

で陽性を示すものであった。これらには短鎖の脂肪族ニトロソアミン；二価金属；アルデヒド（例えばホルムアルデヒド、クロトンアルデヒド）；アゾ色素（例えばバタージェロー）；ピロリジジナルカロイド；アリル化合物（イソチオシアン酸アリル、塩化アリル）、およびニトロ（例えば芳香族、脂肪族）化合物が相当する。

8. *In vitro*のほ乳類培養細胞試験における最大濃度を1 mMとする理論的根拠は以下とおりである。試験の標準組合せはAmes試験と*in vivo*試験が含まれている。組合せ全体で考えると、ほ乳類培養細胞試験において遺伝毒性発がん物質と考えられるすべての化学物質を検出する必要はない。Ames試験あるいは*in vivo*遺伝毒性試験では検出されないが、*in vitro*のほ乳類試験の1 mM以上でのみ検出されるような化学物質（DNAを損傷する発がん物質）が存在する可能性は低い。更に、上限の1 mMは、既知医薬品の組織中の濃度を含めた臨床曝露より高く（Goodman& Gilman, 2001）、また、*in vivo*の非臨床試験で一般的に達する量より高い（PhRMA/EFPIA/JPMAの調査）ことから、ハザード同定の色合いが強い。ヌクレオシド類縁体およびいくつかの抗生物質のように、ある種の薬物は極めて高い臨床曝露を必要とすることが知られている。既存薬物との強さの比較はスポンサーの興味のあるところであり、1 mMの上限以上での評価が必要であったとしても、ヒトの安全性を最終的に決定するのは*in vivo*試験である。
9. ある種の遺伝毒性発がん物質は、ある程度の細胞毒性を引き起こす濃度で試験しない限り、*in vitro*遺伝毒性試験で検出されないが、DNA損傷物質は一般に中等度の毒性レベルで検出可能である（例えば染色体異常試験のサンプリング時で30%増殖抑制、Greenwoodら、2004）。細胞毒性が強くなるにしたがって、化学物質あるいはその代謝物による直接的なDNA損傷以外の作用により、遺伝毒性ではなく細胞毒性に関連した「陽性」結果をもたらすことがある。このような非DNA部位を損傷することによって、二次的におこる間接的DNA損傷の誘発は、ある閾値濃度以上で引き起こされることが多い。このような現象が薬理的に意味のあるような低濃度で引き起こされるとは考えられない。

染色体異常誘発作用の弱い既知発がん物質であっても、細胞遺伝毒性学的試験においては、50%より低い細胞増殖抑制濃度で陽性結果を示す（Armstrongら、1992）。一方、DNA損傷、変異原性あるいはがん原性を有しない化学物質でも、細胞毒性が認められるような濃度で染色体切断を誘発することがある（Hilliardら、1998）。*In vitro*細胞遺伝学的試験（染色体異常試験および小核試験）において、約50%の増殖抑制を上限とすることは適切である。

株細胞を用いた細胞遺伝学的試験では、時間経過における細胞集団増殖の測定値が（培養中の細胞数の変化を対照と比較して測定する、例えば細胞集団倍加（PD；注10）と呼ばれる方法）細胞毒性の尺度として有用であることが示されている。また、単純な細胞数は毒性を過小評価するおそれのあることが知られている。リンパ球の培養では、約50%を超えない分裂抑制で十分と考えられる。このためには、中期分裂像の異常を見る試験の場合は分裂指数（MI）を、*in vitro*小核試験では細胞分裂阻止に基づく指標を用いることができる。さらに*in vitro*小核試験については、小核は細胞分裂に続く間期で計数されることから、細胞周期全体が回っているのを確認することが重要である。このためには、細胞の分裂を抑制が核の分裂には影響を与えないサイトカラシンBの使用が考えられ、二核細胞における小核を計数すればよいことになる（リンパ球を用いる場合に推奨される）。株化細胞では、上に記した時間経過による細胞集団倍化（PD）など、細胞増殖を他の方法で証明することもできる（Kirsch-Voldersら、2003）。

マウスリンフォーマ試験（MLA）にはソフトアガー法およびマイクロウェル法があるが、ともに最高濃度を相対増殖率（RTG）20%に近い濃度に制限することで適切な感受性が得られる（IWGT）。Mooreら（2006）の基準を用いた公表データを再調査すると、RTGが20%未満の濃度でのみMLA結果が陽性であったげっ歯類発がん物質は極めて少数であり、この範疇の化学物質については遺伝毒性発がん物質で

ある信頼に足る証拠がない。20%以下のRTGでのみ突然変異の増加がみられる場合には結果の解釈を慎重に行う必要があり、特にRTGが10%以下の濃度のみで突然変異の誘発が認められる場合、その結果のみをもって陽性とは判断できないことが合意された (Mooreら、2006)。

結論として、増殖/生存の減少が、細胞遺伝学的試験では50%、MLAでは80%に達するかそれ以上で得られた陽性結果の解釈には注意が必要である。このような細胞毒性/コロニー形成率レベルで処理された細胞での評価は、感受性を高めると共に、不適切な陽性結果をもたらすリスクを増加させることが知られている。遺伝毒性試験の組合せは、強い細胞毒性発現用量を用いた単一の*in vitro*ほ乳類細胞試験に頼らなくても、適切な感受性を保証できるように考えられている。

適切な毒性の範囲を得るため、広い範囲の濃度を用いた用量設定のための予備試験は有用であるが、遺伝毒性試験ではしばしば極めて狭い間隔 (公比2以下) で数段階の濃度を用いることが必須になる。追加の濃度での試験が有用となる場合があるが、すべての処置濃度群を観察する必要はない。正確な50%の増殖抑制あるいは80%のRTG抑制を示す濃度で試験するために、何度も試験を繰り返すことを意図するものではない。

10. *In vitro*の細胞遺伝学的試験において、細胞毒性を評価するため、細胞数を用いると細胞毒性を過小に見積もることがあるため細胞毒性評価には相対細胞増殖率が適している (Greenwoodら、2004)。50%増殖抑制レベルを算定するために細胞集団倍加を用いると、DNA損傷物質は確実に陽性となる一方で、変異原性あるいは発がん性を有さない物質の陽性頻度が減少することが示されている。
11. 骨髄の分裂中期細胞が使用されるのと同様に、被験物質を1回以上投与された試験動物から採取して培養したリンパ球の分裂中期における染色体異常を調べることが有用である場合がある。ある種のリンパ球の寿命は長いため、原理的に修復されないDNA損傷の蓄積が起こる可能性があり、これらの細胞が*in vitro*で分裂を誘導されたときに染色体異常を増加させる可能性がある。*In vivo*のリンパ球試験は染色体異常誘発性の追加試験として有用となるかも知れないが、一般には、造血細胞の小核試験に加え、肝臓のようなその他の組織を用いた小核試験からの方が、より多くの情報が得られる。すなわち薬物および代謝物の曝露が造血細胞よりもしばしば肝臓で高いためである。
12. 単回投与マウス骨髄小核試験における既知染色体異常誘発物質の活性を詳細に検討すると、一般的に雌よりも雄が小核の誘発に対して鋭敏なことが示されている。雌雄で小核試験における量的な差が認められているが、質的な差は認められていない。明確に量的な差がある場合には雌雄間に毒性の差があるのが通常である。したがって、単回投与の*in vivo*小核試験では雄のみを使用することで問題ないであろう。
13. 毒性試験において、曝露の測定などの目的で追加の血液サンプリングが計画されている場合には注意を要する。そうした放血が小核試験結果を混乱させることがある。すなわち、放血により刺激された赤血球新生が小核を有する赤血球を増加させることがある。
14. メチルセルロース水溶液に代表されるような水溶性溶媒では通常問題ないが、Tween 80のような溶媒では投与可能な容量は単回投与の30分の1程度である。
15. 小核 (およびその他の細胞遺伝学的) 試験における陽性対照の目的は、標本観察者が小核の増加を間違いなく検出できることの証明である。これには、少数の陽性対照動物 (片性で可) を用いる定期的な試験から採取したサンプルを使用すればよい。マニュアル計測では、このようなスライドを各試験で観察するコード化スライドに加えたり、あるいは標本観察者が陽性反応識別能力を有していることを定期的に証明するために用いることも可能である。陽性対照のスライドは、その染色特性や小核頻度によって標本観察者に容易に識別されてはならない。自動計測では、各試験で適切な品質保証対照サンプルを使用する。

他の*in vivo*遺伝毒性試験における陽性対照の目的は、選択した動物種、組織およびプロトコールによる試験がDNA損傷/変異原性の増加を間違いなく検出できることの証明である。試験施設が、複数回の独立した試験において適切な陽性対照物質を常に検出可能なことを証明すれば、そのプロトコールを用いる試験では、試験ごとに陽性対照をおく必要はないが、定期的に陽性対照を試験するのが望ましい。

16. 標準的誘導S-9 mixはヒトS-9よりも高い活性化能を有し、特定の補因子が供給されない限り第2相の解毒能を欠いている。また、*in vitro*では高濃度の試験物質の場合、非特異的な活性化が生ずる可能性がある(Kirklandら、2007)。ヒトS-9あるいは他のヒトに関連した代謝活性化系を用いた遺伝毒性試験は有用である。前臨床試験の動物種、(非誘導のマイクロゾームまたは肝細胞、あるいは*in vivo*)、あるいはヒト試料における既知の代謝物プロファイルとの比較のために、遺伝毒性試験材料を用いた代謝物プロファイルの解析も結果の妥当性検証に役立つ(Kuら、2007)。追加試験では通常、肝臓を用いた*in vivo*試験に焦点を当てる。S-9存在下の*in vitro*試験で陽性結果を示す化学物質が*in vivo*では遺伝毒性を誘発しない可能性があり、それは、代謝物が生成されないか、生成されても極めて少量か、あるいは代謝的に解毒されるかまたは速やかに排泄されるためであり、この場合*in vivo*ではリスクがないことを示唆している。
17. 小核の増加は、遺伝毒性物質を投与しなくても赤血球生成障害(再生性貧血; 髄外造血など)、ストレス、低体温および高体温により生ずる(Tweatsらによる総説、2007, IWGT)。血液中には、脾臓の機能変化が血液からの小核含有赤血球細胞の除去に影響を及ぼし、循環する小核含有赤血球の増加をきたすと考えられる。
18. 小核の誘発が主に染色体損失によるものかあるいは染色体切断によるものかを決定するには、動原体の存在を確認するために、*in vitro*あるいは*in vivo*での小核染色を実施する。例えば、動原体部位のDNA塩基配列プローブを用いる*in situ*蛍光ハイブリダイゼーション(FISH)、あるいはキネトコア蛋白への標識抗体を使用する。誘発された小核の大部分が動原体陽性であれば、染色体損失が示唆される(コルヒチンおよびビンブラスチンのような強力なチューブリン阻害物質でも100%のキネトコア陽性小核を生ずることはなく、大体70~80%程度であるが、リスク評価ではまず異数性誘発物質として認められている)。代替法として、分裂中期の構造異常を調べる*in vitro*あるいは*in vivo*試験を実施する; 陰性であれば、小核の誘発は染色体損失に関連したものと推察する。

7. 用語の解説

アルカリ溶出法 (*Alkaline elution assay*): DNA鎖切断試験を参照。

異数性 (*Aneuploidy*): 細胞あるいは生物種に固有な染色体基本数からずれていること。

塩基対置換 (*Base substitution*): 塩基配列において1つ以上の塩基が他の塩基と置き換わっていること。これにより元のとは異なる蛋白質が合成される可能性がある。

細胞増殖 (*Cell proliferation*): 細胞分裂して娘細胞をつくる能力。

動原体/キネトコア (*Centromere/kinetochore*): 娘染色分体の連合および娘染色体の極への移動と娘核の封入を確実にする紡錘糸の付着に重要な染色体の構造。

染色体異常誘発物質 (*Clastogen*): 染色体の構造的切断を引き起こす物質で、通常光学顕微鏡で検出可能。

コロニー形成率 (*Cloning efficiency*): 1個の細胞がクローンを形成する割合。通常少量の細胞を適切な培養条件下で播種した後に測定する。

コメット法 (*Comet assay*): DNA鎖切断試験を参照。

培養飽和密度 (*Culture confluency*): 目視検査による培養における細胞密度の飽和状態。

細胞遺伝学的評価 (*Cytogenetic evaluation*): 有糸分裂および減数分裂における染色体構造の光学顕微鏡に

よる解析、あるいは小核の解析。

DNA付加体 (DNA adduct) : 化学物質とDNAが共有結合した生成物。

DNA修復 (DNA repair) : DNA損傷後の本来のDNA配列への再構成。

DNA鎖切断 (DNA strand breaks) : DNAの単鎖あるいは二本鎖切断。

DNA鎖切断試験 (DNA strand break assay) : アルカリ処理は、特定の型のDNA損傷をアルカリ溶出手技によって検出できる一本鎖切断に転換させる。これは、フィルターを通して、あるいは単細胞ゲル電気泳動法または顕微鏡スライド上で単層ゲルに包埋された細胞を電流に当てるコメット法で移動率を測定する。その結果、DNAの短い断片が核から「彗星の尾」に移動する。染色した細胞について広範囲のDNA移入を顕微鏡下で肉眼的に計測する。

フレームシフト突然変異 (Frameshift mutation) : 遺伝子の塩基配列に1個または2個の塩基が付加 (挿入) または欠失した突然変異 (遺伝コードの変化)。これにより、元のとは異なる、あるいは短い蛋白質が合成される可能性がある。

遺伝子突然変異 (Gene mutation) : 単一の遺伝子またはその調節遺伝子の配列内に生じた恒久的な変化。変化としては点突然変異、挿入、欠失などがある。

遺伝的指標 (Genetic endpoint) : 対象とする遺伝的变化の型またはそのクラス (例えば、遺伝子突然変異、染色体異常、DNA鎖切断、DNA修復、DNA付加体の生成など)

遺伝毒性 (Genotoxicity) : 誘発のメカニズムに関係なく、遺伝物質に生じた有害な変化の総称。

小核 (Micronucleus) : 細胞質中の核DNAの粒子 ; 染色体全体あるいは染色体断片を含んでいる。

分裂指数 (Mitotic index) : 染色体標本 (スライド) において、細胞分裂していない (間期) 細胞を含む全細胞中に占める各段階の分裂細胞の割合

プラスミド (Plasmid) : バクテリアの通常の遺伝子とは別の微小遺伝子。プラスミドは宿主の遺伝子に挿入されるか、染色体外の微小遺伝子として存在する。

染色体の数的変化 (Numerical chromosome changes) : 固有の一倍体あるいは二倍体の染色体数から染色体の数が変化していること ; 株細胞では、染色体数のモード値から外れていること。

点突然変異 (Point mutations) : 遺伝コードの変化のことで、通常は単一のDNA塩基対に限定される。

多染色赤血球 (Polychromatic erythrocyte) : 細胞分化の途中にあるリボゾームをもつ未成熟な赤血球で、成熟した正染色性赤血球 (リボゾームを欠く) とはRNAの特異染色により容易に判別ができる。

細胞集団倍化あるいは培養増殖 (Population doubling or culture growth) : これはいくつかの方法で算出される ; 適切な計算式の1例を示す : 集団倍化 = 処理開始時の細胞数 (初期値) (X_0) に対する最終時の細胞数の割合 (N) の対数を2の対数で割った値。 $PD = [\log (N \div X_0)] \div \log 2$

倍数性 (Polyploidy) : 染色体のモード値の数的な異常、半数体数のおよその倍数。核内倍加は、分裂中期に染色体の対が「二重染色体」として結合している倍数性の形態学的な形である。

組換え (Recombination) : DNA切断とそれに続く均衡あるいは不均衡な再結合

RTG (相対総増殖率) (RTG (relative total growth)) : この細胞毒性の測定は、相対浮遊細胞増殖率 (処理開始から処理後2日目までの細胞損失および細胞増殖に基づく) を求め、それに、変異体の定量のクローニング時の相対コロニー形成率を掛ける。

単細胞ゲル電気泳動法 (Single Cell Gel Electrophoresis assay) : コメット法。DNA切断試験を参照

生存 (率) (変異原性試験における) (Survival (in the context of mutagenicity testing)) : 死細胞を含む全細胞に占める生存細胞の割合で、通常ある期間薬物処理した後に染色し、コロニー数を測定することにより判定する。

導入遺伝子 (*Transgene*) : 体細胞や生殖株細胞の宿主遺伝子に組み込まれた外来の遺伝子。

不定期DNA合成試験 (UDS) (*Unscheduled DNA synthesis (UDS)*) : DNA損傷によって誘発されるS期以外のDNA合成。通常DNA除去修復と関連している。

8. REFERENCES

- Ashby, J., D. Paton, "The influence of chemical structure on the extent and sites of carcinogenesis for 522 rodent carcinogens and 55 different human carcinogen exposures," *Mutation Research* 286:3-74, 1994.
- Corvi, R., S. Albertini, T. Hartung, S. Hoffmann, D. Maurici, S. Pfuhler, J. van Benthem, P. Vanparys, "ECVAM Retrospective Validation of the *in vitro* micronucleus test (MNT)", *Mutagenesis*, submitted 2007.
- Gatehouse, D., S. Haworth, T. Cebula, E. Gocke, L. Kier, T. Matsushima, C. Melcion, T. Nohmi, T. Ohta, S. Venitt, E. Zeiger, "Report from the working group on bacterial mutation assays: International Workshop on Standardisation of Genotoxicity Test Procedures," *Mutation Research* 312: 217-233, 1994
- Goodman & Gilman "The Pharmacological Basis of Therapeutics". J. G. Hardman, L. E. Limbird, A. G. Gilman (Eds.), McGraw-Hill Professional, New York; 10th edition (August 13, 2001).
- Greenwood, S.K., R.B. Hill, J.T. Sun, M.J. Armstrong, T.E. Johnson, J.P. Gara, S.M. Galloway, "Population Doubling: A simple and more accurate estimation of cell growth suppression in the *in vitro* assay for chromosomal aberrations that reduces irrelevant positive results," *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 43:36-44, 2004.
- Hamada S., S. Sutou, T. Morita, A. Wakata, S. Asanami, S. Hosoya, et al., "Evaluation of the rodent micronucleus assay by a 28-day treatment protocol: summary of the 13th collaborative study by the collaborative study group for the micronucleus test (CSGMT)/Environmental Mutagen Society of Japan (JEMS)-Mammalian Mutagenicity Study Group (MMS)," *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 37:93-110, 2001.
- Hartmann A., E. Agurell, C. Beevers, S. Brendler-Schwaab, B. Burlinson, P. Clay, A. Collins, A. Smith, G. Speit, V. Thybaud, R.R. Tice, "Recommendations for conducting the *in vivo* alkaline Comet assay", *Mutagenesis* 18:45-51, 2003.
- Hayashi, M., J.T. MacGregor, D.G. Gatehouse, I. Adler, D.H. Blakey, S.D. Dertinger, G. Krishna, T. Morita, A. Russo, S. Sutou, "In vivo Rodent Erythrocyte Micronucleus Assay. II. Some Aspects of Protocol Design Including Repeated Treatments, Integration With Toxicity Testing, and Automated Scoring," *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 35:234-252, 2000.
- Hayashi, M., J.T. MacGregor, D.G. Gatehouse, D.H. Blakey, S.D. Dertinger, L. Abramsson-Zetterberg, G. Krishna, T. Morita, A. Russo, N. Asano, H. Suzuki, W. Ohyama, D. Gibson, "In vivo erythrocyte micronucleus assay. III. Validation and regulatory acceptance of automated scoring and the use of rat peripheral blood reticulocytes, with discussion of non-hematopoietic target cells and a single dose-level limit test," *Mutation Research*, 627:10-30, 2007.

Heddle, J.A., S. Dean, T. Nohmi, M. Boerrigter, D. Casciano, G.R. Douglas, B.W. Glickman, N.J. Gorelick, J.C. Mirsalis, H-J Martus, T.R. Skopek, V. Thybaud, K.R. Tindall, N. Yajima, "In vivo transgenic mutation assays", *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 35:253-259, 2000.

Kasper, P., Y. Uno, R. Mauthe, N. Asano, G. Douglas, E. Matthews, M. Moore, L. Müller, M. Nakajima, T. Singer, G. Speit, "Follow-up testing of rodent carcinogens not positive in the standard genotoxicity testing battery: IWGT workgroup report," *Mutation Research*, 627:106-116, 2007.

Kenelly, J.C., R. Waters, J. Ashby, P.A. Lefevre, B. Burlinson, D.J. Benford, S.W. Dean, I deG. Mitchell, "In vivo rat liver UDS assay. In: Supplementary Mutagenicity Tests, UKEMS Recommended Procedures, ed Kirkland D.J. and Fox M., Cambridge University Press, pp 52-77, 1993

Kirkland, D.J., S. Pfuhrer, D. Tweats, M. Aardema, R. Corvi, F. Darroudi, A. Elhajouji, H. Glatt, P. Hastwell, M. Hayashi, P. Kasper, S. Kirchner, A. Lynch, D. Marzin, D. Maurici, J-R. Meunier, L. Müller, G. Nohynek, J. Parry, E. Parry, V. Thybaud, R. Tice, J. van Benthem, P. Vanparys, P. White, "How to reduce false positive results when undertaking in vitro genotoxicity testing and thus avoid unnecessary follow-up animal tests: Report of the ECVAM workshop," *Mutation Research*, 628:31-55, 2007.

Kirsch-Volders, M., T. Sofuni, M. Aardema, S. Albertini, D. Eastmond, M. Fenech, M. Ishidate, S. Kirchner, E. Lorge, T. Morita, H. Norppa, J. Surralles, A. Vanhauwaert, A. Wakata, "Report from the in vitro micronucleus assay working group", *Mutation Research*, 540:153-163, 2003.

Kissling, GE., S.D. Dertinger, M. Hayashi, J.T. MacGregor., "Sensitivity of the erythrocyte micronucleus assay: Dependence on number of cells scored and inter-animal variability", *Mutation Research* 634:235-240, 2007.

Ku, W.W., A. Bigger, G. Brambilla, H. Glatt, E. Gocke, P.J. Guzzie, A. Hakura, M. Honma, H-J. Martus, R.S. Obach, S. Roberts, "Strategy for genotoxicity testing-Metabolic considerations," *Mutation Research*, 627:59-77, 2007.

MacGregor J.T., M.E. Bishop, J.P. McNamee, M. Hayashi, N. Asano, A. Wakata, M. Makajima, J. Saito, A. Aidoo, M.M. Moore, S.D. Dertinger, "Flow Cytometric analysis of micronuclei in peripheral blood reticulocytes: II. An efficient method of monitoring chromosomal damage in the rat", *Toxicological Sciences*, 94:92-107, 2006.

Moore, M. M., M. Honma, J. Clements, G. Bolesfoldi, B. Burlinson, M. Cifone, J. Clarke, R. Delongchamp, R. Durward, M. Fellows, B. Gollapudi, S. Hou, P. Jenkinson, M. Lloyd, J. Majeska, B. Myhr, M. O'Donovan, T. Omori, C. Riach, R. San, L. F. Stankowski, Jr., A. K. Thakur, F. Van Goethem, S. Wakuri, I. Yoshimura, "Mouse Lymphoma Thymidine Kinase Gene Mutation Assay: Follow-up Meeting of the International Workshop on Genotoxicity Testing—Aberdeen, Scotland, 2003—Assay Acceptance Criteria, Positive Controls, and Data Evaluation," *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 47:1-5, 2006.

Müller, L, P. Kasper, "Human biological relevance and the use of threshold arguments in regulatory genotoxicity

assessment: Experience with pharmaceuticals." *Mutation Research*, 464: 9-34, 2000.

OECD Guidelines for Genetic Toxicology (1997)

Scott, D., S.M. Galloway, R.R. Marshall, M. Ishidate Jr., D. Brusick, J. Ashby, B.C. Myhr, "Genotoxicity under extreme culture conditions. A report from ICPEMC Task Group 9", *Mutation Research*, 257:147-204, 1991.

Storer, R.D., T.W. McKelvey, A.R. Kraynak, M.C. Elia, J.E. Barnum, L.S. Harmon, W.W. Nichols, J.G. DeLuca, "Revalidation of the *in vitro* alkaline elution/rat hepatocyte assay for DNA damage: improved criteria for assessment of cytotoxicity and genotoxicity and results for 81 compounds," *Mutation Research*, 368:59-101, 1996.

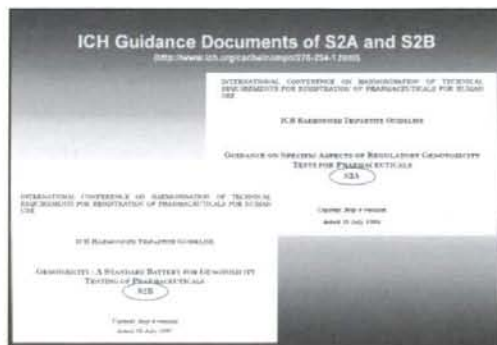
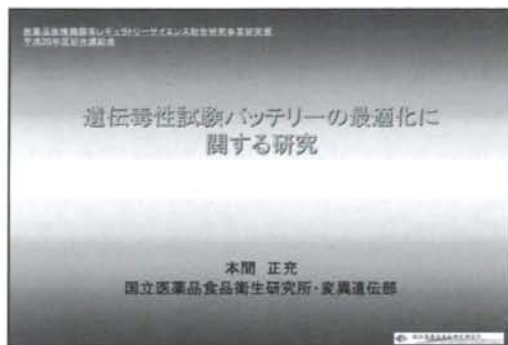
Suzuki, H., N. Ikeda, K. Kobayashi, Y. Terashima, Y. Shimada, T. Suzuki, T. Hagiwara, S.Hatakeyama, K.Nagaoka, J. Yoshida, Y. Saito, J. Tanaka, M. Hayashi, "Evaluation of liver and peripheral blood micronucleus assays with 9 chemicals using young rats A study by the Collaborative Study Group for the Micronucleus Test (CSGMT)/Japanese Environmental Mutagen Society (JEMS) - Mammalian Mutagenicity Study Group (MMS)," *Mutation Research*, 583: 133-145, 2005

Thybaud, V., M. Aardema, J. Clements, K. Dearfield, S. Galloway, M. Hayashi, D. Jacobson-Kram, D. Kirkland, J. T. MacGregor, D. Marzin, W. Ohyama, M. Schuler, H. Suzuki, E. Zeiger, "Strategy for genotoxicity testing: Hazard identification and risk assessment in relation to *in vitro* testing," *Mutation Research*, 627:41-58, 2007.

Tweats, D. J., D. Blakey, R. H. Heflich, A. Jacobs, S. D. Jacobsen, T. Morita, T. Nohmi, M. R. O'Donovan, Y. F. Sasaki, T. Sofuni, R. Tice, "Report of the IWGT working group on strategies and interpretation of regulatory *in vivo* tests. I. Increases in micronucleated bone marrow cells in rodents that do not indicate genotoxic hazards," *Mutation Research*, 627:78-91, 2007.

Tweats, D. J., D. Blakey, R. H. Heflich, A. Jacobs, S. D. Jacobsen, T. Morita, T. Nohmi, M. R. O'Donovan, Y. F. Sasaki, T. Sofuni, R. Tice, "Report of the IWGT working group on strategy/interpretation of regulatory *in vivo* tests. II. Identification of *in vivo*-only positive compounds in the bone marrow micronucleus test," *Mutation Research*, 627:92-105, 2007.

Wakata, A., Y. Miyamae, S. Sato, T. Suzuki, T. Morita, N. Asano, T. Awogi, K. Kondo, M. Hayashi, "Evaluation of the Rat Micronucleus Test with Bone Marrow and Peripheral Blood: Summary of the 9th Collaborative Study by CSGMT/JEMS · MMS," *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 32:84-100, 1998.



Standard Battery of Genotoxicity Tests in ICH (1997)

In Vitro; 2 Tests	<ul style="list-style-type: none"> ● Bacterial Reverse Mutation Assay ● Chromosome Aberration Test <p>or</p> <ul style="list-style-type: none"> ● Mouse Lymphoma Assay (MLA)
In Vivo; 1 test	<ul style="list-style-type: none"> ● Micronucleus Test

Choose one of two tests

Process of Revision of the S2 Guideline in ICH

June 2005 in Yokohama, Japan	The ICH Steering Committee (SC) agreed to initiate a revision of the genotoxicity guideline (Step 1).
October 2006 in Chicago, USA	The ICH Expert Working Group (EWG) discuss revision and plan the approach to a revised guideline.
May 2007 in Brussels, Belgium	The EWG reached a consensus of the revised issues and agree to make a draft guideline according to the consensus.
October 2007 in Yokohama, Japan	The EWG finalized the new guideline for Step2.
February 2008	Postal sign-off for Step2.
June 2008 in Portland, USA	The EWG worked for answering public comments and further discussed for Step 4.
November 2008 in Brussels, Belgium	Skip the EWG meeting, because data of the Comet collaborative study had not been collected.
May 2009 in Yokohama, Japan	The EWG will sign off for Step4.

Background Issues Initiating Revision of the Current Genotoxicity Guideline

- Strategies to address high frequency of positive results (up to 30%) in *in vitro* mammalian cell assays that may not be relevant to human risk
- Taking into consideration of 3R's for genotoxicity assays whenever possible "without impacting" the scientific value of the tests and the evaluation of the human risk.

3R's in animal experiments

- Replacement
- Reduction
- Refinement

Updates in S2(R1) (I)

General:

- Consolidation of S2A and S2B

Bacterial reverse mutation assay:

- Repeat not required for negative assay

Mammalian cell assays:

- Decreased top dose from 10 mM to 1 mM
- Reinforce cytotoxicity limits
 - 50% for chromosome aberrations and *in vitro* micronucleus test
 - 80-90% reduction in RTG for mouse lymphoma cell mutation assay
 - No longer requires testing of precipitating concentrations
- *In vitro* micronucleus test as alternative

For *in vivo* studies:

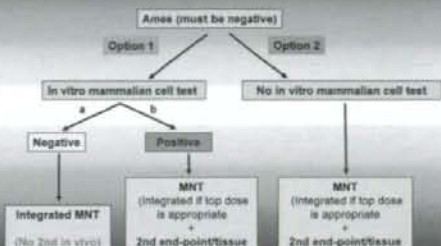
- Encourage integration into repeat dose toxicology studies
- Do not require concurrent positive controls

Updates in S2(R1) (II)

Two options considered equally acceptable

- Option 1:
 - Ames
 - *In vitro* mammalian cell assay
 - *In vivo* micronucleus test (integrated into repeat-dose toxicology study if possible)
- Option 2:
 - Ames
 - Genotoxicity measured *in vivo* in two different tissues, (integrated if possible)

Proposed New Recommended Test Battery



Criteria for Acceptable Dose/exposure in (sub)Chronic Study

- Maximum feasible dose (MFD) based on physico-chemical properties of the drug in the vehicle (provided the MFD in that vehicle is similar to that achievable with acute administration)
- Limit dose of 1000 mg/kg for studies of 14 days or longer, if it is tolerated.
- Exposure
 - a. Plateau/saturation in exposure
 - b. Accumulation

Benefits of Revisions: The 3 R's

- No longer require concurrent positive controls in every *in vivo* assay
- Integration of genotoxicity into toxicology assays
- Reduction in "non-relevant" *in vitro* results will reduce number of follow-up *in vivo* assays

ICH-M3: Timing for Clinical Development

GENOTOXICITY STUDIES RECOMMENDED TO SUPPORT

Prior to first human exposure, *in vitro* tests for the evaluation of mutations and chromosomal damage are generally needed. If an equivocal or positive finding occurs, additional testing should be performed (5).

The standard battery of tests for genotoxicity (6) should be completed prior to the initiation of Phase II studies.

Before phase I: **In vitro tests (Ames + CA or MLA)**
 Before phase II: **Every genotoxicity tests (in vitro & in vivo)**

This guideline should be changed, because option II is the only Ames test as recommended

Genotoxicity Studies in the Draft ICH Consensus Guideline of M3 (released at July 14, 2008)

GENOTOXICITY STUDIES

The genotoxicity studies recommended to support Exploratory Clinical Study approaches are discussed in Section 7.

An assay for gene mutation is generally considered sufficient to support all single dose clinical development trials.

In support of multiple dose clinical development trials, two batteries of tests, Option 1 and Option 2, are described in the ICH S2(R1) document (Ref. 8). Option 2, if selected, should be completed prior to first human use in multiple dose studies. The *in vitro* components of Option 1, if selected, should be completed prior to first multiple dose human studies. The *in vivo* component of Option 1 should be completed prior to Phase 2. If a positive finding occurs, an assessment, and then possibly additional testing (Ref. 6) should be conducted to determine if further administration to human is still appropriate.

Choice of In Vivo Assays: 2nd Endpoint / Tissue

- Options considered as acceptable
 - DNA strand break assays (Comet, alkaline elution)
 - transgenic animal mutation assays
 - UDS assay
- Liver typically preferred tissue, but choice should be based on factors such as
 - type of effect seen in vitro
 - any knowledge of the potential mechanism
 - of the exposed tissues thought to be relevant
- Encourage integration into repeat dose toxicology studies

Comet assay in liver into repeat dose toxicology studies is highly recommended in EWG.

Two in vivo tests vs. 3R policy -How to reduce the animal use?-

- Integration the genotoxicity tests into general toxicology study
- Combination the two in vivo genotoxicity tests in a single study

Collaborative Trial of Comet Assays

1. Possibility of integration of the Comet assay into 28 days repeat dose toxicology study
 - Collaborative studies are conducted in Japan, EU, and USA
 - Verify suitability of Comet assay for repeat-dose studies
 - Results in time for step 4 sign off (May 2009, Yokohama)
2. Possibility of combination of Comet assay and micronucleus tests in a single study
 - JaCVAM Initiative International validation study on Comet Assay in progress
 - Protocol (Administration: 3 times (0, 24, 45 hours), Cell preparation: 3 hours after 3rd administration)
 - Verify suitability of the protocol for both Comet and micronucleus test

Next Steps

- Revisions to guideline taking public comments into consideration
- Preparation of publication to support S2 revisions
- Collaborative trials on Comet assay
- Step 4 sign-off May, 2009, Yokohama

S2 EWG Members (in Portland)

Health Authorities

MHLW Makoto Hayashi (Chair), Ansys
Masamitsu Honma, NIRS
Mori Yoshitomi, PMDA

EU Peter Kasper, BfArM (D)
J. W. van der Laan, RIVM (NL)

FDA David Jacobson-Kram, FDA
Timothy McGovern, FDA

Industry

JPMA Akihiko Wakata, Astellas Pharma
Shigeki Sawada, Eisai Co

EPDIA Lutz Müller, F. Hoffmann-La Roche
Veronique Thybaud, Sanofi-aventis

PhRMA Jerry D. Frantz, BMS
Sheila M. Galloway, Merck



Observer

EFTA B.P. Schmid
Canada T. Matile



ーバイオ医薬品の新しい課題についての調査研究ー

研究分担者：平林 容子（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毒性部）
研究協力者：真木 一茂（（独）医薬品医療機器総合機構）
松本 峰男（（独）医薬品医療機器総合機構）
中澤 隆弘（日本イーライリリー株式会社 薬事部前臨床）
三分一 所 厚司（第一三共株式会社 安全性研究所）
渡部 一人（中外製薬㈱ 安全性研究部）

研究要旨

本研究は、日米EU医薬品規制調和国際会議（ICH）におけるバイオ医薬品の非臨床安全性試験方法に関するS6ガイドラインのカテゴリーベースでの明確化（clarified）と拡充（amplification）の必要性に対応したアップデートの手段としてのAddendumの形式による追補の策定を支援する目的で、国内の関係組織（独立行政法人医薬品医療機器総合機構[PMDA]および日本製薬工業協会[JPMA]）から研究協力者の参加を得て、関連情報の収集や解析を行い、合わせてICHの場での議論に資するための国内の意思統一も図るものである。S6ガイドラインは、1997年に日米EUで合意し、本邦においては2000年に交付された。合意後約10年が経過し、ガイドライン制定時には想定はされていたものの上市されていなかった新しい医薬（例えばヒト抗体医薬、ハイブリッド製品、ペプチドミックスなど）の登場や、生殖発生毒性、発がん性、前臨床・臨床試験のタイミングなど、現S6ガイドラインで触れないか、もしくはケース・バイ・ケースの対象とした従前に経験のない長期の使用、妊婦への適用の可能性、早急な上市のための試験スケジュールの可能な範囲での合理化などに対応するべく、2006年6月の横浜会議からアップデートの必要性の有無についての検討が開始され、2008年6月のポートランド会議において、日・米・EUの合意のもと、頭記Addendum策定にむけた専門家ワーキンググループ（S6（R1）EWG）が構成されることとなった。本研究グループは、このAddendum策定に対する支援を目的に構成され、まず、日本のポジショニングについて、製薬協ワーキンググループの作成による案文をもとに協議し、日本側の対応案をまとめ、この成果をもって、2008年11月のブラッセル会議でのS6（R1）EWGに参加した。S6（R1）EWGは2009年にstep 2に達することを目標とし、Addendumの原案を、2009年6月の横浜会議前までに作成する方針である。本研究グループは、これらの議論に参加し、ここから派生、もしくは関連する諸問題について検討を行い、一定の成果を得たものであり、次年度以降も、S6（R1）のAddendumの策定に向け粛々と研究を進める。

キーワード：バイオ医薬品、非臨床安全性試験、試験法ガイドライン、ICH S6（R1）

A. 研究目的

本研究は、日米EU医薬品規制調和国際会議 (ICH) におけるバイオ医薬品の非臨床安全性試験法に関するS6ガイドラインのカテゴリーベースでの明確化 (clarified) と拡充 (amplification) の必要性に対応したアップデートの手段としてのAddendumの形式による追補の策定を支援することを目的とし、国内の関係組織 (独立行政法人医薬品医療機器総合機構 [PMDA] 及び日本製薬工業協会 [JPMA]) から研究協力者の参加を得て、関連情報の収集/解析を行い、合わせてICHの場での議論に資するための国内の意思統一も図るものである。

2008年6月のポートランド会議では、バイオ医薬品の非臨床安全性試験方法に関する現行S6ガイドラインの基本理念に大きな誤認や修正すべき点に関する指摘はなく、ケース・バイ・ケース対応を維持する点については、日・米・EU各極とも異論はなかったが、以下5項目に関して、現行S6ガイドラインの明確化と拡充が必要であるという合意に達した。

- ① Species Selection (動物種選択)
- ② Study design (試験デザイン)
- ③ Reproductive/developmental toxicity (生殖発生毒性試験)
- ④ Carcinogenicity (がん原性評価)
- ⑤ Immunogenicity (免疫原性評価)

これら5項目にかかるAddendumの策定にむけて、情報収集や、関連する諸問題について検討を行い、日本のポジショニングについて協議し、日本側の対応案をまとめた上で、ICHの場での議論に供する。

B. 研究方法

本研究は、ポートランド会議でのS6ガイドラインのAddendum作成にかかる合意を受けて、まずPMDAより真木一茂・松本 峰男各氏、JPMAより中澤 隆弘・三分一 厚司各氏に研究協力者として参加いただくことで開始した。更に、ブラッセル会議のあと、JPMAより渡部 一人氏にも研究協力者として参加いただいた。尚、国立医薬品食品衛生研究所の井上達・小野寺 博志各氏には、オブザーバーとして、適宜参加いただいた。

1. 日本のポジショニングについての協議

本研究グループは、ポートランド会議でのS6ガイドラインのAddendum作成にかかる合意を受けて、頭記5項目について、それぞれ日本の立場からの問題点の有無、補追に盛り込むべき内容、その科学的根拠などを検討した上で、日本のポジショニングを協議し、対応案をまとめる。

2. ICHにおけるバイオ医薬品の非臨床安全性試験法ガイドライン (S6ガイドライン) のAddendumの策定に向けた専門家ワーキンググループ (S6 (R1) EWG) への参画

本研究グループは、ブラッセル会議においてS6 (R1) EWGに参画し、そこでの議論に対応する。また、各addendumの原案の作成にあたり、サブグループでの検討を進めるための電話会議等にも参画し、そこでの議論にも対応する。

3. S6 (R1) EWGでの議論に関連する諸問題の検討

本研究グループは、S6 (R1) EWGでの議論に関連する諸問題について検討を進めている。本年度は、東京薬科大学薬学部 医療薬学科 臨床薬効解析学教授 山田安彦博士を招聘し、バイオ医薬品、特に抗体医薬におけるヒト初回投与量の設定や毒性試験用量の設定に対する考え方についての情報収集を図る。

C. 研究結果

1. 日本のポジショニングについての協議

S6ガイドラインのAddendum作成にかかる頭記5項目について、JPMAワーキンググループの作成による案文をもとに、それぞれの項目における日本のポジショニングについて協議し、日本側の対応案をまとめた。要点は以下のとおりである。

① Species Selection (動物種選択)

バイオ医薬品は、ヒト生体内に存在するタンパク質の一次構造もしくは類似構造を、対応する鋳型DNAを元に生合成するものであり、ヒト型タンパク、あるいはヒト型タンパク誘導体として開発される。その結果、対象医薬品候補物質については種間交差性がなく、ヒト特異的なものであることも少なくな

いことから、バイオ医薬品の毒性試験では、被験物質が薬理的／生物学的活性を示す適切な動物種 (relevant animal) を選択することが重要となる。ここでは、動物種選択に関連する留意点をまとめた。

①-i) 適切な動物種を選択する上で考慮すべき点
適切な動物種の選別にあたっては、組織交差反応性試験や機能試験などを用い、その動物種に、被験物質に特異的な受容体、もしくは抗体医薬の場合には標的分子 (エピトープ) が発現していること、および当該バイオ医薬品の薬理作用や生物活性が認められることを示す必要がある。

①-ii) 組織交差反応性試験の利用について

抗体医薬品は、エピトープ特異的に作用し、種及び組織特異的に生物活性を示すことが期待される。それ故、抗体医薬品の毒性試験に用いる動物種選択に際して、エピトープの発現量及び生体内分布 (正常及び病態組織における差異を含む)、標的分子のヒト分子との同一性、被験物質の標的分子への結合性及び親和性などについて十分考慮する必要がある。これらの情報については、組織交差反応性試験から得ることができる。ただし、標的分子により誘導されるポストシグナル伝達経路や標的分子の機能活性に種差が存在することがあるため、標的分子の機能解析を行うことも重要である。

①-iii) 第2種動物の必要性

薬理作用や生物活性が認められる動物種が二種以上存在した場合でも、薬理試験や組織交差反応性試験、その他の生理機能などから、試験項目毎に、最も適切な動物種を選択して毒性試験を実施するため、あえて適切性の低いと思われる動物種を用い、併行して試験を施行することの科学的価値は低い。適切な動物種が一種しか存在しなくとも、当該動物種を用いた毒性評価は原則として可能であり、遺伝子改変動物や相同タンパクなどの代替モデルを用いた評価を併行させる必要は必ずしもないものと考えられる。ただし、適切な動物種が存在しないか、チンパンジーのみである場合は、個別の被検対象物質毎に、標的分子のバイオロジー情報に基づく安全性への懸念の程度などから、以下に述べる代替モデルでの評価も考慮することになるものと考えられる。

①-iv) 代替モデルの有用性

代替モデルとしては、a. 遺伝子改変モデル動物として、対象医薬品候補物質にかかる遺伝子のノックアウトや過剰発現モデル動物、あるいは当該分子のヒト型化、b. 被検動物における対象物質の相同タンパクの利用、などが考えられる。上述のような毒性試験の評価における利用の他、特定の毒性所見の発現メカニズムの解明にも有用と考えられる。

a. 遺伝子改変モデル動物：標的分子のノックアウトマウスなど、当該分子 (もしくはその機能) を欠失させたモデル動物の表現型の解析からは、標的分子に対して阻害作用を有するバイオ医薬品 (例えば受容体や内因性タンパクに対するアンタゴニスト抗体) が最大の抑制作用を示したときに想定される生体応答に関する情報が得られるものと考えられる。また、標的分子を過剰発現させたモデル動物の表現型からは、標的分子の過剰投与時の生体変化や、標的分子に対して活性化作用を有するバイオ医薬品の投与によって、当該標的分子の過剰活性化が誘発された場合の生体応答、などについて参考となるデータが得られるものと考えられる。受容体や標的分子をヒト型化したモデル動物については、ヒト分子特異的なバイオ医薬品であっても動物を用いた評価が可能になるものと期待される。一方、遺伝子改変動物は発生過程から標的分子が欠損あるいは過剰発現するため、発生過程や生育に伴い生理機能に修飾が起こる可能性があること、背景データが少ないこと、さらに、標的分子の体内分布、制御機構、ポストシグナル伝達及び免疫系反応などがヒトと同一でない場合もあるため、試験結果の解釈やヒトへの外挿については慎重に行う必要がある。

b. 相同タンパク：被験物質の相同タンパクあるいは相同抗体を用いた動物試験については、臨床予定製剤と同等の薬理的活性及び体内分布を示す場合は、その被験物質を用いた毒性試験の成績から有用な情報が得られるものと期待される。ただし、臨床予定製剤ではない被験物質を用いた毒性試験の結果については、安全域を推定することはしばしば困難であること、相同タンパクの薬理学

的及び薬物動態学的特性が臨床予定製剤と異なる場合があること、また、薬物動態学的特性や受容体親和性がほぼ同等であっても、制御機構やポストシグナル伝達が異なるために薬理作用/生物活性がげっ歯類とヒト/NHP (non human primate) とで異なることもあること、等の理由から、ヒトへの外挿に際しては注意が必要となる。

② Study design (試験デザイン)

バイオ医薬品の非臨床安全性試験では、個々のバイオ医薬品にあわせた適切な試験デザインが求められていることから、ここでは、毒性試験のデザインにおける試験用量設定、反復投与毒性試験の試験期間および回復性試験についての留意点についてまとめた。

②-i) 試験用量設定、特に最高用量の選択基準

試験用量は、現行S6ガイドラインに述べられている通り、「投与量は最大耐量 (Maximum Tolerate Dose; MTD) 及び無毒性用量 (No Observable Adverse Effect Level; NOAEL) を含み用量反応関係に関する情報が得られるように設定」することを目標としているが、「明確な最大用量を求めることができないような、毒性がほとんどないか全くないある種のバイオ医薬品」の場合も含め、「科学的妥当性に基づいた用量設定」をする必要がある。一般に、バイオ医薬品で認められる「毒性変化」は薬理作用の過剰発現によるものか、標的臓器以外に存在する作用点への薬理作用による生体反応 (pleiotropism) によることが多い。即ち、バイオ医薬品で薬理作用の延長上の生体応答以外の生体影響が観察されないことから、従来的一般医薬での毒性発現を指標とした、最大投与可能量 (Maximum Feasible Dose; MFD) や、推定最高臨床用量の100倍に設定する、といった低分子物質で一律に適用されるような最高投与量の設定に関する考え方を適用することは不適切である。逆に、最高用量設定の科学的根拠を示しているのであれば、明確な毒性変化が観察されない場合でも、さらに高用量の評価を実施する必要はないと考える。標的分子のバイオロジーから安全性の懸念が少ないと考えられ、かつ、臨床用量がある程度正確に推定できる場合は、血中濃度に基づく推定最高臨床用量の5倍程度が一

つの目安になるものと考えられる。また、試験動物種における薬力学的反応がプラトーに達する用量 (Maximum Pharmacological Dose; MPD) あるいはその数倍を最高投与量にするという考えもある。この場合は、用量反応曲線を検討し、毒性試験用量範囲に適切な薬理作用発現用量が含まれていることを確認すべきである。

②-ii) 受容体占有率を利用した毒性試験用量設定

分子量、解離定数、PK/TKデータがあれば、毒性試験に用いる用量において、薬物の受容体占有率は推定可能である。実際の前臨床データに基づき、抗CD28抗体、抗VEGF抗体、抗CD20抗体、抗HER2抗体のそれぞれの毒性試験に用いた用量での受容体占有率を算出した。その結果、抗CD28抗体、抗VEGF抗体および抗CD20抗体の場合、最も低い試験用量においてもすでに受容体占有率はほぼプラトーに達していた。抗HER2抗体の毒性試験においては、80%の受容体占有率を示す用量を最低用量とし、最大の受容体占有率になる用量の数倍までの用量が設定されていた (結果は省略)。

②-iii) 反復投与毒性試験の試験期間

反復投与毒性試験の試験期間として、一般的に6ヶ月間投与が適当と考えられている。現在までに米国で承認された23品目のバイオ医薬品について6、9及び12ヶ月間の反復毒性試験のデータと臨床有害事象を比較した報告 (Clarke J et al., Regul. Toxicol Pharmacol, 50, 2-22 (2008)) では、6ヶ月の反復投与毒性試験によって一般的な臨床における有害事象は予測でき、ヒトの安全性予測には6ヶ月間試験が適切であると提案している。なお、6ヶ月の反復投与毒性試験で予測できなかった有害事象については9ヶ月あるいは12ヶ月の投与期間でも予測できなかったことも併せて報告されている。このように長期の反復投与毒性試験の期間は6ヶ月を原則とするが、必要に応じて6ヵ月未満またはそれ以上の試験が実施される場合もあり、いずれの場合も試験期間設定の妥当性を明確にしておく必要がある。

②-iv) 回復性試験の必要性和その期間

回復期間の設定に関する基本的な考え方については、バイオ医薬品に特異的な考慮事項はない。

③ Reproductive/developmental toxicity (生殖発生毒性試験)

生殖発生毒性試験における留意点をまとめた。

③-i) 予定される臨床適用からみた必要性の検討

妊婦あるいは妊娠可能な女性に適用されるバイオ医薬品については生殖発生毒性試験が必要である。

日本と欧米とで生殖発生毒性試験の必要性の認識ギャップがある疾患例として、アルツハイマー病、骨粗鬆症およびリュウマチが挙げられる。これらの疾患には少数例であっても妊娠可能な患者(例えば、若年性アルツハイマー病患者や続発性骨粗鬆症患者など)が含まれるため、日本では生殖毒性試験は必要であるという意見が多いようである。しかし欧米では、このような患者は全体の中で少数であるという理由から、生殖発生毒性データは求めないことがある。こうした相違への日本側の対応としては、対象薬の作用機作を充分考慮し、生殖発生毒性が危惧されるものについては、その科学的根拠に基づいて生殖毒性試験の実施を求める方針をまとめた。

③-ii) NHPを用いた生殖発生毒性試験における問題点の検討

現時点で明らかになっているNHPを用いた生殖発生毒性試験における問題点を整理した。即ち、①妊娠率が低い、②げっ歯類やウサギと比べると背景データが少ない、③アカゲザルは季節繁殖動物である(時期(11-2月)を限定すれば試験可能。一方カンクイザルでは通年可能である)、④試験期間が長い(Seg. I、Seg. IIおよびSeg. IIIをすべてNHPで実施した場合、約9年かかる)、⑤個体当たりの胎児数が少ない(1母動物1胎児)、⑥流産の多発(自然流産の発生率は10-20%程度、流産の理由としては、ストレスなどの他、多要因が関与)、⑦骨格の形態異常及び変異の発生頻度が高い、⑧機能/行動発達の評価には、出生後6ヶ月齢以降から9ヶ月間観察することが必須であり、新生児の免疫能評価には生後6ヶ月以降の動物を用いる、⑨性成熟までに要する期間が長い(平均4年)、⑩施設間のヒストリカルデータに差がある、⑪チンパンジーは動物福祉および動物供給の点から生殖毒性試験に用いることは事実上不可能である。しかし、上述した問題はあがあるが、基本的に

試験法は確立されており、各施設において十分な背景データが蓄積されていれば、NHPを用いて生殖発生毒性を評価することは技術的に可能であると考えられる。

③-iii) 相同タンパクや遺伝子改変動物利用の可能性の検討

動物種選択の項でも触れたとおり、代替モデルを利用したアプローチが考えられるが、ヒトへの外挿に関する本質的な問題も含まれる。それ故、むしろ一部あるいはすべての生殖発生毒性試験を省略して、臨床家にリスクがあることを警告するという選択も念頭におくべきである。

④ Carcinogenicity (がん原性評価)

ここで対象としているバイオ医薬品は、タンパク製剤であり、膜を通過して細胞内へ移行することは原則としてないこと、従って、DNAや染色体に直接作用することは考えられないことから、遺伝毒性は基本的にはないこと、発がん性があるとすれば、それはEpigeneticな機構によるプロモーター作用であることが前提となる。発がん試験を求める条件並びにその場合の考慮点、代替手段などについて検討した。

④-i) げっ歯類の2年間がん原性試験

げっ歯類が適切な動物種ではないことも多く、現行S6ガイドラインにあるとおり「標準的ながん原性試験は一般的に不適切である」。また、げっ歯類が適切な動物種であった場合でも、懸念される細胞増殖促進作用や免疫抑制作用などにより、発がん過程における種差が存在する可能性にも留意が必要である。

④-ii) 類薬における情報の活用

a. 適切な動物種における比較がん原性試験：臨床において類薬のがん原性リスク評価がされている場合は、その類薬と当該バイオ医薬品を薬理作用/生物活性の認められる動物種で比較がん原性試験を行うことにより有用な情報が得られる可能性がある。試験の投与期間は必ずしも2年間である必要はない。EMAガイドライン(2001)ではインスリン誘導体については、ヒトインスリン(陰性対照)およびインスリンAsp B10(陽性対照)を用いた*in vitro*および*in vivo*での比較試験を求め

ている。

- b. 類薬の市販後調査や疫学データ利用：バイオ医薬品のがん原性リスクを含む毒性評価における有用な情報として、市販後調査や疫学データがある。類薬においてこれらの疫学データが存在する場合は、対象物質との類似点と相違点などを考慮した上で、有用な情報が得られる可能性がある。

④-iii) 細胞増殖マーカーを組み入れた適切な動物種における反復投与毒性試験

Epigenetic carcinogenには閾値が存在するため、用量および時間依存性の検討および先行バイオマーカーの探索を行うことが有用であると考えられる。そのための細胞増殖マーカーには、増殖性細胞核抗原 (PCNA: Proliferating cell nuclear antigen)、Ki-67抗原、minichromosome maintenance protein (MCM)、あるいはプロモデオキシウリジン (BrdU: 5-bromo-2-deoxyuridine) などがあげられる。細胞増殖マーカーは反復投与毒性試験に組み込むことで評価可能であるものと考えられるが、その試験期間は少なくとも6ヶ月を要するものと考えられる。なお、細胞増殖マーカー・インデックスの増加が細胞のがん化を直接意味するものではないので、結果の解釈は他の情報とあわせて総合的に行わねばならない。

④-iv) 遺伝子改変動物や相同タンパクの利用による検討

相同タンパクを用いてがん原性試験を行った例としては、マウスあるいはラットの成長ホルモンをそれぞれの動物に投与した2年間のがん原性試験が知られている (Farris GM et al., *Toxicol. Sci.*, 92, 548-561 (2007))。また、遺伝子改変動物を利用したがん原性試験には、例えばヒト型受容体を発現させた遺伝子改変動物を用いた2年間のがん原性試験、相同タンパクを用いた遺伝子改変動物 [rasH2マウス、p53 (+/-)マウス等] による短期がん原性試験、標的となる受容体やタンパク等に相当する遺伝子をノックアウトあるいは過剰発現させた動物を用いた生涯試験などが考えられる。いずれも、前述した通り、系の限界を踏まえた解釈が求められる。

⑤ Immunogenicity (免疫原性評価)

バイオ医薬品の投与によりヒトで生じる抗体は、

その薬理作用や生物活性、副作用に何ら影響を与えないものから、内因性のタンパクを中和して重篤な副作用を示すものまで様々である。そこで、臨床においては、薬物のリスクに応じた詳細な免疫原性評価戦略が提案されている (EMEA/CHMP/BMWP/14327 (2006))。一方、非臨床試験において得られる免疫原性の結果はヒトへの外挿性が低いことが知られていることから、非臨床試験におけるバイオ医薬品の免疫原性評価の主要な目的は、毒性試験において抗体産生の発現状況を把握することであり、PK (TK) 及びPDなどに対する影響を解析し、得られた毒性試験結果の解釈に役立てることにある。ここでは、上記の背景を基にした上で、毒性試験における抗体の特性解析の程度および休業期の抗体測定の実用性について考察した。

⑤-i) 抗体の特性の解析

毒性試験では多くの場合、被験物質 (バイオ医薬品) は動物にとって異種タンパクであるため、抗薬物抗体が産生されるが、これらの抗体は、PK (TK)、PD及びバイオマーカーに影響を与えることで毒性試験結果を修飾する可能性がある。そこで、毒性及び薬物動態の解釈のために抗薬物抗体測定を行い、抗体産生の有無 (あるいは力価、抗体レベル) を明らかにする必要がある。得られた抗薬物抗体に関するデータに基づき、抗体産生とそれに伴う薬物動態及び薬理作用や生物活性の変化と毒性との関連性、抗体産生に関連した新たな毒性の発現、ならびに、免疫複合体の組織への沈着と抗体産生との関連性について考察することが大切である。中和抗体のみならず、clearing antibody (排泄を早くする抗体)、sustaining antibody (排泄を遅くする抗体) や生体内タンパクとの交差抗体が産生されることもある。産生された抗体の特性をどこまで明らかにするかは、毒性の解釈、あるいは、毒性試験が薬物の安全性評価において妥当なものであったか否かを判断するためにどこまで必要かによって判断される。

⑤-ii) 休業期の抗体測定

イムノアッセイの原理に基づいた抗薬物抗体の測定法では、サンプル中に薬物が残存する場合には、薬物と抗薬物抗体との結合により、抗薬物抗体の検

出が妨害される可能性がある。同様に、中和抗体の測定に利用される *in vitro* の細胞を用いた機能試験においても、サンプル中に残存する薬物が測定を干渉する可能性がある。したがって、サンプル中に薬物が存在する場合には、これらの結果の解釈には注意が必要である。薬物による測定値への影響を取り除き、適正な測定結果を得るためには、休業期にサンプルを採取し、抗薬物抗体あるいは中和抗体を測定する方法が推奨される。

2. ICHにおけるバイオ医薬品の非臨床安全性試験法ガイドライン (S6ガイドライン) のAddendumの策定に向けた専門家ワーキンググループ (S6 (R1) EWG) への参画

5つの検討項目のそれぞれについて業界専門家によるプレゼンテーションなどによる最新のデータの紹介、各極の考え方の紹介とパーティ間での相違点の同定、各項目のAddendumドラフト作成グループの編成が行われた。以下にそれぞれの検討項目についての主な討議内容と意見の違いが認められた点あるいは今後の調整が必要な点を示す。

① Species Selection (動物種選択)

主要な討議ポイントは試験動物種の適切性をどのように判定するかということと相同タンパクを使った試験の位置付けを明らかにすることであった。現行S6ガイドラインに記載されている適切な動物種が2種以上存在する場合は2種の動物で毒性評価をするとの記載は、NHPの毒性試験に加え相同タンパクでのげっ歯類試験を求めるものではないこと、という点で出席者の見解が一致した。

課題として、試験動物種が適切であることを示すための条件は何か、1種の試験のみで十分と考えられるのはどんなケースか、相同タンパクを用いた試験の際の留意点は何か、NHPの試験を避けるために相同タンパクでの試験を行うことは適切かといった点が挙げられ、Addendumの作成の過程で討議を重ねさらに明確化することになった。特に、EUにおいてはNHPの試験を避けたいという意向が強いようである。

② Study design (試験デザイン)

ここでは最高投与量設定、反復投与毒性試験の試験期間、回復性試験について討議された。特に、PK/PDモデリングを用いる手法が紹介され、毒性試験の最高用量はMPDとして設定し、さらに推定最高臨床用量の10倍を目安にするということが提案された。PK/PDモデリング解析により、薬理作用の過剰発現による生体変化が毒性所見のほとんどであるバイオ医薬品においては、投与量を過剰に上げてても用量依存性に作用強度が強くなるのではなく、作用持続時間が長くなることが示された。試験期間についても、PK/PDモデリングの考え方を取り入れ、臨床での薬理作用がプラトーになることを基準に設定できるのではないかという意見が出された。回復性試験については必ずしもすべての用量に対応して回復群を設ける必要はないことが確認された。

今回の会議で提案されたMPDを参考に最高投与量を設定する考え方は、日本ではガイドライン解説書で紹介されており、受け入れやすい考え方である。一方、他極においてはMTDやMFDを用いるという考え方がこれまで強かった、今後、他極では、それぞれ部内調整が必要である。日本にとって課題となる点として、ヒトで初めて実施される臨床試験をサポートする毒性試験に未成熟のNHPが用いられることが多いことが指摘された。日本は従来男性への投与の前に雄動物の生殖器への毒性データを求めてきたが、性成熟に達していない動物では適切な生殖器の病理学的解析ができないという懸念がある。

③ Reproductive/developmental toxicity (生殖発生試験)

バイオ医薬品ではNHPのみが適切な動物種というケースがあり、一方NHPにおける生殖毒性評価は可能であるものの様々な留意すべき技術的制約があるため、NHPでの生殖発生毒性試験をどのようにデザインするかという点が主要な討議ポイントであった。NHPの器官形成期において抗体はほとんど胎盤を通過しないことから、NHPのseg II試験だけを行っても、母体への作用による二次的な影響を除けば、胎児への影響はないと予想される。それ故、seg IIとseg IIIを組み合わせた enhanced pre and post natal development (ePPND) 試験が提案され、試験動物数

の削減が期待される。ただし、ePPND試験には時間がかかることから、最終報告書が出来上がるのが第3相試験以降になる場合も想定され、第3相試験までにseg IIデータが必要とするM3ガイドラインとの調整が必要である。

尚、NHPの試験を削減する目的で、相同タンパクのげっ歯類試験をNHP試験の代替に用いることの是非については、各パーティ間で若干の意見の相違がみられた。FDAや日本（MHLW、JPMA）はNHPの生殖毒性試験の方が適切であるというポジションである。EUやEFPIAは科学的にはこれに同意しながらも、動物愛護の観点から相同タンパクのげっ歯類試験の可能性を探りたいという意向を持っている。

④ Carcinogenicity（がん原性評価）

主な討議点は2年間のげっ歯類のがん原性試験をバイオ医薬品でも施行すべきかどうかであった。ある種のバイオ医薬品（例えば、強い細胞増殖促進活性や免疫抑制作用を有する場合）では何らかのがん原性リスク評価が必要であるが、その評価に2年間の癌原性試験はあまり有用ではないというのが出席者の意見であった。しかし、一部の審査当局内にはこの試験を強く求めている声があり、調整が必要であることが報告された。それ故、2年間のげっ歯類のがん原性試験に代わるがん原性リスク評価法の検討、と審査当局との調整が課題と考えられる。

⑤ Immunogenicity（免疫原性評価）

各パーティ間に意見の違いはなく、動物での抗体測定の目的は、ヒトでの抗原性の予測ではなく、中和抗体産生などにより毒性評価に影響を及ぼす懸念の有無を評価する事にあることが確認された。また必ずしも中和抗体測定をしなくてもPDマーカーの変化などで代替できることも合意された。これらの討議に基づき、この項目についてのAddendumのドラフトが作成された。

3. S6 (R1) EWGでの議論に関連する諸問題の検討

本研究グループは、S6 (R1) EWGでの議論に関連する諸問題について適宜検討を進めている。本年度は、東京薬科大学薬学部 医療薬学科 臨床薬効解析学教授 山田安彦博士を招聘し、バイオ医薬品、特に

抗体医薬におけるヒト初回投与量の設定や毒性試験用量の設定に対する考え方についての情報を収集した。

D. 考 察

バイオ医薬品の毒性評価は、薬理的/生物学的活性を示す動物種を用いて実施すべきであり、適切な動物種が一種存在すれば、原則その種での評価で十分と考えられる。適切な動物種がNHPの中でもチンパンジーのみの場合や特定の毒性所見のメカニズム解明の必要がある場合、遺伝子改変動物や相同タンパクなどの代替モデルを用いた毒性試験の実施について考慮する必要がある。試験実施の際には、代替モデルの特性について十分に理解しておくことが大切である。

毒性試験の最高用量は血中濃度に基づく推定最高臨床用量の5倍程度、あるいは薬学的反応がプラトーに達する用量の数倍を目安に設定することが適切であろう。また、科学的根拠に基づいた最高用量で毒性変化が認められない場合には、さらに高い用量で毒性評価する必要はない。長期反復投与毒性試験の試験期間は原則として6ヶ月が適切であるが、毒性の懸念の程度に応じてより短期あるいは長期の試験にすることもある。回復性試験に際しては、観察された毒性所見を薬理作用など様々な側面から考察し、試験の必要性や適切な試験デザインを決定する。

バイオ医薬品の生殖発生毒性評価において、NHPのみが適切な動物種と考えられる場合には、NHPを用いた試験が第一選択であると考えられる。しかしながら技術的および倫理的制約を勘案すると、既存情報の利用、NHPの生殖発生毒性試験に関する試験デザインの簡略化、相同タンパクや遺伝子改変動物の利用といった様々な選択肢を組み合わせ、ケース・バイ・ケースで生殖毒性評価を行うことが求められるであろう。

バイオ医薬品のがん原性リスクは、二次的ながん細胞を増殖させる作用に基づくものであり、周辺情報を最大限利用し、ヒトでのがん原性リスク評価を総合的に行うことが大切である。がん原性リスク評

価のために非臨床試験を行う場合については、用量および時間依存性の検討、および先行バイオマーカーの探索を行うことが重要である。

抗薬物抗体測定はヒトでの抗原性の予測ではなく、中和抗体産生など毒性評価に関する修飾の有無を評価するために施行され、また必ずしも中和抗体測定をしなくてもPDマーカーの変化などで代替できるものと考えられる。

E. 結論

ICHにおけるS6ガイドラインの明確化と拡充の為のAddendumの形式による追補の策定を支援する目的で、国内の関係組織（PMDAおよびJPMA）から研究協力者の参加を得て、関連情報の収集／解析を行い、合わせてICHの場での議論に資するための国内の意思統一も図った。

F. 健康危険情報

該当しない

G. 研究発表

1. 論文発表

Nakazawa T, Implementation of ICH S6: Japanese perspective, pp 67-110, In Preclinical safety evaluation of biopharmaceuticals. ed. by Cavagnaro JA., John

Wiley & Sons, Inc.

Nakazawa T, Kurokawa M, Kimura K, Wakata A, Hisada S, Inoue T, Sagami F, Heidel SM, Kawakami K, Shinoda K, Onodera H, Kumagai Y, Ohno Y, Kawamura N, Yamazaki T and Inoue T, Safety assessment of biopharmaceuticals: Japanese perspective on ICH S6 guideline maintenance. J. Toxicol. Sci. 33:277-82 (2008)

井上忠志, 熊谷雄治, Shawn M. Heidel, 木村和哉, 若田明裕, 久田茂, 川上浩司, 小野寺博志, 篠田和俊, 黒川美佐男, 中澤隆弘, 佐神文郎, 山崎恒義, 井上達, バイオ医薬品の安全性評価についての考え方—ICHガイドラインの見直しに向けて—医薬品研究 (印刷中)

2. 学会発表

該当しない

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

該当しない

2. 実用新案登録

該当しない

3. その他

該当しない

Pmda

バイオ医薬品の新しい課題についての調査研究
「バイオテクノロジー応用医薬品の非臨床における安全性評価」改訂について

(独)医薬品医療機器総合機構
新薬審査第四部/生物系審査第一部
真木 一茂

Pharmaceuticals of Medical Devices Agency

S6改定に至るこれまでの経緯

- S6ガイドライン
 - 適用範囲: バイオ医薬品
 - 基本コンセプト: 「ケース・バイ・ケース」
 - Step 4 (1997.7.16)
 - 国内施行: 医薬審第326号「バイオテクノロジー応用医薬品の非臨床における安全性評価」(2000.2.22)

S6改定に至るこれまでの経緯

- 2006年6月 ICH 横浜会議
 - 見直しの必要性について討議
- 2006年10月 ICH シカゴ会議
 - 改定点の洗い出しを日・米国・EUの各極に要請

ポートランド会議
2008年5月31日～6月5日


How to update the guidance of ICH S6?

- S6改定について
 - 必要性
 - フォーマット
 - 対象項目

International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use **ICH**

S6の改定について

- 改訂は必要
- S6の本文は変更しない
 - 「ケース・バイ・ケース」の理念はそのまま
- 追補(Addendum)として、説明を加える



ブリュッセル会議
2008年11月10日～13日

■内容

- ブレインストーミング
 - 業界専門家によるプレゼンテーション
 - 検討事項についての討議
 - 相違点の洗い出し
- ドラフト作成準備

ICH