

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。

D. 考察

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、卵巣毒性評価方の向上を目指した。

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。反復投与毒性試験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。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。

Table 3に、現在までの今回の検証試験実施のための共同研究の経過と今後の予定を示す。

E. 結論

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。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

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.

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.

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.

2. 学会発表

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

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

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

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

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

Table 1 検証試験における卵巣毒性物質のカテゴリーと共同研究参加企業

Categories of Ovarian Toxicity Compounds

Category	No.	Compound	Company
1. Hormone analogues	1	Medroxyprogesterone acetate (Progesterone)	あすか製薬株式会社
	2	Mifepristone (Progesterone receptor antagonist)	キッセイ薬品工業株式会社
	3	Tamoxifen (Estrogen receptor antagonist)	万有製薬株式会社
2. Primordial follicle damaging agents	4	4 -vinylcyclohexene diepoxide (Group 2B carcinogen)	トーアエイヨー株式会社 味の素株式会社
	5	Busulfan (Antineoplastic Alkylating agent)	杏林製薬株式会社
	6	Cisplatin (Antineoplastic)	富山化学工業株式会社
	7	Cyclophosphamide (Antineoplastic Alkylating agent)	大塚製薬株式会社
3. Metabolic imbalance inducers	8	Anastrozole (Antineoplastic, Aromatase inhibitor)	第一三共株式会社
	9	Di (2-ethylhexyl)Adipate (DEHA)	興和株式会社
	10	Di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP)	中外製薬株式会社
	11	Ethylene glycol monomethyl ether (EGME)	エーザイ株式会社
	12	Indomethacin (COX-1,2 inhibitor, NSAID)	アステラス製薬株式会社
	13	Compound X (PPAR α/γ dual agonist)	旭化成ファーマ株式会社
4. Endocrine imbalance inducers	14	Atrazine (Herbicide, Endocrine modulator)	日本新薬株式会社
	15	Bromocriptine mesylate (Dopamine agonist)	株式会社 三和化学研究所
	16	Chlorpromazine hydrochloride(D2, 5-HT2A H1, α 1-antagonist)	武田薬品工業株式会社
	17	Sulpiride (D2 Antagonist)	田辺三菱製薬株式会社

Table 2

検証試験プロトコール

反復毒性試験

- ・投与期間: 2 および 4 週間
- ・動物種・数: ラット・10匹 / 群
- ・用量: 低(無影響量)・中・高(毒性量)用量
- ・観察項目: 一般状態、性周期、体重等、
- ・病理組織学的検査: 卵巣 (PCNA, HE), その他主要臓器

雌受胎能試験

- ・投与期間: 交配前 2 weeks ~ 妊娠 7日
- ・動物種・数: ラット・10匹 / 群
- ・用量: 反復投与毒性試験とできるだけ同用量
- ・観察項目: 一般状態、性周期、体重等

Table 2a 試験結果

(2W、2週間反復投与;4W、4週間反復投与毒性試験;Reprotox、雌受胎能試験を示す。以下同様)

Results (1)

1. Hormone		2W	4W	Reprotox.
① Medroxyprogesterone acetate (MPA) Dose: 0, 0.4, 2.0, 10 mg/kg	Lowest toxicity dose	0.4 mg/kg	10 mg/kg	0.4 mg/kg
	Findings	Atretic large follicles ↑, etc.	Atretic large follicles ↑, etc.	Irregular estrous cycle
② Mifepristone (progesterone receptor antagonist) Dose: 2W and 4W: 0, 0.8, 4, 20, 100 mg/kg Reprotox.: 0, 0.8, 4, 20 mg/kg	Lowest toxicity dose	4 mg/kg	20 mg/kg	4 mg/kg
	Findings	Atresia of large follicle ↑, Luteal cyst ↑	Atresia of large follicle ↑, Luteal cyst ↑	Postimplantation loss ↑, Live embryo ↓
③ Tamoxifen (SERMs) Dose: 0, 0.005, 0.03, 0.2 mg/kg	Lowest toxicity dose	0.2 mg/kg	0.03 mg/kg	0.005 mg/kg
	Findings	Atresia (large size) ↑, etc.	Atresia (large size) ↑, etc.	Irregular estrous cycle, Preimplantation loss ↑, Live embryo ↓
Is ovarian toxicity or female reproductive toxicity evaluated?		Yes	Yes	Yes
Comments: Hormonal compounds clearly influences ovarian and reproductive functions.				

Table 2b

Results (2)

2. Primordial follicle damage		2W	4W	Reprotox.
① 4-vinylcyclohexene diepoxide Dose: 0, 5, 20, 80 mg/kg	Lowest toxicity dose	80 mg/kg	20 mg/kg	80 mg/kg
	Findings	Small follicle ↓	Small follicle ↓	Preimplantation loss ↑
② Busulfan (Alkylating agent) Dose: 0, 0.1, 0.5, 1.5 mg/kg (p.o.), 2.5 mg/kg (i.p.)	Lowest toxicity dose	>2.5 mg/kg	1.5 mg/kg	1.5 mg/kg
	Findings	Within normal limits	Small follicle ↓	Preimplantation loss ↑, Postimplantation loss ↑, Dead embryo ↑
③ Cisplatin Dose: 2W: 0, 0.25, 0.5, 1.0, 2.0 mg/kg 4W: 0, 0.125, 0.25, 0.5 mg/kg Reprotox.: 0, 0.25, 0.5, 1.0 mg/kg	Lowest toxicity dose	1.0 mg/kg	0.25 mg/kg	0.5 mg/kg
	Findings	Large follicle ↓, Atresia ↑, etc.	Small follicle ↓	Postimplantation loss ↑, Dead embryo ↑
④ Cyclophosphamide Dose: 0, 5, 10, 20 mg/kg	Lowest toxicity dose	> 20 mg/kg	20 mg/kg	5 mg/kg
	Findings	Within normal limits	Atrophy of corpus luteum, etc.	Preimplantation loss ↑, Postimplantation loss ↑
Is ovarian toxicity or female reproductive toxicity evaluated?		Yes/No	Yes	Yes
Comments: Some compounds, such as alkylating agents, may be less toxic on ovaries and more toxic on early development of the embryo. Estrous cyclicity is not affected by the treatment.				

Table 2c

Results (3)

3. Metabolic imbalance		2W	4W	Reprotox.
① Anastrozole (Aromatase inhibitor) Dose: 2W and 4W: 0, 0.01, 0.1, 1, 50 mg/kg Reprotox.: 0, 0.01, 0.1, 5 mg/kg	Lowest toxicity dose	50 mg/kg	1 mg/kg	0.1 mg/kg
	Findings	Large atresia ↑, Cystic follicle ↑, etc.	Large atresia ↑	Irregular estrous cycle, Preimplantation loss ↑, Live embryo ↓
② Di (2-ethylhexyl)Adipate (DEHA) Dose: 0, 200, 1000, 2000 mg/kg	Lowest toxicity dose	1000 mg/kg	1000 mg/kg	1000 mg/kg
	Findings	Large atresia ↑	Large atresia ↑	Irregular estrous cycle, Postimplantation loss ↑
③ Di-(2-ethylhexyl) phthalate Dose: 0, 300, 1000, 3000 mg/kg	Lowest toxicity dose	3000 mg/kg	1000 mg/kg	3000 mg/kg
	Findings	Atypical follicle ↑	Atypical follicle ↑	Irregular estrous cycle, Pregnancy rate ↓
Is ovarian toxicity or female reproductive toxicity evaluated?		Yes	Yes	Yes

Table 2d

Results (4)

3. Metabolic imbalance		2W	4W	Reprotox.
④ EGME (Ethylene glycol monomethyl ether) Dose: 0, 30, 100, 300 mg/kg	Lowest toxicity dose	100 mg/kg	100 mg/kg	30 mg/kg
	Findings	Large atretic follicles ↑, etc.	Large atretic follicles ↑	Irregular estrous cycle
⑤ Indomethacin (NSAID) Dose: 0, 0.4, 1.3, 4.0 mg/kg	Lowest toxicity dose	4 mg/kg	4 mg/kg	- mg/kg
	Findings	Luteinized follicular cyst ↑	Luteinized follicular cyst ↑, Atretic follicular cyst ↑, etc.	4.0 mg/kg: Death 8/10, 1.3 mg/kg: No change
⑥ Compound X (PPAR α/γ dual agonist) Dose: 0, 4, 20, 100 mg/kg	Lowest toxicity dose	4 mg/kg	4 mg/kg	20 mg/kg
	Findings	Atresia of large follicle ↑	Atresia of large follicle ↑	Corpora lutea ↓, Implantation ↓, Live embryo ↓
Are ovarian toxicity or female reproductive toxicity evaluated?		Yes	Yes	Yes/No
<p>Comments: Indomethacin could not induce reprotoxicity. Common histopathological change is an increase of atretic follicles. COX-2 Inhibitors and PPARs disturb rupture of ovulation.</p>				

Table 2e

Results (5)

4. Endocrine imbalance		2W	4W	Reprotox.
① Atrazine (Endocrine modulator) Dose: 2W and 4W: 0, 3, 30, 300 mg/kg Reprotox.: 0, 3, 30, 100 mg/kg	Lowest toxicity dose	300 mg/kg	300 mg/kg	30 mg/kg
	Findings	Large atretic follicle ↑, Loss of newly formed corpus luteum	Large atretic follicle ↑, swelling of old corpus luteum	Irregular estrous cycle
② Bromocriptine mesylate (Dopamine agonist) Dose: 0, 0.08, 0.4, 2 mg/kg	Lowest toxicity dose	0.4 mg/kg	0.4 mg/kg	0.4 mg/kg
	Findings	Corpora lutea ↑	Corpora lutea ↑	Pregnancy rate ↓
③ Chlorpromazine hydrochloride Dose: 0, 3, 10, 30 mg/kg	Lowest toxicity dose	10 mg/kg	10 mg/kg	10 mg/kg
	Findings	Atretic follicle ↑	Atretic follicle (large/cystic) ↑	Irregular estrous cycle
④ Sulpiride Dose: 0, 1, 10, 100 mg/kg	Lowest toxicity dose	1 mg/kg	1 mg/kg	10 mg/kg
	Findings	Atretic follicle (large follicle) ↑	Atretic follicle (large follicle) ↑, Large follicle ↓, etc.	Irregular estrous cycle, Postimplantation loss ↑, Dead embryo ↑
Is ovarian toxicity or female reproductive toxicity evaluated?		Yes	Yes	Yes
Comments: This category clearly influences ovarian and Reproductive functions.				

Table 3

卵巣毒性検出のための共同研究・経過と今後の予定

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
11月下旬	: 卵巣病理組織検査の概要説明および各機関病理担当者による計画発表
11月～	: 各施設での試験開始
2008年 1月下旬	: 各社の病理担当者と病理組織診断基準に関する打ち合わせ
4月中旬～5月上旬	: 各社の病理組織学的検査結果に対するPeer reviewing
5月	: 試験結果概要の報告
6月	: 病理担当者による病理検査結果報告会
12月	: Journal of Toxicological Sciences へ投稿(全社・まとめ計20報)
2009年 1月	: 第25回日本毒性病理学会(浜松)ワークショップおよびポスター発表
2月	: Journal of Toxicological Sciences特集号へ掲載予定
3月	: 48 th SOTポスター発表予定

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

女性生殖臓器への影響評価に関する研究

国立医薬品食品衛生研究所
大野泰雄

吉田緑(研究協力者)

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20年度研究会 平成21年1月20日 日本薬学会長記念館

目的

われわれは医薬品の安全性研究に携わる者として、日本が最も厳しい考えを示してきたガイドラインが修正される場合、その根拠となるべき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、卵巣への影響評価検査が確立されていない現状において、現行の安全性試験で雌受胎能への影響が十分な検出されているか不明であり、またその評価方法についても疑問が残る。一方、毒性および卵巣の特性に関する文献の調査などもとに、卵巣内での機能的あるいはmode of action (MOA) が明らかな卵巣毒性物質の多くについては、現行の2週間あるいは4週間の反復投与毒性試験の中で、病理組織学的検査における卵巣の詳細な検査あるいは関連する機能検査などの追加により、卵巣毒性の検出が可能ではないかと推察するに至った。

げっ歯類を用いた反復投与毒性試験を改良することによって、卵巣毒性検出が可能か否かをバリデーション研究を行う。

製薬協へのオーガナイザーから検証試験の呼びかけ

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

オーガナイザー

久田 茂(あすか製薬(株))
佐神文郎(エーザイ(株))
三分一所厚司(第一三共(株))
吉田 緑(国立衛研)
大野泰雄(国立衛研)

アドバイザー

高橋道人(病理ヒアレビューセンター)

卵巣毒性検出のための共同研究・経過と今後の予定

2007年8月末	試験内容の確認
9月末	参加製薬通知の配布
10月初	参加企業への説明会
11月下旬	卵巣病理組織検査の概要説明および各機関病理担当者による計画発表
11月～	各施設での試験開始
2008年1月下旬	各社の病理担当者と病理組織診断基準に関する打ち合わせ
4月中旬～5月上旬	各社の病理組織学的検査結果に対するPeer reviewing
5月	試験結果概要の報告
6月	病理担当者による病理検査結果報告会
12月	Journal of Toxicological Sciencesへ投稿(全社・まとめ計20報)
2009年1月	第25回日本毒性病理学会(浜松)ワークショップおよびポスター発表
2月	Journal of Toxicology Sciences特集号へ掲載予定
3月	48 th SOTポスター発表予定

卵巣毒性共同研究参加企業一覧

順位	会社名	試験物質	試験種
1	独立成フェーズ製薬会社	PPAR α / γ	一般毒性 / 4週、 雌受胎能
2	株式会社武田	4-methylumbelliferone, Resveratrol, NCCO177-プロキドール(糖衣)	一般毒性 / 4週、 雌受胎能(卵巣特異)
3	あすか製薬株式会社	progesterone	一般毒性 / 4週、 雌受胎能
4	アサヒカミ薬業株式会社	Indinavir, INH42a	一般毒性 / 4週、 雌受胎能
5	エーザイ株式会社	EGFR	一般毒性 / 4週、 雌受胎能
6	大塚製薬株式会社	CyclosporinA	一般毒性 / 4週、 雌受胎能
7	キリン(薬品工業株式会社)	RU58642(RU58668)	一般毒性 / 4週、 雌受胎能
8	住友薬業株式会社	Bosutinib (Ahyzing agent)	一般毒性 / 4週、 雌受胎能
9	森和製薬株式会社	CDK5	一般毒性 / 4週、 雌受胎能
10	株式会社 立和化学研究所	Bismuthamine	一般毒性 / 4週、 雌受胎能
11	武田薬品工業株式会社	Dihydroartemisinin	一般毒性 / 4週、 雌受胎能
12	第一三共株式会社	Acetaminophen (acetaminophen sodium)	一般毒性 / 4週、 雌受胎能
13	明治製菓株式会社	Saligenin	一般毒性 / 4週、 雌受胎能
14	中外製薬株式会社	CDK4	一般毒性 / 4週、 雌受胎能
15	トーアエスビー株式会社	4-methylumbelliferone, Resveratrol, NCCO177-プロキドール	一般毒性 / 4週、 雌受胎能
16	富士化学工業株式会社	CDK5	一般毒性 / 4週、 雌受胎能
17	日本製薬株式会社	Acetaminophen	一般毒性 / 4週、 雌受胎能
18	万有製薬株式会社	Tamoxifen (IEMM)	一般毒性 / 4週、 雌受胎能

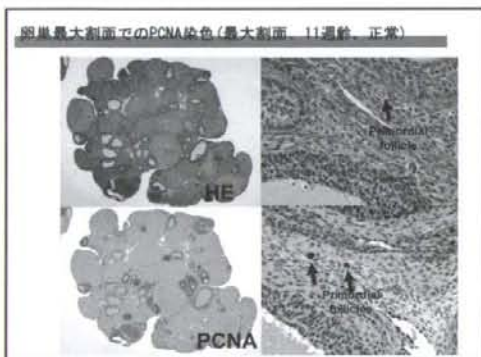
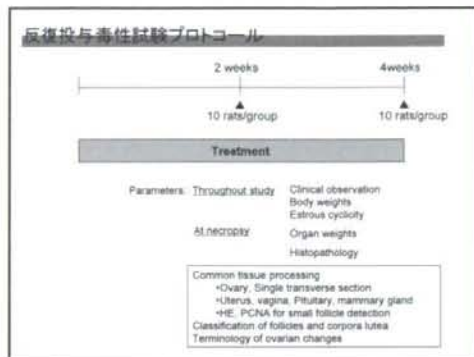
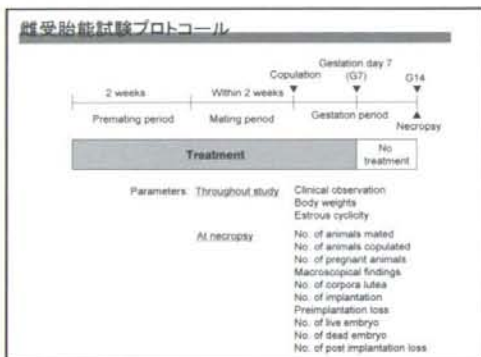
検証試験プロトコール

反復毒性試験

- 投与期間: 2 および 4 週間
- 動物種・数: ラット・10匹 / 群
- 用量: 低(無影響量)・中・高(毒性量)用量
- 観察項目: 一般状態、性周期、体重等。
- 病理組織学的検査: 卵巣(PCNA, HE), その他主要臓器

雌受胎能試験

- 投与期間: 交配前 2 weeks ~ 妊娠 7日
- 動物種・数: ラット・10匹 / 群
- 用量: 反復投与毒性試験とできるだけ同用量
- 観察項目: 一般状態、性周期、体重等



- ### 卵巣毒性物質の作用機序別分類
- Hormone**
 - Medroxyprogesterone acetate (MPA)
 - Mifepristone (progesterone receptor antagonist)
 - Tamoxifen (SERMs)
 - Primordial follicle damage**
 - 4-vinylcyclohexene diepoxide
 - Bisulfan (Alkylating agent)
 - Cisplatin
 - Cyclophosphamide
 - Metabolic imbalance**
 - Anastrozole (Aromatase inhibitor)
 - Di (2-ethylhexyl) adipate (DEHA)
 - Di-(2-ethylhexyl) phthalate
 - EDMAC (Ethylene glycol monomethyl ether)
 - Indomethacin (NSAID)
 - Compound X (PPAR- α) dual agonist)
 - Endocrine imbalance**
 - Atrazine (Endocrine modulator)
 - Bromocriptine mesylate (Dopamine agonist)
 - Chlorpromazine hydrochloride
 - Suberide

Results (1)

1. Hormone		2W	4W	Reprotox.
1. Medroxyprogesterone acetate (MPA) Dose: 0, 5, 2.5, 10 mg/kg	Lowest toxicity dose Findings	0.4 mg/kg Atresia large follicles ¹ , etc.	10 mg/kg Atresia large follicles ¹ , etc.	0.4 mg/kg Single atresia cycle
2. Mifepristone (progesterone receptor antagonist) Dose: 2W and 4W: 0, 0.4, 4, 20, 100 mg/kg Reprotox.: 0, 0.4, 4, 20 mg/kg	Lowest toxicity dose Findings	4 mg/kg Atresia of large follicles ¹ , Luteal cyst ¹	20 mg/kg Atresia of large follicles ¹ , Luteal cyst ¹	4 mg/kg Premature luteal ¹ , Luteal cyst ¹
3. Tamoxifen (SERM) Dose: 0, 0.05, 0.05, 0.2 mg/kg	Lowest toxicity dose Findings	0.2 mg/kg Atresia large size ¹ , etc.	0.05 mg/kg Atresia large size ¹ , etc.	0.05 mg/kg Single atresia cycle, Premature luteal ¹ , Luteal cyst ¹
Is ovarian toxicity of female reproductive toxicity evaluated?				
		Yes	Yes	Yes

Comments: Hormonal compounds clearly influences ovarian and reproductive functions.

Results (2)

2. Primordial follicle damage		2W	4W	Reprotox.
1. 4-vinylcyclohexene diepoxide Dose: 0, 5, 20, 80 mg/kg	Lowest toxicity dose Findings	80 mg/kg Small follicle ¹	20 mg/kg Small follicle ¹	80 mg/kg Premature luteal ¹ , 1.0 mg/kg
2. Bisulfan (alkylating agent) Dose: 0, 0.1, 0.5, 1, 5 mg/kg (0.1, 0.5 mg/kg 0.4)	Lowest toxicity dose Findings	12.5 mg/kg Atresia normal sized	1.0 mg/kg Small follicle ¹	0.5 mg/kg Premature luteal ¹ , Premature luteal ¹ , Dead embryos ¹
3. Cisplatin Dose: 2W: 0, 0.25, 0.5, 1.0, 2.0 mg/kg 4W: 0, 0.125, 0.25, 0.5 mg/kg Reprotox.: 0, 0.25, 0.5, 1.0 mg/kg	Lowest toxicity dose Findings	1.0 mg/kg Large follicle ¹ , Atresia ¹ , etc.	0.25 mg/kg Small follicle ¹	0.5 mg/kg Premature luteal ¹ , Dead embryos ¹
4. Cyclophosphamide Dose: 0, 0.1, 10, 20 mg/kg	Lowest toxicity dose Findings	>20 mg/kg Within normal sized	20 mg/kg Atresia of corpus luteum, etc.	0 mg/kg Premature luteal ¹ , Premature luteal ¹
Is ovarian toxicity of female reproductive toxicity evaluated?				
		Yes/No	Yes	Yes

Comments: Some compounds, such as alkylating agents, may be less toxic on ovaries and more toxic on early development of the embryo. Estrous cyclicity is not affected by the treatment.

Results (3)

3. Metabolic imbalance		2W	4W	Reprotox.
① Acetaminophen (Antipyretic/analgesic)	Lowest toxicity dose Findings	50 mg/kg Large atresia ? Cystic follicle ? etc.	1 mg/kg Large atresia ?	0.1 mg/kg Irregular estrous cycle Proliferation loss ? Lost embryo ?
② Di (2-ethylhexyl)phosphate (DEHP)	Lowest toxicity dose Findings	1000 mg/kg Large atresia ?	1000 mg/kg Large atresia ?	1000 mg/kg Irregular estrous cycle Proliferation loss ?
③ Di (2-ethylhexyl)phthalate	Lowest toxicity dose Findings	3000 mg/kg Atretic follicle ?	1000 mg/kg Atretic follicle ?	3000 mg/kg Irregular estrous cycle Pregnancy rate ?
Is ovarian toxicity or female reproductive toxicity evaluated?		Yes	Yes	Yes

Results (4)

3. Metabolic imbalance		2W	4W	Reprotox.
① EGME (Ethylene glycol dimethyl ether)	Lowest toxicity dose Findings	100 mg/kg Large atretic follicle ?	100 mg/kg Large atretic follicle ?	30 mg/kg Irregular estrous cycle
② Indomethacin (NSAID)	Lowest toxicity dose Findings	4 mg/kg Luteinized follicular cyst ?	4 mg/kg Luteinized follicular cyst ? Atretic follicular cyst ? etc.	4 mg/kg 4.0 mg/kg: Death 8/10 1.0 mg/kg: No change
③ Compound X (PPAR α 17 dual Agonist)	Lowest toxicity dose Findings	4 mg/kg Atresia of large follicle ?	4 mg/kg Atresia of large follicle ?	20 mg/kg Corpus luteal ? Implantation ? Lost embryo ?
Are ovarian toxicity or female reproductive toxicity evaluated?		Yes	Yes	Yes/No

Comments: Indomethacin could not induce reprotoxicity.
Common histopathological change is an increase of atretic follicles.
COX-2 Inhibitors and PPARs disturb rupture of ovulation.

Results (5)

4. Endocrine imbalance		2W	4W	Reprotox.
① Abiraterone (Androgenase inhibitor)	Lowest toxicity dose Findings	300 mg/kg Large atretic follicle ? Loss of newly formed corpus luteum	300 mg/kg Large atretic follicle ? swelling of old corpus luteum	30 mg/kg Irregular estrous cycle
② Brevovogline mesylate (Ghrelin agonist)	Lowest toxicity dose Findings	0.4 mg/kg Corpus lutea ?	0.4 mg/kg Corpus lutea ?	0.4 mg/kg Pregnancy rate ↓
③ Ghrelin/relaxin hydrochloride	Lowest toxicity dose Findings	10 mg/kg Atretic follicle ?	10 mg/kg Atretic follicle (degenerative) ?	10 mg/kg Irregular estrous cycle
④ Sipeptide	Lowest toxicity dose Findings	1 mg/kg Atretic follicle (large follicle) ?	1 mg/kg Atretic follicle (large follicle) ? Large follicle (cyst)	10 mg/kg Irregular estrous cycle Proliferation loss ? Dead embryo ?
Is ovarian toxicity or female reproductive toxicity evaluated?		Yes	Yes	Yes

Comments: This category clearly influences ovarian and Reproductive functions.

まとめ

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。

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変更することにより、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いては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。

一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一

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—

研究分担者：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）

研究協力者：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）

小野寺博志（国立医薬品食品衛生研究所・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（ユーザイ）

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・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。

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。

B. 研究方法

一昨年度、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るようになっていた。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。

C. 研究結果

6月のポートランド会合に先だって、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ド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”こと、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月のブリュッセルにおける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だけの啮類の使用を優先（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DeGorge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、DeGorge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DeGorge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なわれた:

- 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り、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。

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、次の横浜会合ではStep 4に達する見込みはきわめて高いと考えられる。

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より、次の横浜会合でStep 4に達すると考えられる。

F. 健康危機情報

G. 研究発表

1. 論文発表

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)

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)

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

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。

2. 学会発表

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

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

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

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

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

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

M. Yoshida, A. Sanbuissho, S. Hisada, M. Takahashi, Y. Ohno¹, 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

H. 知的財産権の出願・登録状況

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

大野泰雄、中澤憲一^a、小島 肇^a

国立医薬品食品衛生研究所
^a 安全性生物試験研究センター・薬理部

ICH-M3 検討班の班員と研究協力者

班員

中沢憲一(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(病理ビジュアルセンター)
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)

検討内容と今までの経過

- 医薬品の臨床試験および販売申請承認に必要な非臨床安全性試験の国際的ガイドラインであるICH-M3の見直し。

2006年10月・シカゴ

専門家ワーキンググループ(EWG)による見直しの検討開始。

2007年5月・ブリュッセル、9月・ワシントン(臨時)、10月・横浜。

2008年8月・ポートランド

審議を重ね、基本合意に達し、FDAの法律家によるチェックを経て、7月にStep 2文書にサイン

(パブリックコメントの募集)

2008年11月・ブリュッセル

パブリックコメントの検討と、Step 2文書の見直し開始。

2009年1月・電話会議(3回)

コメントの検討の継続

改定案(Step 2)で新たに加わった事柄(1)

- 略語についての説明
- 3Rの原則(使用動物数の削減/代替法の利用/実験の洗練化)の明記
- 臨床試験の実施を認めるための非臨床試験
一臨床試験の実施および販売承認を得るための非臨床試験
- 通常行われる試験としてトキシコキネティクスを明記。
- 必要に応じて行われる試験として、光毒性、免疫毒性、幼弱動物における毒性、薬物乱用に関する非臨床試験を新たに追加。
- バイオテクノロジー応用医薬品については、安全性試験の内容については触れず、非臨床試験と臨床試験のタイミングについて見解を示すに止めた。

改定案(Step 2)で新たに加わった事柄(2)

- 非臨床試験とのタイミングを示すにあたり、臨床試験を第I、II、III相という区分ではなく、試験の期間、対象受験者の数、疾病により区分する。
- 安全性薬理試験の項目にICH-S7AおよびS7Bを引用。
- 単回投与毒性試験を、急性毒性試験とし、内容も修正(後述)。
- 反復毒性試験の内容を修正(後述)。
- 従来の臨床試験の導入(およびそれと関連したヒトへの初回投与量の設定)。
- 遺伝毒性試験の内容をICH-S2の改正案と整合するように修正。
- 生殖毒性試験については、臨床試験に妊娠可能な女性を組み込む条件が3倍で大きな差がないように内容を修正した。
- 光毒性、免疫毒性、幼弱動物における毒性、薬物乱用に関する非臨床試験について新たな記載がなされた他、配剤剤についての項目に追加された。

Step 2: 急性毒性試験 (旧・単回投与毒性試験)(1)

改定前: 2種類の哺乳動物、ヒトに投与する前、用量漸増試験で代用できる。

改定後: 以下のようなオプションも可能とした。

- 一般毒性試験の動物種において最大耐量を求めるように計画された用量漸増試験、または、短所反復投与の用量設定試験。
- 十分な暴露量(ヒトで予定されている適用量におけるC_{max}またはAUCの50倍など)、物知暴露量、あるいは、物理化学的に投与可能な最大量を用量とした試験。
- 高投与用量/げつ歯類で2000 mg/kg/日、非げつ歯類で1000 mg/kg/日
- 他の試験で急性毒性に関する情報が得られるのであれば、これと別に単回投与毒性試験を行うことは推奨しない。
- 臨床試験前にGLPに促った反復毒性試験を行うのであれば、急性毒性の評価は臨床適用経路による C_{max} -GLP試験で良い。

Step 2: 急性毒性試験(2)

改定後:

- マイクロドーズ試験などにおいて、主として急性毒性試験が単回投与臨床試験実施の担保となることがある。このような非臨床試験では、高用量の選択の基準が前記と異なることがある。この選択においては、予定されている臨床用量および投与経路を十分に考慮すべきである。試験はGLP下で行われ、致死性を評価目標とすべきではない。
- 急性毒性はヒトでの過剰投与における影響を予測するものであり、第3相開始前までにその情報を得るべきである。
- 過剰投与の危険性が高いうつ病、疼痛、痙攣などの患者に対する外来の臨床試験において、治療的適応を行う場合、より早期に急性毒性の評価を行うことが望ましい。

Step 2: 反復投与毒性試験(1)

改定後:

- 原則として、2種の哺乳動物(1種は非げっ歯類)で実施される毒性試験の期間は、臨床試験の期間と同じか、あるいはそれを超えているべきであり、反復投与毒性試験の最長投与期間を上限とする(表1)。反復試験の実施にあたって適切なと考えられる限界投与量/投与量は表1を参照のこと。

注1: 臨床用量に対して十分な安全域が確保され、臨床用量が1g/日を超えない場合、げっ歯類で2,000 mg/kg/日、非げっ歯類で1,000 mg/kg/日。また、臨床用量に対して50倍の安全域が確保される用量は、通常、受け入れ可能。

Step 2: 反復投与毒性試験(2)

改定後

表1. 臨床試験の実施に必要な反復投与毒性試験の期間(全地域共通)

臨床試験の最大期間	臨床試験を実施するのに必要な反復投与毒性試験の最小期間	
	げっ歯類	非げっ歯類
2週間以下	2週間*	2週間
2週を超えて6か月まで	臨床期間と同じ	臨床期間と同じ
6か月を超える	6か月	9か月 ^{1,2,3}

- a. 日本: 1種(通常げっ歯類)の2週間毒性試験で即興の組織学的検査の後、妊娠可能な女性を臨床試験に組み込める。(step 2以後に削除)
- b. 以下の場合には最長6か月までの非げっ歯類での毒性試験が適切であると考えられる。
- 1) 免疫原性あるいは耐性の問題により長期毒性試験が困難な場合
 - 2) 痛風痛、勃起不全、単純ヘルペスのように臨床試験期間は6か月を超えるが、断続的治療の場合
 - 3) 末期がんの化学療法剤あるいはアジュバンドのように生命を脅かす疾病を目的とする薬物

Step 2: 反復投与毒性試験(3)

改定後

表1. 臨床試験の実施に必要な反復投与毒性試験の期間(全地域共通)

- c. 小児を対象とする薬物で成長に伴う影響の評価に有用と思われる場合、適切な動物種の幼若動物を用い、適切な時期より投与を開始する慢性毒性試験を行うことができる(例えば、イヌにおける12か月投与試験)。この試験は非げっ歯類における通常の慢性毒性試験とそれとは別に実施される幼若動物の慢性毒性試験の代替となりうる。

- d. げっ歯類および非げっ歯類の3か月投与試験の結果が得られており、臨床投与期間が3か月を超える前に、いずれの慢性毒性試験の結果も全て得られる場合には、6か月を超える臨床試験を開始することができる。

生命を脅かす疾病または重症な疾病を対象とする臨床試験の場合、あるいは、個々の臨床試験の事例が必要な場合、げっ歯類の慢性毒性試験成績が得られており、両種動物種本がその後3か月以内に得られるのであれば、生存中および剖検のデータを基にした臨床試験期間の3ヶ月を超える延長が可能である。

Step 2: 反復投与毒性試験(4)

新規追加

販売承認

臨床現場においては臨床試験中に比べ、リスクの対象となる患者の数が多く、使用条件の管理が困難—非臨床試験の期間はより長い方がよい。

適切な期間は2週間から3か月以下であるが、幅広く使われかつ増長される適応を踏まえて長期用いられる場合(例えば、不安症、季節性アレルギー—関節炎、疼痛)については、非臨床試験の期間は、3か月を超える適応に推奨される期間と同等であるとするのが適切である。

表2. 販売承認申請に必要な反復投与毒性試験の期間(全地域共通)

臨床適応における使用期間	げっ歯類	非げっ歯類
2週間以下	1か月	1か月
2週を超えて1か月まで	3か月	3か月
1か月を超えて3か月まで	6か月	6か月
3か月を超える	6か月	9か月 ^{1,2,3}

注: a, b, c 表1に同じ。

M3 Step 2案へのコメント

	MHLW	13	CDER	FDA	
1	JPMA	14	PCRM, HSUS, HSLF	FDA	
2	Aptus Consulting	EMEA	15	AstraZeneca	FDA
3	Johnson & Johnson	EMEA(Y)	16	Biogen Idec	FDA
5	Gilead Sci. Int.	EMEA	17	Bristol-Myers Squibb	FDA
6	Wyeth	EMEA	18	ICAPP	FDA
7	H. Lundbeck	EMEA	19	Eli Lilly	FDA
8	Xceleron	EMEA	20	Merck	FDA
9	Merck Sharp & Dohme	EMEA	21	Novo Nordisk	FDA
10	FRAME	EMEA	22	Sanofi Aventis	FDA
11	PRA International Early Development Services	EMEA	23	Alcon	FDA
12	EPPIA				

Step 2以降で、見直しがなされた部分(1)

一般毒性試験におけるlimit doseの考え方

- Dose Selection for General Toxicity Studiesの項を設けて、一般毒性試験における limit dose の考え方を記載した。
- げっ歯類のlimit doseを2,000 mg/kgから1,000 mg/kgに軽減した。ただし、1,000 mg/kgで得られる安全域が10倍未満で臨床用量が1 g/day以上の場合には、安全域10倍、2,000 mg/kg、あるいは最大投与可能量とする。
- 安全域が50倍ならば、limit doseまで検討する必要はないとStep 2ではされていたが、FDAのみ、これとは別に毒性プロフィールを求めるとした。

Step 2以降で、見直しがなされた部分(2)

- 安全性薬理試験に薬力学試験を加え、項目を薬理的試験とした。
- ヒトと動物とで不釣り合いなほどレベルに大きな差 (disproportionately greater levels) がある代謝物については必要ならば第3相試験までに毒性試験を実施する。
- 新たな不純物および分解物の毒性試験は第3相試験までに行う必要はない。ただし、製法変更等不純物プロフィールが代わる場合には必要
- 雌生殖臓器への影響は雄の場合と同様に2週間の反復投与毒性試験での十分な病理組織学的検査で検出可能であると、これがあれば第1相、第2相の前までに女性繁殖試験を行わなくとも良いとした。

Step 2以降で、見直しがなされた部分(3)

探索的臨床試験

- 表と本文との関係で、詳細は表に記載することとされた。
- 拡張型単回投与試験の説明を追加した。
- MD試験実施に必要な拡張型単回投与試験の最高用量をivはmg/kg、poはmg/m²換算で臨床用量の1000倍とした。
- MD試験以外についても、試験の内容と目的に関する記述を追加した。
- MD試験以外についても、*In vitro*でのtarget/receptor profilingを行うこと、また、薬力学的に適切なモデルを用いて薬理作用の特徴を明らかにすべきとした。

その他

その他の生殖発生毒性試験、光安全性試験(光がん原性を含む)、小児臨床試験用の幼若動物による試験、薬物濫用性についても見直しが行われた。

今後の予定

3月11日-13日 追加EWG会議
(ワシントン周辺で実施)

Section 8: Local Tolerance Studies
Section 9: Genotoxicity Studies
Section 10: Carcinogenicity Studies
Section 14: Immunotoxicity
Section 17: Fixed Combination Drug Nonclinical Testing

6月 横浜EWG会議でStep 4 合意を目指す。

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20年度分担研究報告書

動物実験の3Rsに関する研究

研究分担者：小島 肇（国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター 薬理部 新規試験法評価室）

研究要旨

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：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）

研究分担者及び研究協力者の氏名・所属機関名及び所属機関における職名

研究分担者

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 室長

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 センター長

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

佐神文郎 日本製薬工業会 基礎部会長

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¹⁾。

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¹⁾。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（添付資料1）、ICATM設立は化粧品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²⁾以外にもREACH（Registration,

A. 研究目的

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