

i) Integrated analysis of the genomic biomarker qualification studies

The integrated analysis should provide a critical assessment and appraisal of overall results, including discussion and interpretation of the findings with regard to the proposed context. This section refers to the methodology and data provided in the individual study reports and other relevant information (Sections 4 and 5).

This section should provide results across studies, using tabular representations as applicable. It should present the strengths and limitations of the biomarker qualification program and study results, analyze the benefits of the biomarker for its intended use, and describe how the study results support its use in the proposed context.

To achieve these objectives, this section can:

- Describe and explain the overall approach to the biomarker qualification program including methods and relevant aspects of study design and statistical analysis;
- Describe the rationale for the selection of population sample studied in the biomarker qualification;
- Describe the analytical performance characteristics of the assay (e.g., accuracy, precision, and other standard parameters);
- Describe the results supporting the non-clinical/clinical use of the biomarker (e.g., retrospective/prospective correlation with phenotype/outcome);
- Summarize the key characteristics of the biomarker, including strengths and limitations (e.g., comparison with relevant standard methods where available, presence/absence of information on pertinent species/population);
- Provide an assessment of expected benefits based upon results of relevant studies, including interpretation of how the biomarker performance supports its use in the proposed context;
- Address issues encountered during the biomarker qualification studies, and how they have been evaluated and resolved;
- Identify unresolved issues, and explain why they should not be considered as barriers to qualification for the proposed context, and/or describe plans to resolve them if applicable.

The use of graphs and tables in the body of the text is encouraged to facilitate the regulatory review process. It is suggested that material presented fully elsewhere not be repeated in this section; rather, appropriate cross-references to more detailed presentations provided elsewhere in the study reports and other documents (Section 4 and 5) are encouraged.

ii) Individual study synopses

This section is intended to provide synopses of the individual studies included in the qualification dossier. Where the submission is based primarily on scientific publications, abstracts and key tables taken from the scientific publications can be used for this section. These should summarize information obtained from

each of the studies for which reports and/or manuscripts have been included in Sections 4 and 5. The length of these sections can vary according to the information to be conveyed.

Section 3: Quality⁶

Drug quality and manufacturing data would in general not be included in a biomarker qualification submission independent from an NDA or MAA.

Sections 4 (Non-clinical) and 5 (Clinical): Study Reports⁷

In this section, full study reports for biomarker qualification should be provided, and raw data could be made available to the regulatory agency upon request. Information on compliance with Good Laboratory Practices (GLP) or Good Clinical Practices (GCP) can be included in these sections. This guideline suggests that, where appropriate, the study reports can follow relevant ICH guidelines (e.g., E3, M4E, M4S) for their preparation.

Within the study reports, the appropriate format of the genomic data will depend on the characteristics of the genomic biomarker measured (e.g., SNPs, CNV) and the methodology used (e.g., microarray, Polymerase Chain Reaction). Reports should be provided using the following structure (as applicable) and should be arranged according to the following sub-headings:

- Section a
 - Assay development reports
 - Analytical assay validation reports
- Section b (as applicable)
 - Non-clinical study reports (*in-vitro*)
 - Non-clinical study reports (*in-vivo*, specify species)
- Section c (as applicable)
 - Clinical pharmacology study reports
 - Clinical efficacy and/or safety study reports

Regardless of the genomic biomarker investigated or technology used, the rationale for selection of the population sample (e.g., species, age, sex) and of other variables related to the phenotype studied should be clearly described.

Study reports used to generate the biomarker qualification data should include, but need not be limited to:

- Type of sample used for genomic analysis and methods of collection, handling and storage;
- Methods used for determination of gene expression or DNA sequence and other structural characteristics;
- Criteria used for selection of candidate genes, if this is the chosen approach (candidate by position, by function, based on expression profiling data);

⁶ Links to CTD Module 3 (where applicable)

⁷ Links to CTD Modules 4 and 5 for non-clinical and clinical reports (where applicable)

- Experimental data as described using, as applicable, the current internationally recognized standards;
- Methods and software used for analyses;
- Results of analyses of genomic biomarkers, including genome-wide association studies, sequencing, and molecular diagnostic assays, all of which should be described, as applicable, to current internationally recognized standards;
- Performance characteristics of the genomic biomarker test used, as based on retrospective and/or prospective correlation with non-clinical and/or clinical endpoint data as described above. These reports should include a description of the methods and study designs as well as the results of functional studies performed exploring further those genomic biomarkers identified as potentially relevant.

Copies of other documents supporting the genomic biomarker qualification submission should be provided here. This includes, but is not limited to, copies of reference material relating to Sections 2, 4 and 5. This reference material can include, but is not limited to, the following:

- Published articles in peer-reviewed journals (including meta-analyses);
- Expert statements regarding the utility of the biomarker(s) issued by academic or commercial institutions, patient organizations, public-private consortia, and medical practice oversight boards providing guidance on such utility;
- Evaluation reports or other relevant documents as issued by regulatory authorities.

3. ABBREVIATIONS

| | |
|---------------|---|
| CNV: | Copy Number Variation |
| CTD: | Common Technical Document for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use |
| DNA: | Deoxyribonucleic Acid |
| MAA: | Market Authorization Application |
| NDA: | New Drug Application |
| NOAEL: | No Observed Adverse Effect Level |
| NOEL: | No Observed Effect Level |
| PM: | Poor Metabolizer |
| RNA: | Ribonucleic Acid |
| SNPs: | Single Nucleotide Polymorphisms |

非臨床試験

ーガイドラインへの対応と新しい試みー

●特色 / ●造本・体裁・価格 / ●編集委員 / ●執筆者 / ●内容目次

●特色

小社では2001年に「非臨床試験マニュアル」を刊行しましたが、その後の国内外の行政動向、新しい科学的知見を踏まえ、今回本書を発売致します。内外ガイドラインへの対応は勿論、ガイドラインに明記されていない試験法も国際動向に合わせてできる限り収載するとともに、創薬段階での非臨床評価・データベース・GLPも最新の内容を網羅し、実務書として現場で役立つ書となるよう編集されています。

●造本・体裁・価格

体 裁 B5判上製 630頁
発 刊 日 2008年 9月30日
定 価 62,790円(本体 59,800円, 消費税 2,990円)

●編集委員(敬称略)

野村 護 (株)イナリサーチ 試験研究センター長
堀井 郁夫 昭和大学薬学部客員教授(前 ファイザー(株)中央研究所理事)
吉田 武美 昭和大学薬学部毒物学教室教授

●執筆者(執筆順・敬称略)

大野 泰雄 国立医薬品食品衛生研究所副所長
堀井 郁夫 昭和大学薬学部客員教授(前ファイザー(株)中央研究所理事)
倉田 昌明 (株)イナリサーチ 試験研究センター
野村 護 (株)イナリサーチ 試験研究センター長
島田 弘康 (社)東京医薬品工業協会常務理事
高橋 道人 昭和大学薬学部病態生理学教室客員教授
三分一 厚司 第一三共(株)安全性研究所
江馬 眞 (独)産業技術総合研究所安全科学研究部門招聘研究員
高橋 宏明 日本たばこ産業(株)たばこ事業本部渉外企画部主任研究員
高田 孝二 帝京大学文学部心理学教授
乾 公正 石原産業(株)中央研究所安全科学研究室安全性グループグループリーダー
吉田 貴彦 旭川医科大学医学部健康科学講座教授
船田 正彦 国立精神・神経センター精神保健研究所薬物依存研究部
依存性薬物研究室室長
鈴木 勉 星薬科大学薬品毒性学教室教授
足利 太可雄 (株)資生堂品質評価センター
久野 博司 萬有製薬(株)つくば研究所安全性研究所安全性評価室長
佐々木 正治 アポットジャパン(株)開発本部非臨床試験推進グループ毒性ユニット
シニアスペシャリスト
濱田 悦昌 ファイザー(株)非臨床開発研究部
吉田 武美 昭和大学薬学部毒物学教室教授
池田 敏彦 横浜薬科大学臨床薬学科教授
浜田 知久馬 東京理科大学工学部経営工学科教授
松井 一 (株)シーエーシー医薬BT0第3センターエグゼクティブコンサルタント
山田 弘 (独)医薬基盤研究所トキシコゲノミクス・インフォマティクスプロジェクト
研究部門長
藤内 桃子 国立医薬品食品衛生研究所薬理部主任研究員
立野 知世 (株)フェニックスバイオ取締役R&D部長
林 眞 (財)食品農薬品安全性評価センター技術統括部長
鎌田 栄一 国立医薬品食品衛生研究所総合研究評価室
内田 力 田辺三菱製薬(株)研究本部創薬化学研究所
菅野 純 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部長
北嶋 聡 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
相崎 健一 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毒性部
五十嵐 秀 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
小川 幸男 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
関田 清司 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
中島 宣雅 (独)医薬品医療機器総合機構 [PMDA] 信頼性保証部調査役
佐村 恵治 日本製薬工業会信頼性確保チームリーダー
藤田 千絵 (独)製品評価技術基盤機構主任
染谷 仁 (独)医薬品医療機器総合機構信頼性保証部調査専門員
(独)農林水産消費安全技術センター農薬検査部
農林水産省動物医薬品検査所

●内容目次

第 I 章 非臨床試験—regulation studyとtrial study

第1節 非臨床安全性試験のタイミング (大野泰雄／堀井郁夫)

はじめに

1. 非臨床安全性試験内容および実施時期への歩みとその背景
2. ICHガイダンス (ICH M3医薬品の臨床試験のための非臨床安全性試験の実施時期についてのガイドライン)
3. 創薬開発から承認申請に至る過程のさらなる進展とパラダイムシフト
 - 3.1 創薬早期での安全性試験の適用・実施時期とその戦略要点
 - 3.2 創薬における総合的安全性評価への挑戦とデータ・ベースの構築
 - 3.3 非臨床安全性試験実施時期の将来的動向

第2節 単回投与／急性毒性試験 (倉田昌明／野村 護)

はじめに

1. 単回投与毒性試験の意義
2. 単回投与毒性試験と急性毒性試験
3. 単回投与毒性試験の方法
 - 3.1 厚生労働省の医薬品毒性試験ガイドラインにおける単回投与毒性試験
 - 3.2 FDAの単回投与急性毒性試験
 - 3.3 EUの単回投与毒性試験
 - 3.4 EMEAの抗がん剤における単回投与毒性試験
 - 3.5 バイオテクノロジー応用医薬品の単回投与毒性試験
 - 3.6 EU型単回マイクロドーズ臨床試験のための拡大型単回投与毒性試験
 - 3.7 米国型の探索的IND臨床試験の実施に必要な単回投与毒性試験
 - 3.8 厚生労働省の医療機器の急性毒性試験
 - 3.9 OECDの急性毒性試験
4. 単回投与毒性試験実施上の考慮すべき点
 - 4.1 動物種の選択
 - 4.2 投与容量と投与回数
 - 4.3 経口投与時の絶食について
 - 4.4 用量段階
 - 4.5 観察方法
 - 4.6 トキシコキネティクス (TK)
 - 4.7 観察期間
 - 4.8 致死量と最大耐量について
 - 4.9 安全係数について
5. 動物福祉、3Rの観点

第3節 反復投与／亜急性慢性毒性試験 (倉田昌明／野村 護)

1. はじめに
2. 試験の目的と非臨床毒性試験の考え方
3. 予備試験
4. ヒト試験 (Phase I 試験) への対応
5. TK
 - 5.1 定義と目的
 - 5.2 生体試料中薬物濃度測定法バリデーション
 - 5.3 プロファイリングとモニタリング
 - 5.4 TK試験
 - (1) 同じGLP組織で毒性試験の一部として実施する場合
 - (2) 異なるGLP組織で毒性試験の一部として実施する場合
 - (3) 異なるGLP組織で毒性試験とTK測定を別試験として実施する場合
 - 5.5 後付試験
 - 5.6 TK測定時点
 - 5.6 代謝物の測定
6. 法的規制試験 (レギュレーション試験)
 - 6.1 目的
 - 6.2 試験計画
 - (1) 目的
 - (2) 動物種
 - (3) 性
 - (4) 動物数
 - (5) 齢
 - (6) 飼育方法
 - (7) 環境条件
 - (8) 被験物質
 - (9) 用量段階および投与用量
 - (10) 投与期間
 - (11) 投与経路
 - (12) 投与回数
 - (13) 回復性試験
 - (14) In-lifeの観察項目
 - (15) 終了時の検査事項
 - (16) データ解析と評価および結論
7. 不純物の反復投与毒性試験
8. 反復投与毒性試験の評価とヒトへの外挿

第4節 遺伝毒性試験 (島田弘康)

1. 遺伝毒性試験ガイドラインの概略
 - 1.1 ICH 遺伝毒性ガイダンスの成り立ち
 - 1.2 ICH ガイダンスのメンテナンス
2. 各試験法の解説と実施上の問題点
 - 2.1 細菌を用いる復帰突然変異試験
 - (1) 使用菌株
 - (2) 最高用量の設定基準および用量段階
 - (3) 試験法
 - (4) 陽性対照薬
 - (5) プレート数
 - (6) 復帰変異コロニーの観察
 - (7) 試験の成立条件
 - (8) 結果の表示
 - (9) 結果の判定
 - (10) 試験の再現性
 - 2.2 In vitro染色体異常試験
 - (1) 使用細胞
 - (2) 試験法
 - (3) 最高用量の設定基準および用量段階
 - (4) 対 照
 - (5) プレート数
 - (6) 染色体異常の観察
 - (7) 試験の成立条件
 - (8) 結果の表示
 - (9) 結果の判定
 - 2.3 マウスリンフォーマTK試験
 - (1) 使用細胞
 - (2) 試験法
 - (3) 最高用量の設定基準および用量段階
 - (4) 対 照
 - (5) プレート数 (処理系列数)
 - (6) 細胞毒性および突然変異の検出
 - (7) スモールコロニーおよびラージコロニーの判定
 - (8) 試験の成立条件
 - (9) 結果の表示
 - 2.4 In vitro小核試験
 - (1) 使用細胞
 - (2) 試験法
 - (3) 最高用量の設定基準および用量段階
 - (4) 対 照
 - (5) プレート数
 - (6) 小核および細胞毒性の観察
 - (7) 試験の成立条件
 - (8) 結果の表示
 - (9) 結果の判定
 - 2.5 げっ歯類を用いる小核試験
 - (1) 使用動物
 - (2) 被験物質の調製
 - (3) 投与経路
 - (4) 最高用量の設定基準および用量段階
 - (5) 投与回数とサンプリング時間
 - (6) 観察細胞数
 - (7) 結果の表示
 - (8) 試験の成立条件
 - (9) 結果の判定
 - (10) 陰性の場合の暴露証明
3. 光遺伝毒性
4. ICH毒性試験ガイドラインにおける遺伝毒性試験の役割
5. 日本の他の遺伝毒性ガイドラインとの関係
6. 遺伝毒性試験の展望

第5節 長期がん原性試験(発がん性試験) (高橋道人)

1. 長期がん原性試験の概略とその考え方
2. ICHガイドライン
3. がん原性試験の方法
 - 3.1 用量設定試験
 - (1) 単回投与予備試験
 - (2) 反復投与予備試験
 - 3.2 がん原性試験 (本試験)
 - (1) 動物
 - (2) 動物数
 - (3) 投与 (暴露) 経路
 - (4) 用量段階
 - (5) 高用量選択の方法
 - (6) 対照群
 - (7) 投与期間
 - (8) 試験期間
 - (9) 検索方法
4. 長期がん原性試験ができるまでの経緯
5. 長期がん原性試験における適切な動物種
6. 長期がん原性試験を実施すべき物質 (がん原性試験の実施が必要な医薬品)
 - 6.1 臨床適用期間
 - 6.2 がん原性が懸念される場合
 - 6.3 遺伝毒性

- 6.4 用法・用途および適用患者集団
- 6.5 全身暴露
- 6.6 内因性ペプチドおよびタンパク製剤あるいはそのアナログ

第6節 その他のがん原性試験（高橋道人）

- 1. その他のがん原性試験の概略とその考え方
- 2. がん原性検出のためのin vivo追加試験
- 3. 短期・中期in vivoげっ歯類試験系
 - 3.1 短期・中期in vivo試験系の種類
 - 3.2 短期・中期in vivoげっ歯類試験系の選択上考慮すべき点
 - 3.3 メカニズム研究
 - (1) 細胞レベルの変化
 - (2) 生化学的測定
 - (3) 追加の遺伝毒性試験の必要性
 - (4) 試験計画の工夫
- 4. 遺伝子改変動物（トランスジェニック動物）を用いる方法

第7節 生殖発生毒性試験（三分一所厚司）

- 1. 生殖発生毒性試験ガイドライン
- 2. 生殖発生毒性試験の概略
- 3. 生殖発生毒性試験の種類
 - 3.1 受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験（I 試験）
 - (1) 目的
 - (2) 試験方法
 - 3.2 出生前及び出生後の発生並びに母動物の機能に関する試験（II 試験）
 - (1) 目的
 - (2) 試験方法
 - 3.3 胚・胎児発生への影響に関する試験（III 試験）
 - (1) 試験方法
 - 3.4 単一試験計画法（げっ歯類）
 - 3.5 二試験計画法（げっ歯類）
- 4. 生殖発生毒性試験の実施における留意点
 - 4.1 動物種および系統の選択
 - 4.2 投与用量と用量段階の選択
 - 4.3 キネティクス
 - 4.4 動物数について
 - 4.5 交配および妊娠について
 - 4.6 推測統計
- 5. 生殖発生毒性試験の実施のタイミング

第8節 神経毒性試験（江馬 真／高橋宏明／高田孝二／乾 公正）

- 1. はじめに
- 2. 神経毒性に関連するガイドライン
- 3. 段階的試験
- 4. 神経毒性の指標
- 5. 成獣の神経毒性試験
 - 5.1 はじめに
 - 5.2 考慮すべき点
 - 5.3 試験の原則
 - 5.4 方法の概要
 - (1) 供試動物の選択
 - (2) 飼育条件
 - (3) 動物の準備
 - (4) 投与経路と投与液の調製
 - 5.5 手順
 - (1) 動物数
 - (2) 対照群ならびに投与群
 - (3) 信頼性の検討
 - (4) 用量設定
 - (5) リミット試験
 - 5.6 観察
 - (1) 観察の頻度
 - (2) 体重／餌水の摂取量
 - (3) 眼科検査
 - (4) 血液学検査／生化学検査
 - (5) 病理検査
 - (6) 残りの動物
 - 5.7 おわりに
- 6. 神経発生毒性
 - 6.1 はじめに
 - 6.2 OECD-神経発生毒性試験ガイドライン
 - (1) 考慮すべき点
 - (2) 試験の原則
 - (3) 試験の準備
 - (4) 手順
 - (5) 観察
 - 6.3 おわりに

第9節 免疫毒性試験（吉田貴彦）

- 1. 免疫毒性試験の概略
- 2. 免疫毒性とは
- 3. 免疫毒性の範囲
- 4. 免疫毒性試験法の概要
- 5. 医薬品の免疫毒性試験に関するガイドライン
 - 5.1 標準的毒性試験

- 5.2 免疫毒性試験
 - (1) 免疫毒性試験のデザイン
 - (2) 追加の免疫毒性試験
 - (3) 免疫毒性試験の実施時期
6. 免疫毒性的検索法の組合わせ
7. 実験動物の選定
 - 7.1 実験動物の系統
 - 7.2 実験動物の性別
 - 7.3 実験動物の週齢
8. 免疫毒性実験デザインの建て方
 - 8.1 被検物質の曝露の場と免疫応答が惹起される場との関係
 - (1) In vivo曝露, in vivo処置, in vivo測定
 - (2) In vivo曝露, in vivo処置, in vitro測定
 - (3) In vivo曝露, in vitro測定, (無処置)
 - (4) In vivo曝露, in vitro処置, in vitro測定
 - (5) In vitro曝露, in vivo処置, in vitro測定
 - (6) In vitro曝露, in vitro処置, in vitro測定
 - (7) In vitro曝露, in vitro測定, (無処置)
 - 8.2 被検物質の曝露と評価法としての免疫応答との時間的關係
 - (1) 被検物質曝露の先行
 - (2) 被検物質曝露の同時進行
9. 被検物質の曝露
 - 9.1 被検物質の作用時期
 - 9.2 被検物質の投与(曝露)経路
10. 他の生体影響との関係
11. 免疫毒性試験法(各論)
 - 11.1 血液一般検査
 - 11.2 血液生化学検査
 - 11.3 解剖検査
 - 11.4 病理組織学的検査
 - 11.5 免疫抵抗性検査
 - 11.6 イムノフェノタイプング (immuno-phenotype analysis)
 - 11.7 抗体産生応答 (antibody producing response)
 - 11.8 リンパ球増殖活性 (lymphocyte proliferation test)
 - (1) マイトゲン刺激幼若化応答 (mitogen response)
 - (2) リンパ球混合培養 (mixed lymph response)
 - 11.9 細胞傷害性試験 (cytotoxicity test: CT)
 - (1) ナチュラルキラー細胞 (natural killer cell: NK cell) 活性
 - (2) 細胞傷害性Tリンパ球 (cytotoxic T lymphocyte: CTL) 活性
 - 11.10 抗原性試験の応用
 - 11.11 免疫担当細胞機能試験
 - 11.12 即時型過敏症試験 (immediate type hypersensitivity) の応用
 - (1) 能動全身アナフィラキシー試験 (active systemic anaphylaxis: ASA)
 - (2) 受動皮膚アナフィラキシー試験 (passive cutaneous anaphylaxis: PCA)
 - (3) ELISA による特異的IgE測定
 - 11.13 遅延型過敏症試験 (delayed type hypersensitivity: DTH)
 - 11.14 宿主抵抗性試験
 - (1) 感染抵抗性試験 (細菌, ウイルス, 原虫, 真菌など)
 - (2) 腫瘍抵抗性試験
 - (3) 移植片拒絶反応試験 (graft rejection test)
 - 11.15 液性因子などの測定
 - (1) 酵素免疫測定法 (enzyme-linked immunosorbent assay: ELISA)
 - (2) 生物学的測定法 (bioassay)
 - (3) 逆転写PCR法 (reverse transcription polymerase chain reaction: RT-PCR)
 - 11.16 特殊な免疫毒性試験法
 - (1) 組織薄切培養法
 - (2) トキシコゲノミクスを利用した免疫毒性評価法
12. 抗原性試験
 - 12.1 アレルギー反応
 - 12.2 アレルギー反応の種類
 - (1) I型アレルギー
 - (2) II型アレルギー
 - (3) III型アレルギー
 - (4) IV型アレルギー
 - (5) V型アレルギー
13. 抗原性試験(各論)
 - 13.1 能動全身アナフィラキシー試験 (active systemic anaphylaxis test: ASA)
 - 13.2 特異的IgEの測定
 - (1) 受け身皮膚アナフィラキシー試験 (passive cutaneous anaphylaxis test: PCA)
 - (2) ELISA法
 - 13.3 遅延型過敏症試験 (delayed-type hypersensitivity: DTH)
 - (1) モルモット maximization test (Guinea Pig Maximization Test)
 - (2) 足底過敏症試験
 - (3) 接触性過敏症試験 (contact hypersensitivity)
 - 13.4 局所リンパ節試験 (local lymph node assay: LLNA)
 - 13.5 マウス膝窩リンパ節試験 (popliteal lymph node assay: PLNA)
14. あとがき

第10節 依存性試験 (船田正彦/鈴木 勉)

1. はじめに
2. 精神依存の評価法
 - 2.1 Preference法
 - 2.2 薬物自己投与方法
 - (1) 静脈内自己投与方法
 - (2) その他の方法
 - 2.3 Conditioned place preference (CPP) 法
 - (1) CPP法の考え方, 手技と意義

- (2) CPP法の注意点
- (3) CPP法の問題点と有効活用法
- 2.4 薬物弁別
 - (1) 薬物弁別試験の手技
 - (2) 薬物弁別試験の有効活用法
- 3. 身体依存の評価法
 - 3.1 オピオイド型薬物の身体依存性試験
 - (1) 注射法（細谷法）
 - (2) Pellet法
 - (3) Slow release emulsion (SRE) 法
 - (4) Infusion法
 - (5) 薬物混入飼料法 (Drug-admixed food; DAF)
 - (6) その他
 - 3.2 バルビツール酸型薬物の身体依存性試験
 - (1) Drinking法
 - (2) 注射法
 - (3) DAF法（薬物混入飼料法）
 - (4) その他
- 4. まとめ

第11節 局所刺激性試験(感作性試験を含む) (足利太可雄)

- 1. 皮膚刺激性試験
 - 1.1 皮膚刺激とは
 - 1.2 動物を用いる皮膚刺激性試験
 - (1) 皮膚一次刺激性試験
 - (2) 皮膚連続（累積）刺激性試験
 - 1.3 In vitro皮膚刺激性試験
 - (1) 化学物質の物性
 - (2) 角化細胞の単層培養
 - (3) 器官培養
 - (4) 三次元培養皮膚モデル
 - (5) EPIK SIN
- 2. 眼（粘膜）刺激性試験
 - 2.1 眼刺激と眼刺激性試験
 - 2.2 動物を用いる眼刺激性試験 (Draize 試験)
 - 2.3 In vitro眼刺激性試験
 - (1) 開発状況の概要
 - (2) 今後の研究動向
- 3. 皮膚感作性試験
 - 3.1 皮膚感作とは
 - 3.2 動物を用いる皮膚感作性試験
 - (1) Maximization test
 - (2) Adjuvant and strip法 (光感作性試験)
 - (3) Local Lymph Node Assay (LLNA)
 - 3.3 In vitro皮膚感作性試験
 - (1) 定量的構造活性相関 (Quantitative Structure-Activity Relationships : QSAR)
 - (2) タンパク質結合性
 - (3) 抗原提示細胞の活性化
 - (4) その他のアプローチ
 - (5) In vitro光感作性試験

第12節 光毒性試験 一 概 論 一 (足利太可雄)

- 1. 光毒性とは
- 2. 光毒性試験
 - 2.1 動物を用いる光毒性試験
 - (1) 動物
 - (2) 光源
 - (3) 操作手順
 - (4) 判定・評価
 - 2.2 In vitro光毒性試験法
 - (1) 3T3 NRU-PT
 - (2) 今後の研究動向

第13節 医薬品開発における光毒性 (堀井郁夫/内田力) — 創薬早期・開発研究における評価とその実際 —

- 1. はじめに
- 2. 光毒性を取り巻く環境
 - 2.1 光毒性の最近の動向
 - 2.2 欧米当局のガイドラインとその影響
 - 2.3 290 nmという数字の意味
- 3. 光毒性試験方法
 - 3.1 In vivo光毒性試験
 - (1) 動物
 - (2) 光源
 - (3) 操作手順
 - (4) 判定・評価
 - 3.2 In vitro光毒性試験法
 - (1) 3T3 NRU-PT
- 4. 光毒性試験評価の今後の展開
 - 4.1 3T3 NRU試験の限界と新たな取り組み
 - 4.2 新たなリスク評価
 - (1) 市販薬剤におけるROSと光毒性の相関
 - (2) ROSと3T3 NRU試験結果およびDNAダメージとの相関関係
- 5. 創薬早期における化学構造・毒性相関からの光毒性回避
 - 5.1 化学構造とUV吸収

- 5.2 フルオロキノロン抗菌剤
- 5.3 最近のアプローチ：HOMO-LUMOギャップ利用による光毒性の回避
- 5.4 既存薬の分類
- 5.5 合成展開化合物群への適用
- 5.6 光毒性回避に向けて
- 5.7 光毒性回避へ向けての例
- 5.8 光毒性回避のまとめと展望
- 6. 臨床上的問題点とその展望
 - 6.1 臨床における副作用としての光毒性
 - 6.2 臨床における光アレルギー
 - 6.3 臨床における光反応試験
- 7. 今後の展望

第14節 感覚器毒性試験(眼毒性検査、聴覚毒性検査) (久野博司/佐々木正治)

- 1. はじめに
- 2. 視覚器の解剖・生理と発生
 - 2.1 解剖・生理
 - 2.2 発生
- 3. 医薬品の眼の副作用症例
- 4. 実験動物の自然発生病変
- 5. 実験動物における眼科検査法
 - 5.1 一般検査
 - (1) 外観検査
 - (2) 倒像検眼鏡検査
 - (3) 細隙燈顕微鏡検査
 - (4) 病理組織学的検査への連続性の確保
 - 5.2 特殊検査
 - (1) 視覚検査(メナス反応, 迷路テスト, 綿球テスト)
 - (2) 瞳孔反射
 - (3) シルマー試験
 - (4) 蛍光染色
 - (5) 涙膜破壊時間テスト
 - (6) パキメータ
 - (7) 眼圧検査
 - (8) 光干渉断層計
 - (9) レチナトモグラフ
 - (10) 直像検眼鏡検査
 - (11) 蛍光眼底検査
- 6. 実験動物の視覚電気生理検査法
 - 6.1 ERG(網膜電位図)
 - (1) ERGの起源(図29)
 - (2) Full-field ERG(全視野ERG)
 - (3) 多局所ERG
 - (4) PERG(パターンERG)
 - 6.2 VEP(視覚誘発電位)
 - (1) FVEP(フラッシュVEP)
 - (2) PVEP(パターンVEP)
 - 6.3 ERGを記録する
 - (1) ERGに必要な機器, 試薬
 - (2) ERG記録の注意点
 - (3) ERGに影響を及ぼす要因
 - (4) ERGの波形の評価
 - (5) ERG波形成分の抑制
- 7. 聴覚器の解剖・生理と発生
 - 7.1 解剖・生理
 - (1) 内耳
 - (2) 中耳
 - (3) 外耳
 - 7.2 耳の発生
- 8. 実験動物における聴覚検査法

第15節 安全性薬理試験(濱田 悦昌)

- 1. はじめに
- 2. 安全性薬理試験に関するガイドラインの概要
 - 2.1 コアバッテリー試験
 - (1) 中枢神経系
 - (2) 心血管系
 - (3) 呼吸器系
 - 2.2 フォローアップ試験
 - 2.3 補足的安全性薬理試験
- 3. 薬剤誘発性QT延長症候群の潜在的可能性の評価
- 4. GLPの適用
- 5. 用量設定の考え方
 - 5.1 In vivo試験
 - 5.2 In vitro試験
- 6. 代謝物の安全性薬理試験
- 7. 創薬段階における安全性薬理試験と副次的薬理試験
- 8. まとめ

第16節 薬物動態試験(吉田武美)

- 1. はじめに
- 2. 試験方法
 - 2.1 被験物質
 - 2.2 試験系
 - (1) 投与経路

- (2) 投与量
- (3) 投与期間, 投与間隔
- (4) 定量法
- 3. 検討事項
 - 3.1 吸収に関する試験
 - (1) 吸収が問題になった例
 - (2) 吸収に関連する最近の動向
 - 3.2 分布に関する試験
 - 3.3 胎盤・胎児移行性試験
 - (1) 胎盤の構造の種差
 - (2) 医薬品の胎児移行による毒性発現
 - (3) 胎盤移行に関する最近の動向
 - 3.4 薬物の血中存在状態(分布を左右する因子)
 - 3.5 組織分布が問題になった例
- 4. 代謝に関する試験
 - 4.1 薬物代謝酵素誘導剤や阻害剤と代謝阻害が問題となった例
 - 4.2 最近の動向
- 5. 排泄に関する試験
 - 5.1 乳汁移行性試験
乳汁移行の事例
 - 5.2 排泄が問題となった例
 - 5.3 最近の動向
- 6. 薬物動態試験の展望
- 7. 薬物動態試験結果の解釈と評価の留意点
- 8. おわりに

第17節 マイクロドーズ臨床試験とその活用 (池田敏彦)

- 1. はじめに
- 2. マイクロドーズ臨床試験の定義
- 3. マイクロドーズ臨床試験の目的と測定方法
 - 3.1 液体クロマトグラフィー/縦列マスマスペクトロメトリー (LC/MS/MS) を用いる場合
 - 3.2 加速器質量分析法 (Accelerator Mass Spectrometry: AMS) を用いる場合
 - 3.3 陽電子放射断層撮影法 (Positron Emission Tomography, PET) を用いる場合
- 4. マイクロドーズ臨床試験実施に必要な前臨床試験
 - 4.1 拡張型単回投与毒性試験
 - 4.2 放射線内部被曝評価
- 5. 被験物質の品質管理
- 6. おわりに

第18節 毒性試験の統計解析 (浜田知久馬)

- 1. 試験の目的とデータ解析の考え方
 - 2. 計量データの解析
 - 2.1 パラメトリックとノンパラメトリック
 - 2.2 検定の多重性
 - 2.3 多重比較
 - (1) Dunnett検定
 - (2) Tukey検定
 - (3) Williams検定
 - (4) その他の多重比較法
 - 2.4 分散分析と多重比較
 - 3. 計数データの解析
 - 4. 毒性試験に特有な統計解析手法
 - 4.1 単回投与毒性試験
Probit法
 - 4.2 反復投与毒性試験
決定樹
 - 4.3 がん原性試験
 - (1) 生存時間解析手法
 - (2) Peto検定
 - 4.4 変異原性試験の統計解析
 - (1) Ames試験
 - (2) 染色体異常試験
 - (3) 小核試験
 - 4.5 生殖・発生毒性試験
- <統計用語の解説>

第19節 eCTD/CTD (松井 一)

- 1. はじめに
- 2. CTD
 - 2.1 一般原則
 - 2.2 CTDの構成
 - (1) モジュール 1
 - (2) モジュール 2: CTDの概要(サマリー)
 - (3) モジュール 4
 - 2.3 グラニューラリティ・ドキュメント
 - 2.4 CTDの留意点
 - (1) 試験報告書・申請資料の言語
 - (2) 概要文中の図表
 - (3) 申請資料のテンプレート
- 3. eCTD
 - 3.1 eCTDの目的
 - 3.2 eCTDの構成要素
 - 3.3 モジュール 1 に関する事項
 - 3.4 リーフファイル作成に関する事項
 - (1) ファイル形式
 - (2) ファイルサイズ

- (3) フォント
- (4) ブックマーク (しおり)
- (5) ページ番号
- (6) ファイル名
- (7) スキャン文書の解像度
- 3.5 フォルダ作成に関する事項
 - (1) トップレベル・フォルダ名
 - (2) 追加フォルダ
- 3.6 XMLインスタンス作成に関する事項
 - (1) Node Extension
- 3.7 ライフサイクル管理
 - (1) 日本におけるライフサイクル
 - (2) 改訂時の対処方法
 - (3) オペレーション属性
- 3.8 セキュリティ
- 4. eCTD作成の考慮事項
 - 4.1 リーフファイルの標準化
 - 4.2 ブックマークとハイパーテキスト・リンクの付与
 - 4.3 電子的QCチェックの実施
 - 4.4 新たなリソース
 - (1) パブリッシャー
 - (2) eCTD編纂担当者
 - (3) 電子的QC担当者
 - 4.5 署名の取扱い
 - 4.6 スタイルシート
 - 4.7 チェックサム値
 - 4.8 電子記録としてのeCTDに対する対応
- 5. 電子申請の動向
 - 5.1 SEND
 - 5.2 RPS
 - 5.3 XML Authoring

第II章 創薬段階での非臨床安全性評価

第1節 ハイスルーブット・トキシコロジー (堀井郁夫/山田 弘)

- 1. はじめに
- 2. なぜ、ハイスルーブット・トキシコロジーが必要なのか?
 - 2.1 新薬開発過程における創薬から新薬申請までの研究のパラダイムシフト
 - 2.2 ハイスルーブット・トキシコロジーで何を評価するのか?
 - 2.3 ハイスルーブット・トキシコロジーの有効性
 - いかにハイスルーブット・トキシコロジーは貢献できるか?—
- 3. ハイスルーブット・トキシコロジー手法の導入
 - 3.1 創薬の過程 (リード創製・展開) 期における安全性評価:
 - 構造毒性相関とハイスルーブット・トキシコロジー
 - 3.2 ハイスルーブット・スクリーニングにおける測定の自動化と技術
 - 3.3 In vitroおよびin vivoハイスルーブット・トキシコロジーの導入
- 4. ハイスルーブット・トキシコロジーの適用と実施時期
- 5. 実際例の紹介
 - 5.1 In vivoスクリーニング・システムの例—標準的なプロトコル—
 - 5.2 In vitro細胞培養の例
 - (1) In vitro抗真菌剤開発におけるラット初代培養
 - (2) ラット初代培養肝細胞を用いた封入体形成評価法
 - (3) In vitro神経毒性評価系としてのラット脳スフェロイド (SP) 系の検討
 - (4) In vitro甲状腺スフェロイド培養系の毒性試験系の検討
 - (5) ラット胎児初代培養肺細胞を用いた in vitro毒性評価系の検討
- 6. ハイスルーブット・トキシコロジーのさらなるパラダイムシフトと将来の展望

第2節 分子毒性学的アプローチ (堀井郁夫/山田 弘)

- 1. トキシコゲノミクス・トキシコプロテオミクス
 - 1.1 はじめに
 - (1) トキシコゲノミクス
 - (2) トキシコプロテオミクス
 - 1.2 トキシコゲノミクスの適用と最終目的
 - トキシコゲノミクスの適用
 - 1.3 トキシコゲノミクスとトキシコプロテオミクスの技術
 - (1) 遺伝子発現分析
 - (2) DNA-アレイ
 - (3) 二次元ゲル電気泳動
 - (4) 遺伝子発現とタンパク質産生の関係
 - 1.4 トキシコゲノミクス・トキシコプロテオミクスの試験デザイン・バリデーション
 - および対象遺伝子
 - 1.5 活性代謝物を介する肝臓毒性作用での例 (アセトアミノフェン、四塩化炭素、チオアセトアミド)
 - (1) トキシコゲノミクスからみた毒作用機序解明のための化合物の選定
 - (2) 試験のデザイン
 - (3) 試験結果および考察
 - 1.6 胆汁うっ滞障害を示す肝毒性作用の例
 - (1) 化合物と試験デザイン
 - (2) 試験結果および考察
 - 1.7 公表論文の概説およびその考察
 - 1.8 今後の展望
- 2. トキシコパノミクスとしての毒性評価・予測への展開
 - (トキシコゲノミクス, トキシコプロテオミクス, トキシコメタボロミクス)
 - 2.1 はじめに

- 2.2 創薬初期におけるゲノム毒性学の展開
 - (1) In vitroおよびIn vivo HTP-Toxの導入とゲノム毒性学的アプローチ
 - (2) トキシコパノミクス (トキシコゲノミクス・トキシコプロテオミクス・トキシコメタボロミクス)
- 2.3 ゲノム毒性学的アプローチの例
 - (1) In vitro系とin vivo系の相関
 - (2) トキシコパノミクス技術のin vitro安全性評価系への応用
 - (3) 創薬早期における安全性評価系の紹介
- 2.4 ゲノム毒性と薬物動態との接点
- 2.5 安全性評価における分子毒性学の将来への展望
3. トキシコゲノミクスと薬剤感受性
 - 3.1 はじめに
 - 3.2 薬物感受性による薬効・副作用：医薬品治療の実態と“テーラー・メイド”医薬品治療への挑戦
 - 3.3 薬効発現の個人差と副作用（毒作用）発現の個人差：遺伝子関連の観点からみた薬理作用と毒作用
 - 3.4 トキシコパノミクスからみた毒作用発現
 - (1) SNPsと薬物代謝における多様性
 - (2) 遺伝子発現から毒作用発現までの過程での多様性
 - 3.5 毒作用における薬物感受性の事例
 - (1) 肝毒性
 - (2) 聴覚障害
 - (3) その他（抗悪性腫瘍薬の例）
 - 3.6 将来展望

第3節 ヒト肝細胞の調製、保存、及び代謝・毒性研究への利用（篠内桃子）

1. 序
2. 遊離ヒト肝細胞の調製
 - 2.1 ヒト肝細胞調製のための環境整備
 - 2.2 肝組織の水冷保存
 - 2.3 肝細胞の遊離・精製
肝細胞調製法の実際
 - 2.4 日本人の肝細胞標品
3. 肝細胞の凍結保存
 - 3.1 凍結保存液
 - 3.2 凍結保存法
 - 3.3 凍結肝細胞の融解
 - 3.4 肝細胞の凍結・融解法の比較
 - 3.5 初代肝細胞の形態学的変化
 - 3.6 肝細胞の肝機能に及ぼす凍結融解の影響
4. 培養法
5. ヒト肝細胞の代謝・毒性研究への利用
6. まとめ

第4節 ヒト化モデル動物（立野知世）

1. はじめに
2. キメラマウスを作製するためのホスト動物
3. 異種動物肝細胞を持つキメラマウスの作製
4. ヒト肝細胞キメラマウスの性質
5. キメラマウスの薬物動態試験への利用
6. 肝炎ウイルス感染モデル動物としての利用
7. 肝臓幹細胞研究への利用
8. おわりに

第5節 薬物代謝予測と毒性（池田敏彦）

1. はじめに
2. 代謝感受性のスクリーニング
3. 代謝の定性的予測
 - 3.1 有機化学的に酸化を受けやすい部位は代謝（酸化あるいは水酸化）される
 - 3.2 電子密度の高い部位が水酸化されやすい
 - 3.3 エステルおよびアミドは加水分解される
 - 3.4 還元できる官能基は還元される
 - 3.5 他の薬物代謝に関する一般則
 - (1) 一級アミンはアルデヒドを経てカルボン酸にまで酸化されるかアセチル抱合される
 - (2) フェノールはカテコールになり、カテコールはモノメチル化される
 - (3) スルフヒドリル基（SH基）は酸化されてジスルフィド（S-S基）になる
 - (3) 一部グルタチオンとS-S結合による抱合を受けるかS-メチル化される
 - (3) S-メチル化体はスルフォキサイドおよびスルオンになる
 - (4) 窒素を含む複素環化合物はN原子に隣接した部位に酸化を受ける
4. 具体的な薬物代謝予測の方法
5. 薬物毒性と代謝
6. おわりに

第三章 データベースの利用

第1節 構造活性相関による毒性予測（林 真／鎌田栄一）

1. はじめに
2. 既存化学物質の現状
3. データの質
4. Ames試験、in vitro染色体異常試験での試み
 - 4.1 Ames試験における(Q) SARモデルの比較
 - 4.2 Ames試験結果に及ぼす被験物質の分子量
 - 4.3 In silicoで遺伝子突然変異を評価するためのフローチャート

- 4.4 Ames試験結果および3つの(Q)SARモデル解析結果との相違
- 4.5 In vitro染色体試験における(Q)SARモデルの比較
5. 遺伝毒性に関するまとめ
6. 一般毒性試験におけるin silico評価の現状と将来
7. 医薬品の安全性評価におけるin silico評価系の役割
8. まとめ

第2節 創薬における化学構造と毒性予測－毒性回避に向けて－ (内田 力)

1. はじめに
2. 毒性発現要因の分類
3. 作用メカニズムに由来する毒性
4. 別な作用を持つことによる毒性
 - 4.1 hERG チャンネル阻害
 - (1) 分子量の低減
 - (2) 脂溶性 (clogP) の調整
 - (3) 小さな構造変換
 - (4) 塩基性部位の pKa 値の調整
 - (5) Zwitter イオンの形成
 - (6) hERG チャンネル阻害のまとめ
5. 物理化学的性質による毒性
 - 5.1 リン脂質蓄積症 (ホスホリピドーシス)
 - (1) 化合物の物理化学的性質とホスホリピドーシス評価結果
 - (2) ホスホリピドーシス回避に向けて
 - 5.2 光毒性
 - 5.3 物理化学的性質による毒性のまとめ
6. 化学構造に由来する毒性
 - 6.1 反応性代謝物
 - 6.2 反応性代謝物を生成する既知の部分構造
 - (1) アニリンおよびアニリン誘導体
 - (2) ヒドラジン (ヒドラジド)
 - (3) ニトロ化合物
 - (4) 窒素原子を含む環状化合物
 - (5) ベンジルアミン誘導体
 - (6) ホルムアミド誘導体
 - (7) スルホニルウレア誘導体
 - (8) チオウレア誘導体
 - (9) ヒドロキノン誘導体 (キノン誘導体)
 - (10) o-, p-アルキルフェノール誘導体
 - (11) メチレンジオキシフェニル誘導体 (1,3-ベンゾジオキサゾール)
 - (12) 3-メチルインドール誘導体
 - (13) フラン誘導体
 - (14) チオフェン誘導体
 - (15) チアゾール誘導体
 - (16) チアゾリジンジオン誘導体
 - (17) アレン, ブロモアレン誘導体
 - (18) アルキン誘導体
 - (19) α , β -不飽和カルボニル誘導体, アルキルハライド
 - (20) アリファティックアミン誘導体
 - (21) 化学構造に由来する毒性のまとめ
7. まとめ

第3節 トキシコゲノミクスの大規模高精度データベースの構築と解析

(管野 純/北嶋 聡/相崎健一/五十嵐勝秀/小川幸男/関田清司)

1. はじめに
2. トキシコゲノミクス研究の目的と最終目標
3. Percellome Project
 - 3.1 Percellome法: 細胞1個当たりのmRNAコピー数として発現値を得る方法
 - 3.2 Percellome Projectの実験プロトコール
 - 3.3 Percellome Projectデータの構造 (Millefeuille surface data) と解析
 - 3.4 Percellome Projectの概要とデータ例
4. まとめ

第IV章 GLP

第1節 OECD GLPと各国GLP制度 (中島宣雅/佐村恵治)

1. はじめに
2. OECD GLP制度の現状 (概要)
 - 2.1 OECDについて
 - 2.2 OECD GLP制度の現状 (概要)
3. OECD GLPガイドライン
 - OECD GLPガイドラインの現状
4. GLP適合査察プログラム現地評価制度
 - (On-site evaluations of National GLP Compliance Monitoring Programmes)
 - 4.1 背景
 - 4.2 現地評価制度の意義
 - 4.3 現地評価制度の概要
 - 4.4 現地評価の実施方法 (概要)
 - (1) 事前文書評価等
 - (2) 現地評価
 - (3) 現地評価報告書
 - (4) GLP作業グループによる報告書の評価
 - (5) その他
 - 4.5 相互データ受け入れ制度 (MAD: Mutual Acceptance of Data) の今後
5. 米国のGLP制度
 - 5.1 GLPの歴史

- 5.2 GLP調査の種類と実施
- 6. 欧州のGLP制度
 - 6.1 EUにおけるGLPの歴史
 - 6.2 英国
 - 6.3 フランス
 - 6.4 ドイツ
- 7. アジア各国のGLP制度
 - 7.1 アジア各国の全般的な状況
 - 7.2 インド
 - (1) 査察当局
 - (2) その他
 - 7.3 シンガポール
 - (1) 査察当局
 - (2) その他
 - 7.4 台湾
 - (1) 査察当局
 - (2) その他
 - 7.5 タイ
 - 7.6 中国
- 8. おわりに

第2節 日本のGLP制度について (藤田千絵／中島宣雅／(独)農林水産消費安全技術センター
農薬検査部／農林水産省動物医薬品検査所／(独)立農林水産
消費安全技術センター肥飼料検査部)

- 1. はじめに
- 2. GLP制度の動向
 - 2.1 日本国内GLP導入の背景
 - (1) WTO/TBT協定（ガットスタンダード）と市場開放
 - (2) OECD GLPと国際調和
 - 2.2 日本国内GLPの現状
- 3. 医薬品・医療機器GLP
 - 3.1 医薬品・医療機器GLP導入の背景
 - (1) 薬事法の概要
 - (2) GLP導入の背景
 - 3.2 GLP基準の改正
 - 3.3 医薬品・医療機器GLP制度の概要
 - (1) 関係法令等
 - (2) 監視当局の体制および対象分野
 - (3) GLP適合試験施設数（変遷）
 - 3.4 薬事法における他国試験データの受け入れ
- 4. 化学物質GLP
 - 4.1 化学物質GLP導入の背景
 - (1) 化審法の概要
 - (2) GLP導入の背景
 - 4.2 GLP基準の改正
 - 4.3 化学物質GLP制度の概要
 - (1) 関係法令等
 - (2) 監視当局の体制および対象分野
 - (3) GLP適合試験施設数（変遷）
 - 4.4 化審法における他国試験データの受け入れ
- 5. 労働安全衛生法（労安法）GLP
 - 5.1 労安法GLP導入の背景
 - (1) 労安法の概要
 - (2) GLP導入の背景
 - 5.2 GLP基準の改正
 - 5.3 労安法GLP制度の概要
 - (1) 関係法令等
 - (2) 監視当局の体制および対象分野
 - 5.4 労安法における他国試験データの受け入れ
- 6. 農薬GLP
 - 6.1 農薬GLP導入の背景
 - (1) 農薬取締法の概要
 - (2) GLP導入の背景
 - 6.2 GLP基準の改正
 - 6.3 農薬GLP制度の概要
 - (1) 関係法令等
 - (2) 監視当局の体制
 - (3) 分野ごとのGLP適合試験施設数（変遷）
 - 6.4 農薬取締法における他国試験データの受け入れ
- 7. 動物用医薬品等GLP
 - 7.1 動物用医薬品等GLP導入の背景
 - (1) 動物用医薬品等のGLPに関連する法令等の概要
 - (2) GLP制度導入の背景
 - 7.2 動物用医薬品等GLP省令の制定
 - 7.3 動物用医薬品等GLP制度の概要
 - (1) 関係法令等
 - (2) 監視当局の体制および対象分野
 - (3) 動物用医薬品GLP実地調査数（変遷）
 - 7.4 動物用医薬品等GLPにおける他国試験データの受け入れ
- 8. 飼料添加物GLP
 - 8.1 飼料添加物GLP導入の背景
 - (1) 飼料安全法の概要
 - (2) GLP導入の背景
 - 8.2 飼料添加物GLP制度の概要
 - (1) 関係通知
 - (2) 監視当局の体制および対象分野

- (3) GLP査察件数（変遷）
- 9. おわりに
- 9.1 国内協力体制
- 9.2 今 後

第3節 医薬品・医療機器GLP調査の実際（中島宣雅／染谷 仁）

- 1. 医薬品医療機器総合機構とGLP調査
 - 1.1 医薬品医療機器総合機構について
 - (1) 健康被害救済業務
 - (2) 審査関連業務
 - (3) 安全対策業務
 - 1.2 医薬品・医療機器GLPプログラムの概要
- 2. 医薬品・医療機器GLPの制度的枠組み
 - 2.1 承認申請資料の収集・作成基準
 - 2.2 GLP適合性調査
 - 2.3 医薬品・医療機器GLP制度の概要
 - (1) 職員及び組織
 - (2) 信頼性保証部門
 - (3) その他のソフトに関する事項
 - (4) ハードに関する事項
- 3. PMDAによる施設認定のためのGLP適合性調査
 - 3.1 GLP調査の種類等
 - 3.2 調査の流れ
 - 3.3 調査における最近の傾向
 - 3.4 GLP適合性調査に係わる主なQ&A
- 4. おわりに
 - 4.1 医薬品・医療機器の開発のグローバル化と試験の多様化・高度化
 - 4.2 他分野との連携によるノウハウの共有や制度の改正

第4節 信頼性保証部門の業務と役割（杉本哲朗）

- 1. GLP省令におけるQAUに関する規定
 - 2. QAU業務の実際
 - 2.1 試験調査
 - 2.2 施設調査
 - 2.3 コンピュータシステムバリデーションの調査
 - 2.4 委託試験の調査
 - 2.5 複数場所試験の調査
 - 3. QAUのあり方と役割
-

別添 4

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

| 発表者氏名 | 論文タイトル名 | 発表誌名 | 巻名 | ページ | 出版年 |
|---|--|------------------------------|--------|-----------------|------|
| Sanosaka T, Namihira M, Asano H, Kohyama J, Aisaki K, Igarashi K, Kanno J, Nakashima K. | Identification of genes that restrict astrocyte differentiation of midgestational neural precursor cells. | Neuroscience | 155(3) | 780 - 788 | 2008 |
| Niida A, Smith AD, Imoto S, Tsutsumi S, Aburatani H, Zhang MQ, Akiyama T. | Integrative bioinformatics analysis of transcriptional regulatory programs in breast cancer cells. | BMC Bioinformatics | 9 | 404 | 2008 |
| Sekiguchi N, Kawauchi S, Furuya T, Inaba N, Matsuda K, Ando S, Ogasawara M, Aburatani H, Kameda H, Amano K, Abe T, Ito S, Takeuchi T. | Messenger ribonucleic acid expression profile in peripheral blood cells from RA patients following treatment with an anti-TNF-alpha monoclonal antibody, infliximab. | Rheumatology (Oxford) | 47(6) | 780 - 788 | 2008 |
| Ishiguro A, Toyoshima S & Uyama Y | Current Japanese regulatory situations of pharmacogenomics in drug administration. | Exp Review Clin Pharmacol | 1 | 505 - 514 | 2008 |
| 森和彦、宇山佳明 | 国際共同治験の基本 的考え方について | 医薬品研究 | 39 | 557 - 575 | 2008 |

IDENTIFICATION OF GENES THAT RESTRICT ASTROCYTE DIFFERENTIATION OF MIDGESTATIONAL NEURAL PRECURSOR CELLS

T. SANOSAKA,^a M. NAMIHIRA,^a H. ASANO,^a
J. KOHYAMA,^a K. AISAKI,^b K. IGARASHI,^b J. KANNO^b
AND K. NAKASHIMA^{a*}

^aLaboratory of Molecular Neuroscience, Graduate School of Biological Sciences, Nara Institute of Science and Technology, 8916-5, Takayama, Ikoma, Nara 630-0101, Japan

^bDivision of Cellular and Molecular Toxicology, Biological Safety Research Center, National Institutes of Health Sciences, 1-18-1, Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan

Abstract—During development of the mammalian CNS, neurons and glial cells (astrocytes and oligodendrocytes) are generated from common neural precursor cells (NPCs). However, neurogenesis precedes gliogenesis, which normally commences at later stages of fetal telencephalic development. Astrocyte differentiation of mouse NPCs at embryonic day (E) 14.5 (relatively late gestation) is induced by activation of the transcription factor signal transducer and activator of transcription (STAT) 3, whereas at E11.5 (mid-gestation) NPCs do not differentiate into astrocytes even when stimulated by STAT3-activating cytokines such as leukemia inhibitory factor (LIF). This can be explained in part by the fact that astrocyte-specific gene promoters are highly methylated in NPCs at E11.5, but other mechanisms are also likely to play a role. We therefore sought to identify genes involved in the inhibition of astrocyte differentiation of NPCs at midgestation. We first examined gene expression profiles in E11.5 and E14.5 NPCs, using Affymetrix GeneChip analysis, applying the Percellome method to normalize gene expression level. We then conducted *in situ* hybridization analysis for selected genes found to be highly expressed in NPCs at midgestation. Among these genes, we found that *N-myc* and high mobility group AT-hook 2 (*Hmga2*) were highly expressed in the E11.5 but not the E14.5 ventricular zone of mouse brain, where NPCs reside. Transduction of *N-myc* and *Hmga2* by retroviruses into E14.5 NPCs, which normally differentiate into astrocytes in response to LIF, resulted in suppression of astrocyte differentiation. However, sustained expression of *N-myc* and *Hmga2* in E11.5 NPCs failed to maintain the hypermethylated status of an astrocyte-specific gene promoter. Taken together, our data suggest that astrocyte differentiation of NPCs is regulated not only by DNA methylation but also by genes whose expression is controlled spatio-temporally during brain development. © 2008 IBRO. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

*Corresponding author. Tel: +81-743-72-5471; fax: +81-743-72-5479. E-mail address: kin@bs.naist.jp (K. Nakashima).

Abbreviations: bHLH, basic helix–loop–helix; BMP, bone morphogenetic protein; CNTF, ciliary neurotrophic factor; CT-1, cardiotrophin-1; DIG, digoxigenin; E, embryonic day; Gapdh, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; GEO, Gene Expression Omnibus; *gfap*, glial fibrillary acidic protein; *Hmga2*, high mobility group AT-hook 2; JAK, janus kinase; LIF, leukemia inhibitory factor; NPC, neural precursor cell; SSC, sodium chloride sodium citrate; STAT, signal transducer and activator of transcription.

0306-4522/08/\$32.00+0.00 © 2008 IBRO. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.
doi:10.1016/j.neuroscience.2008.06.039

Key words: *N-myc*, *Hmga2*, epigenetics, Percellome method, differentiation.

The mammalian CNS is composed of neurons, astrocytes, and oligodendrocytes. Although these three cell types are derived from common multipotent neural precursor cells (NPCs), their differentiation is spatially and temporally regulated during development (Temple, 2001). Fetal telencephalic NPCs divide symmetrically in early gestation to increase their own numbers, and then undergo neurogenesis through mostly asymmetric divisions. Toward the end of the neurogenic phase, NPCs acquire multipotentiality to generate astrocytes and oligodendrocytes as well as neurons. It has recently become apparent that NPC fate determination is controlled by both extracellular cues, including cytokine signaling, and intracellular programs such as epigenetic gene regulation (Edlund and Jessell, 1999; Takizawa et al., 2001; Hsieh and Gage, 2004).

Interleukin (IL)-6 family cytokines such as cardiotrophin-1 (CT-1), leukemia inhibitory factor (LIF) and ciliary neurotrophic factor (CNTF) activate the janus kinase (JAK)–signal transducer and activator of transcription (STAT) signaling pathway and are known to induce astrocyte differentiation of NPCs (Bonni et al., 1997; Rajan and McKay, 1998). Gene knockouts of LIF (Bugga et al., 1998), LIF receptor β (Koblar et al., 1998), the common receptor component gp130 (Nakashima et al., 1999a) and STAT3 (He et al., 2005) all result in impaired astrocyte differentiation *in vivo*, emphasizing the contribution of JAK-STAT signaling to astroglialogenesis in the developing CNS. Bone morphogenetic proteins (BMPs) are another group of astrocyte-inducing cytokines. They synergistically induce astrocytic differentiation of NPCs via formation of a complex between STATs and BMP-activated transcription factor Smads, bridged by the transcriptional coactivators p300/CBP (Nakashima et al., 1999b).

In addition to these extracellular factors, intracellular programs and factors also play critical roles to regulate astrocytic differentiation of NPCs. We have previously shown that a CpG dinucleotide within a STAT3-binding element (TTCCGAGAA) in the astrocytic marker glial fibrillary acidic protein (*gfap*) gene promoter is highly methylated in NPCs at midgestation (embryonic day (E)11.5), when the cells differentiate only into neurons but not into astrocytes. Since STAT3 does not bind to the methylated cognate sequence, NPCs at midgestation do not express *gfap* even when stimulated by STAT3-activating cytokines such as LIF. As gestation proceeds, the STAT3-binding

site becomes gradually demethylated in NPCs, enabling them to express *gfap* in response to LIF stimulation (Takizawa et al., 2001). Thus, we have proposed that DNA methylation is a critical cell-intrinsic determinant of astrocyte differentiation during brain development. However, the important question of how this astrocyte-specific gene promoter becomes demethylated in NPCs remains unanswered.

Neurogenic basic helix–loop–helix (bHLH) transcription factors have been also shown to regulate astrocyte differentiation during early neural development. Mice carrying mutations in *mash1* and *math3* (Tomita et al., 2000), or, to a lesser extent, *mash1* and *ngn2* (Nieto et al., 2001) exhibit decreased neurogenesis and premature astrogliogenesis. Conversely, overexpression of neurogenic bHLH factors, either *in vivo* during the gliogenic period (Cai et al., 2000) or in cultured NPCs exposed to CNTF (Sun et al., 2001), promotes neurogenesis at the expense of astrogliogenesis. A possible mechanism underlying the repressive effect on astrogliogenesis is that Ngn1 binds to p300/CBP and sequesters them away from STAT3, thereby preventing STAT3 from activating astrocytic gene expression (Sun et al., 2001). Such a mechanism may ensure the restriction of astrocyte differentiation in NPCs that would otherwise differentiate into neurons under the influence of high-level neurogenic bHLH factor expression during the neurogenic period.

Although these studies have provided us with an integrated insight into the mechanism of neurogenic-to-gliogenic switching in NPCs, they do not preclude the involvement of other, as yet unknown, factors. To identify such factors, we first in this study examined gene expression profiles of mid- and late-gestational NPCs by Affymetrix GeneChip analysis, which is widely used to obtain a complete picture of developmental stage-specific gene expression (Abramova et al., 2005; Ajioka et al., 2006). We then performed *in situ* hybridization experiments to investigate the spatio-temporal expression pattern of genes that were found to be highly expressed in midgestational NPCs. Two genes, *N-myc* and high mobility group AT-hook 2 (*Hmga2*), were highly expressed in the ventricular zone of E11.5 but not of E14.5 mouse brain. Transduction of *N-myc* and *Hmga2* into E14.5 NPCs resulted in suppression of astrocyte differentiation, even in the presence of LIF. However, the prolonged expression of these genes in E11.5 NPCs failed to preserve the hypermethylated status of the astrocyte-specific *gfap* promoter. These results suggest that the inhibition of astrocyte differentiation in midgestational NPCs is regulated not only by DNA methylation of astrocyte-specific gene promoters but also by transcription-regulating factors whose expression is controlled spatio-temporally during brain development.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

NPC culture

Timed-pregnant ICR mice were used to prepare NPCs. The protocols described below were carried out according to the animal experimentation guidelines of Nara Institute of Science and

Technology that comply with National Institutes of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals. All efforts were made to minimize the number of animals used and their suffering. NPCs were prepared from telencephalons of E11.5 and E14.5 mice and cultured as described previously (Nakashima et al., 1999b). Briefly, the telencephalons were triturated in Hanks' balanced salt solution by mild pipetting with a 1-ml pipet tip (Gilson, Middleton, WI, USA). Dissociated cells were cultured in N2-supplemented Dulbecco's Modified Eagle's Medium with F12 (GIBCO, Grand Island, NY, USA) containing 10 ng/ml basic FGF (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) (N2/DMEM/F12/bFGF) on culture dishes (Nunc, Naperville, IL, USA) or chamber slides (Nunc) which had been precoated with poly-L-ornithine (Sigma, St. Louis, MO, USA) and fibronectin (Sigma).

Immunocytochemistry

E11.5 and E14.5 NPCs cultured on coated chamber slides were washed with PBS, fixed in 4% paraformaldehyde in PBS, and stained with the following primary antibodies: rabbit anti-SOX2 (1:1000, Chemicon, Temecula, CA, USA), mouse anti- β -tubulin (1:500, Sigma), rabbit anti-GFAP (1:2000, Dako, High Wycombe, UK). The following secondary antibodies were used: Alexa488-conjugated goat anti-rabbit IgG (1:500, Molecular Probes, Eugene, OR, USA), Cy3-conjugated goat anti-mouse IgG (1:500, Chemicon). Nuclei were stained using bisbenzimidazole H33258 fluorochrome trihydrochloride (Nacal Tesque, Kyoto, Japan). All experiments were independently replicated at least three times.

Sample preparation and GeneChip analysis

These procedures were conducted according to the PerceLome method (Kanno et al., 2006) to normalize mRNA expression values to sample cell numbers by adding external spike mRNAs to the sample in proportion to the genomic DNA concentration and utilizing the spike RNA quantity data as a dose-response standard curve for each sample. Cells cultured on coated dishes were washed with PBS, lysed in 500 μ l of RLT buffer (Qiagen K.K., Tokyo, Japan) and transferred to a 1.5-ml tube. Two separate 10- μ l aliquots were treated with DNase-free RNase A (Nippon Gene, Tokyo, Japan) for 30 min at 37 °C, followed by proteinase K (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) for 3 h at 55 °C, and then transferred to a 96-well black plate. PicoGreen fluorescent dye (Molecular Probes) was added to each well, and then incubated for 2 min at 30 °C. The DNA concentration was measured using a 96-well fluorescence plate reader with excitation at 485 nm and emission at 538 nm. Lambda phage DNA (PicoGreen kit, Molecular Probes) was used as standard. The appropriate amount of spike RNA cocktail was added to the sample homogenates in proportion to their DNA concentration. Five independent *Bacillus subtilis* poly-A RNAs were included in the grade-dosed spike cocktail. Total RNAs were purified using an RNeasy Mini kit (Qiagen), according to the manufacturer's instructions. First-strand cDNAs were synthesized by incubating 5 μ g of total RNA with 200 U SuperScript II reverse transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and 100 pmol T7-(dT)₂₄ primer [5'-GGCCAGTGAATTGTAATACGACTCACTATAGGGAGGCGG-(dT)₂₄-3']. After second-strand synthesis, the double-stranded cDNAs were purified using a GeneChip Sample Cleanup Module (Affymetrix, Washington, DC, USA), according to the manufacturer's instructions, and labeled by *in vitro* transcription using a BioArray HighYield RNA transcript labeling kit (Enzo Life Sciences, Farmingdale, NY, USA). The labeled cRNA was then purified using a GeneChip Sample Cleanup Module (Affymetrix) and treated with fragmentation buffer at 94 °C for 35 min. For hybridization to a GeneChip Mouse Genome 430 2.0 Array (Affymetrix), 15 μ g of fragmented cRNA probe was incubated with 50 pM control oligonucleotide B2, 1 \times eukaryotic hybridization control (1.5 pM BioB, 5 pM BioC, 25 pM BioD and 100 pM Cre), 0.1 mg/ml herring sperm

DNA, 0.5 mg/ml acetylated BSA and 1× manufacturer-recommended hybridization buffer in a 45 °C rotisserie oven for 16 h. Washing and staining were performed in a GeneChip Fluidics Station (Affymetrix) using the appropriate antibody amplification, washing and staining protocols. The phycoerythrin-stained arrays were scanned as digital image files, which were analyzed with GeneChip Operating Software (Affymetrix). The expression data were converted to copy numbers of mRNA per cell by the Perclome method, quality controlled, and analyzed using Perclome software (Kanno et al., 2006). The GeneChip data have been deposited in the NCBI Gene Expression Omnibus (GEO; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) and is accessible through GEO series accession number GSE 10796.

Quantitative real-time RT-PCR

Quantitative real-time PCR was performed to confirm the results of GeneChip analysis. RNAs from E11.5 and E14.5 NPCs were reverse transcribed using Superscript II (Invitrogen) and amplified by PCR, with a specific pair of primers for each gene, using the Mx3000P system (Stratagene, La Jolla, CA, USA). The expression of target genes was normalized to that of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*Gapdh*). The gene-specific primers were as follows: mouse *N-myc*: *N-myc*-S, 5'-aacatgctgcaccctcacc-3'; *N-myc*-AS, 5'-tagcaagtccgagcgtgttc-3'; mouse *Hmga2*: *Hmga2*-S, 5'-ggcagccgtccacatcag-3'; *Hmga2*-AS, 5'-taatcctcctcgccgactc-3'; mouse *Sox11*: *Sox11*-S, 5'-gagcctgtacgacgaagtg-3'; *Sox11*-AS, 5'-tgaacaccaggtcggagaag-3'; mouse *Bhlhb5*: *Bhlhb5*-S, 5'-gttgcgcctcaacatcaac-3'; *Bhlhb5*-AS, 5'-actttgca-gaggctggac-3'; mouse *Bcl11a*: *Bcl11a*-S, 5'-gcatcaagctggagaag-gag-3'; *Bcl11a*-AS, 5'-gagcttccatcggaaaactg-3'; mouse *Gapdh*: *Gapdh*-S, 5'-accacagctccatgccatcac-3'; *Gapdh*-AS, 5'-tccaccac-cctgttgcgtga-3'.

In situ hybridization

Digoxigenin- (DIG; Roche) labeled cRNA probes were synthesized for each gene, following the manufacturer's instructions. Cryosections were washed with PBS and fixed with 4% PFA. After fixation, sections were incubated in prehybridization solution (5× sodium chloride sodium citrate (SSC), 1% SDS, 50 µg/ml yeast transfer RNA, 50 µg/ml heparin in 50% formamide) at 70 °C for 1 h and hybridized with 500 ng/ml of DIG-labeled cRNA probes at 65 °C for 16 h. After three washes with wash solution 1 (5× SSC, 1% SDS in 50% formamide) and wash solution 3 (2× SSC in 50% formamide), sections were blocked with 10% normal sheep serum in TBST at room temperature for 1 h and then incubated with 1:1000 alkaline phosphatase-conjugated anti-DIG antibody (Roche) at 4 °C for 16 h. After four washes with TBST, hybridized probes were visualized with 5-bromo-4-chloro-3 indolylphosphate and nitro blue tetrazolium chloride.

Recombinant retrovirus construction and infection

Human *N-myc* and mouse *Hmga2* cDNAs were cloned into the expression vector pMYs, which contains an internal ribosome entry site followed by the region upstream of the *EGFP* gene (Morita et al., 2000). The Plat-E packaging cell line was transiently transfected with the retrovirus DNA by Trans-IT 293 (Mirus, Madison, WI, USA) (Morita et al., 2000). On the following day, the medium was replaced with N2/DMEM/F12/bFGF, and the cells were cultured in this medium for 1 day before virus was collected.

Fluorescence activated cell sorting

Virus-infected E11.5 NPCs were cultured for 4 days, after which GFP-labeled cells were sorted using a FACS Vantage (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) at a flow rate of less than 1500 events/s; gating parameters were set by side and forward

scatter to eliminate debris, dead and aggregated cells. After sorting, genomic DNA was extracted and used for bisulfite sequencing.

Bisulfite sequencing

Sodium bisulfite treatment of genomic DNA was performed using a Methylamp DNA Modification kit (Epigentek, Brooklyn, NY, USA), according to the manufacturer's instructions. The region in the *gfap* promoter containing the STAT-binding site of the bisulfite-treated genomic DNA was amplified by PCR using the following primers: GFmS (5'-GGGATTATTAGGAGAATTTTAGAAGTAG-3'), GFmAS (5'-TCTACCCATACTTAAACTTCTAATATCTAC-3'). The PCR products were cloned into pT7Blue vector (Novagen, Madison, WI, USA) and at least 12 randomly selected clones were sequenced.

RESULTS

Preparation of NPCs from different developmental stages and comparison of their gene expression profiles by GeneChip analysis

E11.5 NPCs do not differentiate into astrocytes, even in the presence of the astrocyte-inducing cytokine LIF, in contrast to 4-day cultured E14.5 NPCs (Takizawa et al., 2001). As a first step toward identifying factors involved in the inhibition of astrocyte differentiation of NPCs at mid-gestation, we examined the gene expression profiles of E11.5 and E14.5 NPCs.

E11.5 and E14.5 NPCs were isolated from embryonic telencephalon and cultured as indicated in Fig. 1A. To evaluate the purity of NPCs in each cell population, the cells were stained with antibody against SOX2, an NPC marker (Graham et al., 2003). As shown in Fig. 1B and C, the majority of cells in both populations were positive for SOX2, indicating that NPCs were highly enriched. An Affymetrix mouse genome GeneChip array was chosen to compare expression profiles in the two populations, and we adopted the Perclome method to normalize gene expression from different samples (Kanno et al., 2006). The method enabled us to quantify mRNA molecules per cell based on the measurement of cell by adding a graded spike cocktail to the samples. We excluded genes whose transcript copy number was below six per cell. Scatter plots illustrating the differences between E11.5 and E14.5 NPCs are shown in Fig. 1D; 194 genes were expressed at >fivefold higher level in E11.5 NPCs than in E14.5 NPCs (Fig. 1D, light blue zone). Of these, 102 were known genes, and were classified by functional category (Fig. 1E). Since we wished to identify negative regulators of astrocyte differentiation, or factors involved in the epigenetic modification in midgestational NPCs, we focused on transcription-related genes (Fig. 1E, red). These 21 genes are listed in Table 1, and five (*N-myc*, *Hmga2*, *Bhlhb5*, *Sox11*, *Bcl11a*) were selected for further analysis because they have been reported to play roles in cell growth, differentiation, and chromatin remodeling in other types of stem cells (Sawai et al., 1990; Zhou et al., 1995; Saiki et al., 2000; Knoepfler et al., 2002; Brunelli et al., 2003; Sock et al., 2004).