100でかつ5回の総投与量が100 $\mu$ g/人までのマイクロドーズ試験

- ・げっ歯類1種の拡張型単回投与毒性試験(静注、または臨床投与経路；トキシコキネティクス)

- ・ヒトの投与用量の算出根拠となる薬効の感受性を有する動物種における薬理学的特性の把握

- ・遺伝毒性試験は不要(ただし、すでに実施された試験があれば提出)

- ・受容体スクリーニングアッセイのプロフィール

・イメージングを行う場合には、適切な線量ベースの投与量が必要

2) 最大5回の投与で、各投与の洗浄期間が半減期の6倍以上。各投与が毒性試験のNOAELあるいは予測薬効量の1/100でかつ投与量が100 $\mu$ g/人までのマイクロドーズ試験。

・げっ歯類1種の7日間反復投与試験（静注、または臨床投与経路；トキシコキネティクス；病理組織検査）

・非PET化合物を使用する場合、Ames試験（または必要であれば適切な代替試験）が必要

・適切な受容体スクリーニングアッセイのプロフィールデータ

・適切な放射線量の投与

3) 薬効用量以下の単回投与探索型臨床試験

・拡張型単回投与毒性試験（哺乳類2種、臨床投与経路、局所刺激性の評価を含む）

・曝露データ（AUC）および*in vitro*代謝データ

・遺伝毒性試験（Ames試験）

・安全性薬理（*in vitro*スクリーニングと毒性試験における症状観察あるいはコアバッテリー試験）

4) 薬効用量域での最長14日間の反復投与探索型臨床試験。最大耐量は求めない。

・標準的な2週間反復投与毒性試験（げっ歯類と非げっ歯類）

・投与可能最大量で毒性が認められない場合、臨床用量を曝露量の1/2まで上げることが可能。

・投与可能最大量までに至らずに毒性が認められなかった場合には、臨床用量を1/10まで上げることが可能

・遺伝毒性試験（Ames試験と染色体異常試験）

・安全性薬理試験（毒性試験と同じ最高用量のコアバッテリー試験）

5) 薬効用量域での反復投与探索型臨床試験。期間は非げっ歯類の毒性試験期間まで（最長14日間）。最大耐量は求めない。

・げっ歯類における2週間の反復投与毒性試験（適切な動物種の選定が前提）

・非げっ歯類の反復投与毒性試験（臨床試験期間と同じ投与期間でげっ歯類のNOAELと同じ投与量。使用動物数は3～6）

・遺伝毒性試験（Ames試験と染色体異常試験）

・安全性薬理試験（コアバッテリー）

・臨床試験における曝露量の制限（例：非げっ歯類試験のAUCおよびげっ歯類試験のNOAELのAUCの1/2）。投与量の増量は毒性試験における毒性所見、曝露量、毒性の重篤度による。これらの毒性試験はモニターすることが可能で、可逆性であり重篤度が低くならない。

B. 各臨床試験フェーズにおける必要とされる反復投与毒性試験期間

1) 探索臨床試験

<14日まで>

・げっ歯類：2週

・非げっ歯類：臨床試験と同期間

2) 第I～III相試験

<2週まで>

・げっ歯類：2週

・非げっ歯類：2週

<1か月まで>

・げっ歯類：1か月

・非げっ歯類：1か月

<1～6か月>

・げっ歯類：臨床試験と同期間

・非げっ歯類：臨床試験と同期間

<6か月以上>

・げっ歯類：6か月

・非げっ歯類：9か月

3) 申請

<2週まで>

・げっ歯類：1か月

・非げっ歯類：1か月

<2週を超え1か月まで>

・げっ歯類：3か月

・非げっ歯類：3か月

<1か月を超え3か月まで>

・げっ歯類：6か月

・非げっ歯類：6か月

<6か月以上>

・げっ歯類：6か月

・非げっ歯類：9か月



### C. 申請に必要とされる反復投与毒性試験期間

<臨床使用期間2週まで>

- ・げっ歯類：1か月
- ・非げっ歯類：1か月

<同2週を超え1か月まで>

- ・げっ歯類：3か月
- ・非げっ歯類：3か月

<同1か月を超え3か月まで>

- ・げっ歯類：6か月
- ・非げっ歯類：6か月

<同3か月以上>

- ・げっ歯類：6か月
- ・非げっ歯類：9か月

ブリュッセル会合後の予定としては：

1) “胎児発生試験のnon-GLP用量設定試験とGLPの検出力”と“非げっ歯類を用いた慢性毒性試験期間と毒性所見データの比較”について、データの見直しと相互確認を行う（6月中）。

2) 10月の横浜会合でのStep 2を目指すため、9月に追加EWG会議を開催（9月25-27日ワシントンを予定）の2点が確認された。

9月の臨時EWG会議は予定通り9月25-27日の3日間、ワシントンで行われた。話し合われた内容は以下の通りである：

第1日目（25日）

生殖毒性のデータベースについて検討した。妊娠可能な女性（WOCBP）を臨床試験に含めることについて、2種類の動物による予備的な催奇形性試験に基づいて短期間（2週間など）および中程度の試験（3か月以下、150人までのWOCBP）を行うことで暫定的な合意が得られたが、これについての条文化を行った。また、行政側がデータに自由にアクセスできるよう、PhRMA側が準備することとなった。

第2日目（26日）

非げっ歯類による慢性毒性データベースの評価を行った。全ての地域でほとんど全ての場合に9か月間の試験を行うよう、条文化がなされた。12か月間の試験は、小児が主たる患者集団となる場合における非げっ歯類幼若動物毒性試験の代用のみとした。また、臨床試験のサポートおよびマーケティングに関する表につ

いて、全地域で調和の取れたアプローチができるように文面の手直しを行った。FADは、臨床適用において長期間の使用が予想される場合には、短期間の処置で非げっ歯類の試験期間の見直しを行う。

第3日目（27日）

6局のうちの1つの代表がスケジュールの関係で会合から退席しなければならなかったため、今回の会議で話し合いを行わなければならない領域、および、これまでには問題とならなかったが、地域差を調和しなければならないものとしてM3文書に付け加えるべき新たなトピックについて洗い出しを行った。また、次の横浜会合に向けて、ドラフトの案を以下のように分担することとなった：小児毒性（EFPIA）、多剤混合薬の非臨床試験（FDA）、乱用についての信頼性（EC）、光毒性（JPMA）、免疫毒性（MHLW）。

横浜会合を前にICH-M3研究班の班会議が、10月26日、午後2時より6時まで、国立医薬品食品衛生研究所安全性生物試験研究センター会議室で開催された。参加者は中澤、大野の他、研究協力者である、大橋、佐神、篠田、中村、小野寺、馬屋原、吉田、高橋の各氏であった。座長である中澤の挨拶の後、5月に行われたブリュッセル会議、および9月に臨時で行われたワシントン会議の報告、および10月29日より開かれる横浜会議に向けての対応について、大野および佐神氏より説明がなされた。報告については、ガイドライン・ステップ2案の変更点を説明する形で行われ、また、横浜会議への対応については各局から提出された案に基づいて行われた。以下に概要を示す：

- ・急性毒性試験（acute toxicity study）：単回投与試験（single dose study）より名称変更
- ・反復投与毒性試験：1）NOAELという用語の使い方があるため、急性毒性等の結果から設定する場合には、dose without apparent effect等に言い換えることが望ましい。2）非げっ歯類慢性毒性試験において9か月を6か月に短縮することの根拠について
- ・小児に対する安全性評価の取り扱いについて
- ・閉経の定義等について
- ・光毒性について
- ・薬物乱用について：情報は必要だが、臨床前の非臨床試験は不要ではないか？

・免疫毒性に関しての大野による文案：医薬品候補物質の遺伝毒性能に関する重要な情報は反復投与毒性試験より得ることが可能である。しかし、反復毒性試験の通常のパラメータでははっきりと現われない毒性が生じる場合もある（例えば、白血球数、免疫に関連する器官の組織病理学的変化、血漿グロブリンの変化、感染症および腫瘍発生の増加）。よって、薬理効果、化学構造、薬物動態プロフィール、臨床的徴候のような他の情報により免疫毒性の可能性が示唆される場合、多数の患者集団への投与（通常は第Ⅲ相試験）の前に特別な免疫毒性試験の実施を考慮することが必要である（ICH-S8）。通常の毒性試験で陽性の知見が認められた場合、その作用と患者集団の性質に応じた適切なタイミングで補足的な試験を行うべきである。患者の免疫能を注意深くモニターする必要がある特別な疾患においては、臨床試験開始前に免疫毒性能を検討するべきである。

続いて、雌繁殖能への影響評価について吉田氏から報告がなされ、企業の有志を集っての研究の立ち上げについて、進行状況が説明された。また、横浜会議ではステップ2への到達を目標とすることを確認した。

ICH横浜会合は10月29日から11月1日にかけて開催された。概要は以下の通りである。

#### 第1日目（29日）

現在修正中のM3ガイドライン案の見直しを開始し、案の文章を大幅に手直した。全ての地域でほとんどの場合において9か月の非げっ歯類試験を行う、ということで合意が得られた。12か月の試験は、主たる患者集団が小児である場合に非げっ歯類幼若動物の慢性毒性試験の代用に用いられるのみである。

#### 第2日目（30日）

M3ガイドライン案の見直し/修正の続きを行った。販売認可に必要な非臨床試験の期間について合意が得られた。また、案の探索型臨床試験に関するセクションについての協議を開始した。2種類のマイクロドーズ試験および治療用量以下で行う試験について合意が得られた。

#### 第3日目（31日）

急性毒性試験の記述について合意が得られた。以下のタイミングに関するセクションをICHおよび各地域

のガイドランスに新たに加えることで一致をみた：免疫毒性試験、光毒性試験、乱用について信頼性を得るための非臨床試験。多剤混合薬の毒性試験をM3の一部とすることについては一致をみなかった。また、探索型臨床試験のセクションについて見直し/修正を行った。探索型臨床試験における初回用量の原則について有意義な討議がなされた。ヒトに対して最初に投与する用量の推定を、新たなセクションとしてM3に加えることで一致をみた。

#### 第4日目（1日）

ICH運営委員会への報告を行った。横浜会合で得られた成果を説明するとともに、以下のような今後の方針を述べた：

- ・ガイドライン案の残りの部分の見直し/修正を完了させる（局所耐性、遺伝毒性、発がん性、生殖毒性、その他の補助試験、小児集団における臨床試験）。

- ・新しいセクションについて正式な協議を始める（免疫毒性、光毒性、乱用の可能性；原稿はすでにICH各局により準備されている）。

- ・ステップ2署名に至るまでの遅れを取り戻すために各局のメンバーに課題を割り当てる。

- ・9月の会議で要求のあった追跡情報について協議する。

#### 2. 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関する研究-妊娠可能な女性を臨床試験に組み込むために必要な非臨床試験の設定範囲について

まず卵巣毒性検出のあたり、げっ歯類卵巣の特徴について検索した。その結果、げっ歯類はヒトなどの非げっ歯類と異なり、絶えず卵細胞が成長、排卵、閉鎖しており、性周期も4から5日という短期間で繰り返されているが、これらの特徴を把握することが卵巣毒性検出に必要であると考えられた。

#### 1) 文献調査等による反復投与毒性試験における卵巣毒性検出の可能性

毒性関連の成書および文献に報告されている既知の卵巣毒性物質を検索した結果、毒性発現機序によって5つのカテゴリーに分類された。これらのカテゴリーのうち、最も重篤な影響は、直接卵細胞に傷害を与えることから卵胞への直接障害作用による毒性であり、この毒性検出が最も重要であると考えられた。これら

の毒性は、放射線、cyclophosphamide、4-vinylchlorohexene dioxide (VCD)、2-bromopropane、1,3-butadieneなどの投与で生じ、原始卵胞あるいは一次卵胞など通常の病理組織学的検査での見逃しがちな小卵胞を不可逆的に障害することから、小卵胞への障害を確実な検出方法について検討した。その結果、ラットの卵胞は約27日程度で一次卵胞から排卵に至る大きな胞状卵法まで発育すると考えられることから、4週間の反復投与により、小卵胞の減少を大きな卵胞の変化として捉えることが可能であると考えられた

卵胞形成は、視床下部・下垂体・性腺軸の厳密な制御を受けているために、卵胞への直接障害物質だけでなく、脳の神経内分泌系を変調する物質、あるいは卵巣でのホルモン合成や代謝関連酵素を阻害する物質も、間接的に卵胞発育を障害する。性周期観察は視床下部・下垂体・性腺軸の変化を持続的に観察する簡便で有用な検査方法であり、多くの卵巣毒性物質で性周期異常が報告されていることから、卵巣毒性検出法として有用であると考えられた。さらに卵巣に関連する内分泌臓器や子宮・膣などの女性ホルモン依存性臓器の組織学的検査を加えることによって、卵巣への影響検出が容易になると考えられた。

つぎに卵巣の標本作製方法について検討を加えた。卵巣毒性として最も懸念される卵胞の障害、特に細胞死による卵胞数の減少は、卵巣の連続切片作製により計測して確認するが多かった。この方法では標本作製に膨大な時間を要するので今回の研究の目的には合致しない。2005年に米国毒性病理学会誌に掲載された米国毒性病理学会ワーキンググループも position paperは具体的な卵巣毒性の評価方法は述べていないが、「卵巣毒性は量的解析(連続切片作製による卵胞数計測)ではなく、毒性病理学専門家による質的解析(通常の毒性試験で行われている病理組織学的観察方法)により、卵巣毒性のスクリーニングは可能」と結論している。またこの論文では、卵巣毒性を容易かつ簡便に病理組織学的に検出できる手段としてproliferating cell nuclear antigen (PCNA)による免疫組織化学染色による卵胞検出方法が推奨されている。本法は簡便で、且つ小卵胞検出に優れていることから、このような方法を必要に応じて通常のヘマトキシリン・エオジン染

色と組み合わせることにより、連続切片を作製せずとも、卵胞の障害を捉えやすくなると考えられた。

また、今回の文献調査で使用した卵巣毒性の研究は、マウスおよびラットを用いた行われたものが大部分であることから、反復投与毒性試験に使用する動物種としてはラットを用いることが可能であると考えられた。注意すべき点としては、系統により視床下部・下垂体・性腺軸への感受性が異なり、ホルモンレベルの系統差として現れることも報告されているので、選択する系統については背景データの蓄積だけでなく、感受性差も考慮した系統の選択が望ましいと考えられた。

これらの文献調査の結果を日本薬学会第127回年会、安全性評価研究会2007年春のセミナーおよび第13回生殖・発生毒性学東京セミナーにて発表した。

2) 反復投与毒性試験による卵巣毒性検出の検証試験  
上記の文献調査により、ラットを用いた反復投与毒性試験によって卵巣毒性検出可能と考えられたが、日本製薬協の協力を得てラットを用いた反復投与毒性試験によって卵巣毒性検出可能かを検証するためのワーキンググループ(WG)を立ち上げた。このWGが中心となって検証試験を立案した。この検証試験では、反復投与毒性試験に並行して、受胎能試験を行い、卵巣毒性検出の感受性についても比較することとした。WGからこの検証試験への参加を募集したところ、18の製薬企業より申し出があり、既に被験物質の選定などが終了し、試験は実施中である。

試験の実施と平行して、参加企業における病理担当者間での卵巣の観察方法の標準化なども現在進めている。しかしながら、毒性作用機序に基づいた卵巣毒性の既存の評価法がないこと、卵巣毒性評価に卵巣の生理や視床下部・下垂体・性腺軸の内分泌環境の理解などが必要であることから、病理担当者の教育にはしばらく時間を要することが予想される。今後の問題点として、病理組織標本を観察する病理担当者の教育は標本作製法と同様、卵巣毒性評価にとって重要な課題であると考えられた。

### 3. 動物実験の3Rsに関する研究

意見交換で合意を得た内容としては、*in vitro*試験で動物実験を完全代替できないことから、さらなる試験法の確立が必要であるということであった。いくつかつ

かの*in vitro*試験は動物実験の3Rs (Reduction:削減、Refinement:苦痛の軽減、Replacement:置き換え)の内、苦痛の軽減には有用であるが、感度が高すぎ(疑陽性が多すぎる)、*in vivo*試験による確認が必要であるとされた。

さらに、CVAMや規制官、業界による定期的な会議の必要性はなく、またCVAMの専門家は安全性ワーキンググループの調整役として招待するとされた。

#### D. 考察

M3のガイドライン案は昨年度に比べ大幅な改善が加えられ、急性毒性試験あるいは探索型試験等については一般からの意見を問うステップ2の段階に達していると言える。しかし、特に今回の修正の目玉とも言える探索型試験についての協議に時間を取られたため、追加の臨時会議をもってしても、遺伝毒性試験、生殖毒性試験等の見直しは積み残される形となってしまった。さらに、光毒性、免疫毒性、小児への対応等、新たにガイドラインに加えなければならない項目も残されている。しかし、これらについては、3極で考え方に大きな隔たりが生じる可能性は現時点では低いと考えられ、事前の電子メールによる意見交換、電話会議等を経て、2008年6月に開催されるICHポートランド会合でステップ2に達する見込みである。

妊娠可能な女性を臨床試験に組み込むために必要な非臨床試験の設定範囲については、文献調査による反復投与毒性試験における卵巣毒性検出の可能性についての今回の文献検索の結果を総合すると以下のことが明らかになった：1) 卵巣の基本的な生理や機能、内分泌環境の把握が卵巣毒性の理解に重要である、2) 毒性発現機序に基づき、卵巣毒性を分類した場合、卵胞への毒性検出が最も重要である、3) しかし、ラットへの4週間の投与期間で卵胞への障害が検出可能と思われる、4) 性周期観察などの生殖器の総合的な解析が卵巣毒性検出に有用である、5) 卵巣の最大断面を鏡検・PCNA染色で卵胞の確認など病理組織学的観察での改変により連続切片を作製せずとも、卵巣毒性が検出可能と思われる、6) 病理検査担当者の教育が必要である。また、これらに加え、卵胞を障害する物質は細胞障害性を有することも多いので、被験物質情

報(細胞障害性、DNA傷害性)の把握も必要であろう。したがって文献調査等の結果より、ラットを用いた4週間反復投与毒性試験を一部改変することによって、既知の毒性発現機序を示す卵巣毒性物質については、検出できる可能性が高いと思われた。反復投与毒性試験による卵巣毒性検出の検証試験については、日本製薬協の協力を得てラットを用いた反復投与毒性試験によって卵巣毒性検出可能かを検証するための検証試験を開始した(18製薬企業の参加)。試験は実施中である。この検証試験では、反復投与毒性試験に並行して、受胎能試験を行い、卵巣毒性検出の感受性についても比較する。

動物実験の3Rsに関する研究については、さらなる議論の中で、規制官によりCVAMは政府機関に密接であるか、その一部であり、代表団の一部であるとされた。医薬品規制における3Rsを適正化する目的において、本会の参加者は動物利用において、ICHのEWG(専門家ワーキンググループ)に提案できるとされた。製薬工業会の懸念は、PETA (PEOPLE FOR THE ETHICAL TREATMENT OF ANIMALS) のような当事者グループが本会への参加を要求していることである。FDAは半年毎のICH会議に先立ち、FDAのパブリックコメント聴取組織を通して当事者グループから意見を求めることを提案した。

#### E. 結論

本年度は非臨床試験のタイミング(M3)に関するガイドライン案の作成において、探索型試験を含む項目で大きな進展があった。残されている項目の修正および新たに加わる項目については、今後協議を進め、2008年6月のポートランド会合でステップ2に達する見込みである。

妊娠可能な女性を臨床試験に組み込むために必要な非臨床試験の設定範囲については、現行の反復投与毒性試験の一部改変によって卵巣への影響を検出可能であることを検索したところ、文献調査等の結果から、ラットを用いた4週間反復投与毒性試験を一部改変することにより、既知の毒性発現機序を示す卵巣毒性物質については検出できる可能性が高いことが示された。また、日本製薬協の協力を得て、ラットを用いた反復投