

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
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

光毒性試験に関する国内外の現状とガイドライン
策定についての調査研究

「光安全性評価に関する製薬協の調査研究」

分別研究者	小野寺 博志	(国立医薬品食品衛生研究所)
協力研究者	中村 和博	(塩野義製薬株式会社)
	三分一 剛彦	(第一三共株式会社)
	小島 肇	(国立医薬品食品衛生研究所)
	細井 一弘	(参天製薬株式会社)
	藤田 初俊	(医薬品医療機器総合機構)
	込山 剛行	(医薬品医療機器総合機構)

研究班の活動内容と方向

昨年度

1. 各国での規制状況について情報収集

今年度

2. 国内光毒性試験実施の現状調査

最終年度

3. 試験法の検討と代替試験を含めた評価法
4. 本邦でのガイダンス策定
5. Harmonisation (各ガイドラインとの整合性)

国内光毒性試験実施の現状調査までの背景

- 日本におけるガイドライン整備の遅れ
 - 皮膚光感作性ガイドライン(1989年)のみ
- EMEA(2002年)/FDA(2003年)ガイドライン(問題点)
 - EMEA/FDA:「290-700 nmの波長に吸収があり、局所に適用される場合あるいは全身曝露後に皮膚あるいは眼に分布する場合に試験が必要」
 - 実施基準が不明確で、殆んど全ての化合物が評価対象
 - EMEA:「3T3細胞を用いた*in vitro*光毒性試験結果は十分な情報を提供」、「*in vivo*非臨床試験は通常は必要とされない」
 - *In vitro*光毒性試験の感受性は高すぎる意見
 - FDAと見解が異なる
 - EMEAはガイドライン見直し予定(2008年10月)未発

本邦における光毒性に関する通知

医薬品のための毒性試験法ガイドライン(平成元年9月11日 薬審1第24号)

皮膚光感作性試験: 皮膚外用剤として用いる被験物質の光感作性試験検査のための標準的試験法を示すものである。原則として、ヒトで皮膚感作性を示すことがよく知られている物質と類似構造を持つ皮膚外用剤又は、皮膚光感作性を待つ可能性が懸念される皮膚外用剤に対して適応される。

Adjuvant and Strip 法 → 光感作 → 光毒起
Harber 法
Horio 法
Jordan 法
Kochover 法
Maurer 法
Morikawa 法
Vinson 法

↓

紅斑・浮腫の頻度と程度を陽性対照群・対照群と比較評価

調査の実施概要

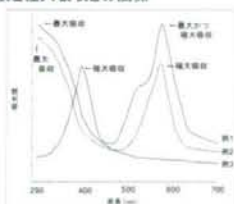
- 目的
 - 「光安全性評価手順の検討を目的とした基礎データ構築のための調査」
- 最終成果
 - 医薬品の光安全性評価手順の確立
- 実施機関
 - 製薬協 基礎研究部会 (一般毒性継続課題チーム)
- 実施期間
 - 平成20年9月5日～10月3日
- 回答率: 38社/68社(58%)
- データ処理
 - 製薬協事務局で会社名をコード化後チームで解析

調査内容

- 光安全性評価手順の検討
 - モル吸光係数と *in vitro* 光毒性試験結果との関連性
 - 化合物の組織分布に基づいた光毒性試験の要否
 - *In vitro* と *in vivo* 光毒性試験結果との関係
 - *In vitro* 光毒性試験結果と光遺伝毒性試験結果との関連
 - 非臨床(*in vitro*あるいは *in vivo*) 光毒性試験結果と臨床での光毒性発現の関連
- 光安全性評価の各社対応状況
- 光安全性評価ガイドラインの必要性

化合物の光吸収性と光毒性

- 290-700 nmの波長に吸収がある場合
- モル吸光係数との関係
- 最大吸収と極大吸収との関係



光安全性評価実施の有無

- 光安全性評価の経験(回答会社中)
79%(30/38社)
- 実施あるいは委託経験の試験内容
(光安全性評価経験のある会社のうち)
 - 光毒性試験: 93%(28/30社)
 - 光遺伝毒性: 43%(13/30社)
 - 光がん原性試験: 17%(5/30社)

化合物の組織分布(皮膚、眼)

- 基準を設けている会社(経験30社中)
 - 設けている: 7%(2/30)、設けていない: 87%(26/30)
 - その他: 3%(1/30)、無回答: 3%(1/30)
- 設けている基準例
 - 皮膚・眼の組織内濃度が血中濃度以上を示す
血中濃度が *in vitro* phototoxicity を示す濃度より高い場合
(*in vivo* 試験の実施基準か?)
 - 皮膚または眼のいずれかの組織/血中比が5以上の場合
投与後一定期間残留(残留性・蓄積性)
 - その他: 皮膚や眼の組織分布と消失速度を考慮する

各企業で実施可能な光毒性試験(回答19社)

• モルモットを用いた光毒性試験:	12
• 3T3細胞を用いた光毒性試験:	9
• 有毛マウスを用いた光毒性試験:	5
• ヘアレスマウスを用いた光毒性試験:	3
• ラットを用いた光毒性試験:	2
• 光染色体異常試験:	4
• 光Ames試験:	3
• ヘアレスマウスを用いた皮膚小核試験:	2
• 光コメットアッセイ:	1
• 光がん原性試験:	0
• モルモットを用いた皮膚光感作性試験:	11
• マウスを用いた光LLNA:	3

光安全性評価ガイドラインについて

- ガイドラインの必要性は(回答会社のうち)
 - 必要である: 92%(35/38)、必要ない: 8%(3/38)
 - 「必要ない」とした理由
 - 非臨床試験ではリスク評価が十分にできない
 - 欧米ガイドラインがあるので十分
- ガイドラインの形態は
 - ICHガイドライン: 89%(31/35社)
 - 国内ガイドライン: 11%(4/35社)

皮膚光感作性試験ガイドラインについて

- 現在ある皮膚光感作性試験ガイドラインの扱いとして
 - 新たなガイドラインへ組み入れる: 63%(24/38)
 - 廃止し、今後も組み入れない: 26%(10/38)
 - その他: 11%(4/38)
- ヒトへの外挿性を検討したうえで、組み入れを検討
- ICHでハーモナイズする必要性

光安全性評価における
非臨床試験の内容に関する課題
(調査からの意見)

- 蓄積されたデータから、より適切な光毒性評価のために
 - 薬物の光吸収と局所分布についての基準を設定
 - 3T3細胞を用いた*in vitro*光毒性試験での感度の調節
 - 各種*in vivo*光毒性試験の、ヒトへの外挿性を検証
- 親化合物が290-700nm波長で非吸収でも光毒性が知られている(例:ケトプロフェン)
 - ヒトにおける主代謝物についても、吸収波長を測定する必要性

光安全性評価における
臨床試験の位置づけに関する課題
(調査からの意見)

- 動物や*in vitro*での光安全性評価の方法では、ヒトでの反応を予想できない。臨床試験における、ヒトでの皮膚反応を評価することが、より適切と考える
- 通常の非臨床毒性試験において、皮膚は肉眼的にも組織学的にも評価されるために光毒性は評価可能
- 3T3細胞を用いた方法は、動物やヒトで確認されない偽陽性率が非常に高く、外挿性に欠ける
- 非常に多くの化合物で*in vitro*光染色体異常誘発能が偽陽性になることから、本試験の使用は限定されるか、ほとんど付加価値のないもの

光安全性評価における
ガイドラインに関する課題
(調査からの意見)

- 早期に共通(ICH)のガイドラインの作成を望む
 - 医薬品の光安全性評価に関しては、日米欧で必ずしも一致した評価法が行われていない
- ガイドライン作りには基本的に賛成
 - ただし、試験系の妥当性(試験の精度、ヒトへの外挿性を含め)が重要

ICH M3 Step2 ドラフト June 5, 2008.

16. 光毒性
 ヒトへの暴露と関連する光安全性試験の妥当性および試験実施のタイミングは、以下の項目を考慮して決定すべきである。1) 化合物分子の光化学的性質(光吸収性と光安定性)、2) 全身的に関連する化合物の光毒性に関する情報、3) 組織分布、4) 光毒性を介する臨床または非臨床所見。
 光毒性の可能性に関する初期評価は、薬物の光反応性に関する物理/化学的特性、スペクトル光学的特性、及び薬理学的分類と構造活性相関に基づいて行なうべきである。評価の結果、潜在的な光毒性のリスクが承認された場合には、それ以後の臨床試験において保護対策をとることが適切であろう。
 次に、ヒトのリスクに対して更なる情報を提供するために、非臨床での皮膚や眼における薬物分布の検討を実施すべきである。光毒性試験は、それが適切であると考えられる場合は、大規模臨床試験(第3相試験)の開始前には実施すべきである。また、頻発早期に眼/皮膚への分布を評価することや臨床での保護対策をとることの必要性を回避するために、非臨床又は臨床試験において光毒性を直接評価することもあり得る。
 『一般的に、げっ歯類の光がん原性試験は医薬品開発の裏付けとして有用ではないと考えられており、推奨されない。』患者における光がん原性のリスクを適切に管理できるのであれば、特別な試験は推奨されず、インフォームド・コンセント又は添付文書(治療要領)などに警告として記載する。『試験することが妥当であると考えるのであれば、げっ歯類以外の試験方法により光がん原性を評価することを考慮すべきであり、販売される前に完了しておくべきである。』

ガイドライン策定に際しての要点

- 欧米ガイドラインの模倣は避け、実効性のある内容
- データをもとにした試験法の評価が必要
- ポイント
 - 化合物の特性をもとにした試験実施の要否
 - 各非臨床試験の妥当性
 - 3T3細胞を用いた試験の感度
 - in vivo*試験の有用性
 - 光遺伝毒性試験の位置づけ
 - 光がん原性試験の扱い
 - 臨床試験への外挿性
 - 非臨床試験の有用性

まとめ

- ガイドライン策定の必要性(要求度)は高い
- 光毒性試験の必要性、試験法の選択については、検討が必要
- 近年承認された医薬品での光毒性試験の実施状況を調査
- 各ガイドラインとの整合性を調整する
- ガイドライン(案)の作成を開始

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
 医薬品安全性を高める医薬品等の品質、有効性及び安全性に関する研究

光毒性試験に関する国内外の現状とガイドライン
 策定についての調査研究

「光安全性評価に関する製薬協の調査研究」

研究分担者 小野寺 博志 (国立医薬品食品衛生研究所)
 研究協力者 中村 知希 (塩野義製薬株式会社)
 立川 一輝 洋司 (第一三共株式会社)
 小島 謙 (国立医薬品食品衛生研究所)
 藤井 一弘 (参天製薬株式会社)
 藤田 和彦 (医薬品品質情報総合機構)
 山田 野行 (医薬品品質情報総合機構)

2008.1.20

1

研究班の活動内容と方向

昨年度

1. 各国での規制状況について情報収集

今年度

2. 国内光毒性試験実施の現状調査

最終年度

3. 試験法の検討と代替試験を含めた評価法
4. 本邦でのガイダンス策定
5. Harmonisation (各ガイドラインとの整合性)

2008.1.20

2

国内光毒性試験実施の現状調査までの背景

- 日本におけるガイドライン整備の遅れ
 - 皮膚光感作性ガイドライン(1989年)のみ
- EMEA(2002年)/FDA(2003年)ガイドライン(問題点)
 - EMEA/FDA:「290-700 nmの波長に吸収があり、局所に適用される場合あるいは全身曝露後に皮膚あるいは眼に分布する場合に試験が必要」
 - ・ 実施基準が不明確で、殆んど全ての化合物が評価対象
 - EMEA:「3T3細胞を用いた*in vitro*光毒性試験結果は十分な情報を提供」、「*In vivo*非臨床試験は通常は必要とされない」
 - ・ *In vitro*光毒性試験の感受性は高すぎる意見
 - ・ FDAと見解が異なる
 - EMEAはガイドライン見直し予定(2008年10月) 未発

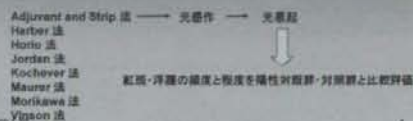
2009.1.20

3

本邦における光毒性に関する通知

新薬品のための薬性試験法ガイドライン(平成元年9月11日、薬審1第24号)

皮膚光感作性試験 皮膚外用剤として用いる被験物質の光感作性試験実施のための標準的試験法を示すものである。原則として、ヒトで皮膚感作性を示すことがよく知られている物質と類似薬性を持つ皮膚外用剤又は、皮膚光感作性を示す可能性が懸念される皮膚外用剤に対して適用される。



2009.1.20

4

調査の実施概要

- 目的
 - 「光安全性評価手順の検討を目的とした基礎データ構築のための調査」
- 最終成果
 - 医薬品の光安全性評価手順の作成
- 実施機関
 - 製薬協会 基礎研究部会 (一般毒性継続課題チーム)
- 実施期間
 - 平成20年9月5日～10月3日
- 回答率: 38社/68社(58%)
- データ解析
 - 事務局で会社名をコード化後チームで実施

2008.1.20

5

調査内容

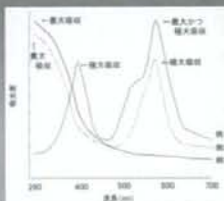
- 光安全性評価手順の検討
 - モル吸光係数と*in vitro*光毒性試験結果との関連性
 - 化合物の組織分布に基づいた光毒性試験の要否
 - *In vitro*と*in vivo*光毒性試験結果との関係
 - *In vitro*光毒性試験結果と光遺伝毒性試験結果との関連
 - 非臨床(*in vitro*あるいは*in vivo*)光毒性試験結果と臨床での光毒性発現の関連
- 光安全性評価の各社対応状況
- 光安全性評価ガイドラインの必要性

2008.1.20

6

化合物の光吸収性と光毒性

- 290-700 nmの波長に吸収がある場合
- モル吸光係数との関係
- 最大吸収と極大吸収との関係



2008.1.20

3

光安全性評価実施の有無

- 光安全性評価の経験(回答会社中)
79% (30/38社)
- 実施あるいは委託経験の試験内容
(光安全性評価経験のある会社中)
 - 光毒性試験: 93% (28/30)
 - 光遺伝毒性: 43% (13/30)
 - 光がん原性試験: 17% (5/30)

2008.1.20

8

化合物の組織分布(皮膚、眼)

- 基準を設けている会社(回答30社中)
 - 設けている: 7% (2/30)、設けていない: 67% (26/30)
 - その他: 3% (1/30)、無回答: 3% (1/30)
- 設けている基準例
 - 皮膚・眼の組織内濃度が血中濃度より高い
 - 血中濃度が *in vitro* phototoxicity を示す濃度より高い場合 (*in vivo* 試験の実施基準か?)
 - 皮膚または眼のいずれかの組織/血中比が5以上の場合
 - 投与後一定期間残留(残留性・蓄積性)
 - その他: 皮膚や眼の組織分布と消失速度を考慮する

2008.1.20

9

各企業で実施可能な光毒性試験(回答19社)

・ モルモットを用いた光毒性試験:	12
・ 3T3細胞を用いた光毒性試験:	9
・ 有毛マウスを用いた光毒性試験:	5
・ ヘアレスマウスを用いた光毒性試験:	3
・ ラットを用いた光毒性試験:	2
・ 光染色体異常試験:	4
・ 光Ames試験:	3
・ ヘアレスマウスを用いた皮膚光毒性試験:	2
・ 光コムトアッセイ:	1
・ 光がん原性試験:	0
・ モルモットを用いた皮膚光感作性試験:	11
・ マウスを用いた光LLNA:	3

2008.1.20

10

光安全性評価ガイドラインについて

- ガイドラインの必要性は(回答会社のうち)
 - 必要である: 92% (35/38)、必要ない: 8% (3/38)
 - 「必要ない」とした理由
 - 非臨床試験ではリスク評価が十分にできない
 - 欧米ガイドラインがあるので十分
- ガイドラインの形態は
 - ICHガイドライン: 89% (31/35)
 - 国内ガイドライン: 11% (4/35)

2008.1.20

11

皮膚光感作性試験ガイドラインについて

- 現在ある皮膚光感作性試験ガイドラインの扱い
 - 新たなガイドラインへ組み入れる: 63% (24/38)
 - 廃止し、今後も組み入れない: 26% (10/38)
 - その他: 11% (4/38)
- ヒトへの外挿性を検討したうえで、組み入れを考慮
- ICHでハーモナイズする必要性

2008.1.20

12

光安全性評価における
非臨床試験の内容に関する課題
(調査からの意見)

- 蓄積されたデータから、より適切な光毒性評価のために
 - 薬物の光吸収と局所分布についての基準を設定
 - 3T3細胞を用いた*in vitro*光毒性試験での感度の調節
 - 各種*in vivo*光毒性試験の、ヒトへの外挿性を検証
- 親化合物が290-700nm波長で非吸収でも光毒性が知られている(例: ケトプロフェン)
 - ヒトにおける主代謝物についても、吸収波長を測定する必要性

2009.1.20

13

光安全性評価における
臨床試験の位置づけに関する課題
(調査からの意見)

- 動物や*in vitro*での光安全性評価の方法では、ヒトでの反応を予想することが困難、臨床試験における、ヒトでの皮膚反応を評価することが、より適切と考える
- 通常の非臨床毒性試験において、皮膚は肉眼的にも組織学的にも評価されるため光毒性は評価可能
- 3T3細胞を用いた方法は、動物やヒトへ外挿されない偽陽性率が非常に高く、信頼性に欠ける
- 非常に多くの化合物で*in vitro*光変色体異常誘発能が偽陽性になることから、本試験の使用は限定されるか、ほとんど付加価値のないもの

2009.1.20

14

光安全性評価における
ガイドラインに関する課題
(調査からの意見)

- 早期に共通(ICH)のガイドラインの作成を望む
 - 医薬品の光安全性評価に関しては、日米欧で必ずしも一致した評価法が行われていない
- ガイドライン作りには基本的に賛成
 - ただし、試験系の妥当性(試験の精度、ヒトへの外挿性を含め)の検討が重要

2009.1.20

15

ICH 第35 章 Draft June 5, 2008.

15. 光毒性

ICHへの参加国は、光毒性試験の妥当性および試験実施のガイドラインは、以下の項目を考慮して定まらなければならない。(1) 化合物の光化学的性質(光吸収と光安定性)、(2) 科学的に期待される化合物の光毒性に関する情報、(3) 薬理作用、(4) 光毒性を誘発する曝露条件は非臨床毒性。

光毒性の可能性に関する初期評価は、薬物の光毒性に關する物理・化学的物性、*in vitro*光毒性の特性、及び曝露条件(経路と曝露条件)に基づいて行なうべきである。評価の段階、曝露条件(光毒性)のリスクが示唆された場合には、それは、皮膚臨床試験において保護対策をとることが適切である。次に、ヒトのリスクに対して異なる情報を得るために、非臨床での皮膚や眼における局所分布の検討を実施すべきである。光毒性試験は、それが適切であると考えられる場合は、大規模臨床試験(第3相試験)の開始前には実施すべきである。また、開発早期に眼/皮膚への分布を評価することや臨床での保護対策をとることの必要性を回避するために、非臨床又は臨床試験において光毒性を直接評価することもあり得る。

一般的に、1ヶ月間の光がん原性試験は医薬品開発の実行けとして有用ではないと考えられており、推奨されない。患者における光がん原性のリスクを適切に管理できるのであれば、特別な試験は推奨される。インフォームド・コンセントは必ず必要(治療観察等)に同意として記載する。『試験することが妥当であると考えるのであれば、ばつ癌以外の試験方法により光がん原性を評価することを考慮すべきであり、販売される前に完了しておくべきである。』

16

ガイドライン策定に際しての要点

- 欧米ガイドラインの模倣は避け、実効性のある内容
- データをもとにした試験法の評価が必要ポイント
 - 化合物の特性をもとにした試験実施の要否
 - 各非臨床試験の妥当性
 - ・ 3T3細胞を用いた試験の感度
 - ・ *In vivo*試験の有用性
 - ・ 光遺伝毒性試験の位置づけ
 - ・ 光がん原性試験の扱い
 - 臨床試験への外挿性
 - ・ 非臨床試験の有用性

2009.1.20

17

まとめ

- ガイドライン策定の必要性(要求度)は高い
- 光毒性試験の必要性、試験法の選択については、検討が必要
- 近年承認された医薬品での光毒性試験実施状況を調査
- 各ガイドラインとの整合性を調整
- ガイドライン(案)の作成を開始

2009.1.20

18

III. 分担研究報告 (非臨床安全性部門 2)

—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—

- 研究分担者：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）
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）
研究協力者：井上 達（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長）
小野寺博志（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 病理部）
篠田 和俊（医薬品医療機器総合機構）
中林 哲夫（医薬品医療機器総合機構）
佐神 文郎（エーザイ・日本製薬工業会）
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 安全性生物試験研究センター 病理部）
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）ガイドライン作成等を目的としている。臨床試験に必要な非臨床試験を検討する部門（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、一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。昨年度のブリュッセルおよび横浜での会合の成果を引き継ぎ、今年度は、ポートランド会合後にStep 2案の合意に至り、さらに、ブリュッセルでの会合、および引き続き開催された電話会議においてパブリックコメントを参考に、この案の修正作業が進められた。女性生殖臓器への影響評価に関する研究では、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否かを検証するために、異なる機序での卵巣毒性が予想される17種類の化学物質をラットに2および4週間反復投与し、雌受胎能試験結果と比較する検証試験を日本製薬協との共同研究として実施した。その結果、詳細な病理組織学的検査の実施など検索項目を一部改変することにより、4週間の反復投与により全ての検索物質で卵巣毒性が検出可能であった。また、一部のアルキル化剤を除き、2週間の反復投与においても卵巣毒性は検出可能であると結論した。動物実験の3Rsに関する研究では、動物実験代替法（以後、代替法と記す）に関する国際協力組織として、2008年日米欧カナダの4局により、代替法協力国際会議（ICATM：International Cooperation on Alternative Test Methods）が設立された。日本における新規代替法の開発及び公定化を目指すために、新規試験法評価室を

中心とする活動団体JaCVAM (Japanese Center for the Validation of Alternative Methods) が ICATMの設立に協力した。

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、卵巣毒性、検証試験、反復投与毒性試験、受胎能試験、動物実験の3Rs、化粧品、動物実験代替法、ICCR (International Cooperation on Cosmetics Regulations)、ICATM (International Cooperation on Alternative Test Methods)

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等を目的とする。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ており、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) が一昨年度よりスタートしている。この修正案 (M3 (R2)) は、タイミングのみならず、臨床試験および販売申請に必要な非臨床試験の内容の規準を定めるものである。今年度は引き続き修正案の作成を進めることを目的とした。

女性生殖臓器への影響評価に関する研究では、現行の医薬品のガイドラインのうち、妊娠可能な女性を臨床試験に組み入れるために必要な非臨床試験の実施時期は三極間での相違が大きく、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た。日本は、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雌受胎能と胚/胎児への影響評価を完了すべきとして、EUおよび米国より厳しい考えを示してきた。日本が最も厳しい考えを示してきたガイドラインを欧米に合わせて修正するためには、その根拠となるべき科学的裏づけが必要ではないかと考える。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、卵巣への影響評価法が確立されていない状況では、現行の一般毒性試験で雌受胎

能への影響が十分に検出されていない懸念が存在する。昨年度の文献調査結果より、既知の作用機序を示す卵巣毒性物質の多くは、ラットを用いた反復投与試験に生殖生理学に基づいた検査項目を加えることにより、それらの卵巣毒性を検出可能であると推察するに至った。この反復投与毒性試験により卵巣毒性が検出可能であるという推察を検証するために、昨年度末に毒性発現機序の異なる卵巣毒性物質17剤をラットに2および4週間反復投与する検証試験を製薬協との共同研究として開始した。また同じ化合物を用いて雌受胎能試験を同時に実施し比較した。本年度はこれらの検証試験から得られた結果を解析し、卵巣毒性が2あるいは4週間の反復投与で検出可能か考察し、一般毒性試験にどのような改良が必要か検討した。

動物実験の3Rsに関する研究では、厚生労働省、米国医薬食品庁 (FDA)、カナダ厚生省、欧州 (EU) 委員会企業産業総局が2007年9月26~28日にベルギー、ブリュッセルにて化粧品に関する規制会議を開催した。これを「化粧品規制協力国際会議」(International Cooperation on Cosmetics Regulations, ICCR) と呼ぶ。この会議は化粧品の安全性を、国際協力を通じて確保するための情報交換の場となるものであり、第1回会議 (ICCR-1) の具体的な議題の一つとして、「化粧品成分の安全性評価と動物実験代替試験法 (以後、代替法と記す)」が挙げられた。続いて、2008年7月30日~8月1日に米国メリーランド州ロックビルでICCRの第2回会合 (ICCR-2) が開催され、それぞれの地域の化粧品業界団体と対話しつつ、化粧品関連の問題の一つとして代替法について議論がなされた。この会議において、ICCRは動物

実験の3Rs（削減、洗練、代替）についての協力を推進するためのワーキンググループである代替試験法協力国際会議（International Cooperation on Alternative Test Methods；ICATM）を設立した。ICCRの規制当局は、ICATMの枠組についての案を確定し、2009年3月に各当局により承認した。

一方、2007年10月、EU委員会と米国FDAは代替法の開発において協調を結ぶべく文書を交わしており、ICATM設立は化粧品の安全性確保のための代替法確立という枠を超えた国際協調が進みつつある。この理由として、EUでは化粧品における動物実験の規制以外にもREACH（Registration, Evaluation, Authorisation and restriction of Chemicals）における安全性の再評価に対応するため、多くの代替法を早急に開発しなければいけない事情がある。一方で、代替法の開発や評価に関する人材や資金が限られているにも関わらず、日米欧が同じ試験法について独自に重複してバリデーション研究や専門家による第三者評価（以後、第三者評価と記す）を行うという危惧を回避する意図がある。

B. 研究方法

一昨年度、M3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。

女性生殖臓器への影響評価に関する研究では、検証試験は製薬協から18社が共同研究に参加した。検索物質には、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17化合物を選択した。今回の検証試験では、最低限の共通の試験設計および検査項目を設定した。検索物質には、ラットに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、以下の改良項目を設定した。

- 1) 動物の系統：各参加企業で背景データの豊富な系統を選択した。
- 2) 動物数：反復投与毒性試験、受胎能試験とも1群最低10匹を用いた。
- 3) 開始週齢：反復投与毒性試験は6週齢までに、雌受胎能試験では10週齢までに試験に供した。
- 4) 検索物質：作用機序から卵巣毒性をホルモン作用物質、小卵胞障害物質、卵巣の代謝を障害する物質および中枢を介して卵巣を障害する物質の4つのカテゴリーに分類した。
- 5) 用量設定：3用量を設定。高用量は文献検索および企業内データより卵巣毒性検出が予想される用量を設定し、低用量には卵巣毒性が観察されないと予測される用量を設定した。
- 6) 観察項目：可能な限り反復投与毒性試験について性周期のチェックを膣スミア像により判定した。
- 7) 病理組織学的検査：検査器官は卵巣だけでなく、ホルモン関連臓器である下垂体、子宮、膣および乳腺について検索した。卵巣は最大面が切片上に載るように、体軸方向に垂直に切り出した。通常の方法で包埋、薄切し、ヘマトキシリン・エオジン（HE）染色を施して鏡検した。小卵胞の検出を容易にするためにproliferating cell nuclear antigen（PCNA）抗体を用いた免疫組織化学染色を行った（Muskhelishvili *et al.*, 2005）。

病理組織学観察および組織所見の統一：卵巣の卵胞および黄体などの組織用語および病理組織学的診断基準について、参加企業の病理担当者で試験開始前より病理検査開始まで数回の全体打ち合わせ会議を開き統一を図った。さらに試験終了後、病理組織学的検査結果についてピアレビューを行い、卵巣の

変化について確認を行った。

動物実験の3Rsに関する研究の進め方は以下の通りである：

1) ICATMの初期メンバー

米国 NICEATM (National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods) / ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods)、EUのECVAM (European Center for the Validation of Alternative Methods) / ESAC (ECVAM Scientific Advisory Committee)、カナダ厚生省及び新規試験法評価室を中心とする活動団体JaCVAM (Japanese Center for the Validation of Alternative Methods) である。

2) ICATMに関する会議

①2008年2月 ICCVAM10周年講演会終了後(米国メリーランド州ベセスダ)

それぞれの組織がバリデーション研究、第三者評価の手順について説明し、今後の協調に関する道を探った。

②2008年3月 47th SOT (米国トキシコロジー学会) 期間中(米国ワシントン州シアトル)

ECVAMの代表であるDr. T. Hartungが細部にわたる米国案を拒否した。

③2008年4月 ICCR 専門家会議(米国メリーランド州ベセスダ)

ECVAMの代表がDr. T. HartungからDr. V. Zangに代わり、これまでの交渉が振り出しに戻した。それぞれの情報交換及び枠組みについて意見交換した。

④2008年6月 SACATM (ICCVAM顧問会議) 終了後(米国ノースカロライナ州リサーチトライアングル)

ECVAM参加者が本件の非関係者であり、情報の交換に留まった。

⑤2008年7月 ICCR-2 (米国メリーランド州ロックビル)

ICATM枠組み案について合意した。しかし、Dr. W. Stokes : NICEATM及びDr. V. Zang : ECVAMが欠席したため、会議後の合意内容に若干の食い違いが生じたが、以後のメール会議で補正した。

⑥2009年11月 29th ESAC終了後(ベルギー、ブリュッセル)

ECVAMの新しい代表として、Dr. J. Kraynak及びECVAM上部機関JRC (Joint Research Center) の代表Dr. E. Anklamが議論に加わり、ICCVAMの第三者評価の手順を基本としてさらなる意見交換を継続することに合意した。

日本においては、JaCVAMがすべての会議に出席し、ICATMの設立に協力した。

C. 研究結果

1. 医薬品の臨床試験と販売申請に必要な非臨床試験に関する研究 -概説-

6月のポートランド会合に先だて、この会合における論点を確認する目的で、電話会議が5月22日に開かれた。ラポーターであるPhRMAのDeGeorge博士より、“ワクチンのアジュバントについてガイドラインに述べること、ただし、一般の医薬品向けの試験項目は省略するか、異なったものとする”、が提案された。ポートランドで話を深める必要がある項目としては、FDAより、“ガイドライン案文書の内容を補強するための追加データの必要性”、および、“小児用医薬品に必要なデータの取得は1種のげっ歯類に限るべきであり、霊長類を用いるべきではない”、ことが提案された。JPMAからは、“早期探索型臨床試験の用量は毒性試験のデザインの変更により選択すべきであること”、“CTDについては本来のフォーマットに沿ったものにする”、および、“短期試験では臨床用量の50倍まで、慢性試験では30倍、急性毒性試験では30倍までとすること”、が提案された。EFPIAのメンバーであるLundeen博士からは、“光毒性についての記述を簡略化すること”が提案され、また、免疫毒性および乱用性についても修正が必要との指摘がなされた。ポートランド会合においては、ガイドラインの正式な第一案である、Step 2を到達目標であることの確認がなされ、そのためには、“すべての項目が完璧である必要はなく、明瞭性を欠いたままであってもStep 4までに仕上げればよい”、という観点で、ポートランドでの合意を目指すこととした。さらに、ポートランド会合の議題および協議日

程についての確認がなされ、上記の問題点等を迅速に解決するために、Lundeen博士に加え、FDAのJacobs博士が事前の対応に当たることとなった。

ICHポートランド（オレゴン州）会合は6月2日から5日にかけて行われた。

第1日目（2日）

M3の現行案について文頭より見直しを行った。その結果、文章の表現をより適切とするための大幅な変更が加わった。

第2日目（3日）

前日に続きM3ガイドライン案の見直しおよび訂正を行った。光毒性等、新しく加わったトピックに関して合意が得られた。また、文書中の早期探索型臨床試験について項目を仕上げた。この項目の文章をより適切にするための修正に関して合意が得られた。

第3日目（4日）

すべての項目について合意がなされ、文章をより適切にするための最終的な見直しを始めた。

第4日目（5日）

引き続き、最終的な文書をより適切にするための見直しおよび訂正を行った。M3ガイドライン案の遺伝毒性に関する部分のタイミングと文章の修正について、遺伝毒性のガイドラインのEWGであるS2のメンバーの同意を得た。

ポートランド会合後に行う作業として、1) FDAの弁護士によるガイドライン案の法的な見直し、2) 法的に見直された用語等についての合意を電話会議で得る、3) Step 2の合意署名を郵便にて行う、4) パブリックコメントを公募する体制をととのえる、ことが運営委員会で報告され、郵便による合意署名、および、11月のブリュセルにおけるM3の会合の設定が認められた。

また、この報告では、ガイドラインの目標の一つとして、“動物および他の資源の不必要な使用の削減（いわゆる3Rsの原則）を促進すること”、が掲げられ、以下のことが今回の会合の成果として列挙された：

・統括的なハーモナイゼーションによるreduction（軽減、削減）およびrefinement（手法の洗練化、

苦痛の回避）の達成

- ・独立した急性毒性試験の削除（reduction）
- ・反復投与毒性試験について、有用性の高い試験計画の達成に必要な暴露および投与量の上限の設定（反復試験のrefinementおよびreduction）
- ・臨床試験支援に必要な動物使用数の削減、および毒性試験の洗練化に資する早期探索型臨床試験の項目の新設（reductionおよびrefinement）
- ・局所刺激性を単独の試験として計画しないことを推奨
- ・生殖毒性試験を後期開発段階まで延期することによる、脱落候補化合物についての試験の回避（reduction）
- ・小児用の医薬品に関しては、幼若動物を用いる毒性試験を常時行うことを回避し、必要となる場合を最小限とした（reduction）。
- ・推奨されている光発ガン性試験は、一般的に言って、医薬品の開発には役立たない（reduction）。
- ・薬物乱用性については、霊長類ではなく上限量を定めたげっ歯類の使用を優先（reductionおよびrefinement）
- ・配合比が一定の固定配合剤については、1種類の動物の使用に限ることとし、通常はげっ歯類を用いる。

ポートランド会合後、ラポーターのDeGoerge博士よりFDAからの法的なコメントが加わったM3ガイドライン案がメール添付にて6月10日に配布された。当初、この案に対する意見交換を16日の電話会議で行った後、Step 2合意の手続きを始めることとされていたが、DeGoerge博士より、この案に2つの修正（法的コメントに従ってなされたstatementsとsentencesの使い分けを元に戻す；残されたままになっている最後の3つの文献を削除する）を加えたものを最終案として各極が認めるのであれば、電話会議を回避し、合意手続きに入るという提案がなされた。この提案に対し6極すべてが支持を表明したため、電話会議は回避された。その後、JPMAの山本氏よりガイドライン案の細かい修正すべき点がいくつか指摘され、これを含めた案がStep 2案として、ICHの運営委員会に25日に提出された。運営委員会

はこれを受けて、6極に対してStep 2ガイドライン案と合意署名のための書類の郵送を行った。すべての合意署名を入手した運営委員会は、7月4日、M3修正ガイドラインStep 2案が最終合意に達したことを報告した。

成立したStep 2はJPMAのメンバーにより和訳案作成がなされ、これにMHLWのメンバーによる修正を加えた最終和訳案が7月7日にICHのMHLW統括責任者に送付された。この和訳案をもとにパブリックコメントの公募が8月下旬まで、約1か月半行われた。その結果、JPMAから90、JPMA以外から44のコメントが寄せられた。

これらのパブリックコメントに対応するため、研究協力者を含む班会議が9月22日に開催された。この班会議で、各コメントの採否が逐一検討され、採用されたコメントについてMHLW側の意見として18の項目に分けてブリュッセル会合に提案することとなった。また、JPMAは提出したコメントの自主検討を行い、MHLWとは別に60のコメントを提案することとした。

その後、Step 2以降ラポーターをDeGoerge博士から引き継いだFDAのJacobs博士を通じて、欧米の各極に寄せられたパブリックコメントが配布された。ブリュッセルではM3部門は11月10日から14日までの4日間話し合いを持つことが8月28日の段階で決まっていたが、コメントの多さなどから、Jacob博士は11月7日の段階で、ブリュッセルにおいてガイドライン最終案であるところのStep 4に達するのは困難であるという見解を示した。

ICHブリュッセル会合のM3部門は予定通り11月10日から14日にかけて開催された。

第1日目（10日）

EWGが最重要であると判断した以下の事項について協議が行われた：

- 1) 薬理試験の項目への薬力学についての記載
- 2) 薬物動態の項目へのヒトと実験動物との間で不釣り合いな差が認められる代謝物についての試験のタイミングに関する記載
- 3) 毒性試験一般における最大用量の記載を一般原則の項目へ移動。

引き続き、ガイドライン案の最初の4つの項目について、6極からのコメントの精査を開始した。第2日目（11日）

毒性試験一般における最大用量に関する記載について修正を加えた：

- 1) げっ歯類における最大用量を2000から1000 mg/kg/日に削減した。
- 2) ヒトへの暴露量の50倍を最大用量とすることを確立し、これは第2相試験までの期間についてはハーモナイズされた。
- 3) 暴露量の50倍の安全域の用量設定は第3相試験の前までとすることについては、地域的な例外規定があるが、しかし、この例外規定によって影響を受ける医薬品の数は非常に少ない。

引き続き、ヒトと実験動物の間で不釣り合いなほど大きな濃度差が認められる代謝物の性質を調べる試験について、および、不純物の性質を調べる試験について文案を作成した。さらに、ICH S2ガイドラインStep 2案に言及する遺伝毒性試験の項目について、タイミングに関する協議を行った。第3日目（12日）

まず、中間会議が望まれるかどうかについて協議を行った。引き続き、6極からのコメントおよびパブリックコメントを精査した：

- 1) 生殖毒性試験の項目について協議した。
- 2) 薬物乱用性に関する項目について協議した。
- 3) 文章がより適切となるよう修正を加えた。

第4日目（13日）

光毒性試験および小児医薬品に関する項目について協議し、文章がより適切となるよう修正を加えた。さらに、ブリュッセル会合後の電話会議の日程として、2009年の1月6日、8日、13日（米国東部時間；午前6時から8時）を選び出した。運営委員会への報告においては、以上の内容とともに、今後すべき対応として：

- 1) EFPIAが電話会議を準備し、PhRMAが会議用の電話番号の支援を行う、
- 2) 2009年1月に行われるこの電話会議で十分な進展が得られなかった場合、FDAがRockville（メリーランド州）に所有する施設において2009年3月

9～13日の週に中間会議を開くよう準備を行うことを提案した。運営委員会は必要な場合には中間会議を開くことを承認した。これらの追加会議計画は、2009年の上半期に行われる横浜会合においてStep 4に達することを目的としている。

また、3Rsに関して達成した内容としては、前回のポートランド会合とほぼ同じであったが、反復投与毒性試験に関する記述が以下のように変更された：

- ・反復投与毒性試験について、有用性の高い試験計画の達成に必要な暴露および投与量の上限が設定された（反復試験のrefinementおよびreduction）。第2相臨床試験までの動物実験における高用量として、ヒトへの暴露の50倍とすることについて一致をみている。米国においては、ヒトへの最初の投与までに行うこととされていた試験が第3相の前まで猶予されることとなり、これにより80%の薬物が開発から落とされるようになっていく。これまで約10%の薬物に必要とされていた試験計画が、現在では推定1%未満の薬物のみが必要とされている。

電話会議の結果

先に合意されたように、日本時間の1月6日、8日および13日の午後8時より10時半にわたり、電話会議が開催された。会議では探索的臨床試験についてのコメントについて検討した。まず、本文中では概要について述べる事とし、試験の詳細については表に記載する事とした。また、主に以下のような修正がなされた。なお、電話会議でも検討できないところが多く残ったことから、横浜でのステップ4の合意を達成するために、3月にワシントンで中間会議を開催することとされた。

- 1) Approach 1から5以外にも別の道もあるとし、そのような場合には行政と相談することとした。
- 2) マイクロドーズ試験実施に必要な拡張型単回投与毒性試験の最高用量としては、予想臨床用量の1000倍（ivではmg/kg体重、poではmg/m²体表面積）で良いとされた。
- 3) *In vitro* target/receptor profilingはApproach 3の準治療用量又は推定治療用量までの単回投与臨床試験

でも必要とされた。

- 4) 7.2項の題がSingle Dose Studies up to Sub-therapeutic or Intended Therapeutic RangeからSingle Dose Studies at Sub-therapeutic Doses or into the Anticipated Therapeutic Rangeに修正された。
- 5) 7.2項に作用標的や薬理作用の探索も目的に含まれる事が明記された。
- 6) 7.3に示されたApproach 4及び5の定義に臨床用量での試験であることが明記された。
- 7) *in vitro*の標的受容体のプロファイリングが必要であることが、Approach 3、4、5にも明記された。

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

—女性生殖臓器への影響評価に関する研究—

今回の検証試験の結果について以下にまとめた。

- 1) ホルモン様作用を示す化合物Hormone analogues
ホルモン様作用を示す物質としてprogesterone作用を示すmedroxyprogesterone acetate、プロゲステロン受容体アンタゴニストであるmifepristone、エストロゲン受容体アンタゴニストであるtamoxifenを用いて検討した。その結果、全ての化合物で明らかな卵巣および雌生機能への影響が2および4週の反復投与毒性試験と受胎能試験ともに認められた。影響の感受性はtamoxifenについては受胎能試験で高かったが、その他の2化合物では同様であった。
- 2) 小卵胞へ障害を及ぼす化合物Primordial follicle damaging agents
小卵胞を障害する化合物として、Group 2B 発がん物質である4-vinylcyclohexene diepoxide (VCD)、抗がん作用を有するアルキル化剤である busulfan、cyclophosphamideおよび抗がん剤cisplatinについて検討した。その結果、4週間反復投与毒性試験および雌受胎能試験で影響が検出されたが、busulfan およびcyclophosphamideについては2週間反復投与で毒性を検出することができなかった。小卵胞の減少が、VCD、busulfan、cisplatin投与により誘発された。PCNA免疫組織化学染色により、小卵胞を簡便且つ感度よく確認することができた。今回使用したcyclophosphamide投与量においてリンパ系器官に重

篤な毒性が認められ本試験の目的から設定量以上の投与は困難であった。Busulfanについても全身への毒性が認められた。卵巣影響の感受性はVCDおよびcisplatinの4週間反復投与の方が雌受胎能試験より高かった。また、このカテゴリーの化合物は性周期に影響を及ぼしにくいという共通の特徴を有していた。

3) 卵巣の代謝を障害する化合物Metabolic imbalance inducers

卵巣の代謝等を障害する化合物として、アロマターゼ抑制により抗腫瘍効果を示すanastrozole、可塑性剤であるdi (2-ethylhexyl) adipate (DEHA) およびdi- (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP)、有機溶剤のethylene glycol monomethyl ether (EGME)、COX-1、2インヒビター、NSAIDであるindomethacinおよびPPAR α/γ デュアルアゴニスト作用を有する開発剤compound Xについて検索した。その結果、全ての化合物の2、4週間反復投与毒性試験において卵巣毒性が検出可能であった。雌受胎能試験については、indomethacinにおいて生殖機能への影響を検出することができなかった。しかし、今回使用したindomethacin投与量において重篤な消化管の潰瘍形成が認められ、本試験の目的から設定量以上の投与は困難であった。多くの化合物で共通に観察された卵巣の変化は、大型の閉鎖卵胞の増加であった。Indomethacinおよびcompound Xは排卵時のグラフ卵胞の破裂を抑制した。

4) 中枢を介して卵巣を障害する物質Endocrine imbalance inducers

中枢を介して卵巣を障害する物質として、除草剤で内分泌攪乱化学物質であるatrazine、ドーパミンアゴニストbromocriptine mesylate、D2、5-HT_{2A} H1、 α 1-アンタゴニストであるchlorpromazine hydrochloride、およびD2アンタゴニストであるsulpirideを選択した。結果として、全ての化合物の2、4週間反復投与毒性試験および雌受胎能試験において、卵巣毒性および生殖機能への影響が検出可能であった。卵巣影響への感受性は化合物により異なり、atrazineでは雌受胎能試験、sulpirideでは反復投与毒性試験で感受性が高かった。

3. 動物実験の3Rsに関する研究

それぞれのバリデーション組織間の国際的な協力、共同研究、交信を促進するため、ICATMの枠組は次の重要な分野の協力について言及している。

1) 適切な計画を立案し、バリデーション研究を運営

規制試験に提案される代替法の国内及び国際規制の決定事項を支援する。

2) 科学的な第三者評価システムの確立

透明性及び利害関係者のための機会を供給する。

3) 代替法の正式な試験法勧告の策定

代替法の迅速な国際的採択及び多大なる努力と手段により成される資源に限定された成果及び影響力の重複を避ける。

以上の内容を盛り込んだ文書を作成し、最終的な合意を行った。

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、ポートランド会合後にStep 2に達することができた。その後のパブリックコメントの募集で、相当数の意見が寄せられたため、当初の予定であったブリュッセル会議でのStep 4到達は不可能となった。これは、早期探索型臨床試験をはじめ、多くの新しい項目がガイドラインに加わったことによる相互理解の不足とガイドライン内の一貫性の若干の不備によるところが大きいと考えられる。多数のコメントに精査を加える作業は容易ではない。しかし、今後3月に開かれる中間会議を経ることにより、今回の横浜会合ではStep 4に達する見込みはきわめて高いと考えられる。

女性生殖臓器への影響評価に関する研究では、反復投与毒性試験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、機序の異なる卵巣毒性物質をラットに2および4週間反復投与し、雌受胎能試験と比較する検証試験を日本製薬協との共同研究により検討した。生殖生理学に基づいた雌生殖器に対する注意深い病理組織学検査観察、小卵胞検出のためのPCNA免疫組織化学染色および性周期観察を一般毒性試験に追加することにより、卵巣毒性評価

法の向上を目指した。

今回の検証試験の結果、全ての検索化合物の4週間反復投与により卵巣毒性が検出可能であった。このうち、小卵胞障害物質に分類した2種類のアルキル化剤busulfanおよびcyclophosphamideの2週間反復投与では卵巣への影響を病理組織学的に検出することができなかったが、両化合物において全身への影響が認められたことから、投与量の設定には適切であると考えられた。これらのアルキル化剤は、薬理作用から卵巣毒性が容易に疑われる。したがって、薬理作用などの情報収集も卵巣毒性の予測に有用であると考えられた。

Indomethacinを除く16化合物で雌受胎能に対する毒性が検出された。反復投与毒性と雌受胎能試験との感受性の比較の結果、感受性は作用機序による違いではなく、化合物によって異なっていた。複数の用量群を設定することによって卵巣への影響は検出可能であると考えられた。

今回の検証試験において注目すべき点として、病理標本作製として採用した卵巣の最大断面による形態計測を行わない質的な観察により、全ての検索物質で卵巣毒性を検出できたことは、病理組織学的検査が卵巣毒性検出のよい指標であることを示していた。とくに、卵胞形成、視床下部・下垂体・性腺軸とホルモン依存性臓器の内分泌学的関連性など生殖生理学への理解に立脚した詳細な病理組織学的検索は卵巣毒性の検出に有用であると考えられた。卵巣毒性のうち、小卵胞は再生されないことから小卵胞への影響は重篤である。PCNA免疫組織化学染色は小卵胞を効率よく検出できる方法であり、小卵胞の障害を検索する上で有用な指標であることが確認された。上述のごとく一部のアルキル化剤では2週間の反復投与で卵巣毒性が検出できなかったことは、今後の検討すべき課題であると考えられる。しかし、反復投与により今回検索した全ての化合物で卵巣毒性が検出できたことは、今回用いた検査方法が卵巣毒性検索の第一段階としては有用であることを示しており、卵巣毒性の懸念が短期の反復投与により示された場合は、さらに詳細な検討を実施すべきであろう。

動物実験の3Rsに関する研究については、ICCR-1では、「化粧品成分の安全性評価と代替法」として議題があげられ、ICCR-2にてICCRがICATMを設立した。しかし、ICATMの合意書には化粧品の安全性確保のためという目的は記載されておらず、ICATMはICCRから離れた組織になりつつある。

これらの事情から、ICATMは2009年の化粧品規制のみを対象としていない。よって、ICATMに関する枠組みの議論が中心で、具体的な試験法の議論が始まっていない。

このような中、2008年10月OECDよりICATMに関する質問状が、各国の代表施設に届いた。ICATMとOECDの関係を明確にするよう求める内容であり、OECD事務局もその存在のあり方に警戒をしているようである。

来年度は、2009年3月以降に5回回のICATM会議が予定されており、細部の枠組みに関する議論及びOECDガイドラインとの位置付けに関する意見交換がなされると考えられる。一方で、情報の共有化という点で、種々の試験法において具体的な国際的な協調が進みつつあり、日本への協力要請数も増している。早急な国内の協力体制の構築が必要と考えている。

E. 結論

本年度は医薬品の臨床試験および販売申請に必要な非臨床試験に関する改正ガイドライン案(M3R2)の作成において、Step 2に達するなど、大きな進展があった。公募により集まったパブリックコメントはかなりの数であるが、今後の追加会議を経ることににより、次回の横浜会合でStep 4に達すると考えられる。

女性生殖臓器への影響評価に関する研究では、詳細な病理組織学的検査の実施等検索項目を一部改変することにより、4週間の現行の反復投与で全ての検索物質の卵巣毒性が検出可能であった。一部のアルキル化剤を除き2週間の反復投与においても卵巣毒性は検出可能であると結論した。今回の検証試験の全ての試験結果および総括は、本年2月にJournal of Toxicologic Sciencesの特集号として掲載される。

動物実験の3Rsに関する研究については、代替法

における国際協力組織として、2008年日米欧カナダの4局により、ICATMが設立された。日本における新規代替法の開発及び公定化を目指すため、JaCVAMもICATMの設立に協力した。今後、この組織を中心に代替法の開発及び公定化が進むことになろう。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Sato, K., Saito, Y., Oka, J., Ohwada, T. and Nakazawa, K. Effects of tamoxifen on L-glutamate transporters of astrocytes. *J. Pharmacol. Sci.* 107, 226-230 (2008)
 - 2) Nakajima, M., Mitsunaga, K., Nakazawa, K., Usami, M. In vivo/in vitro study in rat embryos on indium-caused tail malformations. *Reprod. Toxicol.* 25, 426-432 (2008)
 - 3) Horiuchi, S., Hongo, T., Ishikawa, Y., Miyajima, A., Sawada, J., Ohno, Y., Nakazawa, K., Ozawa, S. Global gene expression changes including drug metabolism and disposition induced by three-dimensional culture of HepG2 Cells - involvement of microtubules. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, in press
 - 4) 大野泰雄：薬学研究における動物実験代替法研究の重要性とその問題点。薬学雑誌 128 (5) 735-740、2008。
 - 5) Yoshida M., Watanabe G, Suzuki T, Inoue K, Takahashi M, Maekawa A, Taya K, Nishikawa A.: Long-Term Treatment with Bromocriptine Inhibits Endometrial Adenocarcinoma Development in Rats. *J. Reprod. Dev.* 2008 In press.
 - 6) Sanbuissho A, Yoshida M., Hisada S., Sagami F, Kudo S, Kumazawa T, Ube M, Komatsu S, Ohno Y.: Collaborative work on evaluation of ovarian toxicity by repeated dose and female fertility studies in rats. *Journal of Toxicologic Sciences*, 2009 In press.
 - 7) Yoshida M., Sanbuissho A, Hisada S, Ohno Y., Nishikawa A.: Morphological characterization of the ovary under normal cycling in rats and its viewpoints of ovarian toxicity detection. *Journal of Toxicologic Sciences*, 2009 In press.
 - 8) 小島肇夫：バリデーションについて、最新動物実験代替法、技術情報協会pp.267-273 (2007)
 - 9) 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)
 - 10) 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)
 - 11) 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)
 - 12) 小島肇夫：JaCVAMの設立と使命、日皮協ジャーナル、57、129 (2007)
 - 13) 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 (2008)
 - 14) Kojima, H. : JaCVAM: An organization supporting the validation and peer review of new alternatives to animal testing, WC6 proceedings, accepted (2008)
- ### 2. 学会発表
- 1) 中澤憲一：“ICH-M3 (R2) Step 2 ガイドラインの概要-単回投与、反復投与試験を中心に-”、日本トキシコロジー学会学術年会；2008年6月
 - 2) 大野泰雄：探索的臨床試験の投与用量設定についてのコメント。第二回APDDミニシンポジウム (2008.5.24) 東京
 - 3) 大野泰雄：ICH-M3ガイドライン案の改訂ポイントと実施上の課題 —はじめに—。日本トキシコロジー学会 (2008.6.28) 東京
 - 4) 大野泰雄：非臨床試験法を巡る新たな流れ—JaCVAMの活動を中心に—、薬剤師研修センター平成20年度GLP研修会プログラム；2008年11月
 - 5) 大野泰雄：マイクロドーズ臨床試験指針と早期探索的臨床試験への期待、第28回日本臨床薬理学会年会；2008年12月

- 6) A. Sanbuissho, M. Yoshida, S. Hisada, F. Sagami, S. Kudo, T. Kumazawa, M. Ube, S. Komatsu, Y. Ohno : Collaborative work to evaluate ovarian toxicity by repeated dose and female fertility studies in rats, SOT; 2009年3月
- 7) M. Yoshida, A. Sanbuissho, S. Hisada, M. Takahashi, Y. Ohno, Akiyoshi Nishikawa: Collaborative work to evaluate ovarian toxicity by repeated dose and female fertility studies in rats: Morphological characteristics of normal cycling ovary in rats and their viewpoints for ovarian toxicity detection, SOT; 2009年3月
- 8) 大野泰雄: ICH-M3ガイドライン案の改訂ポイントと実施上の課題. 第35回日本トキシコロジー学会学術年会ワークショップ 5, 平成20年6月28日、東京
- 9) Midori Yoshida: Chemically induced toxicities of the ovary, uterus, cervix and vagina. National Toxicologic Program Workshop on Pathology of the Reproductive Tract. 平成20年10月29日 米国ノースキャロライナ
- 10) 吉田緑: 性周期から見たげっ歯類卵巣の形態学的特徴とPCNAの有用性 (HEとPCNA). ワーキンググループからの報告-卵巣毒性-. 第9回日本毒性病理学会教育セミナー、平成20年11月8日、東京
- 11) 吉田緑、井上薫、高橋美和、西川秋佳. 正常性周期におけるラット卵巣の形態学的特徴. 第25回日本毒性病理学会学術年会 平成21年1月27日 浜松
- 12) Kojima, H. : JaCVAM Update, Scientific Advisory Committee on Alternative Toxicological Methods, Bethesda (June, 2007)
- 13) Kojima, H. : JaCVAM Update, 6th World Congress on Alternatives 6 Animal Use in the Life Sciences, p.119, Tokyo (2007)
- 14) 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, p.82, Tokyo (2007)
- 15) Kojima, H. : Validation study using Japanese models, 6th World Congress on Alternatives 6 Animal Use in the Life Sciences, p.64, Tokyo (2007)
- 16) Kojima, H. : JaCVAM Update, ECVAM Scientific Advisory Committee, Ispra (November, 2007)
- 17) 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 第2回教育セミナー、東京 (2007)
- 18) 小島 肇: 動物実験と代替法の現状、城西大学生命科学センター講演会、城西大学 (2007)
- 19) 小島 肇: EUにおける動物実験代替法の現状とREACH対策、日皮協・会員研究会、京都 (2007)
- 20) Kojima, H., et al : Validation and implementation, Round table on International aspects of validation & accept, Regulatory Acceptance and Implementation of 3R approach, Annual Conference 2007 EPAA, Brussels (2007)
- 21) Kojima, H., et al : Panel Discussion, ICCVAM Ten-Year Anniversary Symposium, Washington DC (2008)
- 22) 小島 肇: 日本の動向とJaCVAMの活動、JaCVAM第1回ワークショップ「昨今の試験法ガイドラインを巡る国際動向」、東京 (2008)
- 23) Kojima, H. : Report JaCVAM, ECVAM Scientific Advisory Committee, Ispra (May, 2008)
- 24) 小島 肇, REACH対応と動物実験代替法、第128回FJセミナー、東京 (2008)
- 25) Kojima, H. : Methods, North Carolina, (June, 2008)
- 26) Kojima, H. : JaCVAM Update, ECVAM Scientific Advisory Committee, Brussels (November, 2008)
- 27) 小島 肇: *in vitro*毒性試験の光と影、日本環境変異原学会第37回大会、沖縄 (2008)
- 28) 小島 肇: 毒性試験における培養細胞の利用、医薬安全性研究会 2008年冬のセミナー、東京 (2008)
- H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

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 －女性生殖臓器への影響評価に関する研究－

研究分担者：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否かを検証するために、異なる機序での卵巣毒性が予想される17種類の化学物質をラットに2および4週間反復投与し、雌受胎能試験結果と比較する検証試験を日本製薬協との共同研究として実施した。その結果、詳細な病理組織学的検査の実施など検索項目を一部改変することにより、4週間の反復投与により全ての検索物質で卵巣毒性が検出可能であった。また、一部のアルキル化剤を除き、2週間の反復投与においても卵巣毒性は検出可能であると結論した。

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、検証試験、反復投与毒性試験、受胎能試験

A. 研究目的

現行の医薬品のガイドラインのうち、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実施時期は三極間での相違が大きく、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た。日本は、いずれの臨床試験においても妊娠可能な女性を臨床試験の組み入れ前に雌受胎能と胚/胎児への影響評価を完了すべきとして、EUおよび米国より厳しい考えを示してきた。日本が最も厳しい考えを示してきたガイドラインを欧米に合わせて修正するためには、その根拠となるべき科学的裏づけが必要ではないかと考える。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、卵巣への影響評価法が確立さ

れていない状況では、現行の一般毒性試験で雌受胎能への影響が十分に検出されていない懸念が存在する。昨年度の文献調査結果より、既知の作用機序を示す卵巣毒性物質の多くは、ラットを用いた反復投与試験に生殖生理学に基づいた検査項目を加えることにより、それらの卵巣毒性を検出可能であると推察するに至った。この反復投与毒性試験により卵巣毒性が検出可能であるという推察を検証するために、昨年度末に毒性発現機序の異なる卵巣毒性物質17剤をラットに2および4週間反復投与する検証試験を製薬協との共同研究として開始した。また同じ化合物を用いて雌受胎能試験を同時に実施し比較した。本年度はこれらの検証試験から得られた結果を解析し、卵巣毒性が2あるいは4週間の反復投与で検出可能か考察し、一般毒性試験にどのような改良が必要か検討した。

B. 研究方法

この検証試験は製薬協から18社が共同研究に参加した。検索物質には、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17化合物を選択した。毒性発現機序により分類した検索物質の各カテゴリーと検索物質および担当した企業の一覧をTable 1に記す。

今回の検証試験では、最低限の共通の試験設計および検査項目を設定した (Table 2)。投与時期および検査項目を記した一般毒性試験の試験計画をFig. 1に、雌受胎能試験計画を Fig. 2に示した。検索物質には、ラットに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、以下の改良項目を設定した。

- 1) 動物の系統: 各参加企業で背景データの豊富な系統を選択した。
- 2) 動物数: 反復投与毒性試験、受胎能試験とも1群最低10匹を用いた。
- 3) 開始週齢: 反復投与毒性試験は6週齢までに、雌受胎能試験では10週齢までに試験に供した。
- 4) 検索物質: 作用機序から卵巣毒性をホルモン作用物質、小卵胞障害物質、卵巣の代謝を障害する物質および中枢を介して卵巣を障害する物質の4つのカテゴリーに分類した。
- 5) 用量設定: 3用量を設定。高用量は文献検索および企業内データより卵巣毒性検出が予想される用量を設定し、低用量には卵巣毒性が観察されないと予測される用量を設定した。
- 6) 観察項目: 可能な限り性周期を反復投与毒性試験について性周期のチェックを膣スミア像により判定した。
- 7) 病理組織学的検査: 検査器官は卵巣だけでなく、ホルモン関連臓器である下垂体、子宮、膣および乳腺について検索した。卵巣は最大面が切片上に載るように、体軸方向に垂直に切り出した。通常の方法で包埋、薄切し、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色を施して鏡検した。小卵胞の検出を容易にするためにproliferating cell nuclear antigen

(PCNA) 抗体を用いた免疫組織化学染色により卵細胞を染色した。(Muskhelishvili *et al.*, 2005)。

- 8) 病理組織学観察および組織所見の統一: 卵巣の卵胞および黄体などの組織用語および病理組織学的診断基準について、参加企業の病理担当者で試験開始前より病理検査開始まで数回の全体打ち合わせ会議を開き統一を図った。さらに試験終了後、病理組織学的検査結果についてピアレビューを行い、卵巣の変化について確認を行った。

C. 研究結果

今回の検証試験の結果のまとめをTable 2に記載した。結果について以下にまとめた。

- 1) ホルモン様作用を示す化合物Hormone analogues

ホルモン様作用を示す物質としてprogesterone作用を示すmedroxyprogesterone acetate、プロゲステロン受容体アンタゴニストであるmifepristone、エストロゲン受容体アンタゴニストであるtamoxifenを用いて検討した。その結果、全ての化合物で明らかな卵巣および雌生機能への影響が2および4週の反復投与毒性試験と受胎能試験ともに認められた。影響の感受性はtamoxifenについては受胎能試験で高かったが、その他の2化合物では同様であった。

- 2) 小卵胞へ障害を及ぼす化合物Primordial follicle damaging agents

小卵胞を障害する化合物として、Group 2B 発がん物質である4-vinylcyclohexene diepoxide (VCD)、抗がん作用を有するアルキル化剤である busulfan、cyclophosphamideおよび抗がん剤cisplatinについて検討した。その結果、4週間反復投与毒性試験および雌受胎能試験で影響が検出されたが、busulfan およびcyclophosphamideについては2週間反復投与で毒性を検出することができなかった。小卵胞の減少が、VCD, busulfan, cisplatin投与により誘発された。PCNA免疫組織化学染色により、小卵胞を簡便且つ感度よく確認することができた。今回使用したcyclophosphamide投与量においてリンパ系器官に重篤な毒性が認められ本試験の目的から設定量以上の投与は困難であった。Busulfanについても全身への毒性が認められた。卵巣影響の感受性はVCDおよび