

決められた間隔で繰り返されるべきである。例えば、四半期ごと。

2) 改訂ガイドラインでは試験機関に、その投与量レベルや投薬の間隔が適切であるならば、他の通常の毒性試験の一部として遺伝毒性試験のエンドポイントを組み入れることを奨励する。

3) 改訂ガイドラインでは試験機関に複数の遺伝毒性エンドポイントを1つの *in vivo* 試験の中で行うことを推奨する。例えばコメット試験と小核試験。

4) おそらく動物の使用の削減に最も貢献できるのは、現在の試験ガイドラインの考えで生じる偽陽性の数を少なくすることができる点にある。*In vitro* 試験陽性のフォローアップ試験の大部分は意味のない動物試験であるからである。

In vivo 試験への信頼性を高めることは基礎研究や、*in vitro* 試験代替法の評価を阻害することになるかも知れないとの懸念も指摘された。しかしながらパネルではそうにならないことが確認された。CEDER では現在、EPA、NIH の NCGC、および NTP と共に「ハイスループットスクリーニング、トキシコパスプロファイル、および生物学的解釈」に関する研究に協力する旨の覚書にサインするに至っている。“Tox-21”プログラムの下でのこのような高度な基礎研究は、毒性メカニズムの解明に払われており、最終的にはほとんどの動物毒性試験の廃止に至るであろう。

要約

ICH EWG メンバーは、ワークショップが非常に成功したと感じた。パネルメンバーのどれも、改訂ガイドラインが臨床試験における治験者、または実際に薬を服用する患者に、リスクを引き起こすとは感じなかったことは明確であった。ハザードの同定からリスク評価への転換は積極的な方向性であるという明確なコンセンサスが得られた。EWG は、パネラーのコメントに基づき、ガイドラインにおけるいくつかについて明確化が適切であることを認める。これらには、1) オプション1の選択が、より適切であるようなケース、2) *in vitro* 哺乳類培養細胞試験の時、通常の高用量より高い用量を必要とするケース、3) コメット試験が適切な選択ではないケース、などが含まれる。

遺伝毒性専門パネラーからのフィードバックと、新たに明確化された部分を付加した改訂ガイダンスをもって、EWG は、CEDER 幹部に対して改訂ガイダンスの最終化決定を速やかに是認するように求める。

医薬品医療機器等法（薬機法）サイエンス総合研究事業研究班
平成22年度研究会報告（平成22年1月19日）

遺伝毒性試験バッテリーの最適化に関する研究

本間 正充
国立医薬品食品衛生研究所・変異遺伝部

ICH Guidance Documents of S2A and S2B

(<http://www.ich.org/cache/comp0276-2641.html>)

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE

ICH HARMONISED TRIPARTITE GUIDELINE

GUIDANCE ON SPECIFIC ASPECTS OF REGULATORY GENOTOXICITY TESTS FOR PHARMACEUTICALS

S2A

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE

Current Step 4 version
dated 15 Aug 1995

ICH HARMONISED TRIPARTITE GUIDELINE

GENOTOXICITY: A STANDARD BATTERY FOR GENOTOXICITY TESTS OF PHARMACEUTICALS

S2B

Current Step 4 version
dated 15 Jul 1997

Standard Battery of Genotoxicity Tests in ICH (1997)

In Vitro; 2 Tests

- Bacterial Reverse Mutation Assay
- Chromosome Aberration Test or Mouse Lymphoma Assay (MLA)

In Vivo; 1 test

- Micronuclei Test

Choice one of two tests

Performance of Individual Genotoxicity Tests in Detecting Rodent Carcinogens

Reports		Ames	MLA	Chrom. Ab.	MN (Vitro)	MN (Vivo)
Krikland et al., Mutat. Res. 584, 1, 2005	Sens.	58.8	73.1	65.6	78.7	
	Spec.	73.9	39.0	44.9	30.8	
Zeiger Reg. Tox. Pharm. 28, 85, 1998	Sens.	54.0	74.0	52.0		28.0
	Spec.	79.0	32.0	68.0		82.0

Sens. (Sensitivity): % of positive results among rodent carcinogens.
Spec. (Specificity): % of negative results among rodent non-carcinogens.

Background Issues Initiating Revision of the Current Genotoxicity Guideline

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

3R's in animal experiments

- Replacement
- Reduction
- Refinement

Process of Revision of the S2 Guideline in ICH

June 2006 In Yokohama, Japan	The ICH Steering Committee (SC) agreed to initiate a revision of the genotoxicity guideline (Step 1).
October 2006 In Chicago, USA	The ICH Expert Working Group (EWG) discuss revision and plan the approach to a revised guideline.
May 2007 In Brussels, Belgium	The EWG reached a consensus of the revised issues and agree to make a draft guideline according to the consensus.
October 2007 In Yokohama, Japan	The EWG finalized the new guideline for Step2.
February 2008	Postal sign-off for Step2.
June 2008 In Portland, USA	The EWG worked for answering public comments and further discussed for Step 4.
November 2008 In Brussels, Belgium	Skip the EWG meeting, because data of the Comet collaborative study had not been collected.
May 2009 In Yokohama, Japan	Step 4 was ready, but no sign-off!

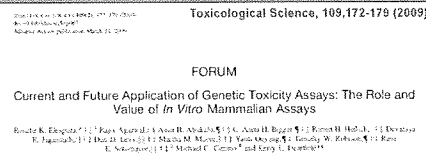
ICH S2 (R1) Step 4 draft (06/09)
Key points of revision

Current (S2B)	Revised S2	
	Option 1	Option 2
Bacterial gene mutation (with repeat)	Bacterial gene mutation (no repeat)	Bacterial gene mutation (no repeat)
In vitro mammalian cell test: Chromosome aberrations OR: mouse lymphoma assay	In vitro mammalian cell test: Chromosome aberrations OR: mouse lymphoma assay OR: micronucleus assay	NO In vitro assay in mammalian cells!
→ 10 mM top conc → > 50/80 % cytotoxicity	→ 1 mM top conc → at most 50/80 % cytotoxicity	
In vivo micronucleus test (acute stand alone test)	In vivo micronucleus test (preferably integrated into rodent toxicity study)	In vivo micronucleus test + 2 nd in vivo endpoint/tissue (i.e. comet assay; preferably as combined study)

ICH SC Meeting Report
 Yokohama, June 6-11, 2009

- ...the EWG developed a draft *Step 4* with all expert party agreement. However, this draft was then edited by the FDA attorney.
- The SC was informed by FDA that the document could not be finalized in Yokohama due to FDA's concerns with the current version of the guideline. The SC noted that some FDA staff feel that the new testing paradigms will weaken safety standards for pharmaceuticals.
- to resolve the controversy a formal scientific resolution will be conducted at the FDA.

The step 4 process was not be finalized in Yokohama



- A group of genetic toxicology experts in several FDA centers strongly objected to the current version of the guideline. This group concerns that the new testing paradigms will weaken safety testing standards for pharmaceuticals.
- The EWG reconsidered these concerns and concluded that their concerns are not justified.

Key issues of conflict

- Option 2: test battery without *in vitro* mammalian cell test (mct)
- Use of (non-validated) *in vivo* Comet assay
- Lowering the top concentration in *in vitro* tests

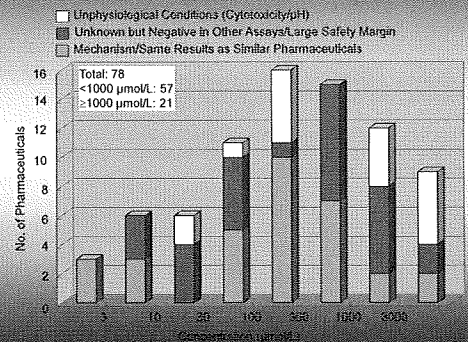
➔ **Less sensitive test battery: we might miss relevant genotoxic drugs**

Possibility of Reduction of Top Concentration in Mammalian Cell Tests-1

JPMA Survey for Pharmaceuticals

- 468 approved pharmaceuticals in Japan from 1999 to 2009
- 78 pharmaceuticals showed positive in mammalian cell genotoxicity assay (mostly chromosome aberration test)

Distribution in Positive Concentrations of Pharmaceuticals in Genotoxicity Assays with Cultured Cells

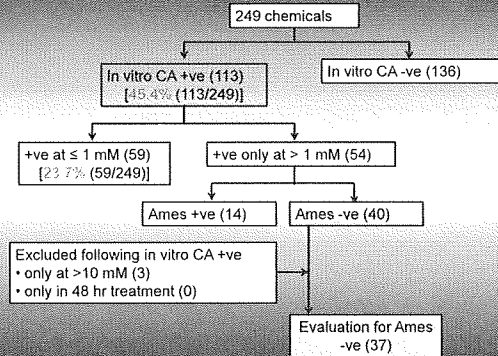


Possibility of Reduction of Top Concentration in Mammalian Cell Tests-2

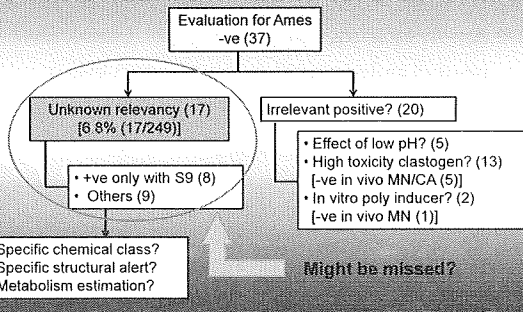
Morita's Survey for Industrial Chemicals

- A part of evaluation of OECD high production volume chemicals
- Accordance with OECD (or Japanese) test guideline and GLP
- Analysis of data from 1994 to 2006
- Ames, in vitro CA, and in vivo MN (if necessary)
- 249 chemicals tested for in vitro CA

Test Results



Analysis of Chemicals Which Were Ames-Negative and In Vitro CA-positive Only at 1 mM



List of Chemicals May Be Missed by the Change of Top Dose Criteria

Chemical	CA Alerts by DEREK	CA Alerts by TIMES
Positive only with S9		
1,4-Dibromobenzene (#65)		CA (M)
Dibutyl adipate (#70)		CA (M)
2-Mercaptobenzimidazole (#71)		CA (P, M)
Sorbitan monooctadecanoate (#76)		CA (M)
N,N-Dimethylbenzylamine (#79)		CA (M)
2-(Diethylamino)ethyl methacrylate (#83)		CA (M)
(Methacryloyloxyethyl) trimethylammonium chloride (#99)	CA	CA (P)
Ethynyltrimethoxysilane (#111)		CA (M)
Others		
2-Hydroxypropanenitrile (#60)		CA (M)
N-Methylamine (#68)		CA (M)
Methacrylic acid, monoester with propane-1,2-diol (#75)		CA (P, M)
2,4-Dinitrophenol (#91)	CA	CA (P, M)
Trimethylamine (#92)		CA (M)
2-Chlorophenol (#95)	CA	CA (P, M)
p-Chlorophenol sodium salt (#96)		CA (P, M)
2-Chlorophenol sodium salt (#97)		CA (P, M)

Expected Capacity of Chromosome Aberration Test by Changing the Criteria of Top Concentration

		Chrom. Ab.
Krikland et al., Mutat. Res. 584, 1, 2005	Sens.	65.6
	Spec.	44.9
Scenario 1 (by Morita's Survey)	If the positive results more than 1mM were judged as negative regardless their carcinogenicity.	
	Sens.	34
Scenario 2 (by JPMA's Survey)	If the positive results more than 1mM were judged as negative regarding that relevant or un-relevant positive is associated with carcinogenicity or non-carcinogenicity, respectively.	
	Sens.	58
	Spec.	65

Will the new guideline weaken the safety testing standard?

Sensitivity of Individual Genotoxicity Tests in Detecting Rodent Carcinogens

	Sensitivity	Reference	Comments
Ames	58.8	Kirkland et al. (2005)	
Chom. Ab.	65.6	Kirkland et al. (2005)	
	58	From JPMA survey	Scenario 2
MN (vivo)	52	Morita et al. (1997)	87 carcinogens (1, 2A, 2B) were examined.
Comet (vivo)	88.6	Kirkland et al., (2008)	25 carcinogens which were neg. or equiv. in NM were examined.
	77	Sasaki et al., (2000)	149 carcinogens (1, 2A, 2B) were examined.

The Number of Carcinogens Missed in the Battery Tests

Current test	New by option1	New by option2
Carcinogen (100)	Carcinogen (100)	Carcinogen (100)
Ames (59%) ↓ 41	Ames (59%) ↓ 41	Ames (59%) ↓ 41
CA (66%) ↓ 14	CA (58%) ↓ 16	Vivo MN (52%) ↓ 20
Vivo MN (52%) ↓ 7	Vivo MN (52%) ↓ 8	Vivo Comet (77-89%) ↓ 2-5

Expecting Sensitivity of the New Battery

- A small number of false negative may increase in Option1.
- False negative may significantly decrease in Option 2.

↓

The new guideline will not weaken the safety testing standard.

Public Meeting

Regarding Scientific Dispute over ICH S2 Revision

- January 25, 2010: at Office of New Drugs FDA CDER, Silver Spring
- panel of invited experts (without obvious bias or conflict)
- two formal presentations
 - ICH EWG (D. Jacobson-Kram)
 - CDER Genetic Tox Subcommittee (A. Bigger)
- discussion of predefined list of questions
- will ask for experts opinion, no voting

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21年度分担報告書

ーバイオ医薬品の新しい課題についての調査研究ー

研究分担者：平林 容子（国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター毒性部）
協力研究者：真木 一茂（独立行政法人 医薬品医療機器総合機構 生物系審査第1部）
松本 峰男（独立行政法人 医薬品医療機器総合機構 生物系審査第2部）
中澤 隆弘（日本イーライリリー株式会社 薬事部前臨床）
三分一所 厚司（第一三共株式会社 安全性研究所）
渡部 一人（中外製薬株式会社 富士御殿場研究所安全性研究部）
中村 和市（塩野義製薬株式会社 開発薬事部）

研究要旨

本研究は、日米EU医薬品規制調和国际会議（ICH）におけるバイオ医薬品の非臨床安全性試験方法に関するS6ガイドラインのカテゴリーベースでの明確化（clarified）と拡充（amplification）の必要性に対応した補遺（Addendum）の策定を支援する目的で、国内の関係組織（独立行政法人医薬品医療機器総合機構 [PMDA] および日本製薬工業協会 [JPMA]）から研究協力者の参加を得て、関連情報の収集や解析を行うものであり、併せてICHの場での議論に資するための国内の意思統一をも図るものである。本年度は、昨年度の成果を元に引き続きS6ガイドラインの補遺策定にむけた専門家ワーキンググループ（S6（R1）EWG）での活動を中心に、これを支援する調査研究を行った。S6ガイドラインの補遺（S6（R1））案は、横浜会議およびその後の電話会議において草稿が作成され、更にセントルイス会議にてStep 2文書として合意され、ICH Steering Committeeの承認の元、各極においてパブリックコメントの収集・対応作業を開始した。本研究グループは、こうしたS6（R1）EWGの活動に参加して、補遺の策定作業に関わり、また国内でのパブリックコメント収集のためのStep 2文書の和訳作業を行いつつ、派生ないしは関連する諸問題についても随時検討を行い、一定の成果を得た。S6ガイドラインの補遺（S6（R1））策定作業は、2010年早期のStep 4到達を目指して続行中であり、次年度以降も粛々と研究を進めていく予定である。

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

A. 研究目的

本研究は、日米EU医薬品規制調和国际会議（ICH）におけるバイオ医薬品の非臨床安全性試験法に関するS6ガイドラインの、カテゴリーベースでの明確化（clarified）と拡充（amplification）の必要性に対応したアップデートの手段としての、補遺（addendum）

の策定を支援することを目的とし、国内の関係組織（独立行政法人医薬品医療機器総合機構 [PMDA] 及び日本製薬工業協会 [JPMA]）から研究協力者の参加を得て、関連情報の収集や解析を行い、併せてICHの場での議論に資するための国内の意思統一も図るものである。

現行ガイドラインのアップデートについては、各極から提案された改訂点を集約し、最終的に5項目に限定して、既存ガイドラインは保持したまま、このものの明確化と拡充を目的とした補遺を作成すること、この際動物愛護の原則（いわゆる3Rs）を考慮すること、が、2008年6月のポートランド会議で合意されている。

補遺の策定が合意された項目は以下の通り：

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

2008年11月のブラッセル会議以降、専門家ワーキンググループ（S6（R1）EWG）による討議、補遺文書案の作成が進められたが、本研究グループは、こうしたS6（R1）EWGの活動に参加して、補遺の策定に従事してきた。本年10月のセントルイス会議で、これまで検討してきた草稿が合意され、Step 2に達したことをうけて、国内でのパブリックコメント収集のためのStep 2合意文書の和訳作業を行った。また、派生ないしは関連する諸問題についても随時検討を行い、一定の成果を得た。

B. 研究方法

本研究は、昨年度に引き続き、PMDAより真木 一茂・松本 峰男各氏、JPMAより中澤 隆弘・三分一 所 厚司・渡部 一人各氏に研究協力者として参加いただくことで進めた。更に、本年度の横浜会議からはJPMAより中村 和司氏にも研究協力者として参加いただいた。尚、国立医薬品食品衛生研究所の井上 達・PMDAの小野寺 博志各氏には、オブザーバーとして、適宜参加していただいた。

1. バイオ医薬品の非臨床安全性試験法ガイドライン（S6ガイドライン）の補遺の策定に向けた専門家ワーキンググループ（S6（R1）EWG）への参画
本研究グループは、昨年度に引き続き、頭記5項

目に対してそれぞれとりまとめた対応案を元に、補遺策定のために開催された横浜会議およびセントルイス会議でのS6（R1）EWG及び、両会議間に開催された電話会議等にも参画し、そこでの議論に対応し、補遺の草稿作成に従事した。新たな問題点については、随時、グループ内での議論を行い、日本側の意志統一と、そのS6（R1）EWGへのフィードバックを行った。

2. Step 2文書の和訳

本研究グループは、S6（R1）EWGで合意に達したStep 2文書の和訳を行った。

3. S6（R1）EWGでの議論に関連する諸問題の検討

本研究グループは、S6（R1）EWGでの議論に関連する諸問題について検討を進めている。本年度は、文献調査として、動物種選択の項の代替モデルの利用に関連した文献の検討を行った（Bussiere *et al.*, 2009）。また、NHPを用いた生殖発生毒性試験の施行時期について、他のガイドライン（M3やS9）との整合性を図るべく、NHPを用いた生殖発生毒性試験に関する文献調査を含む情報収集をおこなった。

C. 研究結果

1. S6（R1）EWGへの参画

S6（R1）EWG は、欧州製薬団体連合会（EFPIA）のDr. Jennifer SimsをRapporteurとして、6極（MHLW、JPMA、食品医薬品局〔FDA〕、米国研究製薬工業協会〔PhRMA〕、欧州連合〔EU〕、EFPIA）及び、カナダ保健省〔Health Canada〕、バイオテクノロジー工業機構（BIO）からの参加者で構成され、横浜会議（平成21年6月8日～11日）、セントルイス会議（同10月26日～29日）のほか、電子メール交信と電話会議を随時行い、作業を進めた。本研究グループは、それぞれの出身母体における関係者等からの意見も収集した上で、随時電子メール交信や、4回にわたる分班会議（平成21年5月22日／7月7日／8月25日（電話会議）／9月25日）により対応を検討し、その結果をS6（R1）EWGにフィードバックした。

S6（R1）EWG は、セントルイス会議においてS6ガイドラインの補遺案を作成し、合意されたStep 2文書（別添1）の要点は以下の通りである。

1-1. 緒言

本補遺の目的は、現行のS6ガイドラインに記載されている動物種の選択、試験デザイン、免疫原性、生殖発生毒性及びがん原性評価の項目について、明確化及び最新化を図ることにある。各項目はそれぞれ現行S6ガイドラインと連動しており、その適応範囲を変えるものではない。

動物愛護の原則（3Rs）については、十分に結果の予想が可能な場合の確認試験的な位置づけの試験についてはこれを推奨しないこと、などにより、特に試験動物の使用数の削減（Reduction）に配慮した。また、代替法の活用（Replacement）については、今後規制当局により信頼性の確認された*in vitro*代替法については、適用を検討すべきであることに言及した。尚、動物の苦痛の軽減（Refinement）については、試験動物を使用する際の一般的な義務事項であるので、あえて言及することはしていない。

1-2. Species Selection（動物種選択）

- 適切な動物種の選択にあたって考慮すべき事項として、動物種間の相対的な標的結合親和性、受容体ーリガンド結合占有率及び動態の質的・量的な比較、機能活性の評価などのデータの活用を推奨することとした。更に、標的分子が通常の試験動物で発現しないケース（外来分子を含む）について動物種選択に対する考え方を整理した。
- 適切な動物種の選択における組織交差反応性の有用性について、これまでの免疫組織化学的検査の結果からは、有用性に乏しいことが明らかとなり（PhRMA 及び BIO's Preclinical Safety Committee（BioSafe）の調査研究、manuscripts in preparation）、推奨しないこととした。
- 1種類又は2種類の動物種選択の基準について、2種類の動物種による試験が求められるケースを同等の適切性を示すげっ歯類及び非げっ歯類がある場合に限り、短期試験のみ両者による試験を求めること、長期試験は科学的根拠がない限りげっ歯類で行うこと、相同タンパク質を用いた代替試験を2種目の動物として使用することは推奨しないこととした。

- 代替モデル（相同タンパク質、トランスジェニック動物、ノックアウト動物及び病態モデル）の使用について、S6ガイドライン第3.3項の考え方はそのまま生かされることを再確認した。一方、これらモデル系は有害作用の確認には役立つが、曝露量に基づく量的なリスク評価には適さないなどの特性を理解した上で、有効活用されることが望まれる。

1-3. Study design（試験デザイン）

- 用量設定及び薬物動態／薬力学的原則の適用について、最高投与量は最高薬理作用あるいは推定臨床曝露量の10倍までの高い方の用量として設定することとした。これは、バイオ医薬品の毒性変化は過剰な薬理作用によるものであることが多く、off-targetの毒性は極めてまれであること、および最高薬理作用量以上に投与量を上げても薬理作用が強くなるのではなく作用持続が長くなるだけであることを考慮して至った結論である。また、このようにして定められた最高投与量において毒性が観察されなかった場合、さらに高い用量で試験を追加してもこれによって得られる新たな情報は乏しいことが確認された。この最高投与量の設定方法については、これまでも議論の多い点であったので、今後、EWG以外の審査官を含め、合意を形成することが大切である。
- 反復投与毒性試験の最長期間について、6、9あるいは12ヶ月の投与期間の妥当性について検討し、これまでに開発されたバイオ医薬品について6ヶ月までの試験で毒性は評価できるという調査結果（Clarke *et al.*, 2008）を踏まえ、現行のS6ガイドラインの文言（原則6ヶ月でよい）を支持することで改めて合意にいたった。但し、この試験期間についてもいろいろな考え方があり、今後EWG以外から別の意見が出される可能性も残されている。
- 回復性について、試験施行の目的は、作用の可逆性をみることにあり、遅延効果をみることで無効であることを明確化した。また、回復性試験は少なくとも1試験で実施すればよいこととした。

- 早期探索的臨床試験について、M3ガイドラインで示されている内容は、バイオ医薬品にも適用される旨が記載された。

1-4. Immunogenicity (免疫原性評価)

- 実施意義：非臨床における免疫原性試験は、試験結果の解釈、及び試験デザインの設定に有用であるが、ヒトでの免疫原性を予測するものではないことを確認した。
- 実施の必要性：免疫原性の検討が必要な場合には、抗体検出試験を実施すべきであるが、持続的な薬力学的活性が示され、薬物動態／トキシコキネティクスに予期せぬ変化がみられない場合や、免疫介在性の反応の所見がみられない場合には、抗薬物抗体の測定は推奨しないこととした。

1-5. Reproductive/developmental toxicity (生殖発生毒性試験)

- 動物種選択について、げっ歯類及びウサギが薬理作用を示す場合は、これら動物種を使用すべきであり、適切な動物種が2種以上存在する場合にも、科学的妥当性が示されれば、胚・胎児発生への影響は動物種1種で評価可能とした。
- 代替法を用いた評価について、ヒト以外の霊長類(NHP)のみで薬理作用を示す場合には、相同タンパク質を用いた評価でなく、臨床使用されるバイオ医薬品を用いたNHPでの評価を推奨することとした。また、妊娠への有害作用を示唆する十分な科学的根拠がある場合には、追加の非臨床試験の実施を推奨しないこととした。
- NHPを用いた試験：受胎能への影響は、性成熟に達したNHPを用いた3ヶ月以上の反復投与毒性試験の中での評価を推奨することとした。胚・胎児発生、並びに出生前及び出生後の発生への影響は、妊娠20日から出生までの投与による1試験(例：Enhanced pre- and post-natal development [ePPND] 試験、(Stewart, 2009))で評価可能とした。
- 試験の実施時期：器官形成期における胚・胎児への曝露量が低いことが示されている場合(モノクローナル抗体など)は、臨床第Ⅲ相試験期

間に胚・胎児発生毒性試験の実施が可能であるとした。また、器官形成期における胚・胎児への曝露が認められ、かつNHPのみで評価可能なバイオ医薬品については、ePPND試験を実施する場合、臨床第Ⅲ相試験実施にあたり、生後7日までの新生児に関する中間報告書の提出が必要であるとした。

1-6. Carcinogenicity (がん原性評価)

- がん原性評価のあり方及びリスクコミュニケーションについて：バイオ医薬品においても、まず既存のS1aガイドラインに準拠して、がん原性試験実施の必要性を検討することとした。ここでがん原性の評価が必要と判断される場合でも、入手可能な様々な情報を基に適切なデータの評価を行うことで、リスク評価が可能と判断される場合は、あえて試験を実施し確認することは推奨しないこととした。尚、これらの評価結果は、臨床現場とのリスクコミュニケーションやリスク管理計画及び市販後調査等に供されるものとした。
- がん原性試験実施の必要性について：
 - a) 作用機序よりがん原性のリスクが懸念されるバイオ医薬品(例：免疫調節剤、成長因子)の場合：In vitro試験又は長期反復投与毒性試験によりがん原性の懸念が改めて示された(裏付けられた)場合、更にごがん原性試験を行うことは推奨しないこととした。一方、in vitro試験(非遺伝毒性を前提としたプロモータ活性の検出を企図したもの)又は長期反復投与毒性試験によりがん原性の懸念が認められず(作用機序から想定された懸念が否定された場合)、かつ、がん原性に関する懸念を添付文書等へ記載することを控えたい場合には、申請者は当該懸念を軽減するために適切ながん原性評価のための追加試験の実施を提案することができることとした。
 - b) 作用機序からはがん原性の懸念が不明であるバイオ医薬品の場合：まずin vitro試験又は長期反復投与毒性試験においては、薬剤特性に応じた評価項目を追加してより広範な評価を行うべきである。これらのin vitro試験又は長期反復投

与毒性試験により新たにがん原性の懸念が示され、かつ、当該懸念を添付文書等へ記載することを控えたい場合には、申請者は適切ながん原性評価のための追加試験の実施を提案することができることとした。一方、*in vitro*試験又は長期反復投与毒性試験によりがん原性の懸念が示されなかった場合は、がん原性試験の施行は推奨されない。

- がん原性試験の方法：現行ガイドラインにあるとおり、利用可能な適切な動物種が存在しない場合や免疫原性の問題から、通常の生涯投与によるがん原性試験を適切に実施できる機会は稀であることを再確認した。さらに、代替法として実施されてきた相同タンパク質を用いたげっ歯類のがん原性試験や短期がん原性試験で得られるデータの解釈も一般的に限定的なものであり、今後は推奨しないこととした。
- 以上のEWG合意事項に関して、特に従来のげっ歯類を用いたがん原性試験の実施要件は、今後のパブリックコメントの内容次第では、Step 4合意にむけた議論の余地を残している。

2. Step 2文書の和訳

本研究グループは、S6 (R1) EWGで合意に達したStep 2文書の和訳を、電子メール発信や平成21年12月11日に開催した分班会議（第5回班会議）等によって行い、パブリックコメントの収集に供した（別添2）。パブコメ期間は平成22年1月8日～3月8日の2ヶ月間とし、次期欧州会議までに収集したコメントの整理、対応策の検討などを進める予定である。

3. S6 (R1) EWGでの議論に関連する諸問題の検討

本研究グループは、S6 (R1) EWGでの議論に関連する諸問題について検討を進めている。本年度は文献調査として、動物種選択の項の代替モデルの利用に関連した文献 (Bussiere *et al.*, 2009) の検討を行い、S6の理念から離れるものではないこと、並びに、補遺に取り込むべき新たな内容を含まないことなどを確認した。また、NHPを用いた生殖発生毒性試験の施行時期について、他のガイドライン (M3やS9) との整合性を図るべく、抗体の胎盤通過に関する文献調査 (Fujimoto *et al.*, 1983; Coe *et al.*, 1993; Malek *et*

al., 1996) や、ePPND法の推奨者であるProf. Dr. G. F. Weinbauer (Covance Laboratories GmbH) をはじめ、Drs. N. Makori & S. Oneda (SNBL USA, Ltd.) が講師を務めた講演会（「ePPND試験の考え方と実際」、平成21年9月7日、東京）等を利用し、NHPを用いた生殖発生毒性試験に関する情報収集をおこなった。

更に、関連課題に関するワークショップを開催するべく準備を進めた。まず、JPMAからStep 4到達を見込んだS6 (R1) についてのワークショップの企画が、2010年開催予定の第37回日本トキシコロジー学会の安仁屋洋子年会長に提案され採択されたので、補遺策定による現行ガイドラインの明確化及び拡充のポイントについて、S6 (R1) EWGメンバーのうち真木一茂及びRuth M Lightfoot-Dunn (PhRMA代表) 両氏を演者とし、発表準備を進めている。尚、当該ワークショップには、核酸医薬品や細胞治療剤、バイオシミラー、さらには最近ガイドライン制定の運びとなったワクチンについても盛り込むこととなり、演者の選定を行った。これらはS6対象とは作用機作も安全性に対する考え方も全く異なるが、それにもかかわらず、これらを同一ワークショップ内で取り扱うことで誤解が誘発される危惧があるとの指摘を受け、これを回避するべく、次善策としてそれぞれの相違点を強調したイントロダクションを加えて対応することとした。

また、バイオ医薬品の非臨床試験に関する調査研究を行ったBioSafeの研究者からの提案に従い、共同シンポジウムの開催に向けて調整を進めている。

D. 考察

以上、本研究は、バイオ医薬品の非臨床安全性試験法に関するS6ガイドラインの、カテゴリーベースでの明確化と拡充の必要性に対応したアップデートの手段としての補遺の策定を支援することを目的とし、これに資するための対応及び検討を行った。

S6 (R1) EWGにおける議論は、EWGメンバー内での考え方に基本的には相違はなく、比較的スムーズに進行したのに対して、EWGメンバーの出身母体からの要求はしばしば過大なものとなり、しかも直接の議論にならないがゆえに、対応に苦慮すること

になった。幸いにしてセントルイス会議では、Step 2 合意に達することが出来たが、最高容量設定、反復投与毒性試験の最長期間、発生生殖毒性における動物種選択の考え方、がん原性の評価など、今後のパブリックコメントの内容や、その対処方によっては Step 4での合意形成が困難となる危険性を内在している項目については、いずれもそれぞれの項目の立脚点となる調査研究結果の内容を出身母体に浸透させることによって合意形成を図る必要があるものと思われる。

E. 結論

S6ガイドラインの明確化と拡充の為の補遺の策定を支援する目的で、国内の関係組織（PMDAおよびJPMA）から研究協力者の参加を得て、関連情報の収集や解析を行い、合わせてICHの場での議論に資するための国内の意思統一を図り、S6 (R1) EWGにおけるS6ガイドラインの補遺案として、Step 2合意文書の策定作業に関わり、継いで国内でのパブリックコメント収集のための当該文書の和訳作業を行いつつ、派生ないしは関連する諸問題についても随時検討を行い、一定の成果を得た。

F. 健康危険情報

該当しない

G. 研究発表

1. 論文発表

該当しない

2. 学会発表

該当しない

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

該当しない

2. 実用新案登録

該当しない

3. その他

該当しない

引用文献

- Bussiere, J. L., Martin, P., Horner, M., Couch, J., Flaherty, M., Andrews, L., Beyer, J., and Horvath, C. (2009). Alternative strategies for toxicity testing of species-specific biopharmaceuticals. *Int J Toxicol* **28**, 230-253.
- Clarke, J., Hurst, C., Martin, P., Vahle, J., Ponce, R., Mounho, B., Heidel, S., Andrews, L., Reynolds, T., and Cavagnaro, J. (2008). Duration of chronic toxicity studies for biotechnology-derived pharmaceuticals: is 6 months still appropriate? *Regul Toxicol Pharmacol* **50**, 2-22.
- Coe, C. L., Kemnitz, J. W., and Schneider, M. L. (1993). Vulnerability of placental antibody transfer and fetal complement synthesis to disturbance of the pregnant monkey. *J Med Primatol* **22**, 294-300.
- Fujimoto, K., Terao, K., Cho, F., and Honjo, S. (1983). The placental transfer of IgG in the cynomolgus monkey. *Jpn J Med Sci Biol* **36**, 171-176.
- Malek, A., Sager, R., Kuhn, P., Nicolaidis, K. H., and Schneider, H. (1996). Evolution of maternofetal transport of immunoglobulins during human pregnancy. *Am J Reprod Immunol* **36**, 248-255.
- Stewart, J. (2009). Developmental toxicity testing of monoclonal antibodies: an enhanced pre- and postnatal study design option. *Reprod Toxicol* **28**, 220-225.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION OF TECHNICAL
REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE

DRAFT CONSENSUS GUIDELINE

**ADDENDUM TO ICH S6: PRECLINICAL SAFETY EVALUATION
OF BIOTECHNOLOGY-DERIVED PHARMACEUTICALS
S6(R1)**

Current *Step 2* version

Dated October 29 2009

At Step 2 of the ICH Process, a consensus draft text or guideline, agreed by the appropriate ICH Expert Working Group, is transmitted by the ICH Steering Committee to the regulatory authorities of the three ICH regions (the European Union, Japan and the USA) for internal and external consultation, according to national or regional procedures.

**S6
Document History**

First Codification	History	Date	New Codification November 2005
S6	Approval by the Steering Committee under <i>Step 2</i> and release for public consultation.	6 November 1996	S6
S6	Approval by the Steering Committee under <i>Step 4</i> and recommendation for adoption to the three ICH regulatory bodies.	16 July 1997	S6

Current *Step 2* version

S6(R1)	Approval by the Steering Committee under <i>Step 2</i> and release for public consultation.	29 October 2009	S6
--------	---	-----------------------	----

ADDENDUM TO ICH S6: PRECLINICAL SAFETY EVALUATION OF BIOTECHNOLOGY-DERIVED PHARMACEUTICALS S6(R1)

Draft ICH Consensus Guideline

Released for Consultation on 29 October 2009, at *Step 2* of the ICH Process

TABLE OF CONTENTS

1.	INTRODUCTION	1
1.1	Purpose of the Addendum.....	1
1.2	Background.....	1
1.3	Scope of the Guideline.....	1
2.	SPECIES SELECTION	1
2.1	General Principles.....	1
2.2	Tissue Cross-Reactivity:.....	2
2.3	One or Two Species.....	2
2.4	Use of Homologous Proteins, Transgenic Models, KOs and Disease Models:	3
3.	STUDY DESIGN	3
3.1	Dose Selection and application of PK/PD Principles.....	3
3.2	Duration of Studies.....	3
3.3	Recovery.....	3
3.4	Exploratory Clinical Trials.....	4
4.	IMMUNOGENICITY	4
5.	REPRODUCTIVE AND DEVELOPMENTAL TOXICITY	4
5.1	General Comments.....	4
5.2	Fertility.....	5
5.3	Embryo-fetal and Pre/Post-Natal Development.....	5
5.4	Timing of studies.....	6
6.	CARCINOGENICITY	6
7.	ENDNOTES	7
8.	REFERENCES	8

LIST OF ABBREVIATIONS

ADA	Anti-drug antibodies
ADC	Antibody drug conjugate
ePPND	Enhanced pre- and post-natal development
EU	European Union
GD	Gestational Day
ICH	International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use
i.v.	Intravenous
NHP	Non Human Primate
PK	Pharmacokinetics
PD	Pharmacodynamics
WOCBP	Women of Childbearing Potential

ADDENDUM TO ICH S6: PRECLINICAL SAFETY EVALUATION OF BIOTECHNOLOGY-DERIVED PHARMACEUTICALS S6 (R1)

1. INTRODUCTION

1.1 Purpose of the Addendum

The purpose of the addendum is to provide clarification on and an update of the following topics discussed in the original ICH S6 guidance: species selection, study design, immunogenicity, reproductive and developmental toxicity and assessment of carcinogenic potential. Scientific advances and experience gained since publication of the original ICH S6 guidance call for this addendum.

This harmonised addendum will help to define the current recommendations and reduce the likelihood that substantial differences will exist among regions.

This guidance should facilitate the timely conduct of clinical trials, reduce the use of animals in accordance with the 3Rs (reduce/refine/replace) principles and reduce the use of other drug development resources. Although not discussed in this guidance, consideration should be given to use of new *in vitro* alternative methods for safety evaluation. These methods, if validated and accepted by all ICH regulatory authorities, can be used to replace current standard methods.

This guidance promotes safe and ethical development and availability of new pharmaceuticals.

1.2 Background

The recommendations of this addendum further harmonise the nonclinical safety studies to support the various stages of clinical development among the regions of European Union (EU), Japan, and the United States. The present guidance represents the consensus that exists regarding the safety evaluation of biotechnology-derived pharmaceuticals.

1.3 Scope of the Guideline

This addendum does not alter the scope of the original ICH S6 guideline.

2. SPECIES SELECTION

2.1 General Principles

A number of factors should be taken into account when determining species relevancy. Comparisons of target sequence homology between species can be an appropriate starting point, followed by cell-based assays to make qualitative and quantitative cross-species comparisons of relative target binding affinities and receptor/ligand occupancy and kinetics. Assessments of functional activity are also recommended. Functional activity can be demonstrated in species-specific cell-based systems and/or *in vivo* pharmacology or toxicology studies. Modulation of a known biologic response or of a pharmacodynamic marker can provide evidence for functional activity to support species relevance.

Consideration of cross-species differences in target binding and functional activity in the context of the intended dosing regime should provide confidence that a model is capable of demonstrating any potentially adverse consequences of target modulation. When the target is not constitutively expressed in typical preclinical species, binding affinity and activity in cell-based systems can be sufficient to guide species selection.

For monoclonal antibodies and related products directed at foreign targets (i.e., bacterial, viral, etc.), it is desirable to evaluate safety in an animal model of disease. Where this is not feasible, a short-term safety study (see ICH S6) in one species (choice of species to be justified by the sponsor) can be considered and appropriate risk mitigation strategies should be adopted for clinical trials. No additional toxicity studies are appropriate.

As described in ICH S6, when no relevant species can be identified because the biopharmaceutical does not interact with the orthologous target in any species, use of homologous molecules, transgenic models and/or animal models of disease can be considered.

The potential for toxicity arising from a novel toxin or toxicant incorporated as an antibody-drug/toxin conjugate (ADC) is likely to occur in a target-independent manner and should be assessed in two species (one rodent and one non-rodent). Where possible, preference should be given to species that exhibit target-specific binding. For toxins or toxicants which are not novel and for which there is a sufficient body of scientific information available, safety evaluation of ADC in a single relevant species should suffice.

2.2 Tissue Cross-Reactivity

Based on recent scientific data, the text in ICH S6, Section 3.3 paragraph 2 is no longer appropriate. Immunohistochemical examination of potential binding of monoclonal antibodies and related products to the target epitope (tissue cross reactivity) should not be used for selection of relevant species for safety evaluation. Other techniques that assess target expression (e.g., *in situ* hybridization, flow cytometry) can provide supportive information for species selection.

However, tissue cross-reactivity data with human tissues can provide useful information to supplement knowledge of target distribution and can provide information on unexpected epitope binding. Tissue cross reactivity studies in nonclinical species are considered to have limited value and therefore are not generally recommended.

Binding to areas not typically accessible to the biopharmaceutical *in vivo* i.e., cytoplasm might not be relevant.

For bi-specific antibodies, evaluating each binding site separately in this assay is not called for.

2.3 One or Two Species

If there are two pharmacologically relevant species for the clinical candidate (one rodent and one non-rodent), then both species should be used for short-term (up to 1 month duration) toxicology studies. If the toxicological findings from these studies are similar in both species, then longer-term studies in one species are usually considered sufficient; the rodent species should be considered unless there is a rationale for using non-rodents. Studies in two non-rodent species are not appropriate.

The use of one species is justified when the biological activity of the biopharmaceutical is well understood or the clinical candidate is pharmacologically active in only one species.

Studies in a second species with a homologous product are not considered to add further value for risk assessment and are not recommended.

2.4 Use of Homologous Proteins, Transgenic Models, KOs and Disease Models

In some cases, alternative approaches to evaluating safety in a pharmacologically-relevant animal species should be used. ICH S6 Section 3.3 can be referenced for further information.

Homologous proteins can be used for hazard detection and understanding the potential for adverse effects due to exaggerated pharmacology, not for exposure-based quantitative risk assessment. It can be possible to conduct safety evaluation studies with homologous proteins using a control group and one dose group provided there is a scientific justification for the dose level selected.

3. STUDY DESIGN

3.1 Dose Selection and application of PK/PD Principles

The toxicity of most biopharmaceuticals is related to their targeted mechanism of action; therefore, relatively high doses can elicit adverse effects which are apparent as exaggerated pharmacology.

A rationale should be provided for high dose selection. PK-PD approaches can assist in high dose selection by identifying i) a dose which gives the maximum intended pharmacological effect in the preclinical species and ii) a dose which gives an up to 10-fold exposure multiple over the maximum exposure to be achieved in the clinic. The highest of these two doses should be chosen as the high dose group in pre-clinical toxicity studies unless scientific data supports a lower dose.

Where PD endpoints are not available, then an up to 10-fold multiple over the highest anticipated clinical exposure is sufficient, provided that corrections are made for differences in target binding and *in vitro* pharmacologic activity between the nonclinical species and humans. For example, a large relative difference in binding affinity and/or *in vitro* potency might suggest the need for higher doses in the nonclinical studies. In the event that toxicity cannot be demonstrated by this approach, then additional toxicity studies at higher multiples of human dosing are unlikely to provide additional useful information.

3.2 Duration of Studies

For chronic use products, the adequacy of 6-month chronic studies is supported by the scientific experience with biopharmaceuticals to date. Studies of longer duration are not anticipated to provide useful information to change the clinical course of development.

3.3 Recovery

Recovery of pharmacological and toxicological effects with potential adverse clinical impact should be understood. This information can be obtained by including a non dosing period in at least one study. The purpose of the non dosing period is to examine reversibility of these effects, not to assess delayed toxicity. The demonstration of complete recovery is not considered essential. An evaluation of recovery is not warranted if there are no adverse effects at the end of the dosing period or sufficient scientific justification can be provided (e.g., evidence that an adverse effect is generally reversible, or an adequate margin of safety exists for the proposed clinical population).

The addition of a recovery period just to assess for immunogenicity is not appropriate.

3.4 Exploratory Clinical Trials

The flexible approaches to support exploratory clinical trials as outlined in ICH M3(R2) can be applicable to biopharmaceuticals. It is recommended that these approaches be discussed and agreed upon with the appropriate regulatory authority.

4. IMMUNOGENICITY

Immunogenicity assessments are conducted to assist in the interpretation of the study results and design of subsequent studies. Such analyses in nonclinical animal studies are not relevant in terms of predicting potential immunogenicity of human or humanized proteins in humans.

Measurement of anti-drug antibodies (ADA) in nonclinical studies is not routinely warranted if there is evidence of sustained pharmacodynamic activity, no unexpected changes in the pharmacokinetics of the test article during the dosing or recovery phase, and/or no evidence of immune-mediated reactions (immune complex-related, vasculitis, anaphylaxis, etc.). However, it is difficult to predict whether such analysis will be called for prior to completion of the in-life phase of the study; therefore, it is often useful to obtain appropriate samples during the course of the study, which can subsequently be analyzed if needed to aid in interpretation of the study results. When study results suggest there is a need to understand immunogenicity to interpret study data, potential for immunogenicity antibody detection assays should be conducted to evaluate the presence of ADAs. When ADAs are detected, the effect on the study results should be assessed, including effects on PK and drug clearance, pharmacology effects, and toxicity. Characterization, specifically of neutralizing potential, is generally not warranted, particularly if adequate exposure and pharmacological effect can be demonstrated by a pharmacodynamic marker of activity in the *in vivo* toxicology studies. In the event that neutralizing antibody assessment is deemed appropriate to interpret the study findings, assessment of neutralizing activity can be addressed indirectly with *ex-vivo* bioactivity assay, a combination of assay formats for PK-PD, or directly in a specific neutralizing antibody assay.

5. REPRODUCTIVE AND DEVELOPMENTAL TOXICITY

5.1 General Comments

Reproductive toxicity studies should be conducted in accordance with the principles outlined in ICH S5(R2); however, the specific study design and dosing schedule can be modified based on an understanding of species specificity, the nature of the product and mechanism of action, immunogenicity and/or pharmacokinetic behaviour and embryo-fetal exposure.

Note 2 of ICH S6 still applies with respect to products where there is public knowledge regarding toxicity to reproduction.

The evaluation of toxicity to reproduction should be conducted only in pharmacologically relevant species. When the clinical candidate is pharmacologically active in rodents and rabbits, these species should be used unless there is a scientific reason to use a NHP. As per ICH S5 Note 5 (2.1), one species can be sufficient to address effects on embryo-fetal development if there is more than one relevant species (see Section on species selection). The sponsor should provide a scientific rationale for selection of species for assessment of effects on embryo-fetal development.

When the clinical candidate is pharmacologically active only in NHP, an appropriate assessment of reproductive toxicity in NHPs is generally preferred over alternative approaches such as studies with homologous products in other species. However, the sponsor should provide a scientific justification when these alternative approaches are proposed. When the weight of evidence (e.g., mechanism of action, phenotypic data from KO mice, class effects) suggests that there will be an adverse effect on pregnancy outcome, these data might provide adequate information to communicate risk, and additional nonclinical studies might not be warranted.

When no relevant animal species exists for the clinical candidate, the use of transgenic mice expressing the human target or homologous protein in a species expressing the human ortholog should be considered.

5.2 Fertility

For products where rodents are a relevant species, an assessment of fertility can be made in a rodent species. The design of the study should be amended as appropriate, for example, to address the nature of the product and potential for immunogenicity.

When the NHP is the only relevant species, the potential for effects on male and female fertility can be assessed by standard histopathological evaluation and assessment of menstrual cyclicity in repeat dose toxicity studies of at least 3 months duration using sexually mature NHPs. If there is a specific cause for concern, specialized assessments such as sperm count, sperm morphology/motility, testicular volume, and male or female reproductive hormone levels should be evaluated in the repeat dose toxicity study.

It is recognized that mating studies are not practical for NHPs. If there is a specific concern from the pharmacological activity about potential effects on conception / implantation and the NHP is the only relevant species, the concern should be addressed experimentally. A homologous product or transgenic model could be the only practical means to assess potential effects on conception or implantation when those are of specific concern. However, it would not be appropriate to produce a homologous product or transgenic model only to conduct mating studies in rodents.

5.3 Embryo-fetal and Pre/Post-Natal Development

The type of molecule and potential differences in placental transfer should be considered in the choice of species for testing – see note 1.

For products pharmacologically active only in NHPs, one well-designed study in NHPs (stage C to E ICH S5a) which includes dosing from day 20 of gestation to birth can be considered. It is also possible for the sponsor to provide a scientific justification for the evaluation of effects on embryo-fetal and postnatal development using alternative study designs or a homologous product in rodents.

For the single NHP study design addressing ICH S5a stages C to E, no caesarian Section group is warranted, but assessment of pregnancy outcome at natural delivery should be performed. This study should also evaluate offspring viability and survival, external malformations, skeletal effects (e.g., by X-ray) and, ultimately, visceral morphology at necropsy. Ultrasound is useful to track maintenance of pregnancy but not for monitoring embryo-fetal development or detecting malformations. Other endpoints in the offspring can also be evaluated if relevant for the pharmacological activity (e.g., immune function or neurobehavioural assessment). The duration of the postnatal phase will be dependent on which additional endpoints are considered relevant for the pharmacological activity.