

い、決定する。ただし、反応工程が1工程のみの製造工程の記載は出発物質の品質が直ちに原薬の品質に影響する危険性があるため原則として避けるべきである。」ことを指摘している。ここで言う反応工程とは、共有結合の生成や切断とされており、出発物質を選択する際には通常2反応工程以上を呈示することが推奨されてきた。本ICHガイドライン(案)も通常複数工程を呈示すべきであることを述べており、出発物質選択に際して、呈示すべき工程に内容的に大きな差はないと推定される。ただし、選択の妥当性を示す要件が具体的に述べられたことから、今後より詳細な説明が必要になることが予想される。

今までのICHガイドラインQ7原薬GMPでは原薬出発物質が市販品であるか否かに関しては論じられていなかったが、本ガイドライン(案)では、市販品の概念が導入され、明確化された。わが国では、今までは市販品か否かは、出発物質を特定するに考慮すべき事項ではなかった。しかし、Q11ガイドライン(案)では、commercial availabilityによって、出発物質の妥当性の要件が大きく異なることから、今後は出発物質の妥当性を説明する際に、追加的説明が必要となる。

#### 金属不純物について

医薬品における金属不純物の規制に関するガイドラインの作成については、その適用範囲、取り上げべき金属不純物に関してはほぼ方向性が決まった。特に、環境土壌由来である、鉛、カドミニウム、水銀、ヒ素に関する毒性評価、欧州医薬品庁(EMA)の金属触媒に関するガイドラインにおいて取り上げられている参考論文の現在までのアップデートなどが終了した。さらにガイドラインで取り扱うことが望ましいとされた金属について、分担して毒性評価を進行中であり、平成23年11月にはステップ2へ進むことを予定している。

#### 遺伝毒性不純物について

遺伝毒性不純物に関するEMAとFDAの遺伝毒性のガイドラインは類似点が多く、臨床開発中および承認後に患者が遺伝毒性・発がん性不純物に暴露された場合の生涯発がんリスクの特徴を明らかにし、リスクを軽減するための様々なアプローチが記載さ

れている。共通点としては、これまで遺伝毒性(試験)はハザードの同定を目的とするものであったが、両ガイドラインは遺伝毒性不純物の暴露量評価、リスク評価を行うことを提案している。また、遺伝毒性には閾値がないという考えが常識であったが、毒性学的懸念の閾値(TTC)の導入や、作用機序から閾値が確立されれば、一日許容暴露量を定めることができることが取り入れられている。これは遺伝毒性の考え方の大きな転換であり、パラダイムシフトともいえる。相違点としては、臨床開発中の医薬品に関しては暴露期間に応じた段階的TTCを用いるが、両者のレベル、特に1ヶ月以下の短期間投与のレベルに相違があること、エームス試験の予測のために推奨されるモデルが異なること、FDAのガイダンスでは小児を対象とした医薬品の不純物に関してはさらなる安全性ファクターを適用することなどが挙げられる。いずれも重要な相違点とは考えられず、ICH-M7のガイドライン策定には大きな障害とはならないものと考えられる。遺伝毒性不純物の発がんリスクの低減にはエームス試験により変異原性の有無を立証し、管理に用いる。構造活性相関(QSAR)による評価はエームス陽性、もしくは陰性を示す化学構造を、これまでの立証された情報から予測するのに有用である。以上が本ガイドラインの一般原則である。

また、本ガイドラインの適用は、新規医薬品申請の際に、DNA反応性不純物に関連した発がんリスクの管理のためのガイダンスを提供するものであるが、臨床適用や合成経路の大幅な変更があった場合には、既存品であっても適用される場合がある。このガイダンスは臨床開発中の新規医薬品にも適用されるが、臨床開発初期段階の不純物管理の手法は十分に開発されているとはいえず、患者の数が限られ、投与期間の短い臨床試験段階での適応にはさらに議論が必要である。

具体的な対象に分解物も含められたが「分解物」に関しては、そのレベルや、分解物を同定するための各種試験法の選択に関して議論が必要と考える。対象とならない医薬品、成分としては、1) 溶出物、2) 添加物、3) バイオ医薬品(S6)、4) 抗悪性

腫瘍薬（S9）、5）がん原性試験を必要としない有効成分がある。このうち「添加物」に関しては新規添加物に関しては対象とすべきとの意見がFDAから出された。また、「がん原性試験を必要としない有効成分」は、主として短期間投与の医薬品を対象とするが、がん原性試験は行っていないものの、遺伝毒性試験は実施し、安全性を担保しているため、その不純物に対しても対象とすべきとの意見もある。

以上の内容はステップ1のドラフトガイドラインに反映される予定である。数回のFace-to-FaceでのEWGで論議し、2012年でのステップ2、2013年でのステップ4を目指す。

#### 小児治験ガイドラインについて

小児治験のアセント文書の4施設統一文書について専門職21名のアンケート結果の内容を吟味し、今後の検討内容を考察し、来年度の公開を目標に、修正作業を開始した。その結果、1）文章の量、記載順序、使用する言葉に留意するとともに、2）年齢層別に伝えるべき治験内容について再確認し、3）説明内容等についてイラストを利用するなどの意見が得られた。各年齢層ごとに、何をどこまで記載し、どのように伝えるか、また、各年齢層及び発達年齢に応じた、より理解しやすい文章構成や記載量などについて、さらに検討する必要がある。また、署名の必要性に対する問題があった。しかし、ICH E-11で署名を得ることが規定されているため、現状では、署名が必要と考えられる。

FDA、EMAの関係者との意見交換・情報交換により、医薬品医療機器総合機構が積極的に国際的な情報を収集し、必要要件等についての国内外の格差をなくし、さらに適切なアドバイスを行う等をして、我が国における小児治験をやりやすくする必要があると考えられた。また、規制当局のみならず、企業や学会関係者も、欧米で発出されている様々な小児関連ガイドライン等を踏まえて、適切な治験プロトコルの作成の努力をすることも重要と考えられた。EUの研究費によるGlobal Research in Paediatricsでの活動は、海外と治験の方法論などを共有する上で極めて有用であると考えられる。

小児剤形のない多くの医薬品について、カプセル

や錠剤を粉碎する等が医療現場で行われているが、その手順の標準化及び徹底は、不十分である。今後、検討を進め、手順の標準化とその周知を徹底する必要があり、また小児用の剤形変更のルール作りをしていく必要がある。

#### 医薬品情報の国際規格化について

標準開発団体（SDO）によるプロセスでは、開発主体であるSDO、国際規格制定団体であるISO、および要件定義を行うICHの3つのプロセスが同時に進行する。開発の鍵を握るのは、開発主体SDOである。要件に適う規格を円滑に開発するには、SDOと連携し時宜を得たテストとフィードバックを行うことが決定的に重要になる。SDOプロセスについては、プロジェクト終了後の事後的評価も必要とされている。さらにISO規格が制定された後は、規格改訂の必要が必ず生じてくるが、ビジネス要件はICHしか把握しておらず、質の高い国際規格の維持のためにはICHの活動を通じた貴重な知識・経験が、蓄積・維持・活用される仕組みが必要である。

医薬品規制情報の電子標準としてICHでは電子文書書式の要件を定義し、その一例としてPDFをあげた。これに対し2008年にPDF1.7がISO32000-1として制定されたが、これに含まれない拡張がすでに新しいソフトウェアには組み込まれており、ISO 32000-2でPDF1.7の拡張が検討されている。ISO規格として勧告した場合、ソフトウェア製品とISO規格との関係を明確にする必要がある。

文書管理に関する国内外の規格について調査した。ICHで従来対象としているのは電子文書自体のフォーマットの問題であり、記録管理、文書管理はそれぞれの組織に委ねられている。しかし、文書のライフサイクル、メタデータに関わる議論のためには国際規格等で整理されている記録、文書マネジメントの概念を踏まえて要件を整理する必要がある。また文書領域におけるXML応用の一例を示したが、近年の標準化は意味的相互運用性という概念の上に成り立ち、XMLは実装技術という役を担っている。XMLによる文書表現に関しては、既存の標準を深く検討し、XMLの位置づけ・役割を吟味する必要がある。臨床・非臨床段階での安全性評価バイオマーカーに

## ついて

バイオマーカーとしては、感度が良く、非臨床と臨床の両方で用いることができ、両者の間をつなげられるものが望ましい。例えば、今までの腎毒性マーカーはひどい変化でやっと検出できるようなもので、臨床での感度良いマーカーが無いので、非臨床で腎毒性が出ると医薬品開発が停止になることが多い。感度の良いマーカーがあれば、腎毒性がでない範囲で臨床試験ができる。また、現在、病理学的検査をやらなければ分からない毒性について、血清等で測定が可能な生化学的バイオマーカーが見つかり、病理変化より以前に現れるマーカーやより低用量で洗われるものがあれば、極めて有用である。但し、一つの臨床マーカーではなく、複数のバイオマーカーをみて評価を実施することができれば、それでも良い。

調査の結果、心毒性マーカーではTn、H-FABP、BNP、筋肉毒性マーカーではFabp3、fsTnI、Parvalbumin-a、miR-133a、神経毒性バイオマーカーではS-100βとNSEなど、有望なものもいくつか現れていることが明らかになった。

バイオマーカーを企業のスクリーニングとして用いるだけならば良いが、臨床評価のクリティカルな指標として用いるためには、行政当局との事前協議と了解が必要であろう。

医薬品開発のグローバル化の流れのなか、バイオマーカーについてもグローバルに認められたものが必要である。しかし、ICHは総括的な問題について議論する場であるので、別途、個別のバイオマーカーの妥当性について産学官で検討すべきである。

## E. 結 論

バイオ医薬品の非臨床評価に関するS6ガイドラインの明確化と拡充の為に補遺の策定を支援する目的で、国内の関係組織から研究協力者の参加を得て、関連情報の収集や解析・外部への発信、国内で収集したパブリックコメントの整理・対応の協議を行い、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、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の策定作業に携わって一定の成果を得た。

光毒性非臨床安全性試験ガイドライン策定を目的にICH-S10がトピック化されEWG会議が開始された。国際調和に向けた国内準備と対応を行った。今後、具体的な項目について議論し、ガイドライン策定に必要な情報とICH-EWG会議に対応し、早期実現を目指す。

はつ癌性試験に関して、PhRMAは、S1Aガイドライン改訂を目論んでいるようであり、がん原性試験に関するガイドラインを取り巻く状況は、流動化しつつある。日本の関係者としては、早急に、また、状況の推移に応じて、対応することが要求される。また、がん原性試験に直接的・間接的に係わる各種ガイドライン間の整合性は担保されねばならず、さらに、それらの内容は時代の変化に対応する必要がある。ガイドラインの改訂や新規ガイドライン策定の機会に随時対応すべきものであり、そのような機会に迅速に対応できるよう、予め準備を進めておくべきである。

生殖毒性試験はその指標が多岐に渡るにも関わらず、発生段階毎の指標に合わせて開発された方法が少ない上に、十分バリデートされた*in vitro*試験法も少なく、行政的に推奨される方法がないことが明らかになった。

治療用ワクチンに関する将来のコンセプトペーパー提出を視野に入れた調査研究活動を新たな活動の枠組みとするに至っている。また、わが国の法的規制においてアジュバントの位置づけがなされていない問題を指摘し、考察文書をまとめた。

改正薬事法に基づく医薬品等の製造販売承認書記載事項に関する指針については、GMP要件となる製造方法に関して、「出発物質は、・・・「原薬GMPガイドラインについて」において示された考え方に従い、決定する。また上記ガイドラインでいう反応工程とは、共有結合の生成や切断（塩交換反応は含まない）」とされており、出発物質を選択する際には通常2反応工程以上を呈示することが推奨されてきた。本ICHガイドライン（案）も通常複数工程を呈示すべきであることを述べており、出発物質選択に際し

て、呈示すべき工程に内容的に大きな差はないと推定される。ただし、選択の妥当性を示す要件が具体的に述べられたことから、今後より詳細な説明が必要になることが予想される。

原薬出発物質に関しては論じられていなかったが、本ガイドライン（案）では、市販品（commercial availability）の概念が導入、明確化された。今までわが国では市販品か否かは、出発物質を特定するに考慮すべき事項ではなかった。Q11ガイドライン（案）では、commercial availabilityによって、出発物質の妥当性の要件が大きく異なることから、今後は出発物質の妥当性を説明する際に、追加的説明が必要となる。

平成22年度に調和を開始した金属不純物のガイドラインは、基本的な方針を決め、取り上げるべきと考えられる金属の安全性評価を順次進めており、現在のところ調和に対して大きな障壁となるものは無い。

遺伝毒性不純物に関する国際ガイドライン（M7）の策定が2010年10月のICH福岡会議から開始された。ガイドラインの性格を明らかにするためタイトルを「潜在的発がんリスクを低減化するための医薬品中DNA反応性（変異原性）不純物の評価および管理」に変更した。DNA反応性不純物の評価はエームス試験と構造活性相関によって行う。また、対象とする医薬品、成分、および対象としないものが論議された。これらの議論を基に現在ステップ1のドラフトガイダンスの作成作業が進行中である。

小児治験におけるアセント文書について、専門家からの指摘をふまえて、再検討を要する事項について抽出し、再検討の作業を開始した。来年度の公表を目指して作業を進めている。また、医薬品医療機器総合機構が積極的に国際的な情報を収集し、必要要件等についての国内外の格差をなくし、さらに適切なアドバイスを行う等をする必要があると考えられた。また、海外ガイドライン等を踏まえて、企業や我々もより適切な治験プロトコルの作成に努める必要がある。小児用の剤形変更については、手順の標準化とその周知を徹底する必要がある。剤形変更のルール作りをしていく必要がある。

SDOプロセスにおいては要件定義を行う団体（ICH）と、開発を担う団体（SDO）、国際規格を制定する団体（ISO）、これらの中で連携、シンクロナイズをはかりながら進めるという非常に複雑な流れとなっている。ICH要件に適うISO規格化を達成するには、開発主体であるSDOとの連携、時宜を得たテストとフィードバックが決定的に重要になる。規格制定後の質の高い国際規格の維持のためにはICHの活動を通じた知識・経験が蓄積され継続的に活用される仕組みが必要である。

国際規格を電子文書の標準として採用する場合、エンドユーザにとって身近なソフトウェア製品の機能全体と必ずしも一対一に対応しないため留意する必要がある。電子文書のライフサイクルを視野に入れるには、記録管理、文書管理の領域で蓄積されている議論、制定されている規格を踏まえる必要がある。さらに、XMLによる文書表現に関しては、意味的相互運用性の標準化の方向を深く吟味し、実装技術としてのXMLの位置づけ・役割を把握した上で考える必要がある。

適切なバイオマーカーは医薬品開発の大きな武器になることから、多くの研究が行われ、心毒性マーカーではTn、H-FABP、BNP、筋肉毒性マーカーではFabp3、fsTnI、Parvalbumin-a、miR-133a、神経毒性バイオマーカーではS-100βとNSEなど、有望なものもいくつか現れており、今後の発展が望まれる。現在のようにグローバルな医薬品開発が必要な時代では、国際的に認められた指標に基づいて臨床試験を行うことが必要である。しかし、重要なバイオマーカーが特定の企業に独占されることは望ましくない。今後も産学官の協力で開発・評価を進めていくことが適切である。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表等

- 1) 平林容子：安全性に関するトピックの動向「S6 (R1)：バイオ医薬品の安全性試験（見直し）」  
医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス, 41 (10) : 792-799, 2010.
- 2) Kojima, H.: Commentary to the Discussion on

- Topics 3, " *in Vitro* Test Approaches with Better Predictivity" at the 5th International Workshop on Genotoxicity Testing, Genes and Environment, 32(2), 40-42 (2010)
- 3) 小島肇夫 : 総合評価の方法、有用性化粧品の処方とその活用、鈴木正人監修、シーエムシー出版、東京、pp.147-151 (2010)
  - 4) Kojima, H., Takeyoshi M, Sozu, T, Awogi, T, Arima, K, Idehara, K, Ikarashi, Y, Kanazawa, Y, Maki, E, Omori, T, Yuasa, A, Yoshimura, I.: Inter-laboratory validation of the modified murine local lymph node assay based on 5-bromo-2'-deoxyuridine incorporation. *J Appl Toxicol.* 31(1)63-74 (2010)
  - 5) Yamamoto, N, Hirano, K, Kojima, H., Sumitomo, M, Yamashita, H, Ayaki, M, Taniguchi, K, Tanikawa, A, Horiguchi, M.: Cultured human corneal epithelial stem/progenitor cells derived from the corneal limbus. *in Vitro Cell Dev Biol Anim.* 46(9):774-80 (2010)
  - 6) Kojima, H.: 3Rs Activities in Japan, AVLR8 Alternative Testing strategies, Progress report 2010, 266 (2010)
  - 7) 小島肇夫 : パイロジェン試験、大阪医薬品協会会報第745号31-63 (2011)
  - 8) 本間正充 : 構造活性相関による遺伝毒性の予測 国立医薬品食品研究所報告 128, 39-43 (2010)
  - 9) 黒川美佐夫、中村和市、細井一弘、本間秀行、上出良一、小野寺博志、吉田武美、下村和裕、中村秀文、笛木修、木村敬、成松鎮雄、永山隆、大野泰雄、影山明彦、Charles Humfrey、本間正充、岸本康弘、三分所厚司、庄司龍雲、津田雅之、原田寧、前田昭夫、望月正隆、西島正弘 : 第5回医薬品評価フォーラムー国際的に未解決な毒性試験の諸問題ー 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス 41, 878-889 (2010)
  - 10) Sun Y., Gruber M., Matsumoto M., Overview of global regulatory toxicology requirements for vaccines and adjuvants. *J Pharmacol Toxicol Methods.* 2011 (submitted)
  - 11) H. Nakamura : Current situation and critical points for paediatric research in Japan. *Innovative Medicine: The Science and the Regulatory Framework. Pharmaceuticals Policy and Law* Volume 12, pp 117-124. 2010
  - 12) 米子真記, 栗山猛, 八代智子, 土田尚, 中村秀文, 小嶋純 : 小児医療現場で起こっている危険 錠剤の粉碎. 薬局61巻7号 2729-2735 (2010.06)
  - 13) 米子真記, 上田明子, 土田尚, 中村秀文, 小嶋純, 宮坂勝之 : 小児医療現場で起こっている危険 本当は子どもに使えない薬の話. 薬局61巻8号 2895-2901 (2010.07)
2. 学会発表
- 1) 中江 大 : S10 : 光安全性の評価. ICH日本シンポジウム2010 兼 第23回ICH即時報告会 (2010年12月, 東京都渋谷区).
  - 2) 山本直樹、谷川篤宏、内藤紘策、綾木雅彦、小島 肇、平野耕治、堀口正之 : マウス水晶体上皮細胞の不死化細胞の作出、第114回 日本眼科学会総会 (2010.4)
  - 3) 小島 肇 : ヒトiPS細胞を用いた新規*in vitro*毒性評価系の構築、日本製薬工業協会セミナー (2010.5)
  - 4) 小島 肇 : パネルディスカッション 新しい感作性および局所刺激性 (皮膚・眼) 試験法のOECDテストガイドライン, 日本トキシコロジー学会学術年会, 沖縄 (2010.6)
  - 5) 小島 肇 : 医薬部外品、化粧品のRegulatory Scienceの展望, 第11回光老化研究会, 東京慈恵会医科大学 (2010.7)
  - 6) Kojima.H., Global impact of 3Rs on regulatory process: sharing experiences and future trends. XII International Congress of Toxicology, Barcelona, Spain (2010.7)
  - 7) Kojima.H., Inoue, T. and Ohno.Y., JaCVAM's role of new alternatives to animal testing and international harmonization. XII International Congress of Toxicology, Barcelona, Spain (2010.7)
  - 8) 小島 肇 : 昨今の国際バリデーション研究の進捗, 皮膚基礎研究クラスターフォーラム 第5回教育セミナー (2010.8)

- 9) 小島 肇：皮膚感作性試験のインビトロ代替法の現状，日本免疫毒性学会学術大会，独立行政法人国立環境研究所 大山記念ホール (2010.9)
- 10) Kojima, H., Arai, S. and Hojyo M., Importance of each human model and the optimal protocol for regulatory use of skin irritation assay. The 23rd Annual and International Meeting of the Japanese Association for Animal Cell Technology, Hokkaido University, Sapporo, Japan (2010.9)
- 11) 小島 肇：パイロジェン試験，大阪医薬品協会技術研究委員会，大阪 (2010.10)
- 12) 小島 肇、北條麻紀：3次元培養表皮モデルを用いるコメットアッセイの条件検討 第3報，日本環境変異原学会第39回大会、つくば (2010.11)
- 13) 宇野芳文、小島 肇：インビボコメットアッセイ：JaCVAM国際バリデーション試験の進捗状況報告 (第2報)，日本環境変異原学会第39回大会、つくば (2010.11)
- 14) 小島 肇、中村 牧、山口能宏、泉 瑠名、鈴木民恵、萩原沙織、篠田伸介、加藤雅一、培養皮膚モデルLabCyte EPI-MODEL24を用いた皮膚刺激性試験代替法のバリデーション研究、日本動物実験代替法学会第23回大会、東京 (2010.12)
- 15) 小島 肇、桑原裕史、林卓巳、坂口眞由美、豊田明美、後藤 悠、中村恒彰、渡辺真一、阿彦恭子、大森 崇、音泉 卓、寒水孝<sup>1)</sup>、森本隆史、林 和彦、坂口 斉：眼刺激性試験代替法 (STE試験) バリデーション研究 第3報、日本動物実験代替法学会第23回大会、東京 (2010.12)
- 16) 小島 肇、北條麻紀：3次元培養表皮モデルを用いるコメットアッセイの条件検討日本動物実験代替法学会第23回大会、東京 (2010.12)
- 17) 小島 肇：S5 化学物質の有害性評価に関する代替試験法開発—発癌性、発生毒性、免疫毒性—今後の展望、日本動物実験代替法学会第23回大会、東京 (2010.12)
- 18) 小島 肇：培養皮膚モデルを用いた皮膚刺激性評価の現状、第10回ヒューマンサイエンス研究資源バンクセミナー、大阪 (2011.1)
- 19) 小島 肇：動物実験代替法における国際動向、日本動物実験代替法学会・JaCVAM合同ワークショップ 動物実験の3Rにおける国際動向、東京 (2011.2)
- 20) 小島 肇：皮膚細胞研究の応用とその可能性、日本化粧品技術者会大阪支部 第15回勉強会ワークショップ、大阪 (2011.2)
- 21) 本間正充；*in vitro*遺伝毒性試験の問題点と将来 第17回HAB研究機構学術年会 (2010.5)
- 22) Mekenyan, O., Ptkov, P., Todorov, M., Kotov, S., Stoeva, S., Dimitrov, S., Honma, M., Hayashi, M., Benigni, R.; Modeling *in vivo* micronucleus test by simulating detoxification pathways. QSAR2010, (2010.5)
- 23) 本間 正充；遺伝毒性試験とその科学的リレバンス. 第11回日本トキシコロジー学会生涯教育講演会 (2010.6)
- 24) 本間 正充；リスク評価における*in vitro*遺伝毒性試験の役割. 第37回日本トキシコロジー学会学術年会 (2010.6)
- 25) 本間正充；医薬品における遺伝毒性不純物の管理と安全性評価. 日本環境変異原学会第39回大会 (2010.11)
- 26) 松本峰男. アジュバントの安全性評価について. 第2回次世代アジュバント研究会 (2011年1月11日、千里ライフサイエンスセンター、大阪市)
- 27) H. Nakamura : Ethical and Social Challenges Facing Pharmacogenomic Research and Implementation of Personalized Medicine in Children: A Japanese Perspective. 2010 Pediatric Pharmacogenomics and Personalized Medicine Conference. April 29, 2010. Kansas city
- 28) H. Nakamura : Pediatric TDM and clinical pharmacology in Japan. First IATDMCT Regional Meeting 2010 in China. September 24, 2010. Beijing.
- 29) H. Nakamura : Current status of pediatric clinical trials and drug development in Japan: activities of regulatory authorities, academia and industries. KFDC (The Korea Society of Food, Drug and

- Cosmetics Regulatory Sciences) . October 14, 2010.  
Seoul
- 30) 中村秀文：小児・妊婦等における医薬品の適正  
使用上の課題. 日本製薬団体連合会安全性委員  
会情報提供検討部会平成22年度ネットワーク会  
議. 2010年11月19日. 東京
- 31) 中村秀文：国内外の小児科領域の現状と提言.  
第88回薬事エキスパート研修会－オーファンド  
ラッグ開発促進に向けた国際的潮流をさぐる－  
欧米の現状と日本の課題－. 2010年12月9日.  
東京
- 32) 中村秀文：小児・授乳中・妊娠中の薬物投与と  
腎. 第2回愛媛腎と薬剤研究会. 2010年12月11日.  
愛媛
- G. 知的所有権の取得状況**
1. 特許取得  
特になし
  2. 実用新案登録  
特になし
  3. その他  
特になし

## 別紙 4

## 研究成果の刊行に関する一覧表レイアウト（参考）

## 書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ

## 雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
<u>平林容子</u>	安全性に関するトピックの動向「S6(R1)：バイオ医薬品の安全性試験（見直し）」	医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス	41(10)	792-799	2010
Hasegawa R, Hirata-Koizumi M, Dourson ML, Parker A, Sweeney LM, Nishikawa A, Yoshida M, <u>Ono A</u> , Hirose A.	Proposal of new uncertainty factor application to derive tolerable daily intake.	Regul Toxicol Pharmacol	58(2)	237-42	2010
Hajime Kojima	Commentary to the Discussion on Topic 3, “In Vitro Test Approaches with Better Predictivity” at the 5 <sup>th</sup> International Workshop on Genotoxicity Testing (IWGT)	Genes and Environment	Vol.32 No.2	40-42	2010
<u>Hajime Kojima</u> , Masahiro Takeyoshi, Takashi Sozu, Takumi Awogi, Kazunori Arima, Kenji Idehara, Yoshiaki Ikarashi, Yukiko Kanazawa, Eiji Maki, Takashi Omori, Atsuko Yuasa and Isao Yoshimura	Inter-laboratory validation of the modified murine local lymph node assay based on 5-bromo-2'-deoxyuridine incorporation	Journal of Applied Toxicology	Vol.31	63-74	2010
小島 肇夫	動物実験の 3 R における国内外の動向	ドージンニュース	No.138	1-9	2011
Aoi Kimura, Naohiko Torigoe, Atsuro Miyata, and <u>Masamitsu Honma</u>	Validation of a simple In Vitro comet assay method using CHL cells	Genes and Environment	Vol.32 No.3	61-65	2010



発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Yasuyuki Saitoh, Yoshikazu Harata, Fukutaro Mizuhashi, <u>Madoka Nakajima</u> and Nobuhiko Miwa	Biological safety of neutral-pH hydrogen- enriched electrolyzed water upon mutagenicity, genotoxicity and subchronic oral toxicity	Toxicol and Industrial Health	Vol.26(4)	203-216	2010
Kenichi Masumura, Yasuteru Sakamoto, Megumi Ikeda, Yasuo Asami, Tetsuya Tsukamoto, Hironobu Ikehata, Yuichi Kuroiwa, Takashi Umemura, Akiyoshi Nishikawa, Masae Tatematsu, Tetsuya Ono, and <u>Takehiko Nohmi</u>	Antigenotoxic effects of p53 on spontaneous and UVB-induced deletions in the epidermis of gpt delta transgenic mice	Environ. Mol. Mutagen.	52	244-252	2011
<u>中村秀文</u>	小児医療現場で起こっている 危険 錠剤の粉砕	薬局	61巻7号	2729-2735	(2010.06)
<u>中村秀文</u>	小児医療現場で起こっている 危険 本当は子どもに使えな い薬の話	薬局	61巻8号	2895-2901	(2010.07)

## II. 分担研究報告（非臨床安全性・品質部門）

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22年度分担研究報告書

## 研究の総括およびバイオマーカーに関する調査研究

研究分担者：大野 泰雄（国立医薬品食品衛生研究所副所長）

### 研究要旨

医薬品開発段階で用いられ得る安全性評価のためのバイオマーカーについて、文献的に調査し、その定義と望ましい要件、受け入れ基準、現在の開発状況、並びに心臓毒性、筋肉毒性、及び神経毒性に関するバイオマーカーについてまとめた。その結果、心毒性マーカーではTn, H-FABP, BNP、筋肉毒性マーカーではFabp3, fsTnI, Parvalbumin- $\alpha$ , miR-133a、神経毒性バイオマーカーではS-100 $\beta$ とNSEなど、有望なものもいくつか現れており、今後の発展が望まれる。現在のようにグローバルな医薬品開発が必要な時代では、国際的に認められた指標に基づいて臨床試験を行うことが必要である。しかし、最近開発されたものの内、公的に評価されているものは、今のところ腎毒性に関わるもの位である。今後も産学官の協力で開発・評価を進めていくことが望ましい。

キーワード：安全性評価、バイオマーカー

### 研究協力者

- 高橋 光一（久光製薬（株）研究開発本部基礎研究所薬理チーム）  
池田 孝則（MSD（株）安全性研究室distinguished senior investigator）  
日原 太郎（エーザイ（株）エーザイ・プロダクトクリエーション・システムズ、バイオファーマシューティカル・アセスメント機能ユニット新技術研究部）  
宇山 佳明（医薬品医療機器総合機構 レギュラトリーサイエンス推進部研究課長）  
熊谷 雄治（北里大学東病院治験管理センター長）

ように評価し、開発過程における意志決定に反映させるかが、重要である。その際、臨床における病気による苦痛の軽減や延命、Quality of Lifeの改善など、明確かつ短期的に把握できるものは開発を進めやすい。しかし、長期間における作用の結果現れる薬効や副作用、体外からは観察しにくい副作用については、通常の臨床試験で行われている数ヶ月程度の臨床試験ではその変化が捉えられないことがあり、逆に検出された時には既に重篤化してしまっていたり、販売承認を受けた後に思いがけない副作用が現れたりして、回収・販売停止等の措置を講じることが必要な場合がある。したがって、上記のような究極的な臨床指標に替わるバイオマーカーの把握は、医薬品開発を効率的かつ迅速に進める上で極めて重要である。安全性評価に関わるバイオマーカーでは、毒性が軽症で可逆的な内に検出できるマーカーが望ましい。米国では国と企業との共同研究として、バイオマーカーコンソーシアムで、そのようなバイオマーカーの開発に努めている。もし、有効なバイオマ

### A. 研究目的

医薬品開発においては、候補物質の有効性および安全性をどのようにとらえるか、また、それをどの

一カーが特定の企業に独占されるようなことになる、他の企業の医薬品開発に支障を来すことになる。このような背景から、本研究班では、産官の共同研究として、安全性評価に関わるバイオマーカーについて、文献的に探索し、その有用性を調査することとした。

## B. 研究方法

研究協力者が、それぞれ分担して、心臓、肝臓、腎臓、その他の臓器毒性に関わるバイオマーカーを文献的に調査し、まとめた。それらを研究班で議論し、評価した。

(倫理面への配慮)

本研究は、文献調査とそれに基づく検討であり、人や動物を用いる実験研究ではなく、個人情報も扱わないため、倫理的問題はない。

## C. 研究結果

### C-1 全般的な検討 (添付文書 1)

#### C-1-1) バイオマーカーの定義と望ましい特性、受け入れ基準

本研究を始めるに際してのバイオマーカーの定義と望ましい特性、受け入れ基準について、明らかにした (添付資料 2)。

医療分野でのバイオマーカーとは、臨床での病気の診断、病態の把握、治療法の選択、治療の効果判定などのエンドポイントに代替しようとする指標であり、「正常なプロセスや病的プロセス、あるいは治療に対する薬理的な反応の指標として客観的に測定・評価される項目 (Aloka G. Chakravarty, FDA, 2003<sup>1)</sup>, 日本薬学会訳)」と定義される。具体的には、特定の病気の状態や薬の効果などに応じた体内の生化学的、病理学的、薬理学的変化を定量的に測定できるもので、血液、尿あるいは組織中に含まれる生体物質あるいは生体から得られる情報や、DNA、RNA、蛋白質、または蛋白質断片、低分子化合物など (脂肪や糖質などの小さな代謝物) から得られる情報がある。

新薬評価のための代替指標 (Surrogate endpoint, Biomarker) とは、「治験に用いられる検査室で計測

される徴候および理学的徴候であり、患者がどのように感じ、機能し、生存するかについて直接的に計測したものである臨床的に重要な指標の代替となるものであり (Aloka G. Chakravarty, FDA, 2003)」、治療上の指標につながることの証明されたマーカーである。また、「Surrogate endpointとは疫学的、治療学的、病態生理学的あるいは他の科学的な根拠に基づき、臨床的な有益・有害事象などクリニカルエンドポイントの発生予測を推定しようとする指標である (FDA, 日本TDM学会 木村利美訳)」と定義されている。

即ち、Surrogate endpointはバイオマーカーの一部である。

新薬評価でバイオマーカーを用いる目的は、より早く、より経済的に候補物質の臨床での作用を予測し、意志決定に必要な検体必要量の削減と迅速化を計ることであり、1) 長期間で現れる変化を短時間で現れる指標に置き換え、2) 測定困難な臨床指標をより簡便な指標やより頻繁に測定できる指標に置き換え、3) 正確に測定することが困難な臨床指標をより高精度に、あるいは安全に測定できる指標に置き換え、4) 他の治療による影響を受けにくい指標に置き換えるためのものである。

バイオマーカーの例としては、1) 特定の受容体等への結合、2) 特定臓器への分布、3) 薬物の作用によって誘導される内因性および外因性の活性、4) 疾患の原因となる因子や病理学的因子への作用、5) 臨床効果に直接関係すると思われる測定値への作用 (血圧、血清生化学値、CD4 count、RNA viral load、tumor size、coronary artery occlusion等) などがある。

新薬開発のためのバイオマーカーとしては、1) 臨床での作用につながるもの。即ち、surrogate endpointやclinical endpointとの相関性と科学的根拠がある。2) 再現性が良い。3) 倫理的に妥当である。4) 測定が容易で経済的である。5) 新薬開発の早期に利用できる必要がある。

これらが満たされているか判断するためには、バリデーションを行い、その適切性が確認される必要がある。そのためにも、下記のような基準もパスする必要があると思われる。

- 1) 関心のある臨床指標を十分にpredictできる。
- 2) 同一の作用を有する代表薬物を用いたデータがある。
- 3) 新しい指標と臨床指標との間の関係や、新しい指標とヒトとの関係が明確である。
- 4) 臨床での作用を予測する上での感度や正確性の点で、既存の方法と比較し同等以上の価値を有する。
- 5) 試験法は堅牢で移転可能。

6) 既存の指標と比較し、科学的、倫理的に優れている。

また、バイオマーカーを公的なものとするためには、以下のような事項についても検討する必要がある。

- 1) 指標の適切性に関する情報があるか。
- 2) 測定指標と臨床での薬効あるいは毒性との関係について論理的整合性があるか。
- 3) 指標の限界が明確であるか。
- 4) 正式かつ詳細なプロトコールがあり、一般のものが入手可能か。
- 5) 試験法とその結果は独立した査読された出版物として得られるか。
- 6) 試験施設内外における反復性や再現性が示されているか。
- 8) 指標のperformanceが既存の指標と比較されているか。
- 9) 指標の妥当性を評価するため全データが査読可能であるか。

#### C-1-2) バイオマーカーの分類とその例

平成20年にまとめられた、ヒューマンサイエンス振興財団による調査レポート (No 62)<sup>2)</sup> によれば、バイオマーカーは以下の4つのカテゴリーに分けられている。

- 1) **Known Valid Biomarker** : 良く確立された実行特性を持つ分析試験系で測定され、試験結果の生理的、毒性的、薬理的もしくは臨床的意義について医学もしくは科学コミュニティにおいて広く合意されたバイオマーカー。

**Safety:** TPMT (6-MP, azathioprine), UGT1A1 (irinotecan), CYP2C9/VKORC (warfarin), CYP2D6 (Strattera)

**Efficacy:** EGFR status (Erbix, Tarceva), Her2/neu status (Herceptin), Philadelphia chromosome ~Bcr-abl (Gleevec)

- 2) **Probably valid Biomarker** : 良く確立された実行特性を持つ分析試験系で測定され、試験結果の生理的、毒性的、薬理的もしくは臨床的意義を説明し得ると思われる科学的枠組みがあるバイオマーカー。あるいは、known valid biomarkerまでには、以下に示す理由のいずれかに該当するため、広く合意に到達しないバイオマーカー。

① 1社のみでデータが公的な吟味がなされていない。

② データは示唆的であるが、結論的ではない。

③ 客観的な立証がなされていない。

**Safety:** Kim-1 ~ preclinical (nephrotoxicity), Gene panels used for preclinical safety evaluation

**Efficacy:** EGFR mutation (Iressa), CYP2D6 (Tamoxifen)

- 3) **Exploratory Biomarker** : 臨床的意義が示唆されるが、再現性等は未確認。Probableあるいはknown valid biomarkerの基礎作りとなる。

#### 参考文献

- 1) Aloka G. Chakravarty, Surrogate Markers and its role in the Drug Development Process.

[http://www.google.co.jp/#hl=ja&source=hp&biw=1095&bih=910&q=Surrogate+Markers+and+its+role+in+the+&btnG=Google+検索&aq=f&aqi=&aql=&oq=&bav=on.2,or.r\\_gc.r\\_pw.&fp=e0b1918135c0d89a](http://www.google.co.jp/#hl=ja&source=hp&biw=1095&bih=910&q=Surrogate+Markers+and+its+role+in+the+&btnG=Google+検索&aq=f&aqi=&aql=&oq=&bav=on.2,or.r_gc.r_pw.&fp=e0b1918135c0d89a)

- 2) chakravarty@cder.fda.gov ヒューマンサイエンス振興財団、規制動向調査報告書、創薬プロセスの革新に向けて 医薬品開発におけるバイオマーカーの探索と活用 (HSレポートNo.62, 平成20年4月)

C-2) バイオマーカー探索・適格性確認の動き (池田孝則)

1. 米国

#### 1-1. Critical Path Institute (C-Path)

C-Pathは、FDAのCritical Path Initiative (2004年3月にFDAによる新薬開発のための政策<sup>1)</sup>) を実現するためにFDAと製薬企業との協力の元に設けられた独立した第3者機関である。このC-PathのPredictive Safety Testing Consortium (PSTC) では、腎障害、肝

障害、筋肉障害、血管障害、心肥大、がん原性に関するWorking groupsが立ち上がっている<sup>2)</sup>。腎毒性に関する非臨床・臨床をつなげるためのバイオマーカー（尿中 KIM-1, Albumin, Total Protein, B2-Microglobulin, Cystatin C, Clusterin, Trefoil factor-3）が日米欧の規制当局に、バイオマーカー認証のための適格性確認相談が行われ、非臨床試験でのバイオマーカーとしての適格性が3極の規制当局から確認を受けている。PMDAにおける評価結果については、PMDAのホームページに公開されている<sup>3)</sup>。また、この腎毒性バイオマーカーについては、Nature Biotechnologyの特集号<sup>4)</sup>として公表された。

#### 1-2. The Biomarker Consortium

Foundation for National Institute of Health (FNIH) のひとつであるThe Biomarker ConsortiumはNIH、FDA、米国研究製薬工業協会 (PhRMA)、The Centers for Medicare & Medicaid Services (CMS)、及びBioからの基金により運営されている<sup>5)</sup>。がん、免疫・炎症、代謝性疾患、神経科学の領域のバイオマーカーの確立をめざしている。すでに、II型糖尿病のバイオマーカー<sup>6)</sup> についての報告、新規のバイオマーカーを用いた乳がんの臨床治験等が行われている<sup>7)</sup>。

#### 1-3. ILSI Health and Environmental Sciences Institute (ILSI/HESI)

米国のノンプロフィット組織である、ILSI/HESI<sup>8)</sup> においても、毒性バイオマーカーの検討がおこなわれており、腎毒性バイオマーカーとしてRenal Papillary Antigen-1 (RPA-1) とClusterinの2つが、FDA及びEMAのバイオマーカー適格性確認をうけている<sup>9)</sup>。

## 2. 欧州

#### 2-1 Innovative Medicines Initiative (IMI)

EUと欧州製薬団体連合会が共同で出資するIMI<sup>10)</sup> においては、現在2つの安全性に関するバイオマーカープロジェクト、MARCAR (BioMARKers and molecular tumor classification for non-genotoxic CARcinogenesis)<sup>11)</sup> 及びSAFE-T (Clinical biomarker qualification via SAFER and FASTER EVIDENCE-BASED TRANSLATION)<sup>12)</sup> が進行中である。

## 参考文献

- 1) <http://www.fda.gov/ScienceResearch/SpecialTopics/CriticalPathInitiative/CriticalPathOpportunitiesReports/ucm077262.htm>
- 2) <http://www.c-path.org/pstc.cfm>
- 3) [http://www.pmda.go.jp/operations/shonin/info/consult/m03\\_pharma\\_kekka.html](http://www.pmda.go.jp/operations/shonin/info/consult/m03_pharma_kekka.html)
- 4) Nat Biotech 2010. 28 (5).  
<http://www.nature.com/nbt/journal/v28/n5/index.html>
- 5) <http://www.biomarkersconsortium.org/index.php>
- 6) Wagner JA, Wright EC, Ennis MM, Prince M, Kochan J, Nunez DJR et al. Utility of adiponectin as a biomarker predictive of glycemic efficacy is demonstrated by collaborative pooling of data from clinical trials conducted by multiple sponsors. Clin Pharmacol Ther 2009, 86: 619-25.
- 7) <http://ispy2.org/>
- 8) <http://www.hesiglobal.org/i4a/pages/index.cfm?pageid=1>
- 9) <http://www.hesiglobal.org/i4a/pages/index.cfm?pageID=3541>
- 10) <http://www.imi.europa.eu/content/home>
- 11) <http://www.imi-marcar.eu/>
- 12) <http://www.imi-safe-t.eu/>

#### C-3) 個別バイオマーカーについての調査結果

研究班での今回の調査は文献調査中心で行うとした。また、製薬協では2005年に心臓、肝臓、腎臓毒性についてのマーカーを調査したので、今回の調査では、心臓、筋肉、および神経（脳以外）について調査することとした。以下に、それぞれの調査方法とその結果を記す。

##### C-3-1) 心毒性バイオマーカーについての調査（高橋光一）

新規毒性バイオマーカーの開発は、医薬品開発時における化合物の早期毒性予測や臨床で使用されている薬物の副作用の早期発見に極めて重要であると考えられ、様々なアプローチで新規毒性バイオマーカーが開発されている<sup>1)</sup>。

心臓における毒性バイオマーカーの文献調査は、製薬協で実施した調査結果の報告<sup>2)</sup>がある。今回、

再度DB検索を実施し、過去調査した結果を比較した。なお、レビュー論文<sup>3,4,5)</sup>や雑誌の特集<sup>6)</sup>などの報告もあった。

## 方法

過去10年間の文献を以下のDBを用いて検索した(2011.1)。

(MEDLINE, EMBASE, TOXCENTAR, BIOSIS HCAPLUS, DDFU : [Keyword] Biomarker & (heart or cardiac) & toxicity)

## 結果

全ヒット数は822件であった。この結果からさらに「非臨床」で絞り込んだ結果、252件となった。

論文中で測定されているマーカーを抽出したが、ゲノムマーカー等、一部新規物質が報告されていたが、多くは以前の調査時と同じ物質の報告であり、その延長線上の検討であった。今回は、得られた知見の一部を記す。

## Troponin (Tn) 類

Tnは心筋傷害のバイオマーカー(細胞質可溶性マーカー)として、臨床において有用性が認知されており、頻用されている。一方、非臨床領域でも主に実験的急性心筋傷害モデルを用いた検討時に利用されており、文献数は最も多い。

Tnの中ではTnIとTnTが測定されている。TnIとTnTはTn複合体のサブユニットを形成しており、特異性等の一般的な物質特性はほぼ同様の性格を持つと考えられるが、測定に関してはそれぞれ長所と短所を有しているようである。

以前の報告<sup>2)</sup>では、非臨床での測定にヒト用測定キットを適用していたが、現在では各種動物用が取り揃えられており<sup>7)</sup>、測定精度は明らかに向上した。さらに、サル等の大動物でも測定が可能であり、LDHやCPKと比較して有用性が高いことが報告<sup>8)</sup>されている。

一方、病理組織像とTn値上昇が必ずしも相関しない場合もあり<sup>9,10)</sup>、測定結果を考察する際には注意を要する。

## Heart-type fatty acid binding protein (H-FABP)

H-FABPは、Tnと同様に細胞質可溶性マーカーであるので、心筋傷害時にはTnと同様な挙動を示すと

考えられ、臨床上有用なマーカーである<sup>6,10)</sup>。非臨床でも有用性が認められ、臨床と同様にTnと同時に測定している報告も多い。

## その他

心筋ストレスマーカーであるbrain natriuretic peptide (BNP)、NT-proBNPは心不全の診断、予後評価、治療効果の判定に広く用いられ、臨床上有用なマーカーである<sup>11)</sup>。その他、pentraxin 3, tenascin Cも報告<sup>6)</sup>されている。また、ゲノムマーカー(Spp1, Fhl1, Timp1, Ccl7およびReg3b)<sup>12)</sup>や*in vitro*<sup>5,13)</sup>での評価も報告されており、今後の展開が注目されている。

## 結論

心毒性マーカーに関しては、Tn, H-FABP, BNP等比較的以前から報告されているマーカーが主体であった。一方、ゲノムマーカーを含め新規物質の報告も散見され、今後の発展が望まれる。

また、各マーカーとも測定精度が向上したため、ヒト/動物ブリッジング評価も以前と比較すると精度が高くなったと考えられる。

## 参考文献

- 1) Marrer E. and Dieterle F.: Impact of biomarker development on drug safety assessment. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 243(2), 167-179 (2010).
- 2) 高橋 光一 他: 心・肝・腎に関する新規毒性バイオマーカーの現状 -文献的考察-. *医薬品研究*, 36(12), 564-576 (2005).
- 3) Chan D. and Ng LL.: Biomarkers in acute myocardial infarction. *BMC Medline*, 8,34 (2010).
- 4) Walker DB: Serum biomarkers of cardiac injury for nonclinical safety testing. *Toxicol. Pathol.*, 34, 94-104 (2006).
- 5) Kettenhofen E. and Bohlen H.: Preclinical assessment of cardiac toxicity. *Drug Discovery Today*, 13(15/16), 702-707 (2008).
- 6) 医学のあゆみ. 232(5), 459-479 (2010).
- 7) Serra M, et al.: Veterinary and toxicological applications for the detection of cardiac injury using cardiac troponin. *Vet. J.*, 185(1):50-57 (2010).
- 8) Minomo H, et al.: Characteristics of troponins as myocardial damage biomarkers in cynomolgus

monkeys. *J. Toxicol. Sci.*, 34(6), 589-601 (2009).

9) Tonomura Y, et al.: Evaluation of the usefulness of biomarkers for cardiac and skeletal myotoxicity in rats. *Toxicology*, 266(1-3), 48-54 (2009).

10) Clements P, et al.: Time course characterization of serum cardiac troponins, heart fatty acid-binding protein, and morphologic findings with isoproterenol-induced myocardial injury in the rat. *Toxicol. Pathol.*, 38(5), 703-714 (2010).

11) 猿原大和 他：心不全,急性冠症候群の診断,予後の推定に有用なバイオマーカー. *ICUとCCU*, 33(7), 515-523 (2009).

12) Mori Y, et al.: Identification of potential genomic biomarkers for early detection of chemically induced cardiotoxicity in rats. *Toxicology*, 271, 36-44 (2010).

13) Andersson H, et al.: Assaying cardiac biomarkers for toxicity testing using biosensing and cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells. *J. Biotechnol.*, 150(1), 175-181 (2010).

#### C-3-2) 筋肉毒性バイオマーカーの調査 (日原太郎) 調査方法

最近10年間のEMBASEで公開された文献を用いて調査を実施した (2010年6月)。検索単語として Muscle&biomarker&toxicityを用いた。検索後abstractに眼を通し、筋肉毒性とBiomarkerに関連がみられた文献を調査した。

#### 結果および考察

今回の調査において、FABP3,fsTnI,Parvalbumin-a, miR-133aが筋肉特異的バイオマーカーの候補として選別した。それぞれに関して調査内容を報告する。

##### 1) Fabp3

細胞質に存在する蛋白質で、心臓、腎臓、脳、筋肉で発現<sup>1),2)</sup>が確認されている。脂肪酸のトランスポートに関与し、核内受容体であるPPAR $\gamma$ により発現が制御<sup>2),3)</sup>される。筋肉毒性化合物である2,3,5,6-tetramethyl-p-phenylenediamine (TMPD), Cerivastatinにより、血清Fabp3が変動<sup>4)</sup>するが、心臓毒性化合物 (Isoproterenol)<sup>5)</sup>でも変動することが報告されている。

##### 2) fsTnI (fast-twitch skeletal muscle troponin I)

筋肉に特異的に発現しているTroponin Iの一種であり、ラットにおいてCerivastatin投与により血清中fsTnIが上昇する。心臓毒性化合物がIsoproterenol<sup>6)</sup>では上昇しない。また、筋肉障害が見られる患者において、血清fsTnIの上昇が確認<sup>7)</sup>されている。

##### 3) Parvalbumin- $\alpha$

TMPDを投与されたラットにおいて尿中parvalbumin- $\alpha$ が上昇<sup>8)</sup>する。また、ハンチントン (HD) 病モデルマウス、HD患者において、筋肉中のparvalbumin- $\alpha$ のmRNA減少<sup>9)</sup>する。

##### 4) miR-133a

心臓ならびに筋肉で発現しているマイクロRNAの一種<sup>10)</sup>であり、ラットにおいて、TMPD、スタチンにより血中miR-133aが上昇<sup>10)</sup>する。AMI (急性心筋梗塞)において、ラット、ヒト血漿レベルでの上昇が確認<sup>11)</sup>されている。

#### まとめ

最近10年間に発表された文献を用いて筋肉特異的バイオマーカーの調査を実施した。その結果、Fabp3,fsTnI,Parvalbumin- $\alpha$ ,miR-133aがバイオマーカー候補として取り上げた。しかし、心毒性化合物によっても変動するものや、文献情報がまだまだ少ないなどの理由で、現時点でこれらを筋肉特異的バイオマーカーとする結論には至らなかった。

#### 参考文献

- 1) Eugene Y. Zhen Dr., Michael J. Berna, Zhaoyan Jin, Michael L. Pritt, David E. Watson, Bradley L. Ackermann, John E. Halel : Quantification of heart fatty acid binding protein as a biomarker for drug-induced cardiac and musculoskeletal necroses. *Proteomics Clin. Appl.*, 1: 661-671 (2007)
- 2) Peter James O' Brien : Cardiac troponin is the most effective translational safety biomarker for myocardial injury in cardiotoxicity. *Toxicology*, 245: 206-218 (2008)
- 3) Baichun Yang, Kathleen K Brown, Lihong Chen, Kevin M Carrick, Lisa G Clifton, Judi A McNulty, Deborah A Winegar, Jay C Strum, Stephen A Stimpson, and Gregory L Pahel : Serum adiponectin as a



biomarker for *in vivo* PPARgamma activation and PPARgamma agonist-induced efficacy on insulin sensitization/lipid lowering in rats. *BMC Pharmacol.*, 4: 23 (2004)

4) Michael L. Pritt, David Greg Hall, Justin Recknor, Kelly M. Credille, Donna D. Brown, Nathan P. Yumibe, Albert Eric Schultze, David E. Watson : Fabp3 as a Biomarker of Skeletal Muscle Toxicity in the Rat: Comparison with Conventional Biomarkers. *Toxicol. Sci.*, 103: 382-396 (2008)

5) Yutaka Tonomura, Yoko Mori, Mikinori Torii, Takeki Uehara: Evaluation of the usefulness of biomarkers for cardiac and skeletal myotoxicity in rats. *Toxicology* 266: 48-54 (2009)

6) Vassallo JD, Janovitz EB, Wescott DM, Chadwick C, Lowe-Krentz LJ, Lehman-McKeeman LD. : Biomarkers of drug-induced skeletal muscle injury in the rat: troponin I and myoglobin. *Toxicol Sci.* 111: 402-12 (2009)

7) Jeremy A. Simpson<sup>1</sup>, Ralf Labugger<sup>1</sup>, Christine Collier, Robert J. Brison, Steve Iscoe, Jennifer E. Van Eyk: Fast and Slow Skeletal Troponin I in Serum from Patients with Various Skeletal Muscle Disorders: A Pilot Study. *Clinical Chemistry* 51: 966-972 (2005)

8) Dare TO, Davies HA, Turton JA, Lomas L, Williams TC, York MJ. : Application of surface-enhanced laser desorption/ionization technology to the detection and identification of urinary parvalbumin-alpha: a biomarker of compound-induced skeletal muscle toxicity in the rat. *Electrophoresis* 18: 3241-51 (2002)

9) Andrew D. Strand<sup>1</sup> Aaron K. Aragaki, Dennis Shaw, Thomas Bird, Janice Holton, Christopher Turner, Stephen J. Tapscott, Sarah J. Tabrizi, Anthony H. Schapira, Charles Kooperberg, James M. Olson : Gene expression in Huntington's disease skeletal muscle: a potential biomarker. *Hum. Mol. Genet.* 14: 1863-1876 (2005)

10) Omar F. Laterza, Lee Lim, Philip W. Garrett-Engele, Katerina Vlasakova, Nagaraja Muniappa, Wesley K.

Tanaka, Jason M. Johnson, Joseph F. Sina, Thomas L. Fare, Frank D. Sistare, Warren E. Glaab : Plasma MicroRNAs as Sensitive and Specific Biomarkers of Tissue Injury. *Clinical Chemistry* 55: 1977-1983 (2009)

11) Guo-Kun Wang, Jia-Qi Zhu<sup>1</sup>, Jun-Tao Zhang, Qing Li, Yue Li<sup>1</sup>, Jia He, Yong-Wen Qin, Qing Jing<sup>1</sup> : Circulating microRNA: a novel potential biomarker for early diagnosis of acute myocardial infarction in humans. *Eur. Heart J.* 31: 659-666 (2010)

### C-3-3) 神経毒性バイオマーカーの調査 (池田孝則) 方法

神経毒性バイオマーカーについては、PubMed<sup>1)</sup>を用いた論文検索により候補物質を探索した。ここで、神経毒性検出のためのバイオマーカーとしての条件として、以下のことを考慮した。

- 1) 血液、尿、脳脊髄液で測定可能なもの
- 2) ヒトと動物でともに検出されるもの
- 3) 組織病変や生理的な機能変化にともない、増加・減少するもの
- 4) 画像・生理的検査と同等、もしくは優れた感度・特異性をもつもの
- 5) 末梢・中枢が分別可能であることを望ましい
- 6) 神経体、軸索、シュワン細胞、膠細胞等が分別可能であることが望ましい

「Nerve」、「Injury」、「Biomarker」という検索語句により、1369 Hitを得た。その中から、可能性ある候補物質を以下に記した。

### 結果

#### 1. SBDP ( $\alpha$ -II-Spectrin Break Down Product) と Cleaved-Tau

神経の骨格蛋白である $\alpha$ -II-Spectrinが、障害刺激により細胞内に流入したCa<sup>2+</sup>により活性化された calpain又はcaspase-3により分解されたものがSBDPであり、Tau蛋白がcalpainにより分解されたものが Cleaved-tauである<sup>2)</sup>。SBDPの150 kDaと145 kDaのものは、calpainにより、120 kDaのものはcaspase-3により産生される。ヒト又は動物において、脳脊髄液から検出されており、ヒトでは頭部障害<sup>3,4)</sup>、ラットでは頭部打撃モデル<sup>5,6)</sup>、イヌでは心手術後モデル

(低温での心停止と心肺バイパス手術後の中枢神経障害モデル)<sup>7)</sup>において、上昇することが報告されている。*in vitro*においても、培養神経細胞死のときにも培養液中に放出される<sup>8)</sup>。ラットでは、薬物誘発のものとして、メタアンフェタミンによるc-tauの上昇が報告されている<sup>9)</sup>。

## 2. S-100β protein

Ca依存性のシグナル蛋白であるS-100βは、星状膠細胞から放出され、末梢血や脳脊髄液で検出可能である<sup>10)</sup>。ヒトでは、ベンゾジアゼピン過剰服用<sup>11)</sup>、心停止<sup>12,13)</sup>、虚血性脳卒中<sup>14)</sup>、脳内出血<sup>15)</sup>、頭部障害<sup>16,17,18,19)</sup>、心停止後の低酸素<sup>20,21)</sup>、一酸化炭素中毒<sup>22,23)</sup>等で上昇が認められている。実験動物では、ラットのペンテトラゾール痙攣<sup>24)</sup>や頭部打撲モデル<sup>25)</sup>において上昇することが報告されている。後述するNSEより高感受性<sup>26)</sup>であり、他のバイオマーカーより優れる<sup>27,28)</sup>といった報告もある。中枢の放射線療法程度の障害でも上昇が検出可能である。ただし、ラットの実験において、大腿骨骨折<sup>29)</sup>や絶食<sup>30)</sup>によっても上昇するとの報告や、ヒトにおいても骨折により上昇するとの報告<sup>31)</sup>もあることから、特異性については注意が必要である。すでに、虚血性脳卒中中のPh II試験に探索的なバイオマーカーとして使用されている<sup>32)</sup>。

## 3. Myelin Basic Protein (MBP)

MBPは、中枢に特異的なミエリン膜プロテオリピッドであり<sup>33)</sup>、ヒトでは急性脳梗塞<sup>34)</sup>や虚血再還流時<sup>35)</sup>に、脳脊髄中の濃度が上昇することが報告されている。

## 4. Glial Fibrillary Astrocytic Protein (GFAP)

GFAPは、星状膠細胞の構成蛋白であり<sup>36)</sup>、ヒトの急性虚血性脳卒中時に脳脊髄液中に上昇する<sup>37)</sup>。脳障害時には、S100βやNSEより高感度・特異性があるとの報告<sup>38)</sup>がある。

## 5. Neuron-Specific Enolase (NSE)

NSEは、神経細胞質に由来し<sup>39)</sup>、脳脊髄液及び末梢血から検出可能である。ヒトでは頭部損傷<sup>40)</sup>や虚血再還流<sup>35)</sup>により、まだラットのペンテトラゾール痙攣<sup>24)</sup>や頭部打撲モデル<sup>25)</sup>で上昇が認められる。その他の情報として、ラットにトルエンを暴露したと

き脳内濃度が上昇すること<sup>41)</sup>や、ヒトでの中枢障害後の炎症性反応により相関しているとの報告<sup>42)</sup>がある。  
神経毒性バイオマーカー調査のまとめ

非臨床試験における動物を用いた系統的な神経毒性バイオマーカー検討はなされてはならず、化学物質の毒性評価におけるバイオマーカーとして用いられているものは、いまのところ存在しない。ヒトの臨床研究として、S-100βとNSEについては、頭部損傷、虚血、脳卒中について多く検討がされている。

## 参考文献

- 1) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>
- 2) Liu J, Liu MC, Wang KK. Calpain in the CNS: from synaptic function to neurotoxicity. *Sci Signal* 2008, 1: re1.
- 3) Brophy GM, Pineda JA, Papa L, Lewis SB, Valadka AB, Hannay HJ, Heaton SC, et al. αII-Spectrin breakdown product cerebrospinal fluid exposure metrics suggest differences in cellular injury mechanisms after severe traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 2009, 26: 471-9.
- 4) Pineda JA, Lewis SB, Valadka AB, Para L, Hannay HJ, Heaton SC, et al. Clinical significance of II-spectrin breakdown products in cerebrospinal fluid after severe traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 2007, 24: 354-66.
- 5) Cox CD, West EJ, Liu MC, Wang KK, Hayes RL, Lyeth BG. Dicyclomine, an M1 muscarinic antagonist, reduces biomarker levels, but not neuronal degeneration, in fluid percussion brain injury. *J Neurotrauma* 2008, 25: 1355-65.
- 6) Siman R, Zhang C, Roberts VL, Pitts-Kiefer A, Neumar RW. Novel surrogate markers for acute brain damage: cerebrospinal fluid levels correlate with severity of ischemic neurodegeneration in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab* 2005, 25: 1433-44.
- 7) Weiss ES, Wang KK, Allen JG, Blue ME, Nwakanma LU, Liu MC, Lange MS, et al. Alpha II-spectrin breakdown products serve as novel markers of brain injury severity in a canine model of hypothermic circulatory arrest. *Ann Thorac Surg* 2009,

- 88: 543-50.
- 8) Dutta S, Chiu YC, Probert AW, Wang KK. Selective release of calpain produced alphaII-spectrin (alpha-fodrin) breakdown products by acute neuronal cell death. *Biol Chem* 2002, 383: 785-91.
- 9) Gabbita SP; Scheff SW; Menard RM; Roberts K; Fugaccia I; Zemlan FP. Methamphetamine enhances the cleavage of the cytoskeletal protein tau in the rat brain. *Neuroscience* 2003, 116: 1063-8.
- 10) Marenholz I, Heizmann CW, Fritz G. S100 proteins in mouse and man: from evolution to function and pathology (including an update of the nomenclature). *Biochem Biophys Res Commun* 2004, 322: 1111-22.
- 11) Ambrozic J, Bunc M, Osredkar J, Brvar M. S100B protein in benzodiazepine overdose. *Emerg Med J* 2008, 25: 90-2.
- 12) Bottiger BW, Mobes S, Glatzer R, Bauer H, Gries A, Bartsch P, Motsch J, Martin E. Astroglial protein S-100 is an early and sensitive marker of hypoxic brain damage and outcome after cardiac arrest in humans. *Circulation* 2001, 103: 2694-8.
- 13) Rosen H, Rosengren L, Herlitz J, Blomstrand C. Increased serum levels of the S-100 protein are associated with hypoxic brain damage after cardiac arrest. *Stroke* 1998, 29: 473-7.
- 14) Fassbender K, Schmidt R, Schreiner A, Fatar M, Muhlhauser F, Daffertshofer M, Hennerici M. Leakage of brain-originated proteins in peripheral blood: temporal profile and diagnostic value in early ischemic stroke. *J Neurol Sci* 1997, 148: 101-5.
- 15) Gazzolo D, Di Iorio R, Marinoni E, Masetti P, Serra G, Giovannini L, Michetti F. S100B protein is increased in asphyxiated term infants developing intraventricular hemorrhage. *Crit Care Med* 2002, 30: 1356-60.
- 16) Bechtel K, Frasure S, Marshall C, Dziura J, Simpson C. Relationship of serum S100B levels and intracranial injury in children with closed head trauma. *Pediatrics* 2009, 124: 697-704.
- 17) Berger RP, Beers SR, Richichi R, Wiesman D, Adelson PD. Serum biomarker concentrations and outcome after pediatric traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 2007, 24: 1793-801.
- 18) Dimopoulou I, Korfiatis S, Dafni U, Anthi A, Psachoulia C, Jullien G, et al. Protein S-100b serum levels in trauma-induced brain death. *Neurology* 2003, 60: 947-51.
- 19) de Kruijk JR, Leffers P, Menheere PP, Meerhoff S, Twijnstra A. S-100B and neuron-specific enolase in serum of mild traumatic brain injury patients. A comparison with health controls. *Acta Neurol Scand* 2001, 103: 175-9.
- 20) Bottiger BW, Mobes S, Glatzer R, Bauer H, Gries A, Bartsch P, et al. Astroglial protein S-100 is an early and sensitive marker of hypoxic brain damage and outcome after cardiac arrest in humans. *Circulation* 2001, 103, 22: 2694-8.
- 21) Rosen H, Rosengren L, Herlitz J, Blomstrand C. Increased serum levels of the S-100 protein are associated with hypoxic brain damage after cardiac arrest. *Stroke* 1998, 29: 473-7.
- 22) Brvar M, Mozina H, Osredkar J, Mozina M, Noc M, Brucan A, et al. S100B protein in carbon monoxide poisoning: a pilot study. *Resuscitation* 2004, 61: 357-60.
- 23) Brvar M, Mozina H, Osredkar J, Mozina M, Brucan A, Bunc M. The potential value of the protein S-100B level as a criterion for hyperbaric oxygen treatment and prognostic marker in carbon monoxide poisoned patients. *Resuscitation* 2003, 56: 105-9.
- 24) Oses JP, Leke R, Portela LV, Lara DR, Schmidt AP, Casali EA, et al. Biochemical brain markers and purinergic parameters in rat CSF after seizure induced by pentylenetetrazol. *Brain Res Bull* 2004, 64: 237-42.
- 25) Loy DN, Sroufe AE, Pelt JL, Burke DA, Cao QL, Talbott JF, et al. Serum biomarkers for experimental acute spinal cord injury: rapid elevation of neuron-specific enolase and S-100beta. *Neurosurgery* 2005, 56: 391-7.
- 26) Fassbender K, Schmidt R, Schreiner A, Fatar M, Muhlhauser F, Daffertshofer M, Hennerici M. Leakage

- of brain-originated proteins in peripheral blood: temporal profile and diagnostic value in early ischemic stroke. *J Neurol Sci* 1997, 148: 101-5.
- 27) Kovcsdi E, Luckl J, Bukovics P, Farkas O, Pal J, Czeiter E, et al. Update on protein biomarkers in traumatic brain injury with emphasis on clinical use in adults and pediatrics. *Acta Neurochir (Wien)* 2010, 151: 1-17.
- 28) Shinozaki K, Oda S, Sadahiro T, Nakamura M, Abe R, Nakada TA, et al. Serum S-100B is superior to neuron-specific enolase as an early prognostic biomarker for neurological outcome following cardiopulmonary resuscitation. *Resuscitation* 2009, 80: 870-5.
- 29) Pelinka LE, Szalay L, Jafarmadar M, Schmidhammer R, Redl H, Bahrami S. Circulating S100B is increased after bilateral femur fracture without brain injury in the rat. *Br J Anaesth* 2003, 91: 595-7.
- 30) Netto CB, Conte S, Leite MC, Pires C, Martins TL, Vidal P, Benfato MS, et al. Serum S100B protein is increased in fasting rats. *Arch Med Res* 2006, 37: 683-6.
- 31) Uden J, Bellner J, Eneroth M, Alling C, Ingebrigsten T, Romner B. Raised Serum S100B Levels after Acute Bone Fractures without Cerebral Injury. *J Trauma* 2005, 58: 59-61.
- 32) Elting JW, Sulter GA, Kaste M, Lees KR, Diener HC, Hommel M, et al. AMPA antagonist ZK200775 in patients with acute ischemic stroke: possible glial cell toxicity detected by monitoring of S-100B serum levels. *Stroke* 2002, 33: 2813-8.
- 33) Sternberger NH, Itoyama Y, Kies MW, Webster H. Myelin basic protein demonstrated immunocytochemically in oligodendroglia prior to myelin sheath formation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1978, 75: 2521-4.
- 34) Brouns R, De Vil B, Cras P, De Surgeloose D, Marien P, De Deyn PP. Neurobiochemical markers of brain damage in cerebrospinal fluid of acute ischemic stroke patients. *Clin Chem* 2010, 56: 451-8.
- 35) Gazzolo D, Abella R, Marinoni E, Di Iorio R, Li Volti G, Galvano F, Pongiglione G, et al. Circulating biochemical markers of brain damage in infants complicated by ischemia reperfusion injury. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem* 2009, 7: 108-26.
- 36) Rosengren LE, Wikkelso C, Hagberg L. A sensitive ELISA for glial fibrillary acidic protein: application in CSF of adults. *J Neurosci Method* 1994, 51: 197-204.
- 37) Brouns R, De Vil B, Cras P, De Surgeloose D, Marien P, De Deyn PP. Neurobiochemical markers of brain damage in cerebrospinal fluid of acute ischemic stroke patients. *Clin Chem* 2010, 56: 451-8.
- 38) Honda M, Tsuruta R, Kaneko T, Kasaoka S, Yagi T, Todani M, et al. Serum glial fibrillary acidic protein is a highly specific biomarker for traumatic brain injury in humans compared with S-100B and neuron-specific enolase. *J Trauma* 2010, 69: 104-9.
- 39) Marangos PJ, Schmechel DE. Neuron specific enolase, a clinically useful marker for neurons and neuroendocrine cells. *Annu Rev Neurosci* 1987, 10: 269-95.
- 40) Geyer C, Ulrich A, Grafe G, Stach B, Till H. Diagnostic value of S100B and neuron-specific enolase in mild pediatric traumatic brain injury. *J Neurosurg Pediatr* 2009, 4: 339-44.
- 41) Huang J, Kato K, Shibata E, Hisanaga N, Ono Y, Takeuchi Y. Effects of subacute toluene exposure on neuronal and glial marker proteins in rat brain. *Toxicology* 1990, 61: 109-17.
- 42) Pleines UE, Morganti-Kossmann MC, Rancan M, Joller H, Trentz O, Kossmann T. S-100 beta reflects the extent of injury and outcome, whereas neuronal specific enolase is a better indicator of neuroinflammation in patients with severe traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 2001, 18: 491-8.

#### D. 考 察

医薬品開発段階で用いられ得る安全性評価のため