

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(卵巣毒性検出の感受性について受胎能試験との比較)を開始しており、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、*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り、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。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Sato K, Akaishi T, Matsuki N, Ohno Y, Nakazawa K, beta-Estradiol induces synaptogenesis in the hippocampus by enhancing brain-derived neurotrophic factor release from dentate gyrus granule cells. *Brain Res.*, 1150 108-120 (2007)
- 2) Nakajima, M., Takahashi, H., Nakazawa, K., and Usami, M. Fetal cartilage malformation by intravenous administration of indium trichloride to pregnant rats. *Reproduct. Toxicol.* 24, 409-413 (2007)
- 3) Usami, M., Mitsunaga, K., and Nakazawa, K. Comparative proteome analysis of the embryo proper and yolk sac membrane of day 11.5 cultured embryos. *Birth Defects Res. B* 80, 383-395 (2007)
- 4) Usami, M., Mitsunaga, K. and Nakazawa, K. Two-dimensional electrophoresis of protein from cultured postimplantation rat embryos for developmental toxicity studies. *Toxicol. In Vitro* 21, 521-526 (2007)
- 5) Saarinen, M.N., Katsuda, S., Makela, S., Maekawa, A., Santti, R., Yoshida, M. Chemopreventive effects of a plant lignan 7-hydroxymatairesinol on mammary and uterine cancer development in rat models. In *Cancer: Disease Progression and Chemoprevention*. (Ed. T. Tanaka). Research Signpost, India. (2007), in press.
- 6) 小島肇夫、日本における動物実験代替法の開発動向、*Fragrance Journal* 10, 29-34 (2007)
- 7) 小島肇夫、動物実験代替法のバリデーション、*COSMETIC STAGE*, 8, 54-56 (2007)
- 8) 小島肇夫、代替法国際動向から見た新技術導入の可能性、動物実験代替法のためのバイオマテリアル・デバイス、シーエムシー出版pp.1-5 (2007)
- 9) 小島肇夫、動物実験代替法の現状と展望、*日本薬理学会会誌*、130、505-509 (2007)

2. 学会発表

- 1) 吉田 緑 雌受胎能評価に必要な安全性試験について 日本薬学会第127回年会 一般シンポジウム 平成19年3月30日 富山県民会館
- 2) 吉田 緑 M3ガイドラインの見直し：妊娠可能な女性の治験への参加に必要な非臨床試験 安全性評価研究会2007年春のセミナー 平成19年5月19日 武田薬品工業株式会社 大阪工場・体育館ホール
- 3) 吉田 緑 卵巣の定量評価 第13回生殖・発生毒性学東京セミナー 平成19年10月5日 国立オリンピック記念青少年総合センター
- 4) Kojima, H., JaCVAM Update, Scientific Advisory Committee on Alternative Toxicological Methods, Bethesda, (June, 2007)
- 5) 小島 肇、代替法を取り巻く内外の動きと今後の方向性、皮膚基礎研究クラスターフォーラム、東京 (7月、2007)
- 6) Kojima, H. JaCVAM Update, 6th World Congress on Alternatives 6 Animal Use in the Life Sciences, Tokyo (August, 2007)
- 7) Kojima, H. JaCVAM Process to Validate and Peer Review of New Alternative Methods, 6th World Congress on Alternatives 6 Animal Use in the Life Sciences, Tokyo (August, 2007)
- 8) 小島 肇、動物実験と代替法の現状、城西大学生命科学研究センター講演会、城西大学(10月、2007)
- 9) 小島 肇、EUにおける動物実験代替法の現況とREACH対策、京都 (11月、2007)
- 10) Kojima, H., JaCVAM Update, ECVAM Scientific Advisory Committee, Ispra (November, 2007)

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

国際的整合性を目指す医薬品等の 品質、有効性及び安全性に関する研究

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

国立医薬品食品衛生研究所

班長: 中澤憲一

報告者: 大野泰雄

ICH-M3 検討班の班員と研究協力者

班員

中澤憲一(国立医薬品食品衛生研究所 薬理部)

大野泰雄(国立医薬品食品衛生研究所)

小島 肇(国立医薬品食品衛生研究所 薬理部)

研究協力者 安全性分野

伊藤真紀(塩野義製薬)

小野寺博志(医薬品機構)

大橋京一(大分大 医)

佐藤洋一(医薬品機構)

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(医薬品機構)

山本恵司(武田薬品工業)

吉田 緑(国立衛研)

研究課題

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

- 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(中澤憲一)
- 2) 雌性生殖臓器に対する影響評価に関する研究(大野泰雄)
- 3) 医薬品の安全性評価における動物実験代替法に関する研究(小島 肇)

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 (中澤憲一)

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 (ICH-M3での主な検討課題)

1. 安全性薬理
2. トキシコキネティクスおよびファルマコキネティクス
3. 単回投与毒性 ⇒ 急性毒性(MHLW)
4. 反復投与毒性(JPMA, PhRMA, EFPIA)
5. ヒト初回投与量の算定
6. 探索的臨床試験
7. 局所毒性
8. 遺伝毒性(JPWA)
9. がん原性
10. 生殖毒性(男性、妊娠可能性の無い女性、妊娠可能女性、妊娠女性)(JPMA, PhRMA, EFPIA)
11. 幼小児臨床試験(EFPIA)
12. 免疫毒性(MHLW)
13. 光毒性
14. 依存性(Non-clinical Abuse liability)
15. 複合製剤のための非臨床試験 (FDA)

急性毒性(draft 15)

- 単回投与毒性試験⇒急性毒性(臨床投与経路)
- 得られる情報はオーバードースへの対応のために必要 ⇒通常、実施は第三相の前が良い。
- 鬱、痛み、痴呆の外來患者を対象とする場合はより早く実施する。
- Dose escalation study, short duration dose ranging studiesでも必要な情報が得られる。
- ヒトでの暴露を大きく上回る(例 30倍の暴露)、暴露の飽和、maximum feasible dose試験でも良い
- Limit dose: げっ歯類 2000mg/kg
非げっ歯類1000mg/kg
- マイクロドーズ試験の場合を除き、非GLPで良い。

反復投与毒性(draft 15)

- 臨床試験が単回あるいは2週間までの反復投与の場合では、通常、げっ歯類と非げっ歯類動物を用いた2週間の反復投与毒性試験が必要
(日本では女性に投与する前に4週間)
- 臨床試験期間と同じあるいはそれを超える期間の反復投与毒性試験が必要。
- げっ歯類では6ヶ月、非げっ歯類では6ヶ月(EU)あるいは9ヶ月(日、米)の反復投与毒性試験で6ヶ月を超える臨床試験をサポートできる。
- 6ヶ月を超える試験の必要性について、三極の製薬団体が6ヶ月以後に明らかになる毒性について調査し、その結果に基づいて考察した。

6ヶ月を超える試験を行わなくとも良い状況(日米)

- 免疫原性やトランスにより長期の試験が妨害される場合。
- 偏頭痛やED、ヘルペスのように、短期間の間歇的治療が繰り返され、結果として臨床試験期間が6ヶ月を超える場合。
- がんの化学療法のように、生命に危険な疾患の治療を意図している薬物

探索的臨床試験

医薬品開発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

- ヒトに毒性が現れないと想定される用量以下に限定
 - 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
 - 試験に必要な被験物質量を削減できる
(非臨床試験を含めOne Batchで可能とする)
- 従来より早期に臨床試験に入ることを意図。

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は暫定的なものでICHの分類とは異なる。

探索的臨床試験に期待する情報

- ヒトでの薬物動態情報
- イメージング技術を用いたヒト体内分布に関する情報
- 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(mechanism of action)
- 薬効につながるバイオマーカーの妥当性に関する情報
- その他

探索的臨床試験の実施に必要な非臨床試験 (draft 15)

探索的臨床試験の形	毒性試験/安全性薬理試験の範囲
I型探索的臨床試験 (5回まで、総量100ug以下)	<ul style="list-style-type: none"> ● げっ歯類を用いた臨床投与経路での拡張型急性毒性試験*。 ● Limit dose: 10mg/kg ● 適切な動物種を用いた薬理試験。 ● 遺伝毒性は不要。 ● 受容体結合性。 ● RI暴露評価

* : 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

探索的臨床試験の実施に必要な非臨床試験(draft 15)

探索的臨床試験の形	毒性試験/安全性薬理試験の範囲
I型探索的臨床試験 (100ug以下を5回まで、総量500ug以下)	<ul style="list-style-type: none"> ● げっ歯類を用いたivあるいは臨床投与経路での7日間の反復投与毒性試験 (Toxicokineticsを含む) ● Ames試験。 ● RI暴露評価

探索的臨床試験の実施に必要な非臨床試験(draft 15)

探索的臨床試験の形	毒性試験/安全性薬理試験の範囲
II型探索的臨床試験 (単回投与**) 日本とEUはNOAELの1/10以下) 米国はNOAELの1/2まで	<ul style="list-style-type: none"> ● げっ歯類および非げっ歯類を用いた臨床投与経路での拡張型単回毒性試験† ● Toxicokinetics (AUC) ● In vitro代謝 ● Ames試験 ● 安全性薬理コアバッテリー <p>* ** : MTD, MFD, or limit doseはげっ歯類では 2000 mg/kg、非げっ歯類では 1000 mg/kg † : 日本では妊娠可能女性を組み合わせるためには、1月のげっ歯類の反復投与試験か雌の繁殖試験が必要。</p>

探索的臨床試験の実施に必要な非臨床試験(draft 15)

探索的臨床試験の形	毒性試験/安全性薬理試験の範囲
III型探索的臨床試験 (臨床用量までの単回あるいは14日までの反復投与試験) Toleranceは検討しない。	<ul style="list-style-type: none"> ● 標準的な2週間の反復投与毒性試験 (げっ歯類と非げっ歯類)。用量は最高用量でのヒト推定暴露量 (AUC) を数倍は超えること。 ● 両種で毒性が現れない場合は、NOAELの1/10まで臨床用量をあげても良い。 ● 毒性が認められた場合、あるいはMFDが使用された場合は、NOAELのAUCの1/2まであげられる。 ● 臨床で毒性が認められない場合は、毒性試験での毒性が追跡可能であり、可逆的であり、重篤度が低い場合には、このAUC以上まで用量をあげてもよい。 ● Ames 試験と染色体異常試験 ● 安全性薬理コアバッテリー <p>† : 前のスライド。</p>

探索的臨床試験の実施に必要な非臨床試験

探索的臨床試験の形	毒性試験/安全性薬理試験の範囲
III型探索的臨床試験 (2週間を上限とする非げっ歯類での毒性試験期間までの期間の単回あるいは反復投与臨床試験、臨床用量を用い、MTDを求めない。)	<ul style="list-style-type: none"> ● 2週間の反復投与毒性試験 (適切ならばげっ歯類)。少なくとも臨床投与経路での非げっ歯類での確認試験†。 ● Ames 試験と染色体異常試験 ● 安全性薬理コアバッテリー <p>† : EUと日本では妊娠可能女性を組み合わせるためには胎児影響の評価が必要 (日本は繁殖影響も)。 ● 毒性が現れない場合は、非げっ歯類でのAUC、あるいはげっ歯類のNOAEL AUCの1/2のどちらか低い値を基礎に限界用量を決めるべきである。毒性試験での毒性が追跡可能であり、可逆的であり、重篤度が低い場合には、このAUC以上まで用量をあげてもよい。</p>

遺伝毒性試験

- 遺伝毒性試験のフルバッテリーは第二相試験前までに完了すべき。
- 例外を除き、初めてヒトに投与するまえに、遺伝子変異と染色体異常に対する適切な試験を行っておくべき。
- 陽性でもヒトに投与することを考慮する場合は、追加の試験が必要。
- 曖昧な結果の場合は、臨床試験の状況下でのリスクが低い場合は臨床開発を継続して良い。しかし、多数の被験者で試験する前に、また、長期の試験を行う前に、曖昧な結果を明確にするための追加試験を完了しておくべき。

2) 雌性生殖臓器に対する影響評価に関する研究(大野泰雄)

生殖発生毒性試験(現行)

妊娠可能な女性(WCBP)への投与

現行ガイドライン (1997.7 Step 4)

胚胎児発生試験 日・欧(WCBP開始前)、米(PhaseⅢ前)

雌受胎能試験* 日(WCBP開始前)、欧・米(PhaseⅢ前)

理由

- 臨床試験における避妊処置の信頼性が低かった。
- 反復投与試験における雌生殖臓器評価への疑問があった。

この10年間の変化

- 卵胞の病理学的観察の向上
 - 臨床試験における被験者管理の向上
- 避妊処置をとることにより、生殖毒性試験実施タイミングを変えることができるか？

臨床試験中の妊娠リスク

ICH-M3 会議資料

(Brussels, May-07)

Dr James McLeod作成

妊娠リスク推定のための背景情報

- 米国での統計
 - Menstrual periods 18/21 → 51才: ~400回
 - Average pregnancy/women: ~3
 - Average births/women: 2.4
 - Pregnancy/menstrual period: ~0.8% (1.3% for 18-35才)
 - Birth/menstrual period: ~0.55%
 - Pregnancy rate when seeking child: ~85%/年
 - OC/IUD/... prevention rate: ~90%
 - Annual pregnancy rate for 20-29 year women: ~17%
- Rates in Japan & Western Europe are lower
- 臨床試験
 - 1-2 weeks exposure → 1 menstrual period
 - Pregnancy testing on baseline

US National Center for Health Statistic - 2003

Phase 3 Studies

- Studies conducted in younger female patients
 - RA, SLE, C-IBS (潰瘍性大腸炎), HIV, MS (Metabolic syndrome?), drug abuse
 - Several months of therapy – risk previously defined
 - C-IBS (5 births/ 6000 periods): ~0.08%/menstrual cycle
 - RA development studies: ~0.07%/menstrual (birth)
 - Pregnancy improves disease
 - Development study << Registry rates < general patient rates < general population rates
 - The birth rate is ~10-15% of expected
 - Compounds with previously delineated reproductive risk

催奇形性試験用量設定試験の予測能

- 製薬協の調査結果
 - 用量設定試験で外表、内臓、骨格を観察した場合の本試験での奇形および変異の予測
 - False negative 15% (16/105 comp.)
 - False positive 7% (7/105)
- 臨床試験の間での妊娠し、出生する確率:
0.07-0.08%/1メンス期間
- 通常の避妊処置の有効率: 約90%
- 2週間試験での出生率概算: $0.1\% \times 0.1 = 0.01\%$
- 徹底した避妊処置で更に妊娠確率は下げられる。

まとめ

- 臨床試験中の妊娠可能な女性の妊娠率は低い
 - 開発初期の臨床開発段階での妊娠はまれであり、出生にいたることは極めてまれである。
 - 開発初期の試験においては妊娠リスクが最低になるように計画される。
 - 第一相及び第二相の段階での妊娠リスクは低い。
- 第二相までは適切な避妊処置をとることで催奇形性試験を行わなくとも良い。

催奇形性試験を必要としない状況 (draft 15)

- 避妊が徹底された下での2週間までの治験
- 下記の疾患で、妊娠リスクを十分にコントロールした状況でのより長期の治験
女性に多い疾病
健康人を使用できない治験
- 被験物質の作用機構、薬剤の形態、適切な動物実験モデルで発生毒性実施の困難さ、についての知見も考慮

催奇形性試験実施時期 (draft 15)

2週間から3ヶ月の臨床試験を150人を限度に行う場合は

- 第二相開始までに、全てのパラメータ検査を含む用量設定試験を行っておく。
- 第二相試験では避妊を徹底する（志願者への十分な試験を行っていないことの通知と適切な避妊処置教育、信頼できる妊娠検査の実施）。
- 妊娠可能女性を組み込んで良いとする数と期間は妊娠率に影響する年齢や疾患といった因子により影響される。
- その他の状況では、妊娠可能女性を組み込む前に、最終的な非臨床発生毒性試験を終了させておくべき。

繁殖性試験実施時期

- すべての地域で第三相までに終了しておくべきとしたが、日本は妊娠可能女性を組み込むまえに繁殖毒性試験か4週間の試験で女性生殖臓器への影響をみておくべきとしている。

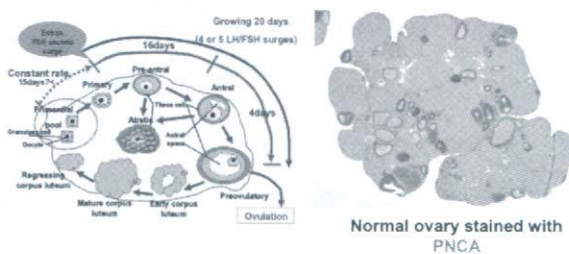
理由：避妊処置では女性生殖臓器への影響を回避できない。しかし、雌繁殖能試験か卵巣の成熟期間をカバーする4週間の反復投与毒性試験での雌生殖臓器を適切に観察すれば、影響の有無を推定できるだろう。

- 2週間試験でも可能かどうかは、今後のバリデーション次第。
- バリデーションの結果4週間でも困難と言うことになれば、日本の態度を変える可能性がある。

雌性生殖臓器への影響評価法 についてのバリデーション

卵巣毒性を考えるポイント

- げっ歯類卵巣の特徴
- 卵巣毒性の発現機序



文献調査等からの卵巣毒性検出の可能性

既知の発現機序に基づく卵巣毒性の大部分は検出可能

反復投与毒性試験

- 動物種 ラット or マウス
 - 系統 SDラット? ICR or B6C3F1マウス
 - 年齢 Young adult
- 投与期間 2週間 or 4週間?

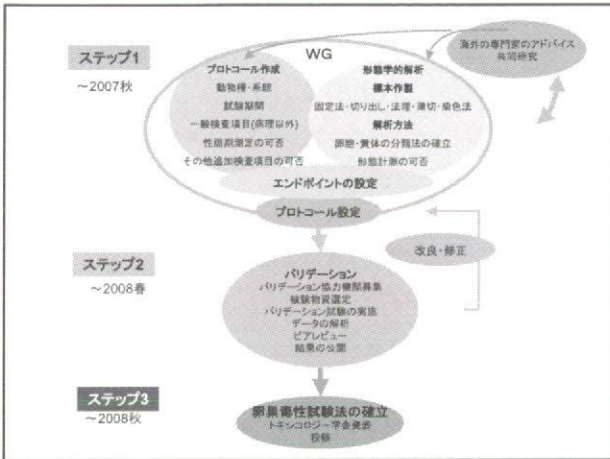
エンドポイント

- 形態学的解析を主 卵巣 関連臓器
- 作用機序によって追加
 - ◆ 性周期観察
 - ◆ ホルモン測定/生化学的解析
 - ◆ 遺伝子解析

総合的解析

外挿

- 作用機序 / Mode of action



卵巣毒性共同研究参加企業一覧

順位	会社名	担当者	試験物質	試験種
1	旭化成ファーマ(株)	吉澤 潤博	PLP(100)	軽毒性(1週)・難受動物
2	味の素(株)	安土兼子	Vincetibine(100), SP rats, 60日間以内	難受動物
3	あすの薬業(株)	矢野 茂	インドメタシン	軽毒性(21日)・難受動物
4	アステラス製薬(株)	大川 新司	インドメタシン(100)	軽毒性(21日)・難受動物
5	エーザイ(株)	西尾 晋平, 武田直和	EGFR, IL-18, IL-10, 100ug/kg po	軽毒性(21日)・難受動物
6	大塚製薬(株)	斎藤 俊	17β-Testosterone(100), 17β-Oestradiol(50), S100	軽毒性(21日)・難受動物
7	キッシー薬品工業(株)	藤井 公平, 田村広明	17β-Oestradiol(100), 17β-Testosterone(100), 17β-Oestradiol(50), 17β-Testosterone(50)	軽毒性(21日)・難受動物
8	小林製薬(株)	上藤 賢, 堀田聡希	17β-Oestradiol(100), 17β-Testosterone(100)	軽毒性(21日)・難受動物
9	興和(株)	石塚 英博	17β-Oestradiol(100), 17β-Testosterone(100)	軽毒性(21日)・難受動物
10	(株) 和光化学研究所	藤澤 俊博	17β-Oestradiol(100), 17β-Testosterone(100)	軽毒性(21日)・難受動物
11	武田薬品工業(株)	松本 純子	17β-Oestradiol(100), 17β-Testosterone(100)	軽毒性(21日)・難受動物
12	第一三共(株)	山本 洋, 野崎 白 井 正人	17β-Oestradiol(100), 17β-Testosterone(100)	軽毒性(21日)・難受動物
13	前田 薬製薬(株)	宇野 敏彦	17β-Oestradiol(100), 17β-Testosterone(100)	軽毒性(21日)・難受動物
14	中外製薬(株)	瀧口 直二	17β-Oestradiol(100), 17β-Testosterone(100)	軽毒性(21日)・難受動物
15	トーアエコー(株)	伊藤 篤志	17β-Oestradiol(100), 17β-Testosterone(100)	軽毒性(21日)・難受動物
16	富士化学工業(株)	木暮和夫, 野崎 聡明	インドメタシン以外のNSAIDを複数行中	軽毒性(21日)・難受動物
17	日本新薬(株)	土平 幸	17β-Oestradiol(100), 17β-Testosterone(100)	軽毒性(21日)・難受動物
18	五右衛門(株)	坂 秀敏, 土橋 武志	卵巣で報告中	軽毒性(21日)・難受動物

3) 医薬品の安全性評価における 動物実験代替法に関する研究 (小島 肇)

**動物実験代替法の
バリデーショングループの会合**

- The half-day meeting held on May 6, 2007, between ICH M3(R2), S2(R1) Safety Experts and representatives of the three ICH regions of CVAMs (Centers for the Validation of Alternative Methods).
- Presenters
Abby Jacobs (ICCVAM and 
Thomas Hartung (ECVAM) 
Yasuo Ohno (JaCVAM/NIHS) 

会議の結果

- It was noted that no *in vitro* test was ready for full replacement of animal studies and further work was needed to establish tests. Several *in vitro* tests are useful for refinement but they are too sensitive and *in vivo* tests are still needed for confirmation.
- Regular VAM/Regulators/Industry informal meetings were not considered necessary. The Group recommended that VAM experts could be invited to integrate into Safety Working Groups.

SC discussion:

- The regulators clarified that VAM have close links or were part of the agencies and therefore could be part of their delegation. Their participation would ensure that impact of ICH EWG work on animal use is adequately addressed, with the objective to optimize the use of the "3Rs" (Reduce, Refine and Replace) principles in medicines regulation.
- PhRMA expressed concerns that groups such as PETA not meeting the interested parties' definition would request participation. FDA mentioned that the FDA organization of public hearings prior to each ICH meeting allowed all interested parties to provide input.

M3ガイドラインの今後の目標

平成20年6月: Step II

平成20年11月: Step IV

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—

分担研究者：大野 泰雄（国立医薬品食品衛生研究所・副所長）

研究協力者：吉田 緑（国立医薬品食品衛生研究所・病理部）

研究要旨

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。

キーワード：非臨床試験、国際ハーモナイゼーション、卵巣毒性、反復投与毒性試験、
受胎能試験

A. 研究目的

現行の医薬品の臨床試験のための非臨床試験の実施時期についてのガイドラインにおいて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、三極間で大きく、より有用な医薬品の開発および使用のための国際的にハーモナイズしたガイドラインの作成が進む

現状とはそぐわない点が生じているため、医薬品国際ハーモナイゼーション会議（ICH）の非臨床試験のタイミングに関する部門（M3）においてもガイドラインの修正作業がスタートしている。

妊娠可能な女性の臨床試験の組み入れるために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ような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。

そこで本研究は、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：毒性発現メカニズムに基づいて卵巣毒性物質を分類し、2週間あるいは4週間の反復投与毒性試験、あるいはそれらの改変により、卵巣毒性を検出できる可能性について、毒性関連の文献調査によって検索した。
- 2) 反復投与毒性試験による卵巣毒性検出の検証試験：この文献調査の結果に基づき、毒性発現機序ごとに卵巣毒性物質を選択し、2および4週間反復投与毒性試験によって卵巣毒性を検出可能かを検証する。

B. 研究方法

- 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については、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を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。
- 2) 反復投与毒性試験による卵巣毒性検出の検証試験：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。

C. 研究結果

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 (Figure 1)、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。

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 (Table 1)。

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 (Figure 1)。

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場合が多かった。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、卵巣毒性を容易且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Figure 2に記載したように簡便で、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。Table 2に病理標本作製のポイントを、Table 3に病理組織学的検査のポイントを列記した。

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。

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。WGの概念図をFigure 3に示す。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。それぞれの試験の計画の概略をFigures, 4および5に示す。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。

D. 考 察

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

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

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。

E. 結論

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と思われた。

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（卵巣毒性検出の感受性について受胎能試験との比較）を開始した。試験は実施中である。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Saarinen, M.N., Katsuda, S., Makela, S., Maekawa, A., Santti, R., Yoshida, M. (2007). Chemopreventive effects of a plant lignan 7-hydroxymatairesinol on mammary and uterine cancer development in rat models. In Cancer: Disease Progression and Chemoprevention. (Ed. T. Tanaka). Research Signpost, India. In press.

2. 学会発表

1. 吉田 緑 雌受胎能評価に必要な安全性試験について 日本薬学会第127回年会 一般シンポジウム 平成19年3月30日富山県民会館
2. 吉田 緑 M3ガイドラインの見直し:妊娠可能な女性の治験への参加に必要な非臨床試験 安全性評価研究会2007年春のセミナー 平成19年5月19日武田薬品工業株式会社 大阪工場・体育館ホール
3. 吉田 緑 卵巣の定量評価 第13回生殖・発生毒理学東京セミナー 平成19年10月5日 国立オリンピック記念青少年総合センター

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

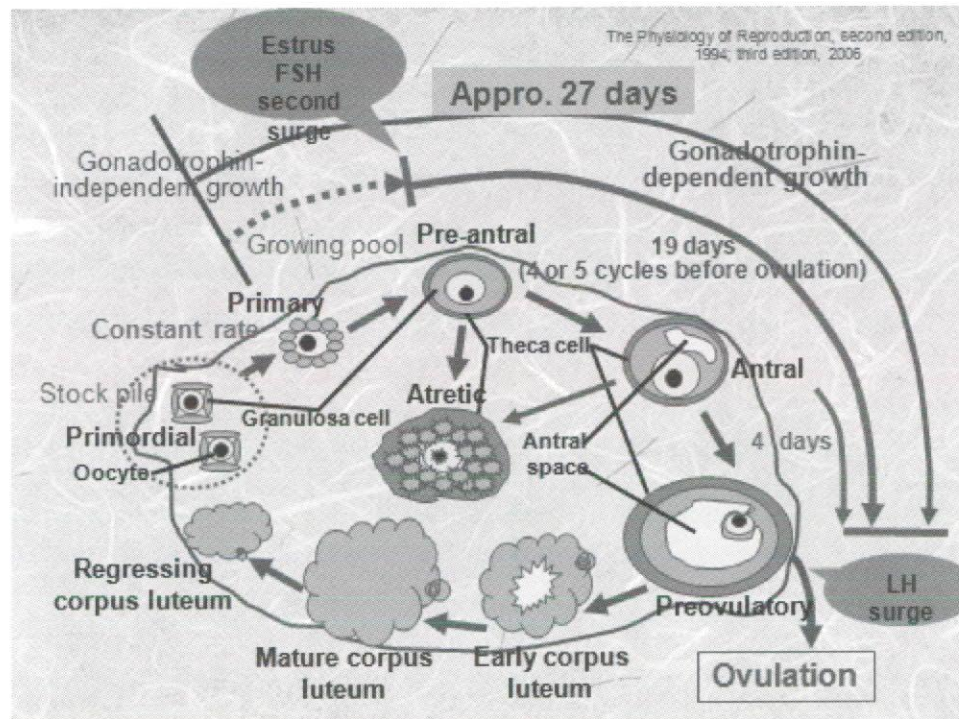


Figure 1 卵胞の発育

Table 1

毒性発現機序	
1. ホルモン作用・抗ホルモン作用物質	エストロゲン・抗エストロゲン作用物質、プロゲステロン、ゴナドトロピン、プロラクチン、SERMs
2. 卵胞への直接障害	放射線、cyclophosphamide、4-vinylchlorohexene(VCH)、2-bromopropane、1,3-butadiene、9:10-dimethyl-1:2-benzanthracene(DMBA)、COX-2inhibitors(inhibition of ovulation)
3. ホルモン合成および代謝に関与する酵素の阻害	di-(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP)、代謝物mono-(2-ethylhexyl)phthalate (MEHP)、ethylene glycol monomethyl ether (EGME)、PPAR
4. 脳の神経内分泌過程の変調による性腺刺激ホルモンに影響を与えた結果、生殖器系を障害	phenothiazine、reserpine、chlorpromazine、MAO阻害薬、モルヒネ、ハロペリドール、bromocriptine、atrazine
5. 非特異的な要因	ストレスに起因する体重減少・ストレスによると診断する場合は慎重な評価が必要)

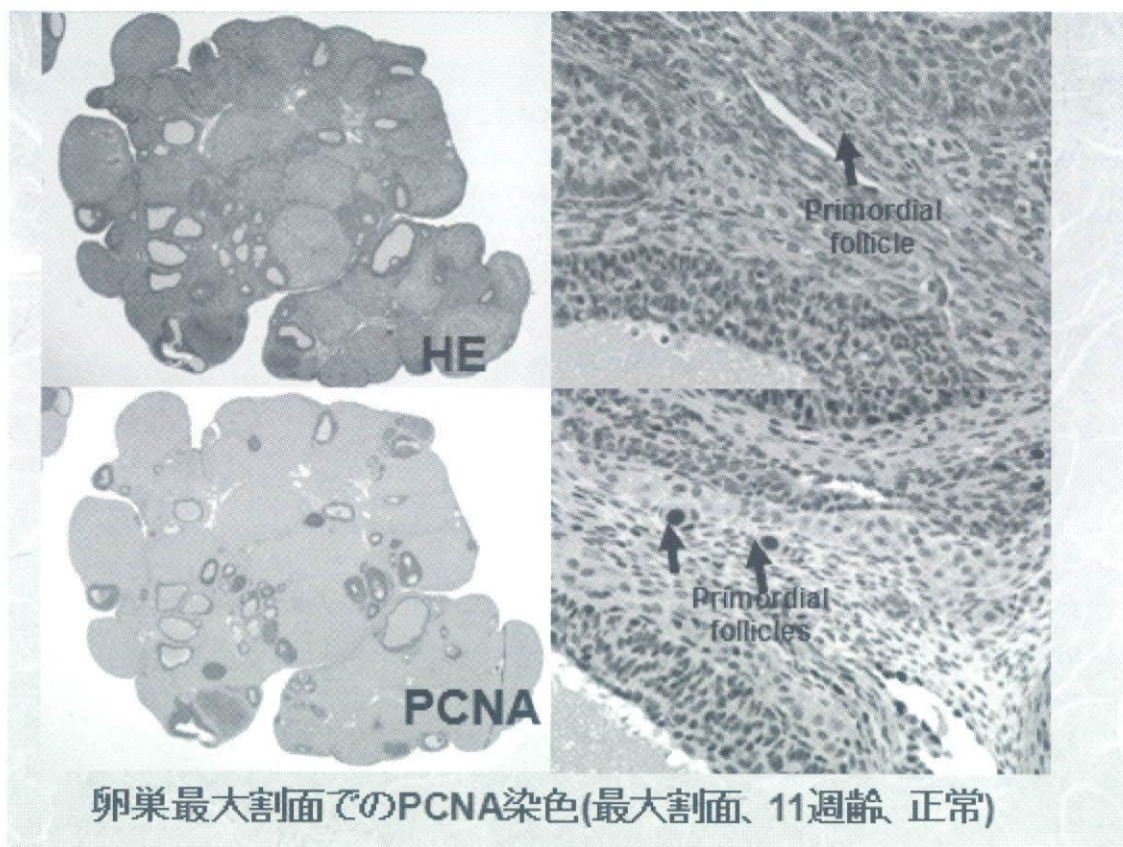


Figure 2

Table 2

卵巣の病理組織学的検査方法(案)

- 切り出し: 卵巣の最大面ができるように二分割し、左右併せて4箇所を鏡検
- 固 定: 10%中性緩衝ホルマリン固定
- 薄 切: 4 μ 連続切片作製は実施しない
- 染 色:
 1. H-E
 2. PCNA染色 (Muskhelishvili L et al., 2005)
pH.6.0 0.01Mクエン酸緩衝液で15分MW
抗体希釈倍率 800倍
DAB発色

Table 3

● 組織標本の観察方法 観察ポイント

1. 性周期の有無・卵巣重量異常の有無の確認
2. 卵巣・子宮・膣の形態と性周期が一致するか確認
3. 各時期の卵胞の存在確認と状態観察
 - Small follicles
(primordial and primary follicles, Pedersen stages 1-3b)
 - Growing follicles
(secondary to large preantral follicles, Pedersen stages 4-5b)
 - Antral follicles (Pedersen stages 6, 7)
 - Preovulatory follicles (Pedersen stage 8)
 - Atresia
4. 黄体の存在確認と状態観察
5. 間質の状態観察
6. 関連臓器の変化の有無

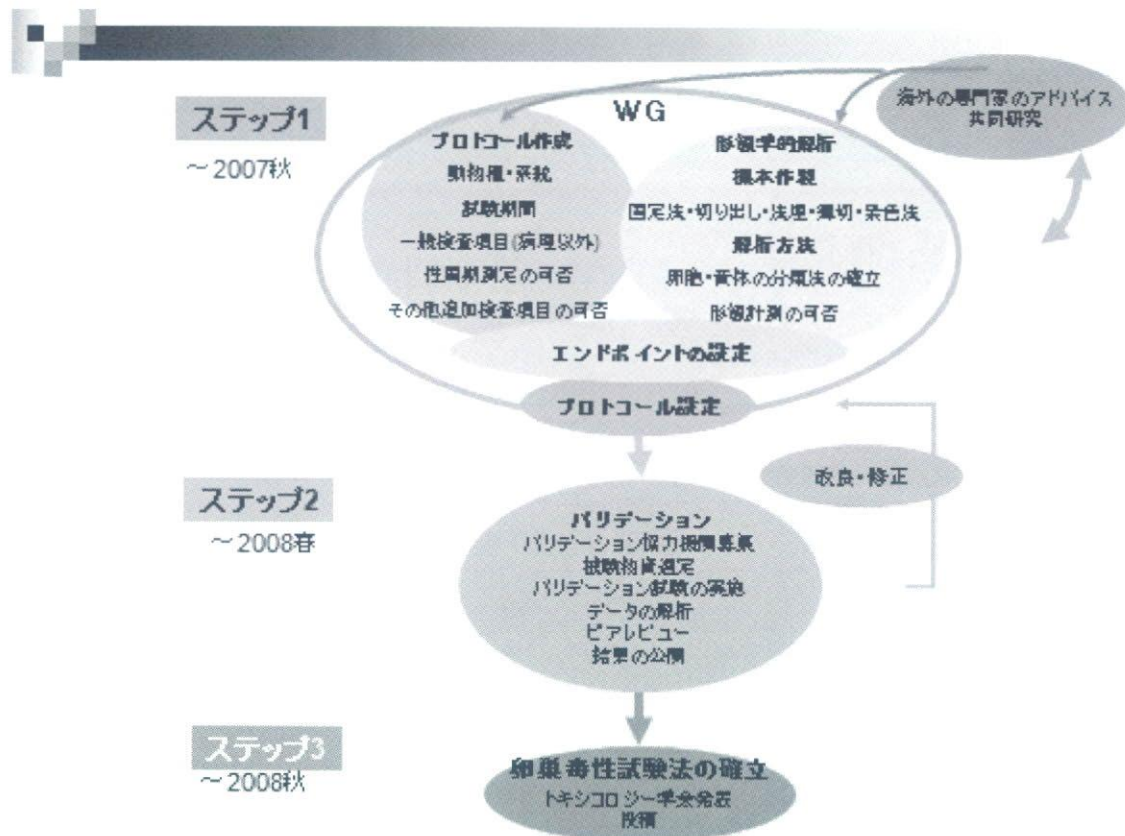


Figure 3 卵巢毒性検出WG

Table 4 試験計画書の概要(一般毒性試験)

卵巣毒性検出のための試験(一般毒性試験)

- 投与期間：2または4週間
- 動物系統：SD、Fischer、Wistar(各施設で通常使われている系統)
- 週令：6~8週令(各施設で通常使われている週令)
- 数：雌10例/群
- 被験物質：XXXX
- 投与用量：0、低、中、高 mg/kg (3用量が適当か、毒性がある程度発現する用量と無毒性量を含める)
- 観察項目：一般状態、体重、摂餌量
- 解剖：卵巣(切り出し、固定、標本作製、鏡顕方法は別途詳細に記載)
主要器官(肝臓、腎臓、下垂体、子宮、膈、副腎、その他)、重量(生化学的検査、ホルモン測定)
(遺伝子解析)

Table 5 試験計画書の概要(受胎能試験)

卵巣毒性検出のための試験(受胎能試験)

- 投与期間：交配前2週間、交尾後7日まで(交配期間2週間)
- 動物系統：SD(各施設で通常使われている系統)
- 週令：10~12週令(各施設で通常使われている週令)
- 数：雌10例/群(交配用の雄)
- 被験物質：XXXX
- 投与用量：0、低、中、高 mg/kg (3用量が適当か、毒性がある程度発現する用量と無毒性量を含める)
- 観察項目：一般状態、体重、摂餌量、性周期(投与開始から交尾まで)
- 解剖：妊娠14日、黄体数、着床数、生存胚数、死亡胚数
卵巣(固定のみ)

卵巣毒性検出のための試験

タイムライン

- 2007年 8月末 :試験内容の確認
- 9月末 :参加募集通知の配布
- 10月初 :参加企業への説明会
- 卵巣病理組織検査講習会
- 11月 :各施設での試験開始
- 2008年 4月 :各施設からの試験結果の提出、投稿準備
- 5月 :試験結果の集約
- 9月 :投稿原稿集約、提出
- 10月 :結果発表会
- 2009年 3月 :SOT

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

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 —

分担研究者：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）
大野 泰雄（国立医薬品食品衛生研究所・副所長）
小島 肇（国立医薬品食品衛生研究所・薬理部新規試験法評価室長）
小野寺博志（医薬品医療機器総合機構）
研究協力者：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。

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、レギュラトリー・サイエンス

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。

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会合に向けての班会議を開催し意見を交換した。

C. 研究結果

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 μ 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 μ 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。