

in vitro (Fig. 3). By using the genes commonly up-regulated both *in vivo* and *in vitro*, PCA was performed for 32 compounds, and principal component 1 was identified as a convenient parameter to extract PPAR α agonists from the database (Fig. 3). This study is one of the first to create an *in vivo*–*in vitro* bridge for the validation of a genomic biomarker.

4.6 Bridging between the rat and human: Coumarin-induced hepatotoxicity [19]

A system that perfectly predicts hepatotoxicity in the rat would not necessarily improve the prediction of hepatotoxicity in humans. The final goal must be the prediction of hepatotoxicity in humans for drug development. The extra-

polation of toxicity data from rodent to human is not sufficient. However, if general toxic mechanisms or toxicological pathways are conserved over species, they would be useful bridges between animal models and clinical events. One expected result from toxicogenomics technology is to overcome the barrier due to species difference in the prediction of clinical toxicity.

We investigated the possibility of an informational bridge connecting transcript responses between rat and human hepatocytes, and rat liver *in vivo* after the administration of coumarin. In this experiment, primary cultured rat hepatocytes were exposed to 12, 60, and 300 μM coumarin for 24 h. No obvious cytotoxicity was detected by LDH release (100.5, 97.7, and 95.1% of control, respectively). Then, we extracted the significant genes according to the gene list obtained from *in vivo* study; the extracted genes showed

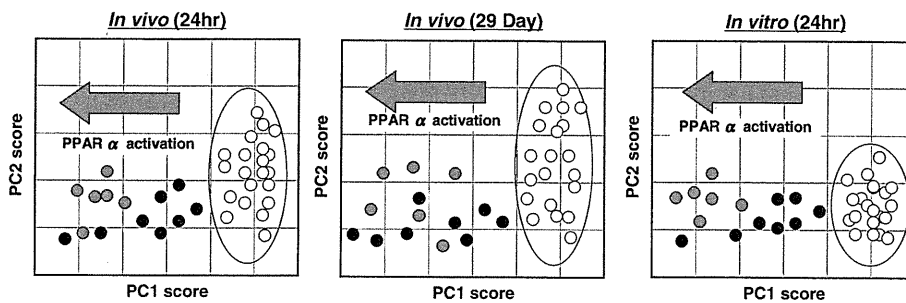


Figure 3. An *in vivo*–*in vitro* bridge for genomic biomarkers to assess PPAR α agonistic action. A model case for creating an *in vivo*–*in vitro* bridge for genomic biomarkers is presented. The data from three agonists of PPAR α in our database (clofibrate, WY-14643 and gemfibrozil) were analyzed, and 41 commonly up-regulated probe sets between *in vivo* and *in vitro* were extracted. The validity of these probe sets as biomarkers for the evaluation of PPAR α agonistic activity was evaluated by PCA. These plots show the principal separation of samples due to putative PPAR α agonistic activity toward the negative direction on the x-axis, PC1.

Coumarin-responsive genes (*in vivo*)

Up-regulated: 136 probe sets
Down-regulated: 79 probe sets

Further gene extraction

Probe sets with changes at the highest concentration of 1.5-fold or more and 0.6-fold or less than that of the control

In vivo–*in vitro* bridging genes

Up-regulated: 37 probe sets
Down-regulated: 29 probe sets

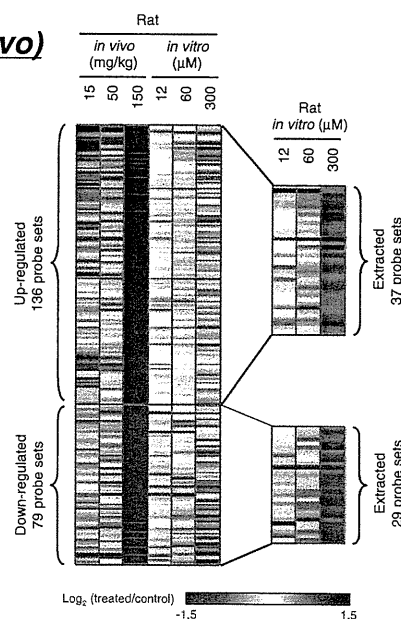


Figure 4. Heat map of the expression profiles of probe sets in rat liver and rat hepatocytes treated with coumarin. A considerable number of the *in vivo*-selected probe sets show similar profiles between *in vivo* and *in vitro* assays. The selected genes, namely the *in vivo*–*in vitro* bridging probes, had clear dose-dependent changes in expression.

significant up-regulation (136 probe sets) or down-regulation (79 probe sets) in livers treated with 150 mg/kg coumarin. A similar trend was observed between *in vivo* and *in vitro* cell responses, although the extent of the response (the fold change) was generally smaller, and fewer genes showed a measurable change in the *in vitro* cell assay (Fig. 4). Probe sets showing changes of 1.5-fold or more or 0.6-fold or less than that of the control at the highest concentration (300 μM) in rat hepatocytes were selected as *in vivo*–*in vitro* bridging probes that reflect the toxicological mechanism of coumarin *in vivo*. The selected genes (37 up-regulated and 29 down-regulated) had clear dose-dependent changes in expression that enabled us to assess the hepatotoxicity of coumarin by using the *in vitro* data (Fig. 4).

Next, cultured human hepatocytes were exposed to 12, 60, and 300 μM coumarin for 24 h. No obvious cytotoxicity was detected by LDH release (100.6, 100.9, and 102.0% of control, respectively). The *in vivo*–*in vitro* bridging probes were assigned to their human ortholog genes to form a set of rat–human bridging probes, and changes in their expression were compared in rat *versus* human hepatocytes. In total, 14 up-regulated probe sets and 11 down-regulated probe sets were identified; their relative expression levels are shown in Fig. 5. The pattern of changes in gene expression was similar in rat and human cells, but the extent of the changes was more prominent in rat cells than in human cells, in accordance with the known species-specific differ-

ence in hepatotoxicity [32–38]. In the case of diclofenac, which is a hepatotoxicant without species difference, there was no evidence of a species-specific difference in gene expression between rat and human cells. The observation that the induction of stress-related genes was more robust in rat cells than in human cells could be a direct reflection of the extent of stress and subsequent damage caused by coumarin in each species. Although more data are needed to connect species and model systems with human risk assessment, this approach is an important step in bridging the differences between species.

5 Future perspectives

This review focuses on our efforts in toxicogenomics research and highlights recent progress in the application of toxicogenomics. In the early stage of drug development, genomic biomarkers are used to identify and optimize lead compounds among several candidates. As full-scale toxicity testing is quite costly, safety assessment of candidate drugs is usually performed just before the clinical trial. If serious toxicity emerges at this stage, it might be necessary to return to the screening of seed compounds, because toxicity is often inherent to the basic structure and is thus never eliminated by minor modification. If the potential phenotype (when repeatedly dosed) is predictable in the early stage

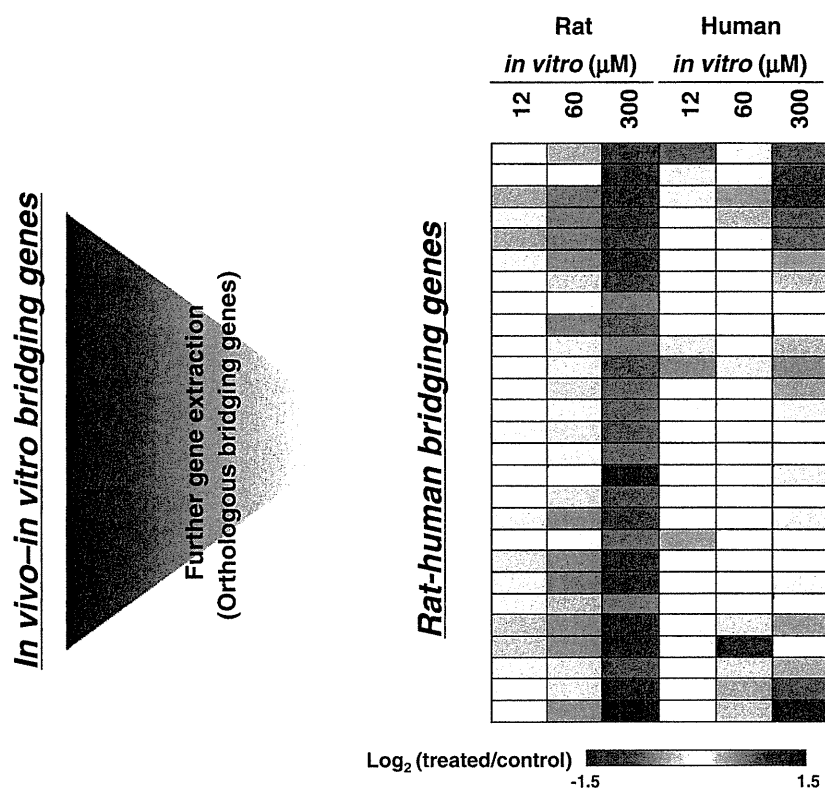


Figure 5. Heat map of the expression profile of probe sets in rat and human hepatocytes treated with coumarin. Among the *in vivo*–*in vitro* bridging probes for rats, 14 up-regulated and 11 down-regulated probe sets were assigned to human ortholog (species bridging marker), and their expression is shown as a heat map of the expression profile in rat and human hepatocytes treated with coumarin (12, 60 and 300 μM). Each probe set dose-dependently responded to coumarin in both species, whereas the extent of the changes appears to be more prominent in rats than in humans.

of drug development by gene expression data from a small number of experimental animals, it would effectively cut the time and cost of drug development. The use of genomic biomarkers in the early stage of drug development will strengthen the safety screening of drug candidates before they are administered to humans. The use of genomic biomarkers will also reduce the number of animals sacrificed during drug development. However, the candidate biomarkers reviewed here have not necessarily been evaluated with large independent test sets and are rarely validated across laboratories. Further definitive validation studies are absolutely essential for judging the acceptability of candidate genomic biomarkers in pre-clinical safety assessments. Furthermore, regulatory agencies, the pharmaceutical industry and academia must establish guidelines for the integration of “omics” data, including toxicogenomics and genomic biomarkers, into drug safety assessment. We are currently in the project’s second stage, known as the TGP2. Our goals are as follows: (i) establishment of genomic biomarkers to predict the toxicity of drug candidates in the early stage of drug development, (ii) bridging of species differences, and (iii) application of toxicogenomic data for regulatory science. These efforts will contribute to the accelerated development of more effective and safer drugs.

The PSTC also represents a next important step in the validation and regulatory use of new pre-clinical biomarker tests with the initiative of the C-Path Institute. The novel biomarkers are internally developed and used by each individual pharmaceutical company and consortium are of limited value for regulatory use because the methods used have not been validated by an independent party. To resolve these issues, there is a growing need for a large and cross-institutional study on a global scale. The PSTC is a public–private partnership, led by the C-Path Institute, which brings together pharmaceutical companies to share and validate each other’s safety testing methods under advisement of the Food and Drug Administration (FDA) and its European counterpart, the European Medicines Evaluation Agency (EMA). The aim of the PSTC is to identify and qualify safety biomarkers for regulatory use as part of the Food and Drug Administration’s Critical Path Initiative. The 17 corporate members of the consortium share internally developed pre-clinical safety biomarkers in five workgroups: carcinogenicity, kidney, liver, muscle, and vascular injury. Consortium members are sharing their new pre-clinical biomarker tests for examination and cross-validation by other members of the consortium. Candidate genomic biomarkers reviewed here will need a similar validation process through collaborative research like that of PSTC. These processes are expected to enable the regulatory agencies to write new guidelines for industry that identify more accurate methods to predict drug safety.

The authors have declared no conflict of interest.

6 References

- [1] Ismail, K., Landis, J., Can the pharmaceutical industry reduce attrition rates? *Nat. Rev. Drug Discov.* 2003, 3, 711–715.
- [2] Edgar, R., Domrachev, M., Lash, A. E., Gene expression omnibus: NCBI gene expression and hybridization array data repository. *Nucleic Acids Res.* 2002, 30, 207–210.
- [3] Barrett, T., Troup, D. B., Wilhite, S. E., Ledoux, P. *et al.*, NCBI GEO: archive for high-throughput functional genomic data. *Nucleic Acids Res.* 2009, 37, D885–D890.
- [4] Brazma, A., Parkinson, H., Sarkans, U., Shojatalab, M. *et al.*, ArrayExpress – a public repository for microarray gene expression data at the EBI. *Nucleic Acids Res.* 2003, 31, 68–71.
- [5] Parkinson, H., Kapushesky, M., Kolesnikov, N., Rustici, G. *et al.*, ArrayExpress update – from an archive of functional genomics experiments to the atlas of gene expression. *Nucleic Acids Res.* 2009, 37, D868–D872.
- [6] Ikeyo, K., Ishi-i, J., Tamura, T., Gojobori, T. *et al.*, CIBEX: center for information biology gene expression database. *C. R. Biol.* 2003, 326, 1079–1082.
- [7] Hayes, K. R., Vollrath, A. L., Zastrow, G. M., McMillan, B. J. *et al.*, EDGE: a centralized resource for the comparison, analysis, and distribution of toxicogenomic information. *Mol. Pharmacol.* 2005, 67, 1360–1368.
- [8] Waters, M., Stasiewicz, S., Merrick, B. A., Tomer, K. *et al.*, CEBS Chemical Effects in Biological Systems: a public data repository integrating study design and toxicity data with microarray and proteomics data. *Nucleic Acids Res.* 2008, 36, D892–D900.
- [9] Burgoon, L. D., Zacharewski, T. R., dbZach toxicogenomic information management system. *Pharmacogenomics* 2007, 8, 287–291.
- [10] Mattingly, C. J., Colby, G. T., Forrest, J. N., Boyer, J. L., The Comparative Toxicogenomics Database (CTD). *Environ. Health Perspect.* 2003, 111, 793–795.
- [11] Mattingly, C. J., Rosenstein, M. C., Colby, G. T., Forrest, Jr, J. N. *et al.*, The Comparative Toxicogenomics Database (CTD): a resource for comparative toxicological studies. *J. Exp. Zool. A Comp. Exp. Biol.* 2006, 305, 689–692.
- [12] Mulrane, L., Rexhepaj, E., Smart, V., Callanan, J. J. *et al.*, Creation of a digital slide and tissue microarray resource from a multi-institutional predictive toxicology study in the rat: an initial report from the PredTox group. *Exp. Toxicol. Pathol.* 2008, 60, 235–245.
- [13] McBurney, R. N., Hines, W. M., Von Tungen, L. S., Schnackenberg, L. K. *et al.*, The liver toxicity biomarker study: phase I design and preliminary results. *Toxicol. Pathol.* 2009, 37, 52–64.
- [14] Porter, M. W., Castle, A. L., Orr, M. S., Mendrick, D. L., in: Burczynski, M. E. (Ed.), *Predictive Toxicogenomics: An Introduction to Toxicogenomics*, CRC Press, Boca Raton 2003, pp. 225–260.
- [15] Tibshirani, R., Hastie, T., Narasimhan, B., Chu, G., Diagnosis of multiple cancer types by shrunken centroids of gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2002, 99, 6567–6572.

- [16] Brown, M. P., Grundy, W. N., Lin, D., Cristianini, N. *et al.*, Knowledge-based analysis of microarray gene expression data by using support vector machines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2000, 97, 262–267.
- [17] Kiyosawa, N., Shiwaku, K., Hirode, M., Omura, K. *et al.*, Utilization of a one-dimensional score for surveying chemical-induced changes in expression levels of multiple biomarker gene sets using a large-scale toxicogenomics database. *J. Toxicol. Sci.* 2006, 31, 433–448.
- [18] Uehara, T., Kiyosawa, N., Hirode, M., Omura, K. *et al.*, Gene expression profiling of methapyrilene-induced hepatotoxicity in rat. *J. Toxicol. Sci.* 2008, 33, 37–50.
- [19] Uehara, T., Kiyosawa, N., Shimizu, T., Omura, K. *et al.*, Species-specific differences in coumarin-induced hepatotoxicity as an example toxicogenomics-based approach to assessing risk of toxicity to humans. *Hum. Exp. Toxicol.* 2008, 27, 23–35.
- [20] Kiyosawa, N., Uehara, T., Gao, W., Omura, K. *et al.*, Identification of glutathione depletion-responsive genes using phorone-treated rat liver. *J. Toxicol. Sci.* 2007, 32, 469–486.
- [21] James, L. P., Mayeux, P. R., Hinson, J. A., Acetaminophen-induced hepatotoxicity. *Drug Metab. Dispos.* 2003, 31, 1499–1506.
- [22] Kiyosawa, N., Ito, K., Sakuma, K., Niino, N. *et al.*, Evaluation of glutathione deficiency in rat livers by microarray analysis. *Biochem. Pharmacol.* 2004, 68, 1465–1475.
- [23] Hirode, M., Ono, A., Miyagishima, T., Nagao, T. *et al.*, Gene expression profiling in rat liver treated with compounds inducing phospholipidosis. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2008, 229, 290–299.
- [24] Hirode, M., Horinouchi, A., Uehara, T., Ono, A. *et al.*, Gene expression profiling in rat liver treated with compounds inducing elevation of bilirubin. *Hum. Exp. Toxicol.* 2009, 28, 231–244.
- [25] Uehara, T., Hirode, M., Ono, A., Kiyosawa, N. *et al.*, A toxicogenomics approach for early assessment of potential non-genotoxic hepatocarcinogenicity of chemicals in rats. *Toxicology* 2008, 250, 15–26.
- [26] Ellinger-Ziegelbauer, H., Gmuender, H., Bandenburg, A., Ahr, H. J., Prediction of a carcinogenic potential of rat hepatocarcinogens using toxicogenomics analysis of short-term *in vivo* studies. *Mutat. Res.* 2008, 637, 23–39.
- [27] Ellinger-Ziegelbauer, H., Stuart, B., Wahle, B., Bomann, W., Ahr, H. J., Comparison of the expression profiles induced by genotoxic and nongenotoxic carcinogens in rat liver. *Mutat. Res.* 2005, 575, 61–84.
- [28] Fielden, M. R., Brennan, R., Gollub, J., A gene expression biomarker provides early prediction and mechanistic assessment of hepatic tumor induction by nongenotoxic chemicals. *Toxicol. Sci.* 2007, 99, 90–100.
- [29] Nie, A. Y., McMillian, M., Parker, J. B., Leone, A. *et al.*, Predictive toxicogenomics approaches reveal underlying molecular mechanisms of nongenotoxic carcinogenicity. *Mol. Carcinog.* 2006, 45, 914–933.
- [30] Fielden, M. R., Nie, A., McMillian, M., Elangbam, C. S., Interlaboratory evaluation of genomic signatures for predicting carcinogenicity in the rat. *Toxicol. Sci.* 2008, 103, 28–34.
- [31] Tamura, K., Ono, A., Miyagishima, T., Nagao, T. *et al.*, Profiling of gene expression in rat liver and rat primary cultured hepatocytes treated with peroxisome proliferators. *J. Toxicol. Sci.* 2006, 31, 471–490.
- [32] Vassallo, J. D., Hicks, S. M., Daston, G. P., Lehman-McKeeman, L. D., Metabolic detoxification determines species differences in coumarin-induced hepatotoxicity. *Toxicol. Sci.* 2004, 80, 249–257.
- [33] Felter, S. P., Vassallo, J. D., Carlton, B. D., Daston, G. P., A safety assessment of coumarin taking into account species-specificity of toxicokinetics. *Food Chem. Toxicol.* 2006, 44, 462–475.
- [34] Vassallo, J. D., Hicks, S. M., Daston, G. P., Lehman-McKeeman, L. D., Metabolic detoxification determines species differences in coumarin-induced hepatotoxicity. *Toxicol. Sci.* 2004, 80, 249–257.
- [35] Felter, S. P., Vassallo, J. D., Carlton, B. D., Daston, G. P., A safety assessment of coumarin taking into account species-specificity of toxicokinetics. *Food Chem. Toxicol.* 2006, 44, 462–475.
- [36] Born, S. L., Hu, J. K., Lehman-McKeeman, L. D., o-Hydroxyphenylacetaldehyde is a hepatotoxic metabolite of coumarin. *Drug Metab. Dispos.* 2000, 28, 218–223.
- [37] Born, S. L., Caudill, D., Smith, B. J., Lehman-McKeeman, L. D., *In vitro* kinetics of coumarin 3,4-epoxidation: application to species differences in toxicity and carcinogenicity. *Toxicol. Sci.* 2000, 58, 23–31.
- [38] Lake, B. G., Investigations into the mechanism of coumarin-induced hepatotoxicity in the rat. *Arch. Toxicol.* 1984, 7, 16–29.

トキシコゲノミクスプロジェクトと安全性試験

漆谷 徹郎

要約：マイクロアレイ技術の発達により，一度に全遺伝子の発現を定量するという，一時代前は夢のようなことが可能となった。医薬品開発における安全性研究は，何が起るかわからないという状態で発生確率の低い有害作用の可能性を予測せよという，一見して不可能なことを強いられていたが，これを毒性学に応用したトキシコゲノミクスという領域が生まれ，安全性研究に革命をもたらした。我が国のトキシコゲノミクスプロジェクトは，世界最大規模のデータベース TG-GATEs を完成させたが，これを安全性試験に適用するには多くの課題が見いだされてきた。現在，後継プロジェクトにおいて，このシステムを活用し，安全性バイオマーカーの創出に力を注いでいる。

はじめに

ポストゲノム時代といわれる現在，新薬のシーズを見いだす技術は飛躍的に発展を遂げているように見えるものの，日本のみならず世界的に新規薬物の成功例はかえって減少しつつある。ヒトゲノムプロジェクトとそれに続く各種生物のゲノム解読は，医学・生理学・生物学の進歩に大きく貢献したことは明らかであるが，その進歩が新薬開発に直結していないという感がある。

前世紀の薬物開発は，モデル動物に人為的に作り出した症状を指標にしてスクリーニングすることが多く，臨床に持って行って初めて，ヒトには無効な「ラットのための良薬を作ってしまった」ことが判明する場合が見られた。ヒトゲノムの解明は「疾患関連遺伝子」という標的に対する薬物開発を可能とした。従って少なくとも試験管レベルではヒトに対して有効性を示す薬物を選択することが可能となっている。それにもかかわらず多くの候補化合物がドロップアウトしているのは，そのかなりの部分が非臨床試験において見いだせなかった毒性が臨床において発現したためといって

よい(1)。これは製薬産業の開発コスト高を招き，医療費の圧迫を招くばかりでなく，「有害な化合物で人体実験をした結果，使用できないことが判明した」という，倫理的にも大きな問題を生み出すことになる。綿密な安全性試験を行っても臨床での安全性予測の確度が低いと言うことは，逆の見方をすると，本来は臨床で有用であったはずの新薬を，毒性ありとして葬り去った例があったかもしれない。

1. 安全性試験の問題点

現在の安全性試験は，過去の幾多の事例の反省の上に立ち，実験動物やデータ管理に関してソフト・ハードの両面から強力な標準化を推し進め，その質の向上は著しい。しかし，試験データ自身の信頼性向上は，必ずしも臨床での安全性予測の信頼性向上を意味するものではない。薬物自身が目的とする薬理作用の延長上に明らかな臓器・細胞毒性がある場合は，その薬物の用量反応関係から，薬用量における有害作用発現程度が予測でき，対処しやすい。一方，実際の臨床上問題になる副作用に関しては，薬理作用の延長である場合は少なく，代謝物など薬物それ自身の作用ですらない場合も多い。また，仮に重大な副作用が臨床用量で数千～数万分の1の確率で発生したとすれば，そのような薬物は発売中止せざるを得ないが，これを動物実験で予測しようとする，たとえ種差がなくても，数千例の実験でも不足であるという，非現実的なことになる。そして勿論，種の壁は厚い。現実の安全性試験は「実験動物に極端な高用量を与えたときに見えてくる病態生理学的変化を，ヒトにおいて薬用量で低頻度に生じる有害作用へ外挿する」という，原理的にみても困難な戦略をとらざるを得ない。

「予測不能な毒性を予測する」という逆説を打破するために考えられる最も強力な戦略の一つが，「生体に薬物が作用する時に生じるすべての遺伝子発現変化

キーワード：オミクステクノロジー，マイクロアレイ，データベース
 同志社女子大学薬学部 (〒610-0395 京都府京田辺市興戸) E-mail: turushid@dwc.doshisha.ac.jp
 (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 (〒567-0085 大阪府茨木市彩都あさぎ7-6-8)
 原稿受領日：2010年3月23日，依頼原稿
 Title: The Toxicogenomics Project and drug safety evaluation. Author: Tetsuro Urushidani

(トランスクリプトーム)を網羅的に解析する」毒性学的手法, すなわち「トキシコゲノミクス」である。薬物により非常に低い確率で「予期せぬ」毒性が生じるとしても, その原因となる事象は生体内に必ず生じているはずであり, 観測可能なはずである。もしそのすべての事象を観測することができ, その因果関係を説明することができれば, 原理的には予測が可能である。生体のすべての生理学的変化を観測する一現実的にはこんなことは不可能であるが, テクノロジーの進歩は, これに近いことを可能にした。マイクロアレイ技術の発達により, 1回の実験で実質的に全遺伝子の発現値を定量することが可能となったのである。

2. トキシコゲノミクスプロジェクト

このような背景のもと, 厚生労働省, 国立医薬品食品衛生研究所(国衛研), および日本製薬工業協会のワーキンググループは官民共同の「トキシコゲノミクスプロジェクト」(TGPI)を企画した(2)。これは2002年からの5年のプロジェクトであり, 以後企業合併などがあって, 終了時には, 医薬基盤研究所を中核として, 国衛研と製薬15社(エーザイ, 大塚, 小野, キッセイ, 三共, 三和化学, 塩野義, 大日本住友, 第一, 武田, 田辺, 中外, アステラス, 三菱ウェルファーマ, 持田)の共同研究体制であった。

TGPI開始当初の計画は以下の通りであった。まず, 医薬品を中心とした150の化合物を用い, 対象臓器は肝臓を主とすること。これは医薬品の有害作用の多くがこの臓器に絞られること, またそれを構成する細胞種が比較的均一であり, ノウハウを蓄積するには都合がよいためであった。勿論, 腎毒性も重要な問題であり, すべての検体について肝臓のみでなく腎臓のサンプリング, 病理検査を施行し, 一部腎臓の発現解析も実施した。動物はラットを選択した。プロジェクト開始時点ではまだラットの全ゲノム解析は終了しておらず, マウスを用いるべきであるとの意見もあった。しかし, 古典的な毒性試験はすべてラットを用いて行われており, 膨大なデータの蓄積があった。トキシコゲノミクス手法による毒性予測という, 新しい課題に挑戦する場合, この知識を利用しない手はない。また, 血液生化学など, 遺伝子発現データ以外の情報もマウスより豊富に得られるのも利点であった。

本プロジェクトを計画していた時点で, 欧米の大製薬企業やバイオベンチャー企業は既にデータベースの作成を開始しており, 出遅れの感は否めなかった(3)。そこで先行するものに対抗できる特長を模索し, 表に示すようなプロトコルを採用した。Affymetrix GeneChipを用いることによる定量性・再現性に優れたデータを, 多段階の用量・時点で収集し, これに各種の充実した毒性学的データをリンクさせることができた。また, 培養細胞を用いた種差のブリッジングも

考慮に入れた。

選択された150の化合物 (<http://www.tgpi.nibio.go.jp/seika.html> 参照)は, 各治療領域を網羅して, 肝・腎毒性を示す医薬品の代表的なカテゴリーに属する, いわば「毒性学の教科書」である。これまでに多くのトランスクリプトームデータベースつくられてきたが, これだけの数の医薬品に関して用量や時点のデータがそろっている例はほとんどなく, 世界に誇れるものである。

TGPIの5年間で24000匹のラットの犠牲のもとに, 8億件以上の遺伝子発現データと, これにひもづけられた288万項目の血液生化学データ, 48000件以上の病理組織データが得られ, さらにこれを探索・解析するツール, 判別分析などの予測ツールに結果のビューワーを加え, 統合データベースシステム: TG-GATES (Genomic Assisted Toxicity Evaluation System by Toxicogenomics project)を完成することができた。

オミクス技術の概説, その毒性学への応用と問題点に関しては別稿(4)を参照されたいが, 基本的には, 遺伝子発現パターンをある特定の毒性に関連づける作業である。それはたとえば最近のデジカメやタスポの顔認識システムに似ている(事実, 繁用される support vector machine という判別方式は, TG-GATESの予測プログラムにも組み込まれている)。ある特定の毒性学的フェノタイプと, 複数の遺伝子の発現パターンを抽出して関連付ける。顔認識の場合は, 多数の顔の画像を収集して, 眼や鼻の位置をコンピューターに学習させ, 判別器を作成することになるが, 毒性の場合は「どれが眼か鼻かをコンピューターに学習させること」に対応する部分に困難さがある。

表 TGPIのプロトコル

In vivo			
動物	Sprague Dawley rat	6 week old	N=5
溶媒	0.5% methylcellulose または corn oil		
用量	Low, middle, high (1:3:10)		
	経口 (一部静脈内, 腹腔内)		
剖検	単回投与後 3, 6, 9, 24 時間		
	連続投与 3, 7, 14, 28 日後, 最終投与後 24 時間		
標本採取・保存	肝臓, 腎臓, 血漿		
GeneChip 解析	N=3 (肝臓は全化合物, 腎臓は 30 化合物)		
検査項目	病理組織: 肝臓, 腎臓 体重, 臓器重量 (肝, 腎), 摂餌量, 血液生化学, 血液学 (37 項目)		
In vitro: rat			
動物	Sprague Dawley rat	6 week old	
細胞	コラゲナーゼ消化法による肝実質細胞		
溶媒	培地または DMSO (上限 0.1%)		
濃度	Low, middle, high (1:5:25)		
処置時間	2, 8, 24 時間		
GeneChip 解析	Duplicate		
検査項目	細胞生存率 (LDH 遊離, および DNA 量)		
In vitro: human			
細胞	ヒト凍結肝細胞 (その他の項目はラットと同様)		

コンピューターは遺伝子の毒性学的意味を知らない（人間の知識が足りないので教え込めない）ので、見かけ上相関のある遺伝子を採用してしまう。これが「遺伝子型」であれば確定した値なので問題は少ないが、「遺伝子発現変動」には生物学的なばらつきが含まれるため、生物学的に無意味で再現性のない判別器が生まれてしまう。この問題は、巨大なデータベースを用いてバリデーションを繰り返せばある程度克服できる。しかしこの戦略には本質的な欠陥がある。

たとえ古典的な毒性学的フェノタイプが遺伝子発現変化と結び付いたとしても、これだけでは何のためにマイクロアレイ実験を行ったのかわからない。そのフェノタイプを測定すればそれで済むのであるから、これに意味があるとすれば、古典的な毒性学手法よりも感度が高いか、早期判定できるかのどちらかのメリットが要求される。医薬品の場合は生体に作用することが前提であり、当然多くの生理応答が期待される。この応答を、治療量で起こるべきものと、不必要な有害反応に切り分けることが必要となるが、現在の知識ではこれは不可能に近い。また後者に関しては、最終的な毒性学的フェノタイプに至る複雑な過程が完全に理解できていないと、特定の遺伝子の初期応答が、将来重大な有害作用につながるか否かを判断することができない。

生体の病態生理学的機構が完全に解明されないと意味のある安全性予測は不可能である、というのはあまりに悲観的な見方である。毒性学者は手をこまねいているわけではない。むしろトキシコゲノミクス手法によって、逆に毒性学的パスウェイを積極的に解明していくということが求められている。

3. 種差の壁

ラットの実験結果を詳細に検討すれば、「ある化合物のラットでの毒性予測」は可能となろうが、それでは不満が残る。医薬品開発ではあくまでもヒトにおける安全性評価が最終目標である。本データベースの直接の目的は、非臨床安全性試験の合理化・加速化であるが、特に外部評価においては、ヒトにおける安全性への寄与を強く要求されるのが常である。最近マイクロドーズ試験が注目されているが、これは主に体内動態を見るものであって、間接的には安全性評価に寄与するかも知れないが、薬理量より遙かに低用量で安全性を判断するのは極めて困難といえよう。ヒトの個体を対象とした直接的な毒性評価が不可能である以上、何らかの代替法を採用せねばならない。

トキシコゲノミクス手法で種差を克服するには、原理的に次のような4つの戦略が考えられる。

1) 培養細胞を用いる方法

予備検討において、HepG2のようなライン化された細胞での遺伝子発現変化は正常な肝臓とは大きく異

なることが確認され、TGPI ではヒト凍結肝細胞とラット一次培養肝細胞を用いた試験を行うこととした。すなわち、ラットの *in vivo* →ラットの *in vitro* →ヒトの *in vitro* →（ヒトの *in vivo*）というブリッジングである。

TG-GATEs には、一群の遺伝子における応答性を *in vivo* と *in vitro* を並列して一覽する機能、ヒトとラット間のオースログ変換を自動的に行い、遺伝子リストの種間比較する機能などが装備されている。しかしながら *in vitro* と *in vivo* のデータが蓄積されて行くにつれ、解決すべき問題が山積していることを強く認識せざるを得なかった。極端に言えば、ヒト・ラット間の差よりもラットの *in vivo* と *in vitro* の差の方が大きいかもしれない。これはヒト由来の細胞を用いたとしても *in vitro* から *in vivo* への外挿が困難で、培養細胞のデータは非常に限定的な使用に限られてしまうことを意味する。直接の細胞毒性であれば外挿は容易であろうが、臨床における有害作用は、血流や神経を介したものが多く、また、肝障害が生じているような状況下では、非実質細胞（培養系ではほとんど除かれている）の関与が大きいことが知られている。さらに、薬物それ自身ではなく代謝活性化を受けたものが毒性の本体である場合も多いが、培養条件下では生体のような薬物代謝は期待できない。培養法の工夫で改善はされて行くであろうが、現在のところは *in vitro* で再現可能な毒性学的パスウェイをなるべく多く見いだして、これを参照するという使い方がベストであろう。

2) ヒト型臓器を持った動物を用いる方法

これには主にマウスを利用した2つの方法がある。一つは、ヒト型遺伝子を組み込む方法であり、他方は、ヒトの臓器を移植・定着させる方法である。前者は、すべての関連遺伝子をヒト化することが困難なこと、プロモーター領域込みでヒト化しないとモデルとして成立しないことなどの欠点がある。従って特定の遺伝子の関与を研究する場合にはよいが、一般的なスクリーニングに利用するには程遠い。後者として、免疫不全マウスの肝臓をヒト肝細胞で置き換えたモデルが作られているが(5)、高価であること、免疫不全状態という特殊な環境下での毒性発現が臨床に外挿できるか、など問題が多く、これも一般化は困難である。安全性試験は標準化される必要があり、当分は研究的な使用に限られるであろう。

3) 血液サンプルを用いたトランスクリプトーム

ラット肝臓における特定の遺伝子群の発現パターン変化からある医薬候補品の毒性が良好に予測でき、ヒトでの再現が期待されたとしても、臨床治験で患者の肝生検を行うことは非現実的である。非臨床データを臨床につなげるには、非侵襲的サンプルが望まれる。これには、非臨床での遺伝子発現データから予測される血中あるいは尿中の代替マーカーを提案するか、あ

るいは生検しなくても得られるサンプルの遺伝子発現を測定するしかない。前者の場合、薬物の毒性発現に相関して発現変化する遺伝子があったとしても、その遺伝子産物が細胞外に出てこない限り検出できない。遺伝子産物が分泌されるものであれば、血中に反映されるのは、発現に対する効果と分泌に対する効果を合わせた結果でしかない。非分泌型のものであれば、血中で検出されるということは細胞の破壊を意味し、古典的な逸脱酵素の検出と変わらないことになる。ただし、逸脱酵素より遙かに感度と特異性が高ければ、臓器特異的 mRNA の漏出を測定する意味はある(6)。

後者の候補としては、血液中の白血球がほとんど唯一のものである。薬物投与時に全身で起こる有害作用が、直接あるいは間接的に白血球の遺伝子発現変化として反映されることを期待している。実際、ラットにおいて、アセトアミノフェン投与により薬物特異的な遺伝子変化が検出できたとの報告があり(7)、また、臨床研究も進められている。

4) 毒性学的パスウェイを介したブリッジング

これまでの経験では、動物細胞において薬物の毒性に特徴的な遺伝子群の変化が認められたとしても、これらを単純にオルソログ変換したものは、ヒト細胞における発現変化を示す遺伝子群と低い一致率しか示さない。しかし、個々の遺伝子同士の対応は低いにしても、毒性物質に対する「機能遺伝子群」としての病理的応答は共通性が見いだせる場合がある。そこで、動物実験で得られた結果を、毒性学的パスウェイ上にマッピングして「ヒトにおいてもこのようなメカニズムで毒性が発現する危険がある」ことを提示することは、合理的な手法と考えられる。これは前述した「毒性学的パスウェイ」解明の重要性を示すものであり、現在最も期待すべき戦略といえよう。

4. トキシコゲノミクス・インフォマティクスプロジェクト (TGP2)

トキシコゲノミクスが各国で走り出した頃は、データベースさえ構築すれば、あとはコンピューターを駆使して何とかなるだろう、という考えがあったように思う。特に2005年、FDAが新薬の申請時にゲノミクスデータのボランティアサブミッションを開始したことから、この分野に注目が集まった。しかしながら、データが集積するにつれ、それは余りに楽観的であることが明らかになってきた。最近のFDAをはじめとする世界的な動向では、ゲノミクスデータを安全性試験に応用するには、バイオマーカーという形で提示することが求められる方向にある(8)。バイオマーカーはFDAの定義によれば「生物学的プロセスや病理学的プロセス、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」であり、

トキシコゲノミクスであれば、遺伝子(群)の発現パターンと判定アルゴリズムのセットであり、特定の毒性学的フェノタイプの診断・予測、あるいは毒性メカニズムの評価ができるものと定義される。そして、安全性試験に資するものであるためには、再現性を保証するバリデーションが必須である。このようなバイオマーカーの取得には、前述のように、多くの課題があるため、TGP1の後継プロジェクトとして、トキシコゲノミクス・インフォマティクスプロジェクト(TGP2)が組織された。TGP1と同様に、医薬基盤研を中核として、国衛研、製薬13社(アステラス、エーザイ、大塚、小野、キッセイ、三和化学、塩野義、住友化学、第一三共、大日本住友、武田、田辺三菱、中外)が参画する官民共同プロジェクトである。TGP2の目的は、TG-GATEsを活用し、多くの安全性バイオマーカーを創出すること、前述の血液のトランスクリプトミクスに加えメタボロミクスなど他のテクノロジーをも含めた多彩な戦略により種差のブリッジングを果たすこと、そして、これらの成果を創薬につなげるため、トキシコゲノミクスをレギュラトリーサイエンスに利用する基盤を築くこと、の3点に集約される。現在はまだTGP2が進行中であるが、成果の一部については、最近の総説(9)を参照されたい。

おわりに

トキシコゲノミクスをはじめとするオミクステクノロジーは、すべての現象を把握しなければならない毒性学者にとって、必須の技術である。タンパク質や代謝物の変化も当然重要であり、プロテオミクスやメタボロミクスを加えて統合した、トキシコパノミクスという概念すら導入されるに至っている。ただしこれらを創薬に結びつけるには再現性の保証された安全性バイオマーカーという形に仕上げる必要があり、これは現在のプロジェクトの重要な使命である。また、ヒトにおける安全性研究も、更なる飛躍が望まれる。その一つの試みとして、iPS細胞を各臓器の細胞に分化させ、トランスクリプトミクスと結びつけることによって、ヒトの遺伝子型別の安全性試験系の構築を目指した研究が、医薬基盤研を中心に始められている。

文 献

- 1) Kola I, et al. *Nature Rev Drug Discov*. 2004;3:711-715.
- 2) Urushidani T. *Hepatotoxicity*. Wiley; 2007. p. 507-529.
- 3) Boverhof DR, et al. *Toxicol Sci*. 2006;89:352-360.
- 4) 漆谷徹郎. *日薬理誌*. 2009;133:112-114.
- 5) Ohashi K, et al. *Nature Med*. 2000;6:327-331.
- 6) Kudo Y, et al. *Vet Med Sci*. 2008;70:993-996.
- 7) Bushel PR, et al. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104:18211-18216.
- 8) <http://www.fda.gov/oc/initiatives/criticalpath/>
- 9) Uehara T, et al. *Mol Nutr Food Res*. 2009;54:218-227.

●特集／マイクロドーズ臨床試験

2. マイクロドーズ臨床試験に必要な非臨床試験データ

国立医薬品食品衛生研究所

大野 泰雄

Non-clinical Data Needed for the Conduct of Microdose Clinical Study

Yasuo OHNO

National Institute of Health Sciences
1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan

Microdose clinical study was introduced to Japan in June 2008 for the purpose of promoting new drug development. However, the upper dose of the study is below 100 μg and the application of findings to drug development is limited. On the other hand, the ICH-M3 guidance "Non-clinical safety studies for the conduct of human clinical trials for pharmaceuticals" was revised in June 2009, which introduces other approaches to exploratory clinical studies. The guidance describes five approaches (two microdose approaches, one sub-therapeutic single dose approach, and two up to therapeutic dose range repeated-dose approaches). Because the highest doses of these studies are limited to within the anticipated non-toxic dose ranges, requirement of toxicity tests is decreased compared to the classic phase 1 study. The rationales for the reduction of toxicity tests are explained.

Key words : microdose clinical study, safety test, ICH, exploratory clinical study

1. 序

早期探索的臨床試験は医薬品開発の初期段階で開発候補物質の絞り込みを行うための臨床試験であり、その目的と投与量に基づき、概略1) 極めて低用量を用いて薬物動態を検討するマイクロドーズ臨床試験 (MD試験) (I型) と、2) MD試験よりは高いが、薬効用量よりは低い用量で薬物動態と薬効につながる作用を評価する準薬効用量早期探索的臨床試験 (II型)、および3) 薬効は現れるが毒性は現れないと思われる用量を用い、薬物動態や薬物相互作用、および薬効を評価する薬効用量早期探索的臨床試験 (III型) に分けられる。これらを単回あるいは反復投与の回数に応じて分けることもある。一方、ICH (International Conference on Harmonisation of the Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use) では段

階的に臨床投与量を増加させることから、Table 1で示したように早期探索的臨床試験を5つのアプローチに分類した。いずれにせよ、従来の第I相試験は推定薬効用量を超え、被験者が耐えられる最高用量 (最大耐量: MTD) まで投与することが予定されているが、早期探索的臨床試験では、試験の目的を狭め、投与量を毒性の現れないと推定される用量や投与回数に限定することにより、試験実施に必要な非臨床試験の範囲を狭め、結果として、非臨床試験および臨床試験も含め、One Batchの合成でまかなえる程度までに、少量の被験物質での評価を可能とするとともに、臨床試験で要求されるGMP (Good Manufacturing Practice) 上の負荷を軽くし、臨床試験に入りやすくなるように企図したものである。

本稿ではMD試験についての厚生労働省の通知(2008)¹⁾と2009年6月にICHでStep 4の合意²⁾が達

Table 1 早期探索的臨床試験についてのICH M3 (R2) (Step 4)

臨床試験の型	内容と用量範囲	実施に必要な非臨床試験
マイクロドーズ臨床試験 (アプローチ 1)	<ol style="list-style-type: none"> 1) 総投与量を 100 μg 以下とし、被験者 1 人あたり 5 回まで分割して投与するもの。 2) 総投与量は薬効量の 1/100 以下、無毒性量の 1/100 以下。 	<ol style="list-style-type: none"> 1) 1 つの動物種 (通常げっ歯類) における予定臨床投与経路または静脈内投与を用いた拡張型単回投与毒性試験 (TK 評価を含む)。最高用量は 1000 倍の暴露までで良い。 2) インビトロ標的/受容体結合プロファイルの解析。 3) 薬力学的に外挿性のあるモデルにおける薬効薬理作用についての適切な評価に基づいて、臨床投与量を設定。 4) 遺伝毒性試験は不要。構造活性相関情報があれば提出する。 5) 高放射活性物質 (例えば、PET イメージング剤) の場合には、適切な薬物動態学的情報と放射線暴露量の推定が必要。
マイクロドーズ臨床試験 (アプローチ 2)	<ol style="list-style-type: none"> 1) 1 回あたりの最高用量が 100 μg。投与は休業期間 (実際もしくは予想される半減期の 6 倍以上) を設けて、最大 5 回まで (被験者あたり総投与量 500 μg 以下)。 2) 各投与量は薬効量の 1/100 以下、無毒性量の 1/100 以下。 	<ol style="list-style-type: none"> 1) 1 つの動物種 (通常、げっ歯類) における臨床投与経路を用いた 7 日間反復投与毒性試験 (TK 評価を含む)。最高用量は 1000 倍の暴露までで良い。他は、アプローチ 1 の 2)-5) と同じ。
準薬効用量又は推定薬効域での単回投与試験 (アプローチ 3)	<ol style="list-style-type: none"> 1) 初回用量は、最も感受性の高い動物種における毒性所見のタイプや薬効用量を考慮して選択する。ヒトでの初回用量に関して考慮すべきその他の事項については、各極のガイダンスを参考にすべき。 2) 動物での毒性がヒトにおいてモニタリングが可能であり、可逆的なものと予想される場合には、最高用量は、より感受性の高い種における NOAEL での暴露の 1/2 までが許容される。 	<ol style="list-style-type: none"> 1) げっ歯類及び非げっ歯類を用いた拡張型単回投与毒性試験 (TK 評価を含む)。投与経路は予定臨床経路。血液学、血液生化学、剖検及び組織病理学データが含まれること。最高用量は、MTD、MFD、又は限界量。 2) 遺伝毒性試験 (Ames 試験) 3) 薬理作用については、アプローチ 1 の 2)、3)、および安全性薬理試験コアバッテリー。
反復投与臨床試験 (アプローチ 4) 薬効域であるが、臨床最大耐量の評価を目的としない 14 日までの投与	<ol style="list-style-type: none"> 1) 両動物種で毒性がみられた場合、初回用量は適切な各極のガイダンスに従う。 2) 毒性がいずれの動物種でもみられなかった場合や毒性が 1 種の動物種でしかみられなかった場合、推定暴露量が、より低い暴露を示した動物種の NOAEL における AUC の約 1/50 になるように、初回用量を設定する。ヒトの初回用量に関して、例えば、薬力学活性の推定などの、考慮すべきその他の事項については、各極のガイダンスを参考にする。 3) 両動物種で毒性がみられない場合、臨床最高用量は、動物試験での最高用量におけるいずれかの種での低い方の暴露 (AUC) の 1/10 を超えない用量。 4) 1 種においてのみ毒性が示されている場合、最高臨床用量は、毒性を示した動物種から得られた NOAEL での AUC 又は毒性を示さなかった動物種における最高用量での AUC の 1/2 のいずれか低い方を超えない。 5) 両動物種で毒性がみられる場合、最高臨床用量は、標準的なリスク評価方法に基づく。この特殊な場合には臨床最大耐量が探索できる。 	<ol style="list-style-type: none"> 1) げっ歯類と非げっ歯類における標準的な 2 週間反復投与毒性試験 (TK 評価を含む)。用量設定は、最高用量にて予想される臨床 AUC の倍数の暴露を基にする。 2) 遺伝毒性試験 (Ames 試験及びインビトロ又はインビボの染色体異常誘発能試験)。 3) 薬理作用については、アプローチ 1 の 2)、3)、および安全性薬理試験コアバッテリー。
反復投与臨床試験 (アプローチ 5) 薬効域であるが、臨床最大耐量の評価を目的とせず、非げっ歯類の投与期間を超えない 14 日までの投与。	<ol style="list-style-type: none"> 1) 初回用量は、体表面積換算で、より感受性の高い動物種における無毒性量の 1/50 以下。ヒトの初回用量に関して、例えば、薬力学活性の推定などの、考慮すべきその他の事項については、各極のガイダンスを参考にする。 2) ヒトにおける最大暴露は、非げっ歯類の無毒性量での AUC 又はげっ歯類での無毒性量での AUC の 1/2 のいずれか低い方を超えない。 	<ol style="list-style-type: none"> 1) げっ歯類を用いた標準的な 2 週間反復投与毒性試験 (げっ歯類が適切な種であることの理由が必要)。最高用量は MTD、MFD、又は限界量とする。 2) 非げっ歯類 (n=3) における確認試験で、げっ歯類での NOAEL における暴露を得られると推定される用量を最短 3 日間かつ少なくとも予定臨床試験期間を投与する。もしくは、非げっ歯類における漸増投与試験で、げっ歯類での無毒性量における暴露を得られると推定される用量を最短 3 日間かつ少なくとも予定臨床試験期間を投与する。 3) 遺伝毒性試験 (Ames 試験及びインビトロ又はインビボの染色体異常誘発能試験)。インビボ試験を実施する場合には、げっ歯類の毒性試験の一部として組み込むことが可能な場合もある。 4) 薬理作用については、アプローチ 1 の 2)、3)、および安全性薬理試験コアバッテリー。

成された「Guidance on Nonclinical Safety Studies for the Conduct of Human Clinical Trials and marketing authorization for Pharmaceuticals M3 (R2) : ICH M3 (R2) と略す」に基づき MD 試験に必要な非臨床試験について述べる。これ以外の早期探索的臨床試験については ICH M3 (R2) のガイダンス²⁾を参照されたい。

2. マイクロドーズ臨床試験 (MD 試験) について

1) わが国で通知された MD 試験について

平成 20 年 6 月 3 日に厚生労働省から通知された「マイクロドーズ臨床試験の実施に関するガイダンス (MD 試験指針)」は EMEA (European Medicines Agency)³⁾ および FDA (米国の Food and Drug Administration)⁴⁾ の関連する指針をベースに策定されたものである。指針では MD 試験を「ヒトにおいて薬理作用を発現すると推定される投与量 (以下「薬効発現量」という。) の 1/100 を超えない用量又は 100 μg のいずれか少ない用量の被験物質を、健康な被験者に単回投与することにより行われる臨床試験をいう」と定義し、その目的を「被験物質のヒトにおける薬物動態に関する情報を医薬品の臨床開発の初期段階に得ることである。具体的には、被験物質の吸収や血中動態、排泄特性、ヒトにおける代謝物プロファイル等を明らかにすること、分子イメージング技術を用いて被験物質の体内における局在に関する情報を得ること等である」とした。MD 試験を医薬品開発の初期に実施し、薬物動態学的に適正と思われるものを選択しておくことにより、その後の臨床開発において、体内動態が原因で開発が失敗する可能性を削減できるものと期待されている。この試験では許容される投与量が極めて低いことから Accelerator Mass Spectrometry (AMS : 加速器質量分析法) や高感度 LC/MS/MS (Liquid Chromatograph/Mass Spectrometry/Mass Spectrometry) などの高感度分析法を使用する必要がある。また、Positron Emission Tomography (PET : 陽電子放射断層撮影法) 等のイメージング技術と組み合わせることにより、ヒト体内分布を明らかにし、ヒト組織を用いた *in vitro* 試験結果と組み合わせることにより、標的部位での薬力学的作用や意図せぬ部位での作用の推定にも利用できる。

MD 試験における被験者の安全性確保のために必要な非臨床試験は、一般に、下に述べる (1) 拡張型単回投与毒性試験 (1 種動物)、(2) 局所毒性試験、および (3) 薬理作用に関する試験、および放射性同位元素を用いる場合は暴露レベルの安全性評価に限定される。

これは、MD 試験が毒性も薬効も認められないと思われる極めて低用量で行われる試験であることと矛盾しているように見えるが、被験者に思いがけない毒性が現れることを未然に防止するために行うものである。

一方、ICH M3 (R2) では、PET への応用を考慮し、反復投与できる MD 試験を導入した。それには、総投与量が 100 μg 以下のアプローチ 1 と 1 回あたりの用量が 100 μg 以下で 5 回までの反復投与で総投与量が 500 μg 以下のアプローチ 2 に分類され、それぞれについて、臨床投与量の制約と必要な非臨床試験の範囲を定めた。

2) ICH M3 (R2) に記載された MD 試験 アプローチ 1

これは、前項と同様に、毒性も薬効も現れないと推定される用量で、被験物質の体内動態を検討するための試験である。反復投与が認められているが、総投与量は 100 μg 以下、かつ、拡張型単回投与毒性試験での無毒性量 (NOAEL) の 1/100 以下かつ薬効発現量の 1/100 以下に制限されている。実施に必要な非臨床試験としては、1 動物種 (通常、げっ歯類) での予定臨床経路あるいは静脈内投与での拡張型単回投与毒性試験でトキシコキネティクス (TK : 通常、血中濃度推移で評価される被験物質による全身暴露) 評価を含む試験が必要である。最高投与量は臨床投与量の 1,000 倍 (静脈内投与では体重換算、経口投与では体表面積換算) まででよい。また、薬理学的な特性を明らかにするために、*in vitro* 標的/受容体結合プロファイルの解析が必要である。さらに、薬力学的に外挿性のあるモデルにおける薬効薬理作用 (作用機序や効力) についての適切な評価に基づいて、臨床投与量を設定すべきとされている。なお、遺伝毒性試験は実施しなくてもよいが、何らかの試験あるいは構造活性相関の情報があれば治験申請時に提出すること。高放射活性物質 (たとえば、PET イメージング剤) の場合には、適切な薬物動態学的情報と放射線暴露量の推定が必要とされている。

3) ICH M3 (R2) に記載された MD 試験 アプローチ 2

この場合も、毒性も薬効も現れないと推定される用量での臨床試験で、1 回あたりの臨床投与量は 100 μg 以下で、無毒性量の 1/100 以下および薬効量の 1/100 以下とされ、総投与量は 500 μg 以下に制約されている。なお、投与は休薬期間 (実際もしくは予想される半減期の 6 倍以上) を設けて、最大 5 回までとされている。一般毒性試験としては、1 種 (通常、げっ歯類) における 7 日間の反復投与毒性試験 (TK 評価を含む) を予定臨床経路あるいは静脈内投与で実施し、血液学ならびに血液生化学検査と剖検および組織病理学検査を実施する必要がある。最高投与量の設定、遺伝毒性

試験の実施，ならびに高放射活性物質への対応はアプローチ 1 の場合と同様である。

3. 拡張型単回投与毒性試験

これは従来の単回投与毒性試験に観察時期と観察項目を追加したものであり，EMEA³⁾，FDA⁴⁾，および日本の MD 試験指針¹⁾に記載されており，それらはいずれも同じ内容である。すなわち，拡張型単回投与毒性試験においては，投与後の観察期間は 2 週間とし，毒性徴候の種類，程度，発現時期，推移および可逆性について，用量および時間との関連で観察し記録する。また，適切な時期（通常，投与翌日および 2 週間の観察期間終了時）に血液検査，血液生化学検査および病理組織学的検査を行う。なお，病理組織学的検査については，高用量群に組織学的変化がなければ，対照群および高用量群のみ行うことで差し支えない。なお，日本の MD 試験指針では，意味もなく多数の臓器について，病理組織学的検査を行うことは求められておらず，被験物質の特性や検査結果に基づいて，適切な臓器・組織を選択し，実施することでよいとされている⁵⁾。なお，投与翌日に観察するのは急性的影響が 2 週間後には回復し，検出できなくなる可能性を考慮したためである。投与 2 週間後の観察は，遅延毒性の有無や回復性を評価するためである。

動物は 1 種類の哺乳類の雌雄を用い，対照群を設けたうえで実施する。当該試験の実施により，当該被験物質の実験動物に対する最大無毒性量 (NOAEL) および最小毒性発現量を確立するか，またはマイクロドーズ臨床試験における当該被験物質の投与量に関する適切な安全域 (margin of safety；通常，日本の MD 試験指針では体表面積換算で 100 倍以上) を確立する。

投与経路については，MD 試験指針では当該被験物質の MD 試験における予定投与経路とされているが，ICH M3 (R2) 指針では静脈内投与も認めている。なお，当該被験物質の MD 試験における予定用量に対し，体表面積換算でその 1,000 倍量を用いても毒性が認められない場合，当該 1,000 倍量を拡張型単回投与毒性試験の上限用量としても差し支えないとされている。

4. ヒトでの薬効用量推定方法

ヒト薬効用量推定方法については，MD 試験指針に以下の 2 つの方法が記載されている。

1) 経験的な方法

動物における薬効発現量をもとに体表面積換算する

ことにより，ヒトでの薬効発現量を推定するもので，FDA の初回投与量設定法のガイダンス⁶⁾や探索的 IND 研究に関するガイダンス⁴⁾においても採用されている。また，EMEA の MD 試験に関するポジションペーパー³⁾でも採用されている。しかし，MD 試験指針では，「この予測方法はあくまでも経験則であり，精度の高い予測法とは言い難い。動物を用いた in vivo データ及びヒト組織や細胞を用いた in vitro データ等を総合的に評価して有効血中濃度が予測可能であれば，より精度の高い方法」として，以下の方法が推奨されている。

2) 薬物動態学的情報を用いる方法

この方法は，最大血中濃度 (C_{max}) または血中濃度時間曲線下面積 (AUC) を基準に推定するものであり，どちらを採用するかについては，薬効発現の作用機序等により異なる。 C_{max} を基準に推測する方法では，「まず，適切な動物での薬効発現量における最大血中濃度 (C_{max}) を求める。血漿タンパク結合について，動物とヒトとの種差を補正し，ヒトでの薬効発現量における C_{max} (ヒト推定 C_{max}) を推定する。この方法は，動物もヒトも血漿タンパクと結合していない遊離型で薬効を発現すると仮定している。なお，遊離型，結合型それぞれの作用発現への寄与が不明の場合には，タンパク結合を補正した場合としない場合の両者を計算し，より低い方を採用する。更に，動物における分布容積及び動物及びヒトにおける血漿タンパク結合情報をもとにヒトにおける分布容積 (V_d) を推定する。最後に，ヒト推定 C_{max} と V_d の積から，ヒトでの薬効発現量を計算する (MD 試験指針)」。AUC を薬効の指標として用いる場合も，同様に行う。

5. 早期探索的臨床試験に必要な非臨床試験について

1) MD 試験に必要な非臨床試験の範囲

Table 1 に示したように，MD 試験に必要な一般毒性試験は拡張型単回投与試験のみでよいとされている。これは，以下に述べる理由による。

著者の調査によれば，低分子量化学物質で致死量が MD 試験の用量の約 100 倍である 0.2 mg/kg 以下の物質は少ない⁷⁾。とくに，2 μ g/kg 以下の物は TCDD (2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin) および botulinum toxin のみであった。2-20 μ g/kg は abrin toxin と saxitoxin, tetrodotoxin のみであった。20-200 μ g/kg は amanitin, dinophysistoxin, okadaic acid, methylphenidate, digoxin, および digitoxin のみであった。これらによる毒性の多くは，詳細な症状観察を含む，通常

Table 2 経口投与での致死量の種差 (mg/kg)

	ヒト LDLo	マウス LD ₅₀	ラット LD ₅₀	イヌ LD ₅₀	動物/ヒト
Botulinum toxin A*	2.14	81.4	96		44.86
Abrin A toxin	0.007	6638			948286
Digitoxin	0.071		56	0.5	789
Cantharidin	0.28	1		60	214
Colchicine	0.4	5.886	2.5		15
Methadone HCl	0.5	70	95		190
4-Aminopyridine	0.59	658	1050	3700	6271
Alphaprodine HCl	1.4	68	90		64
Arcenic (III) oxide	1.429		40		28
Fluoroacetamide	2		5.75		2.9
Sodium metaarsenite	2		41		21
Thallium (I) sulfate	2.166	35	16	16	16
Emetine	2.941	12	12		4.1
Warfarin	6.667	323	1.6		48
Barium carbonate	11		418		38
Aconitin	28	1			0.04
Chlordane	29		283		9.8

* : Unit/kg

の単回投与毒性試験あるいは安全性薬理試験で検出できる。しかし、微生物等に由来するトキシン類等のなかには、毒性が2 µg/kg以下の用量で現れる物も多く、また、一般の症状観察では検出しがたい肝・腎・内分泌器官等にも毒性が現れることがある。このような状況に対応するためには、血液学ならびに血液生化学的検査や尿中酵素測定、さらに病理学的検査も必要である。

なお、単回投与の早期探索的臨床試験は拡張型単回投与毒性試験に基づいて行うことが許容されるが、この場合は、GLP (Good Laboratory Practice) に基づく信頼性の高いデータが必要である。なお、致死性を評価目標とすべきではない。また、バイオテクノロジーで作られた薬品については、未知のところが多いことから、MD試験指針では、「生物由来製品又は体内で如何なる受容体が関与するか十分な知見が得られていないものなど従来の医薬品とは全く異なる作用機序による薬理作用を期待した化合物を投与する場合については、個別にその安全性等についての考察が必要であり、本ガイダンスをそのまま適用することはできない」とされた。ICH M3 (R2) 指針でも「バイオテクノロジー応用医薬品については、本ガイダンスは、臨床開発に

関連する非臨床試験の実施時期に関してのみの指針となる」とされた。

2) ヒト暴露レベルの1,000倍までの用量が必要な理由

今までに蓄積された化学物質等の毒性データによれば、MD試験で使用される100 µgという用量で重篤な毒性を現す低分子化合物はほとんどないこと⁷⁾、また、あったとしてもそれらの毒性は単回投与毒性試験で検出可能なものである。一方、経口投与の単回投与試験での致死量の種差は100倍を超えることがあるが (Table 2)、多くの場合、薬理活性の1/100という用量の設定で重篤な副作用は回避できると思われる。しかし、ヒトと動物との間に1,000倍を超える種差があった fialuridine による死亡事故⁸⁾やヒトとカニクイザルとの間にリンパ球の反応性に大きな差があった CD28 に対するアゴニスト抗体 TGN1412 により重篤な副作用を発現した事故⁹⁾などもあり、必ずしも非臨床試験を臨床用量の1,000倍を超える高用量まで実施したからといって予測できない場合もある。機械的に毒性試験を実施するだけでなく、被験物質の化学構造や薬理作用の特徴を十分把握し、必要に応じて静脈内投与試験の実施やヒト由来試料を用いた検討、薬理作用の延

長としての副作用も含め、毒性学的学識を基にした考察で判断する必要がある。

しかし、ヒトでの毒性を事前に予測し、対応準備をしておくためには、なるべく、現れる毒性徴候を把握しておくことが望ましい。一方、単回投与毒性試験の結果は動物種のみならず、動物の系統、実験施設等により大きくばらつくことが知られている。これらのことから、ヒトに初めて投与する前の拡張型単回投与毒性試験の最高用量はヒト試験での暴露量の1,000倍まで投与することが求められたものである。この際、経口投与での暴露量はおもに体表面積換算で換算されるが、静脈内投与の場合は体重換算で計算される。

なお、静脈内投与試験の結果は、経口投与の結果と比べ、ヒトへの予測性はより高いと考えられることから、ICH M3 (R2) 指針では静脈内投与試験で行うことも考慮された。

Fialuridine (FIAU) の経験

NIHが慢性B型肝炎治療薬として開発したもので、実験動物での試験では肝、脾、骨格筋、神経への毒性は認められなかったことから、1993年3月から、0.10-0.25 mg/kg/day 24週間投与、1-2週ごとに観察とのプロトコルで6カ月臨床試験を15名の患者で開始したところ、13週でlactic acidosis (LA)と肝不全が突然発現し、7名は進行性LA、黄疸悪化、肝機能悪化を呈し、3名も中程度の肝毒性を起こした。脾臓炎、神経障害、筋障害も発生し、投与停止した。同年6-8月の間に、肝臓、脾臓障害で5名が死亡し、2名は肝移植で救命した⁹⁾。

組織検査では肝の脂肪蓄積が認められたが、肝細胞の壊死や構造変化はわずかであった。電子顕微鏡検査で肝細胞のミトコンドリア異常と脂肪蓄積が認められた¹⁰⁾。一方、Richardsonら(1994, 1999)^{11,12)}によれば、企業データより、経口投与での最大耐量(MTD)はラット70日間投与で510 mg/kg/日、イヌ90日間投与で3 mg/kg/日、サル30日間投与で25 mg/kg/日と推定している。また、ラットに500 mg/kg/dayを90日間、ウッドチャックに7.5 mg/kg/dayを90日間投与しても弱い変化のみしか認められなかった。すなわち、反復投与での致死量にヒトとラットとの比較では2,000倍以上、イヌとでは10倍以上、サルとでは100倍、ウッドチャックとでは30倍以上の差があった。

その後の研究により、FIAUはhENT1発現細胞でミトコンドリア内に輸送されるが¹³⁾、マウスENT1はFIAUを輸送するが、ミトコンドリアに分布せず、マウス肝臓から調製したミトコンドリアはFIAUを輸送しないことが明らかになった¹⁴⁾。

そこで、医薬品や農薬等の承認申請の際には以前から一般薬理試験(安全性予測の面を強調し、安全性薬理試験とも呼ぶ)の実施が求められていた。MD試験の実施前に、すべての安全性薬理試験を終了させておくことは必ずしも必要ではないが、適切な*in vivo/in vitro*試験により、治療標的に関連した薬理作用や思いがけない薬理作用などを調べ、被験物質の主たる薬理作用について明らかにしておく必要がある。また、薬効発現量を明らかにしておくことが必要である。これはMD試験における最高用量の設定や薬理作用の延長として現れる副作用を予測するために利用される。また、この段階で薬理作用発現の種差を調べておくことは、適切な毒性試験動物種の選択にも資する。

ICH M3 指針でも、呼吸、循環、中枢神経系への作用が生命にとってとくに重要であることから、ヒトに初めて投与する前に、それらに対する被験物質の作用を安全性薬理試験としてGLP下で実施することを求めてきた。一方、TGN1412の臨床試験で予期せぬ重篤な障害が発生したことを踏まえ、EMA(2007)¹⁵⁾はヒト初回投与量設定のためにMABEL(Minimal Anticipated Biological Effect Level)法を推奨した。これは、すべての利用可能な*in vitro*および*in vivo*のPK/PDデータをモデリングアプローチでまとめ、必要に応じて、安全係数を適用して初回投与量を決定するものである。これに必要なPK/PDデータとしては、ヒトおよび適切な動物種由来の標的細胞を用いた1) *in vitro*の標的部位への結合および受容体占有データ、2) *in vitro*濃度-反応曲線データ、また、適切な動物種での3) *in vivo*用量/暴露-反応関係データ、および4) 薬理作用発現用量での暴露データが挙げられている。TGN1412のヒトT細胞刺激作用の最小有効濃度(0.1 μg/mL)を基に計算すると、体重70 kgの男性での投与量は約0.003 mg/kgとなる。これに安全係数を考慮し、さらに低い臨床用量で行うべきであったとされている¹⁶⁾。ICH M3 検討班では、薬理作用を*in vivo*およびヒト標本を含む*in vitro*試験系で検討し、PK/PD関係を考慮してヒトでの薬理作用発現用量を推定し、それに安全係数を加味して初回投与量を定めるべきとの考えから、ICH M3 (R2) 指針ではMD試験においても、*in vitro*での標的部位や各種受容体への結合濃度をあらかじめ調べることによる薬理学的なプロファイリングを行っておくこと、また、薬力学的に適切なモデルを用いて薬理作用の特徴を明らかにすることを推奨した。

3) 薬理試験の必要な理由

一般毒性試験では必ずしも検知されない毒性があ

Table 3 遺伝毒性不純物の臨床開発段階での許容量 ($\mu\text{g}/\text{day}$)

	暴露期間						
	単回	2日-14日	14日-1月	1月-3月	3月-6月	6月-12月	12月以上
Müller et al (2006)	120	120	120	40	20	10	1.5
FDA 案 (2008)	120	120	60	20	10	5	1.5
EMA Q&A (2008)	120	60	60	20	10	5	1.5

TGN1412の経験¹⁶⁾

TGM1412は白血病と自己免疫疾患治療を目的とするCD28 アゴニスト作用を有するモノクローナル抗体であり、カニクイザルで50 mg/kgを4週間投与しても忍容性が認められたことから、2006年3月13日のFIM臨床試験で健康志願者(6名)に0.1 mg/kg infusion(投与量はMD試験の約50倍)後、全員に極めて重篤な有害作用が発現した。Cytokine release syndrome or Cytokine storm(発熱、低血圧、多臓器不全)であり、集中治療を受けた。

4) 遺伝毒性試験について

遺伝毒性試験はMD試験に要求されていない。これは、発がん物質でも Threshold of Toxicological Concern (TTC: 1.5 $\mu\text{g}/\text{human}/\text{day}$, 約30 ng/kg/day)以下の暴露については、一般に発がんの懸念は無視できるとされていることによる^{17,18)}。ただし、aflatoxin-like compounds, N-nitroso-, azoxy-, steroids, TCDD-like compoundsについては、0.15 $\mu\text{g}/\text{day}/\text{human}$ でも生涯摂取すると発がんリスクが $1/10^6$ より高いものが多い¹⁹⁾。しかし、医薬品においては、ベネフィットも勘案し、生涯リスクを $1/10^5$ で判断するのが適切である²⁰⁻²²⁾。また、TTC値は特定の条件下(短期間暴露、生命に危険な状況、既知の不純物、食物等からの暴露)では1.5 $\mu\text{g}/\text{day}$ 以上でも良いと考えられる²¹⁾。そこで、Müllerら(2006)²⁰⁾はリスクが暴露量に比例するとの考えを前提としたLinear extrapolation modelにより生涯発がんリスクを $1/10^5$ に保ったまま、短期間に外挿した(Table 3)。また、FDA²²⁾やEMA²¹⁾は上記に不確実係数を2加味した基準を作成したが、ICH M3の検討グループではFDAの案を採用し、5回までの反復投与であれば、100 μg の投与が許容されると判断したものである。

6) 局所刺激性試験について

局所刺激性については、MD試験の実施前に評価しておく必要がある。ただし、動物福祉を考慮し、無駄な動物実験を排除するため、拡張型単回投与毒性試験における投与局所の観察により局所刺激性の評価が可

能であれば、改めて試験を実施する必要はない。ICH M3 (R2) 指針でも、MD試験の前に実施することを必ずしも求めている。ただし、新規の媒体を使用する場合には、媒体の局所毒性を評価すべきとされている。

6. その他

放射性標識体を用いる場合は、放射線被曝のレベルとその安全性に関する評価を事前に終了しておく必要がある。Accelerator Mass Spectrometry (AMS: 加速器質量分析法)を用いたMD試験では、放射線暴露は放射線障害防止法で定められた基準より低くとも、有用なデータを得ることが可能である。また、国際放射線防護委員会(ICRP: International Commission on Radiological Protection)による勧告(ICRP 1990)²³⁾で示された「一般公衆の年間被ばく線量限度」以下で実施可能である。ただし、不必要な摩擦を避け、社会に受け入れてもらうためには、独立した第三者委員会において適切な暴露/安全性評価を行うことにより、試験を実際に実施する医師や被験者の安全性についての懸念を除くことが望ましい。

バイオ医薬品等への適用に関して、FDA(2006)の指針⁴⁾によれば、30 nmolまでならば、生物製剤についてもMD試験を適用可能である。しかし、この根拠は不明確であり、これ以下の用量でも強い毒性を現す毒素等は多くある⁷⁾。そこで、MD試験指針では「生物由来製品又は体内で如何なる受容体が関与するか十分な知見が得られていないものなど従来の医薬品とは全く異なる作用機序による薬理作用を期待した化合物を投与する場合については、個別にその安全性等についての考察が必要であり、本ガイダンスをそのまま適用することはできない。」としたものである。しかし、これは、必ずしもこれらの物質についてMD試験実施を否定しているものではなく、その安全性について、投与方法や候補物質の特性を十分理解したうえで、より慎重な考察を行ったうえで実施することを求めたもの。しかし、現在の医薬品開発の多くが、バイオ医薬品であることを考慮すると、ICHでの審議を踏まえ、

それらの開発の標準の手順を示す必要がある。なお、ペプチド・タンパク質のMD試験の意義については、矢野ら²⁴⁾の総説を参照されたい。

7. 終わりに

ガイドラインに従って作成された非臨床試験の結果を適切に利用すれば、志願者や患者に起こりうる多くの毒性を予測しうる。しかし、すべての物質について、ヒトでの毒性を正確に予測することはできない。また、動物を用いる非臨床安全性試験では、これ以上、動物実験を行っても新たな知見は得られないという限界もある。基本的に、臨床試験に必要な非臨床試験の範囲は、被験物質の特性や投与用量、また、被験者の特性や人数に応じたリスクとベネフィットを勘案しながら、定めるべきものである。また、事前に得られた臨床、非臨床データに基づき、安全性を確認しながら、段階的に行われるべきものである。そこで、ICH M3 (R2)の改訂に際しては、非臨床試験とのタイミングを示すにあたり、臨床試験を第I、II、III相という分類ではなく、試験期間、対象被験者数、疾病の種類により区分された。

文 献

- 厚生労働省医薬食品局審査管理課長通知(2008)「マイクロドーズ臨床試験の実施に関するガイダンス」(薬食審査発第0603001号)。
- ICH M3 (R2) (2009) Guidance on nonclinical safety studies for the conduct of human clinical trials and marketing authorization for pharmaceuticals. ICH consensus guideline.
- EMA (2003) Committee for Proprietary Medicinal Products. Position paper on non-clinical safety studies to support clinical trials with a single microdose. (CPMP/SWP/2599/02, 2003.1.23)
- FDA (2006) Exploratory IND Studies. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER). January, 2006.
- 厚生労働省医薬食品局審査管理課 事務連絡(2008)「マイクロドーズ臨床試験の実施に関するガイダンス(案)」に対する意見募集の結果について(2008.6.3)
- FDA (2005) Guidance for Industry. Estimating the Maximum Safe Starting Dose in Initial Clinical Trials for Therapeutics in Adult Healthy Volunteers. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER)
- 大野泰雄. マイクロドーズ臨床試験の毒性学的根拠について. マイクロドーズ臨床試験: 理論と実践—新たな創薬開発ツール
の活用に向けて—, 杉山雄一, 栗原千絵子(編), じほう社, 2007.
- 山口照英, 石井明子. 次世代バイオ医薬品の開発にあたっての非臨床・臨床試験について—TGN1412事故が医薬品開発に与えたインパクト—. 谷本学校 毒性質問箱 第10号. 安全性評価研究会編集委員会(編), サイエントリスト社, 2007.
- Brahams D. Deaths in US fialuridine trial. *Lancet*. 1994; **343** (8911): 1494-5.
- McKenzie R, Fried MW, Sallie R, Conjeevaram H, Di Bisceglie AM, Park Y, et al. Hepatic failure and lactic acidosis due to fialuridine (FIAU), an investigational nucleoside analogue for chronic hepatitis B. *N Engl J Med*. 1995; **333**: 1099-105.
- Richardson FC, Engelhardt JA, Bowsler RR. Fialuridine accumulates in DNA of dogs, monkeys, and rats following long-term oral administration. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994; **91**: 12003-7.
- Richardson FC, Tennant BC, Meyer DJ, Richardson KA, Mann PC, McGinty GR, et al. An evaluation of the toxicities of 2'-fluorouridine and 2'-fluorocytidine-HCl in F344 rats and woodchucks (*Marmota monax*). *Toxicol Pathol*. 1999; **27**: 607-17.
- Lai Y, Tse CM, Unadkat JD. Mitochondrial expression of the human equilibrative nucleoside transporter 1 (hENT1) results in enhanced mitochondrial toxicity of antiviral drugs. *J Biol Chem*. 2004; **279**: 4490-7.
- Lee EW, Lai Y, Zhang H, Unadkat JD. Identification of the mitochondrial targeting signal of the human equilibrative nucleoside transporter 1 (hENT1): implications for interspecies differences in mitochondrial toxicity of fialuridine. *J Biol Chem*. 2006; **281**: 16700-6.
- EMA (2007) Guideline on strategies to identify and mitigate risks for first-in-human clinical trials with investigational medicinal products.
- Duff, Gordon W. Expert Group on Phase One Clinical Trials: Final Report. 2006, Dec 7.
- JECFA (1999), WHO Technical Report Series 868, 49th report of the Joint FAO/WHO expert Committee on Food Additives.
- Munro IC, Ford RA, Kennepohl E, Sprenger JG. Correlation of structural class with no-observed-effect levels: a proposal for establishing a threshold of concern. *Food Chem Toxicol*. 1996; **34**: 829-67.
- Kroes R, Renwick AG, Cheeseman M, Kleiner J, Mangelsdorf I, Piersma A, et al.; European branch of the International Life Sciences Institute. Structure-based thresholds of toxicological concern (TTC): guidance for application to substances present at low levels in the diet. *Food Chem Toxicol*. 2004; **42**: 65-83.
- Müller L, Mauthe RJ, Riley CM, Andino MM, Antonis DD, Beels C, et al. A rationale for determining, testing, and controlling specific impurities in pharmaceuticals that possess potential for genotoxicity. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2006; **44**: 198-211.
- EMA (2006) Guideline on the limits of genotoxic impurities.
- FDA (2008) Guidance for Industry. Safety Testing of Drug Metabolites.
- ICRP (1990) Recommendations of the International Commission on Radiological Protection. *ICRP Publication* 60.
- 矢野恒夫, 杉山雄一, 加藤基浩, 馬屋原宏, 清原孝雄, 残華淳彦ほか. ペプチド・タンパク質のマイクロドーズ臨床試験の意義・実施基盤. *臨床評価* 2008; **35**: 651-65.

Gene expression profiling in rat liver treated with compounds inducing elevation of bilirubin

M Hirode^{1,2}, A Horinouchi^{1,2}, T Uehara², A Ono^{2,3}, T Miyagishima², H Yamada², T Nagao⁴, Y Ohno^{2,3} and T Urushidani^{2,5}

¹Development Research Center, Pharmaceutical Research Division, Takeda Pharmaceutical Company Limited, Yodogawa-ku, Osaka, Japan; ²Toxicogenomics Informatics Project, National Institute of Biomedical Innovation, Ibaraki, Osaka, Japan; ³National Institute of Health Sciences, Setagaya-ku, Tokyo, Japan; ⁴Food Safety Commission of Japan, Chiyoda-ku, Tokyo, Japan; and ⁵Department of Pathophysiology, Doshisha Women's College of Liberal Arts, Kyotanabe, Kyoto, Japan

We have constructed a large-scale transcriptome database of rat liver treated with various drugs. In an effort to identify a biomarker for the diagnosis of elevated total bilirubin (TBIL) and direct bilirubin (DBIL), we extracted 59 probe sets of rat hepatic genes from the data for seven typical drugs, gemfibrozil, phalloidin, colchicine, bendazac, rifampicin, cyclosporine A, and chlorpromazine, which induced this phenotype from 3 to 28 days of repeated administration in the present study. Principal component analysis (PCA) using these probes clearly separated dose- and time-dependent clusters in the treated groups from their controls. Eighteen more drugs in the database, reported to elevate TBIL and DBIL, were estimated by PCA using these probe sets. Of these, 12 drugs, that is methapyrilene, thioacetamide, ticlopidine, ethinyl estradiol, alpha-naphthylisothiocyanate, indomethacin, methyltestosterone, penicillamine, allyl alcohol, aspirin,

iproniazid, and isoniazid were also separated from the control clusters, as were the seven typical drugs causing elevation of TBIL and DBIL. The PC1 value showed high correlation with TBIL and DBIL. In the cases of colchicine, bendazac, chlorpromazine, gemfibrozil, and phalloidin, the possible elevation of TBIL and DBIL could be predicted by expression of these genes 24 h after single administration. We conclude that these identified 59 probe sets could be useful to diagnose the cause of elevation of TBIL and DBIL, and that toxicogenomics would be a promising approach for prediction of this type of toxicity.

Key words: bilirubin; liver; principal component analysis; rat; toxicogenomics

Introduction

The Toxicogenomics Project is a 5-year collaborative project by the National Institute of Biomedical Innovation, the National Institute of Health Science, and 15 pharmaceutical companies in Japan that started in 2002.¹ Its aim was to construct a large-scale toxicology database of transcriptomes to predict toxicity of new chemical entities in the early stage of drug development. Over 150 chemicals, mainly medicinal compounds, were selected and their gene expression in the liver was comprehensively measured by using Affymetrix GeneChip®. In 2007, the project was fin-

ished and the whole system, consisting of the database, the analyzing system, and the prediction system, was completed and named as TG-GATEs (Genomics Assisted Toxicity Evaluation System developed by the Toxicogenomics Project, Japan). Recently, we identified a biomarker for the diagnosis of hepatic phospholipidosis, nongenotoxic hepatocarcinogenicity, glutathione depletion-responsive, and serum triglyceride-decreasing by using our database.^{2–5}

Bilirubin is mainly a breakdown product of heme (part of the hemoglobin in the red blood cells). The heme is then turned into unconjugated bilirubin (indirect bilirubin) in the macrophages of the spleen. It is then bound to albumin and sent to the liver. In the liver it is conjugated with glucuronic acid (direct bilirubin, DBIL), making it soluble in water. Total bilirubin (TBIL) and DBIL levels can be measured in the blood, but indirect bilirubin is calculated from the

Correspondence to: Mitsuhiro Hirode, Development Research Center, Pharmaceutical Research Division, Takeda Pharmaceutical Company Limited, Yodogawa-ku, Osaka, 532-8686, Japan.
Email: Hirode_Mitsuhiro@takeda.co.jp

total and direct bilirubin. Bilirubin levels reflect the balance between production and excretion.

Increased TBIL causes jaundice of the prehepatic, hepatic, and posthepatic types. The “prehepatic type” is derived from increased bilirubin production. This can be due to a number of causes, including hemolytic anemia and internal hemorrhage. If the DBIL is normal, then the problem is an excess of unconjugated bilirubin, and the location of the problem is upstream of bilirubin excretion. The “hepatic type” indicates problems in the liver, which are reflected as deficiencies in bilirubin metabolism (e.g., reduced hepatocyte uptake of bilirubin, impaired conjugation of bilirubin, and reduced hepatocyte secretion of bilirubin). Some examples would be drug-induced hepatic disorders (especially antipsychotic drugs, some sex hormones, and a wide range of other drugs), cirrhosis, and viral hepatitis. The “posthepatic type” is derived from obstruction of the bile ducts, which are reflected as deficiencies in bilirubin excretion. An obstruction such as gallstones or cancer can be located either within the liver or outside the liver.

In the present study, we selected elevation of TBIL and DBIL as a target phenotype and tried to identify candidate biomarkers that identify chemi-

icals with the potential to cause this phenotype by using our database.

Materials and methods

Compounds

The compounds used for the data analysis are listed in Table 1, in which the chemical name, abbreviation, dosage, administration route, and vehicle used in the study are summarized.

Animal treatment

The experiments were carried out as previously described in the literature.⁶ Male Crl:CD (SD) rats were purchased from Charles River Japan Inc., (Kanagawa, Japan) at 5 weeks of age. After a 7-day quarantine and acclimatization period, the animals were divided into groups of five animals, using a computerized stratified random grouping method based on the body weight for each age. The animals were individually housed in stainless-steel cages in a room that was lighted for 12 h (7:00 a.m.–7:00 p.m.) daily, ventilated with an air-exchange rate of 15 times per hour, and maintained at 21–25 °C with a relative humidity

Table 1 List of compounds used in the present study

Compound name	Abbreviation	Dose (dose level, mg/kg)			Administration route	Vehicle	Bilirubin
		Low	Middle	High			
Gemfibrozil	GFZ	30	100	300	po	CO	A
Phalloidin	PHA	NA	NA	0.5	ip	SA	B
Colchicine	COL	1.5/0.5 ^a	5/1.5 ^a	15/5 ^a	po	MC	C
Bendazac	BDZ	100/30 ^a	300/100 ^a	1000/300 ^a	po	MC	C
Rifampicin	RIF	20	60	200	po	MC	C
Cyclosporine A	CSA	30/10 ^a	100/30 ^a	300/100 ^a	po	CO	B
Chlorpromazine	CPZ	4.5	15	45 (150 ^b)	po	MC	C
Methapyrilene	MP	10	30	100	po	MC	B
Thioacetamide	TAA	4.5	15	45	po	MC	C
Ticlopidine	TCP	30	100	300	po	MC	D
Ethinyl estradiol	EE	1	3	10	po	CO	A
Alpha-naphthylisothiocyanate	ANIT	1.5	5	15	po	CO	D
Indomethacin	IM	0.5	1.6	5	po	MC	C
Methyltestosterone	MTS	30	100	300	po	MC	A
Penicillamine	PEN	100	300	1000	po	MC	A
Allyl alcohol	AA	3	10	30	po	CO	D
Aspirin	ASA	45	150	450	po	MC	D
Iproniazid	IPA	6	20	60	po	MC	B
Isoniazid	INAH	50	100	200	po	MC	C
Glibenclamide	GBC	100	300	1000	po	CO	D
Cyclophosphamide	CPA	1.5	5	15	po	MC	B
Nitrofurantoin	NFT	10	30	100	po	MC	D
Valproate	VPA	45	150	450	po	MC	D
Methotrexate	MTX	0.1	0.3	1	po	MC	C
Tetracycline	TC	100	300	1000	po	MC	C

po, peroral; CO, corn oil; A, bilirubin oxidase method; NA, not applicable; ip, intraperitoneal; SA, saline; B, vanadate oxidation method; MC, 0.5 wt/vol% methylcellulose; C, azobilirubin method; D, alkali azobilirubin method. The animals were treated for 3, 7, 14, or 28 days, except PHA, which were treated for 3 or 7 days.

^aAs single dose/repeated dose.

^bExtra-high dose (only single dose of CPZ).

of 40–70%. Each animal was allowed free access to water and pellet food (CRF-1, sterilized by radiation, Oriental Yeast Co., Japan). Rats in each group were orally dosed various drugs suspended or dissolved either in 0.5% methylcellulose solution or corn oil according to their dispersibility, except phalloidin, which was dissolved in saline and administered intraperitoneally. For single-dose experiments the rats were sacrificed at 3, 6, 9, and 24 h after dosing. For repeated dose experiments, the animals were treated for 3, 7, 14, or 28 days, except phalloidin, which were treated for 3 or 7 days, and they were sacrificed 24 h after the last dosing. Food was not withdrawn before sacrifice and the time of autopsy was done between 9:00 a.m.–11:00 a.m. for the repeated dose group and 24 h after the single dose group. Blood samples for routine biochemical analysis were collected into heparinized tubes under ether anesthesia from the abdominal aorta after which the animals were sacrificed. As the animal experiments were performed in four different contract research organizations where different automated blood chemistry analyzers were used, TBIL and DBIL were quantified by four different methods, that is bilirubin oxidase method (TBA-120FR, Toshiba Medical Systems Corporation, Japan), vanadate oxidation method (Hitachi H7170, Hitachi High-Technologies Corporation, Japan), azobilirubin method (COBAS MIRA plus, Roche Diagnostics, Switzerland), and alkali azobilirubin method (Hitachi H7070, Hitachi High-Technologies Corporation, Japan). Because of this difference, the absolute values could not be compared, and the judgment of hyperbilirubinemia was done based on the difference from the control value. These methods are shown in Table 1 as A, B, C, and D in this order. The experimental protocols were reviewed and approved by the Ethics Review Committee for Animal Experimentation of the National Institute of Health Sciences.

Microarray analysis

Q5 After collecting the blood the animals were euthanized by exsanguination from the abdominal aorta under ether anesthesia. An aliquot of the sample (about 30 mg) for RNA analysis was obtained from the left lateral lobe of the liver in each animal immediately after sacrifice, kept in RNeasy Mini Kit (Qiagen, Valencia, California, USA) and total RNA was isolated according to the manufacturer's instructions. Microarray analysis was conducted on three out of five samples, selected based

on their body weight excluding the highest and the lowest, for each group by using the GeneChip® Rat Genome 230 2.0 Arrays (Affymetrix, Santa Clara, California, USA), containing 31,042 probe sets. The procedure was conducted basically according to the manufacturer's instructions using the Superscript Choice System (Invitrogen, Carlsbad, California, USA) and T7-(dT)24-oligonucleotide primer (Affymetrix) for cDNA synthesis, cDNA Cleanup Module (Affymetrix) for purification, and BioArray High yield RNA Transcript Labeling Kit (Enzo Diagnostics, Farmingdale, New York, USA) for synthesis of biotin-labeled cRNA. Ten micrograms of fragmented cRNA were hybridized to a Rat Genome 230 2.0 Array for 18 h at 45 °C at 60 rpm, after which the array was washed and stained by streptavidin-phycoerythrin using a Fluidics Station 400 (Affymetrix) and then scanned by a Gene Array Scanner (Affymetrix). The digital image files were processed by Affymetrix Microarray Suite version 5.0, and intensities were normalized for each chip by setting the mean intensity to 500 (per chip normalization).

Q6

Microarray data analysis

To extract probe sets related to the elevation of TBIL and DBIL, we first used the gene expression data from liver from rats treated by repeated administration for 3, 7, 14, and 28 days, with gemfibrozil (GFZ), phalloidin (PHA), colchicine (COL), bendazac (BDZ), rifampicin (RIF), cyclosporine A (CSA) and chlorpromazine (CPZ), which are known to cause elevation of TBIL and DBIL, and that was confirmed in the present study.

After removing the probe sets with Affymetrix absent call in all the 48 sample sets ($N = 3$ for 4 time points and 4 dose levels for one drug), except PHA, which had 12 sample sets ($N = 3$ for 2 time points by repeated administration for 3 and 7 days, and 2 dose levels), genes differentially expressed by the treatment were extracted by Welch's ANOVA/ t -test ($P < 0.05$) for the dose level at one time point. This procedure was continued for all time points, and the genes showing significant change at any point were combined as elevation of TBIL and DBIL responsive genes. In the next step, commonly mobilized genes among these seven chemicals were selected.

The individual expression value (global mean) was converted to ratio by the mean of corresponding control value, and all the values with different doses and time points of the test compounds were gathered, and they were normalized by converting them to z -scores for each gene (pergene normalization). Principal component analysis (PCA) was

performed using Spotfire Decision Site (Spotfire, Somerville, Massachusetts, USA).

Pathway and gene ontology (GO) analysis

The identified probe sets were subjected to GO analysis by DAVID (Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery; <http://david.abcc.ncifcrf.gov/>) using Fisher's exact test.⁷

Results

Blood biochemical examination

The results of TBIL and DBIL examination of seven typical compounds (GFZ, PHA, COL, BDZ, RIF, CSA, and CPZ) known to induce their elevation in

rat plasma are shown in Figure 1. In most cases, both TBIL and DBIL were elevated and this tended to progress with dose and time. In the cases of COL and BDZ, DBIL was increased with a peak at 4th day and TBIL showed the same change as COL. TBIL was increased for all sampling points at high dose of BDZ. With CPZ, the DBIL was elevated at the 15th day or later, but changes in the TBIL were obscure at any sampling point.

Microarray data analysis

Differentially expressed genes with statistically significant differences were extracted from each of the seven representative drugs elevating TBIL and DBIL as described in the Materials and methods section. The numbers of extracted probe sets were 3690 for

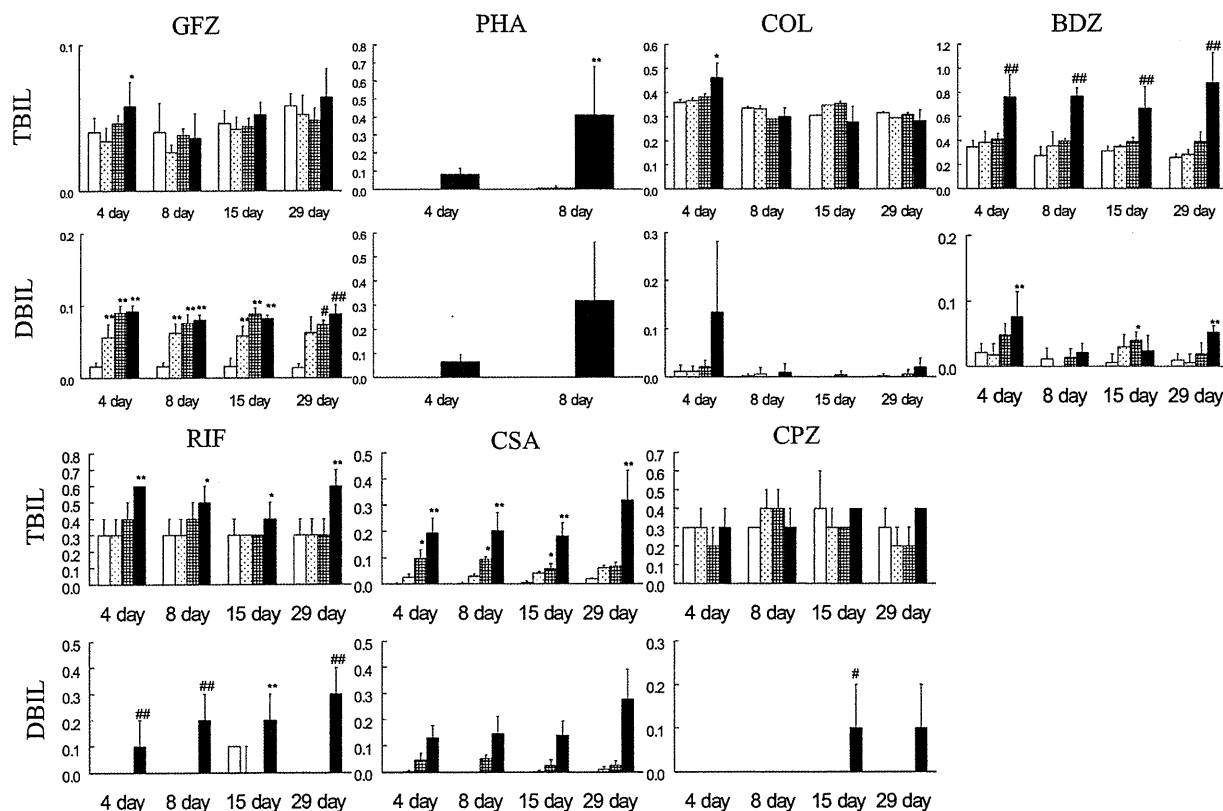


Figure 1 Plasma total bilirubin (TBIL) and direct bilirubin (DBIL) concentrations for rats treated with gemfibrozil (GFZ), phalloidin (PHA), colchicine (COL), bendazac (BDZ), rifampicin (RIF), cyclosporine A (CSA), or chlorpromazine (CPZ). Six-week-old male Sprague-Dawley rats were treated with each compound for 3, 7, 14, or 28 days, and they were sacrificed 24 h after the last dose. Blood samples were collected at sacrifice. Plasma TBIL and DBIL concentrations were estimated as described in the Materials and methods section. As the animal experiments were performed in four different contract research organizations where different automated blood chemistry analyzers were used, TBIL and DBIL were quantified by four different methods (see Table 1). Because of this difference, the absolute values could not be compared and the judgment of hyperbilirubinemia was done based on the difference from the control value. Open (control), dotted (low dose), checked (middle dose) and filled (high dose) columns represent plasma TBIL and DBIL concentrations (mg/dL). Values are expressed as mean \pm SD of five rats each for each time and compound. Significant difference from the control rats: (* P < 0.05, ** P < 0.01: Dunnett test, # P < 0.05, ## P < 0.01: Dunnett type mean rank test).