

Table 23 平成19年度計画

- MD 試験ガイドライン案の作成
(適用範囲についての検討)
- 探索的臨床試験ガイドライン素案の作成
- 治験薬 GMP についての検討

今回は10月に横浜で開催される予定ですので、横浜でステップ2に達することを目標に作業を進めています。ステップ2の段階で最終的に探索的臨床試験そのものの定義や分類が確定し、そのために必要な非臨床試験の範囲が確定しますので、それに合わせて国内の指針も変えるべきと考えています。

3項で述べたように、総合科学技術会議で2007年夏を目途に検討することを指示されましたので、それまでにMD臨床試験のガイドラインの案の作成を進めていく予定です。今のところ、どこまで探索的臨床試験の考え方を適用するかについて、研究班としての結論はまだ出ていません。ICHのM3のガイドラインではバイオテクノロジー産物はその適用外で、一般的な医薬品及び低分子のタンパク化合物について適用するとの考え方で検討を進めています。米国のe-INDのガイドラインのようにバイオテク産物にも適用するかは今後の検討課題です。

ガイドライン素案に関しては、東京大学杉山雄一

先生らのグループに精力的に検討していただき、作成していただきました。感謝します。

文 献

- 1) 厚生省医薬局審査管理課長：医薬品の臨床試験のための非臨床安全性試験の実施時期についてのガイドラインの改正について、医薬審第1019号、平成10年11月13日。
- 2) 厚生省医薬安全局審査管理課長：医薬品の臨床試験のための非臨床安全性試験の実施時期についてのガイドラインについて、医薬発第1831号、平成12年12月27日。
- 3) Casarett & Douls 5th ed. (2001).
- 4) 内藤裕史著：中毒百科，南江堂 (2001)。
- 5) The Sigma Aldrich Library of Chemical Safety data, ed II. (1988).
- 6) Registry of Toxic Effects of Chemical Substances (RTECS).
- 7) 鶴飼 卓：急性中毒処置の手引き第3版，日本中毒情報センター編，薬業時報社 (1999)。
- 8) 吉村正一郎：急性中毒情報ファイル第3，廣川書店 (1996)。
- 9) Merck Index 13th ed. (2001).
- 10) 厚生省薬務局長：治験薬の製造管理及び品質管理基準及び治験薬の製造施設の構造設備基準 (治験薬 GMP) について，薬発第480号，平成9年3月31日。

動物実験代替法の国際動向

大野 泰雄

Abstract : There were several international and national institutes for the promotion of 3Rs. Those were ECVAM, ICCVAM, NCA, ZEBET, JaCVAM and etc. FRAME, 3R Research Foundation, and NC3Rs are agencies that support research on alternatives. This article introduced those institutes and agencies outside Japan and explained situation of regulatory acceptance of alternatives by OECD, EU, and US. Scientific association for the promotion of 3Rs were also established in Europe, Japan, and Korea. 6th World Congress on Alternatives and Animal Use gathered more than 1000 attendents from every continents. 3Rs is now globally accepted to harmonize the need of life science and ethical requirement to respect life.

3Rs declaration was agreed by EU governments and industries in 2005. They promised to establish partnership among them to promote 3Rs. REACH project was accepted in 2006 to improve the protection of human health and the environment while maintaining competitiveness. About 30,000 chemicals, produced more than 1 ton/year, are to be registered with some kinds of safety data. This implies conduct of a lot of animal experiments. Therefore, the use of alternative methods are recommended where appropriate methods are available.

Key words : alternatives, ECVAM, ICCVAM, 3Rs declaration, REACH

1. はじめに

動物を用いる生命科学研究が社会に受け入れられ、その支持を得、意味のない摩擦を避けるためには、不必要な動物実験を止め、やむを得ず行う動物実験においては適切な手続きに従い、動物使用数と動物に与える苦痛を最小限にする必要がある。

欧米ではこのような認識は古くからあり、

“Current situation of alternatives to animal experiments outside Japan.”



Yasuo Ohno (National Institute of Health Sciences, 国立医薬品食品衛生研究所—158-8501 東京都世田谷区上用賀 1-18-1)

1976年国立衛生試験所入所。現在、国立医薬品食品衛生研究所副所長、日本薬理学会評議員、日本動物実験代替法学会評議員、HAB協議会評議員、日本薬物動態学会監事。薬学博士。

1954年にはRusselとBurchにより動物実験代替法(代替法)についての3Rsの原則が提案された¹⁾。また、イギリスでは医学分野における実験動物を他のものに置き換えるための基金(FRAME)が1969年に、米国では1981年にジョンズホプキンズ大学に代替法センターが開設され代替法の開発や評価が行われてきた。新たに開発された動物実験代替法を科学的に評価し、可能なものについては取り入れていこうという考えの下、EUは代替法開発の拠点とし、代替法についてのデータベースを設置・維持するため、また、行政、産業、生物・医学分野の科学者、消費者、および動物愛護運動グループの対話を促進することを目的に1991年に代替法バリデーションセンター(European Center for the Validation of Alternative Methods: ECVAM)を設立した。米国は毒性試験法の開発、バリデーション、受け入

れ、および国内・国際レベルでのハーモナイゼーションに関する問題を連邦政府内で調整するためにNICEATM (NTP Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods) の下にNIEHS (National Institute of Environmental Health Sciences) の機関としてICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods) を1993年に設置した。ICCVAMは15の行政機関および研究機関からの代表により構成され、米国内外から提供されたバリデーションデータのPeer Reviewによる代替法評価を行っている。

1996年には安全性評価のための動物実験代替法のバリデーションと行政的受け入れに関するOECDの会議が開催され、それらの基準が示された²⁾。その要点については、先に解説した³⁾。要約すると、代替法はリスクアセスメントの目的のために、既存の方法と比較し同等以上、望むらくはそれ以上の価値を有するデータが得られ、堅牢かつ経済的であり、科学的、倫理的に妥当なものでなくてはならない。また、それらが、code化された被験物質を用い、GLP原則に準じて行われた適切なバリデーションに基づく公開データで裏付けられたものでなくてはならない。また、施設内外での反復性や再現性についての情報が提供されなければならない。

なお、ECVAMやICCVAMでは従来の安全性試験の代替法のみならず、定量的構造活性相関や内分泌かく乱化学物質検索のような新たな毒性評価の要請やトキシコゲノミクスのような新しい技術を取り入れるための検討も行っている。また、ECVAMとICCVAMは評価結果の相互承認や共同バリデーションの実施などの協力を行っている。

本稿では代替法の受け入れ状況と、それを巡る最近の国際情勢について述べる。

2. 動物実験代替法を巡る最近の国際状況

2-1. OECDの状況

医薬品や農薬、化学物質の安全性評価においては、行政やOECDのような国際機関の定めた毒性試験法ガイドラインに基づいて各種の試験が実施されることが多い。これらの試験法についても、

動物福祉への配慮が求められ、2002年よりOECD安全性試験法専門家会議に動物福祉団体代表で構築されたInternational Council on Animal Protection in OECD Programmes (ICAPO) の代表が参加するようになった。最近承認された動物福祉を考慮した試験法ガイドラインを表1に示した。皮膚感作性試験法 (OECDガイドライン429: Local Lymph Node Assay (LLNA)) が1998年に採用された。これはモルモットを用いるMaximization法に完全に替わるものではないが、動物の使用数や動物に与える苦痛が少ない方法である。2000年には動物実験に関する人道的なエンドポイントに関するガイドライン⁵⁾を通知した。また、単回投与毒性試験においては統計的に厳密なLD50値を求めないとし、従来の多数の動物を用いてLD50値を求める試験法(401)を廃止し、10匹程度の動物でLD50を推定する試験法(420: Fixed Dose Method, 423: Acute Toxic Class Method, 425: Up-and-Down Procedure)を採用した(2001)。また、2002年には皮膚腐食性試験として皮膚の導電度を測定する方法(TER法)や培養細胞を用いて作成した皮膚三次元モデルを用いる試験法(430: Transcutaneous Electrical Resistance Test, 431: Human Skin Model Test)が、2004年には皮膚吸収性試験のためのヒトやブタの皮膚を用いた試験法(同428: Skin Absorption: *in vitro* Method)や光毒性試験ガイドライン(432: *In Vitro* 3T3 NRU phototoxicity test)が採用された。これらの試験法については別に解説した⁴⁾。

最近の動きとして、2006年には皮膚腐食性のための*In vitro*膜バリアー試験法(435: *In Vitro* Membrane Barrier Test Method for Skin Corrosion)が記載された。また、ガイドライン案として、2006年度に*In vitro*小核試験(Draft Proposal for 487: *In Vitro* Micronucleus Test)、並びに、hER-HeLa-9903 Cell Lineを用いたStably Transfected Transcriptional Activation (TA) Assayがエストロゲン様作用の検出試験法として記載された⁶⁾。今後も*in vitro*の眼刺激性試験や皮膚刺激性試験、感作性試験などの開発が期待されている。

表1 代替法の行政的受け入れ状況 (http://ecvam.jrc.it/index.htmに一部追加)

- 1) EpiSkin™ skin corrosivity test (67/548/EEC 2000, OECD 2002)
- 2) 3T3 NRU phototoxicity test (67/548/EEC 2000, OECD 2002)
- 3) EpiDerm™ skin corrosivity test (67/548/EEC 2000, OECD 2002)
- 4) Rat TER skin corrosivity test (67/548/EEC 2000, OECD 2002)
- 5) In vitro tests for percutaneous absorption (OECD 2002)
- 6) Deletion of the acute oral toxicity test, Lethal Dose (LD50) (67/548/EEC 2001, OECD 2001)
- 7) Local Lymph Node Assay for skin sensitisation (LLNA) (OECD 1998, updated 2002, U.S. EPA OPPTS 1998)
- 8) ELISA test for batch potency testing of erysipelas vaccines (EDQM/European Pharmacopoeia 2004)
- 9) ELISA test for batch potency testing of tetanus vaccines for human use (EDQM/European Pharmacopoeia 2003)
- 10) Toxin Binding Inhibition (ToBI) test for batch potency testing of tetanus vaccines for human use (EDQM/European Pharmacopoeia, 2003)
- 11) In Vitro Membrane Barrier Test Method for Skin Corrosion (OECD 2006)

括弧の中はそれぞれの機関で承認された年を示した。

EDQM : European Directorate of the Quality of Medicines & HealthCare

2-2. EUにおける状況

2-2-1. EUにおける化粧品の安全性評価と代替法の受け入れ状況

EUでは1993年の化粧品の安全性評価に関する指令⁷⁾において、適切な代替法があればとの前提つきではあるが、1998年までには実験動物を用いて安全性を評価した化粧品原料および最終製品の販売を禁止することを決めた。しかし、代替法の開発・バリデーションが充分でなかったことから、その施行を2000年6月30日まで延期した。その後、2002年6月末まで再度延期された。その再再延長に関する調停会議での合意結果を踏まえ、化粧品およびその原料の安全性評価に関する化粧品指令第7次改正がEU政府および議会で認められ、2003年3月11日付けで公布された⁸⁾。その内容は①ECVAMやOECDで承認された代替法があるものはすべて即時禁止、②2009年までに動物を用いるすべての安全性試験を全面的に禁止、および動物実験を行った化粧品の販売禁止、また、動物を用いて安全性評価を行った化粧品のEU域内への輸入を禁止、ただし、③薬物動態試験や生殖発生毒性、反復投与毒性試験などの全身的な作用を検討する試験については2013年まで猶予する、というものである。

第七改正が成立したことを受け、ECVAMは重点課題を以下の11項目に整理した⁹⁾。1) 全身毒

性(単回投与毒性、反復投与毒性、神経毒性、肺毒性、腎毒性、肝毒性、免疫毒性、血液毒性)、2) 局所毒性(光毒性、皮膚腐食性、皮膚刺激性、眼刺激性)、3) 感作性(皮膚感作性、吸入感作性)、4) 発がん性、5) 生殖毒性、6) トキシコキネティクス、7) 環境毒性、8) 科学的な情報サービス、9) 定量的構造活性相関、10) 生物学材料(発熱性物質試験)、11) 戦略開発(*in vitro* 毒性試験やバリデーションにおけるGLP, Good Cell Culture Practice (GCCP) のガイドライン、トキシコゲノミクス)。

これらのうち、光毒性試験、皮膚腐食性試験、皮膚感作性試験、および経皮吸収試験についてはOECDレベルあるいはEUレベルでのガイドラインあるいはその案が存在する(表1)。また、ECVAMの諮問委員会であるESAC (ECVAM Scientific Advisory Committee)は1997年には3T3 NRU 光毒性試験、1998年には皮膚腐食性試験としてヒト皮膚三次元モデルであるEPISKIN™とTER法を、2000年には皮膚感作性のためのLLNA試験、EpiDerm™皮膚腐食性試験、CORROSITEX™皮膚腐食性試験を確立された代替試験法として承認した(表2)。生殖毒性試験については2002年には生殖発生毒性評価のための胚性幹細胞試験、全胚培養試験、マイクロマス試験を科学的にバリデーションされた方法として

ESACより報告された。このESACの結論を受けてEUはこれらの代替試験から得られたデータを化粧品の安全性評価に用いることに合意した。

EUの化粧品および非食品に関する健康および消費者保護担当機関であるSCCNFP (Scientific Committee for Cosmetic Products, and Non-food Products intended for Consumers) は光毒性試験 (3T3 NRU PT法) および皮膚腐食性試験 (TER, EPISKIN™, EpiDerm™法) を公的に validation された試験法として認めた。また、経皮吸収試験 (ヒトあるいはブタ皮膚を用いる *in vitro* Skin Absorption法) および皮膚感作性試験 (LLNA法) を認めた (2002) ¹⁰⁾。なお、フランスは眼刺激性試験法としてアガロースゲル拡散細胞毒性試験法とウサギ角膜線維芽細胞法 (NR) を公示した (1999.12.30)。

ECVAMは現在単回投与毒性試験と皮膚刺激性試験、および眼刺激性試験についてはバリデーシ

ョン中、あるいはその準備中である。また、*in vitro* 胎児毒性試験、皮膚刺激性試験、急性毒性試験、免疫毒性試験、トキシコゲノミクスについてECVAM主催のWorkshopを開催し、検討を進めている。なお、ECVAMは2004年の“Report for establishing the timetable for phasing out animal testing for the purpose of the Cosmetic Directive”において、皮膚腐食性、皮膚刺激性、光毒性、光遺伝毒性を除く多くの試験法は、化粧品指令第7次改正の禁止年には完全代替は困難と予測している。このため、ECVAMは、第6次 Framework Programme on Research and Developmentとして、急性毒性試験、生殖発生毒性試験、感作性試験に関する検討プロジェクトを組織した。また、2002年よりNICEATM (The NTP Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods) と共同で急性経口毒性を評価するための *in vitro* 細胞毒性試験のバリデー

表2 ESAC (ECVAM Scientific Advisory Committee) により科学的にバリデーショナルされた代替法として報告された試験法 (<http://ecvam.jrc.it/index.htm>)

- 1) Artificial skin models (EPISKIN®, EpiDerm®) for skin irritation testing (27 April 2007)
- 2) Reduced Local Lymph Node Assay (rLLNA) for skin sensitisation (27 April 2007)
- 3) Statement on the conclusion of the ICCVAM retrospective study on Organotypic *in vitro* assays as screening tests to identify potential ocular corrosives and severe eye irritants. (27 April 2007)
- 4) Micronucleus Test as an Alternative to the *In Vitro* Chromosome Abberation Assay for Genotoxicity Testing (17 November 2006)
- 5) SkinEthic™ Human Skin Model for Skin Corrosivity Testing (17 November 2006)
- 6) Five *In Vitro* Pyrogen Tests (21 March 2006)
- 7) Testing Strategy to Reduce the Use of Fish in Acute Aquatic Toxicity Testing (21 March 2006)
- 8) The Colony Forming Unit-Granulocyte/Macrophage (CFU-GM) Assay for Predicting Acute Neutropenia in Humans (21 March 2006)
- 9) ELISA test for batch potency testing of erysipelas vaccines (28 June 2002)
- 10) Embryonic stem cell test for embryotoxicity (01 May 2002)
- 11) Micromass embryotoxicity assay (01 May 2002)
- 12) Whole rat embryo embryotoxicity assay (01 May 2002)
- 13) CORROSITEX assay for skin corrosivity (06 December 2000)
- 14) ELISA test for batch potency testing of tetanus vaccines for human use (06 December 2000)
- 15) Toxin Binding Inhibition (ToBI) test for batch potency testing of tetanus vaccines for human use (06 December 2000)
- 16) Local Lymph Node Assay for skin sensitisation (LLNA) (21 March 1999)
- 17) 3T3 Neutral Red Uptake (NRU) phototoxicity test (1997)
- 18) *In vitro* production of monoclonal antibodies (14 May 1998)
- 19) EpiSkin™ skin corrosivity test (03 April 1998)
- 20) Rat Transcutaneous Electrical Resistance (TER) skin corrosivity test (03 April 1998)
- 21) EpiDerm™ skin corrosivity test (21 March 1998)

ーション研究を実施した。

2-2-2. EUにおけるECVAM以外の代替法関連機関の活動

EUにはドイツのZEBET (Centre for Documentation and Evaluation of Alternatives to Animal Experiments, 1989設立) やオランダのNCA (Netherlands Centre for Alternatives to Animal Use) のような国レベルの代替法研究機関がある。また、イギリスにおけるFRAME (Fund for the Replacement of Animals in Medical Experiments: 1969年設立) やスイスにおける3R Research Foundation (1987設立) のような代替法研究支援のための民間の財団が以前から存在し、代替法に関する情報の収集や研究、バリデーション、あるいはそれらの支援活動を行ってきた。最近では2004年にイギリスにおいて動物試験、研究における3Rsの推進、開発、実施を目的にNC3Rs (National Centre for the Replacement, Refinement and Reduction of Animals in Research) ²⁷⁾ が設立された。質の高い3Rs研究に資金を提供し、3Rsを広めるためのセミナーやシンポジウムを組織し、また、3Rsの情報ソースやガイドラインを開発している。これには英国内務省やMRC (Medical Research Council), BBSRC (Biotechnology and Biological Sciences Research Council), ABPI (The Association of the British Pharmaceutical Industry) およびThe Wellcome Trustより資金が提供されている。

代替法に関連する学会として、ESTIV (European Society of Toxicology *in Vitro*) があり、*in vitro*毒物学を促進することを目的に活動し、「Toxicology *in Vitro*」を発刊している。また、MEGAT (Middle European Society for Alternative Methods to Animal Testing) も、代替法の普及とバリデーション、3Rsの分野での研究の推進、メディアへの情報提供などを目的に活動している。

2-2-3. 化粧品業界の活動

COLIPA (欧州化粧品工業連合会) は動物試験代替法の開発と受け入れに向けたコーディネートを目的に、1992年にSCAAT (Steering

Committee on Alternatives to Animal testing) を常設の委員会として設置した。現在、眼刺激性、感作性・皮膚刺激性、光毒性および変異・遺伝毒性に関する代替法検討のための4つのTask Force (TF) があり、それぞれ積極的に活動が進められている^{13) 12)}。

このうち感作性・皮膚刺激性TFにおいては、日本企業により開発されたヒト単球由来細胞株であるTHP-1細胞を用いた*in vitro*皮膚感作性試験h-CLAT (human Cell Line Activation Test) のring studyが2004年6月から開始された。また、同様のU937細胞を用いた試験法やグルタチオンや合成システインペプチドとの結合性を評価するpeptide reactivity assayなどが評価されている。

2-2-4. 3Rs宣言

2005年11月に行われた欧州委員会主催のワークショップ「EU goes Alternatives」において、今後、EUの各産業分野において、効果と安全性の両面に関する代替法の開発を促進することが宣言された(3Rs宣言)。これには代替法開発に関するパートナーシップ (EPAA: European Partnership for Alternative Approaches to Animal Testing) として¹³⁾、欧州委員会からは企業、研究、健康と消費者保護、環境、共同研究センターのそれぞれに関わる常任理事会およびECVAMの6機関が参加している。工業会からもCEFIC (欧州化学品工業会)、EFPIA (欧州製薬団体連合会)、COLIPA (欧州化粧品工業会)、Euro BIO (欧州バイオテクノロジー工業会)、AISE (石鹼洗剤協会)、ECPA (欧州農薬工業会) など6団体が参加している。また、医薬品、化粧品、化学品メーカーなど27企業が参加している。

3Rs宣言においては以下のような基本認識が示されている。

- 1) 政策の策定・施行にあたり、動物の福祉要件を全面的に尊重する。
- 2) 大部分の産業部門は動物実験抜きでは充足し得ない規制・行政上の義務を負っている。
- 3) 動物試験の置き換えが可能な分野ではそのための研究を、いまだ達成できない分野では、動物実験の削減と洗練に関する研究を加速化するように努力すべきである。

- 4) いくつかの分野では置換代替法の使用により既に評価できるようになっている。その他でも、より少数の実験動物を用い、また実験動物の苦痛を緩和した方法で評価することが可能となっている。
- 5) 3Rs促進のために、更に、探求する余地が多く残されている。
- 6) 動物実験への依存性の低い安全性評価への革新的取組みにプロテオミクスやゲノミクス、バイオインフォマティクスのような先端技術を活用できる。
- 7) 会議参加者は、実験動物の福祉および3Rsへの新しい取組みを連携・強化する必要がある。
- 8) 新試験法の開発は動物実験を減らすだけでなく、EU企業の競争力を高めるものである。

また、EU政府と関連機関および団体・企業は以下の点について合意した。

- 1) 企業団体とEU委員会が動物試験の削減を目的とした代替法を用いた対応を促進するための協力関係を構築する。
- 2) 短期・中期・長期的活動および応分の責任範囲を特定する「行動計画」の策定、およびその年次改正・更新に寄与する。
- 3) 適切な資源と資金提供を通して代替法の開発、妥当性検証、実施を促進し、かつ、規制当局による承認の迅速化を目指す。

この合意に基づき、1年後の2006年12月にBrusselsでEPAA年次大会が開催され、EPAAの進捗状況とステークホルダーによる評価が報告された。

2-2-5. REACH (Registration, Evaluation, and Authorisation of Chemicals) の施行と代替法

REACHはヒトの健康と環境保護を改善するとともに、EUの化学産業の競争力を維持し、イノベーション能力を高めることを目的とし、化学物質によるリスクを管理し、流通経路の各段階で、安全性に関する情報を提供する責任を課すものである。

この規制は2006年12月18日にEU委員会の環境閣僚理事会で承認され、2007年6月1日から発効することになった^{14)~16)}。REACHは、EU域内で年間1トン以上製造・輸入されるすべての化学物質の登録を既存物質と新規物質を区別せずに義務付けるものであり、3万種の化学物質が対象となる。既存物質の登録期限は物質の製造・輸入量や有害性への懸念によって分けられるが、2018年までに段階的に登録される。年間1トン以上の物質の登録には、製造・輸入量に応じて物理化学的性状、ヒトの健康への有害性、生態毒性の情報が必要となる。動物試験が行われる場合、重複を避けるために関係書類の事前審査が義務づけられる。ヒトに対する毒性に関する情報は、可能なら代替手段を用いて入手する。これらの代替手段は欧州委員会によって確認され、さらに化学物質庁または国際的な機関によって認定されなくてはならない。EU委員会は代替法の使用に関し3年ごとに報告書を提出し、必要なら新たな法的提案を行うことになっている。

安全性評価のために提出が義務付けられているデータを表3に示した。

表3 REACHにより要求される安全性に関するデータ

| |
|--|
| 年間1トン以上： <u>皮膚刺激性または皮膚腐食性試験</u> ， <u>眼刺激性試験</u> ， <u>皮膚感作性試験</u> ， <u>バクテリアを用いるin vitro変異原性試験</u> ， <u>経口投与急性毒性試験</u> |
| 年間10トン以上： <u>in vivo皮膚刺激性試験</u> ， <u>in vivo眼刺激性試験</u> ， <u>哺乳類細胞を用いるin vitro細胞遺伝学試験</u> または <u>in vitro小核試験</u> ， <u>哺乳類細胞を用いるin vitro遺伝子突然変異試験</u> （ただし、バクテリアを用いるin vitro試験と哺乳類細胞を用いるin vitro細胞遺伝学試験またはin vitro小核試験が陰性的の場合）、 <u>吸入または皮膚経路による急性毒性試験</u> ， <u>短期反復投与毒性試験</u> （28日間、場合によって90日間）、 <u>生殖/発生毒性に関するスクリーニング</u> ， <u>トキシコキネティクス試験</u> ， <u>リスクアセスメント</u> |
| 年間100トン以上： <u>亜慢性毒性</u> （90日）， <u>出生前発生毒性試験</u> ， <u>二世代生殖毒性試験</u> |
| 年間1,000トン以上： <u>慢性毒性</u> （>12カ月）や <u>追加評価</u> ， <u>発がん性試験</u> |

下線はESACにより科学的にバリデーションされた代替法が報告されているもの。

2-3. 米国の状況

2-3-1. ICCVAMによる検討

ICCVAMは1998年に皮膚腐食性試験法としてのCorrositex[®]についてPeer Reviewを行い、本方法が動物愛護の点で問題はないこと、また、すべての化学物質に有用とは言えないが、Department of Transport (DOT) で必要とされる状況においては有用であると評価した¹⁹⁾。また、本試験で陰性の場合には皮膚刺激性試験により確認の必要があるが、false positiveを許容するならば陽性の場合の動物試験は不要とした。同様の検討により、モルモットを用いたMaximization法の代替試験法としてLLNA法について、マウスを用いることから完全な代替法ではないが、妥当な方法であるとして認知した²⁰⁾。また、皮膚腐食性試験としてEpiDerm[™]、およびEPISKIN[™]法およびTER法について評価し、皮膚腐食/刺激性評価のためのスキームにおいてweight-of-evidence評価のための一つとして使用できるとした。また、これらの試験で陽性とされたものは、そのまま陽性として分類やラベリングして良いとしている。

ICCVAMはECVAMと密接な協力関係を結び、お互いが承認した試験法については、簡易の評価促進プロセスを採用している²¹⁾。また、急性全身毒性を評価するための細胞毒性試験(BALB/c 3T3または正常ヒト角化細胞(NHK)を用いるNeutral Red 取り込み(NRU)試験法)についての共同バリデーションを実施し、2006年10月にはほぼ最終化されたバックグラウンドレビュー文書(BRD)並びにICCVAMによる試験法評価報告書が公表された。本報告書でICCVAMは、「これら2種の細胞毒性試験は法規制におけるハザード分類という目的には精度は十分ではないが、現在の急性毒性プロトコルであるUp-and-Down Procedure (UDP) およびAcute Toxic Class (ATC) 法の開始用量を設定するために使用することができる」と勧告した²⁰⁾。

4種の眼刺激性試験代替法(BCOP法、HET-CAM法、ICE (Isolated Chicken Eye Test) 法およびIRE (Isolated Rabbit Eye Test) 法)の専門家による評価を行い、2006年3月にそれらの最終BRD^{21)~24)}が公表された。本文書では、(1)

4法はいずれも*in vivo*試験法を代替する方法とはならないこと、(2) ICCVAMが推奨する限定的に使用でき、眼腐食性など強い眼刺激性物質のスクリーニングに使用できる方法としてBCOP試験およびICE試験が挙げられること、(3) HET-CAM試験およびIRE試験については、現時点では推奨できず、眼腐食性や強い眼刺激性物質を同定するためにはプロトコルや判断基準の最適化、追加バリデーションが必要であることを報告している。

ICCVAMは、生殖毒性試験としてカエルの胚を用いたFETAX試験(Frog Embryo Teratogenesis Assay-Xenopus)を、内分泌かく乱化学物質評価系として*in vitro* estrogen receptor and androgen receptor binding and transcriptional activation (TA) 法の評価の依頼をEPAから受けており、その一環としてJaCVAMやECVAMとの共同バリデーション計画を進めている。また、LLNA法の評価もPeer Reviewを近い時期に行う予定である。

2006年11月にNICEATMとICCVAMは代替法の5カ年計画案を発表した²⁵⁾。この計画では、(1)連邦政府機関試験計画に、適切で信頼性のある方法を統合するための、新規および改良された非動物および他の代替試験の研究開発、解釈および検証、(2)3Rs推進のための新規および改良された非動物試験と代替試験に関する最優先分野の確認、の2点に取り組むとした。また、試験開発の優先分野としては、①急性眼刺激性、腐食性、②Biologics/Vaccines、③急性皮膚毒性(刺激性・腐食性、感作性と吸収を含む)、④急性全身毒性(経口、経皮、吸入)、⑤慢性毒性・発がん性、⑥生殖・発達毒性、⑦内分泌攪乱物質、⑧神経毒性、⑨免疫毒性の9項目を挙げている。

2-3-2. CTFAの状況

CTFA(米国化粧品工業会)は化粧品の原料および最終製品について、安全性を立証する方法としての前臨床試験および臨床試験の使用に関するガイダンスの広範な改訂作業に取り組んでいる。1991年に作成した現行ガイドラインとの大きな相違点の一つは動物実験代替法の追加であり、細胞、組織、器官培養を用いる*in vitro*代替法や構

表4 代替法に関連したICHでの検討

- 1) 単回投与毒性試験において統計学的に厳密なLD50値を要求しない。
非齧歯類では必ずしも死亡するまで用量を上げなくとも良い。
- 2) 反復投与毒性試験において12カ月試験を要求しない。
- 3) 雄性生殖臓器毒性検出系としての2週間反復投与毒性試験で良いとした。
- 4) 発がん性試験における動物種数を1種に削減し、代替法で補足しても良い。
- 5) 臨床試験との関係における非臨床試験実施タイミングについて合意

造活性相関を用いてコンピュータによる予測を行う *in silico*法も含まれる可能性がある。

2-4. アジアの状況

日本においては、日本動物実験代替法学会の前身である日本動物実験研究会が1982年に発足して以来、代替法の開発やバリデーション、並びに市民との交流を行ってきた。中国や韓国においても代替法関連研究が行われ、昨年には韓国にも代替法学会が設立された。2007年8月に東京で開催された第6回国際動物実験代替法会議にはこれらの国をはじめとし、台湾、タイ、インドなどからも多くの研究者が参加し、今までで最も多くの参加者があった。動物福祉と代替法に関する研究が発表された。韓国および北京においてサテライトシンポジウムも開催され、多くの参加者を集め、関心の高さが示された。

3. おわりに

動物実験は近未来において不要となるとは思われない。一方、3Rsの原則は欧米や日本だけでなく、世界的に広く受け入れられている。今後も、生命科学研究における動物利用の適性を計る必要があるとともに、可能なものについては、積極的に代替法に置き換える努力が必要である。なお、医薬品の承認申請に添付すべき資料の国際的ハーモナイゼーションのための会議 (ICH) では表4に示したような安全性試験法ガイドラインの変更がなされ、我が国のガイドラインにも導入された。これらは3Rsの原則を念頭に入れてはいたが、必ずしもそれを意図したものではなかったが、結果として、ICHは3Rsの原則に貢献したと言える。

謝辞

本稿をまとめるに際し、厚生労働科学研究費補助

金 (医薬安全総合研究事業)「安全性評価のための動物実験代替法の開発および評価体制の確立に関する研究 (主任研究者:大野泰雄)」において、分担研究者の板垣宏氏が、日本化粧品工業連合会・動物実験代替専門委員会委員とともに作成した「代替法についての国際情勢の調査」報告を利用させていただいた。ここに感謝する。

参考文献

- 1) Russel W.M.S, Burtch R.L., The principles of Human Experimental Technique (Methuen, London) (1959)
- 2) OECD (1996) Final report of the OECD workshop on harmonization of validation and acceptance criteria for alternative toxicological test methods, OECD : ENV/MC/CHEM/TG (96) 9.
- 3) 大野泰雄, 動物実験代替法のバリデーション方法と行政的受け入れの現状, 国立医薬品食品衛生研究所報告1~12 (2004)
- 4) 大野泰雄, 皮膚と美容, **35**, 2~8 (2003)
- 5) OECD (2000) Guidance document on the recognition, assessment and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment No.19.
- 6) OECD (2006) Draft Guideline for the Testing of Chemicals : Stably Transfected Transcriptional Activation (TA) Assay for Detecting Estrogenic Activity of Chemicals—The Human Estrogen Receptor Alpha Mediated Reporter Gene Assay Using HeLa-hER-9903 Cell Line—Ver. 2006. Oct. 12
- 7) EU (1993) Council Directive 93/35/EEC
- 8) EU (2003) Directive 2003/15/EC of the European Parliament and of the Council, February 27, 2003 ; Official Journal of the European Union, L66, 11/03/2003, P0026~0035
- 9) Hartung T. et al., *ATLA*, **31**, 473~481 (2003)

- 10) SCCNFP (2002) SCCNFP/0546/02, final June 4, 2003, Memorandum concerning of the actual status of alternative methods to the use of animals in the safety testing of cosmetic ingredients.
- 11) De Silva, O. et al., *ALTEX*, **22**, Special Issue, 255 (2005)
- 12) Basketter, D. et al., *ALTEX*, **22**, Special Issue, 139 (2005)
- 13) EU (2005) European Partnership to Promote Alternative Approaches to Animal Testing. 3Rs Declaration. (http://ec.europa.eu/enterprise/epaa/index_en.htm)
- 14) EU (2006) Regulation (EC) No1907/2006 of the European Parliament and of the Council of 18 December 2006 concerning the Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals (REACH), establishing a European Chemicals Agency, amending Directive 1999/45/EC and repealing Council Regulation (EEC) No793/93 and Commission Regulation (EC) No1488/94 as well as Council Directive 76/769/EEC and Commission Directives 91/155/EEC, 93/67/EEC, 93/105/EC and 2000/21/EC, Official Journal of the European Union, L396, Volume 49.
- 15) EU (2006) Directive 2006/121/EC of the European Parliament and of the Council of 18 December 2006 amending Council Directive 67/548/EEC on the approximation of laws, regulations and administrative provisions relating to the classification, packaging and labelling of dangerous substances in order to adapt it to Regulation (EC) No 1907/2006 concerning the Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals (REACH) and establishing a European Chemicals Agency.
- 16) EU (2006) Q and A on the new Chemicals policy, REACH (<http://europa.eu/rapid/pressReleasesAction.do?reference=MEMO/06/488&format=HTML&aged=0&language=EN&guiLanguage=fr>)
- 17) ICCVAM (1999) Corrositex[®] : An *in vitro* test method for assessing dermal corrosivity potential of chemicals. NIH Publication No : 99-4495.
- 18) ICCVAM (1999) The Murine Local Lymph Node Assay : A Test Method for Assessing the Allergic Contact Dermatitis Potential of Chemicals/Compounds. NIH Publication No.99-4494.
- 19) Federal Register Vol.67, No.147, 31/07/2002, p49706-49707.
- 20) ICCVAM (2006) Background Review Document : In Vitro Cytotoxicity Test Methods for Estimating Acute Oral Systemic Toxicity. NIH Publication No : 07-4518.
- 21) ICCVAM (2006) Background Review Document for BCOP : *In Vitro* Test Methods for Detecting Ocular Corrosives and Severe Irritants. NIH Publication No : 06-4512.
- 22) ICCVAM (2006) Background Review Document for Isolated Chicken Eye (ICE) Test, NIH Publication No : 06-4513.
- 23) ICCVAM (2006) Background Review Document for Hen's Egg Test - Chorioallantoic Membrane (HET-CAM) Test, NIH Publication No : 06-4515.
- 24) ICCVAM (2006) Background Review Document for Isolated Rabbit Eye (IRE) Test, NIH Publication No : 06-4514 NIH Publication No : 06-4514
- 25) NICEATM/ICCVAM (2006) Federal Register notice requesting comments on the development of the Five-Year Plan. Federal Register/Vol.71, No.218, pp.66172-66173, November 13, 2006

医薬品開発における代謝物の安全性評価についての考え方

内藤 真策*¹, 古田 盛*¹, 吉田 武美*², 北田 光一*³,
 笛木 修*⁴, 海野 隆*⁵, 大野 泰雄*⁶, 小野寺博志*⁴,
 川村 信之*⁷, 黒川美佐男*¹, 佐神 文郎*¹, 篠田 和俊*⁴,
 中澤 隆弘*¹, 山崎 恒義*⁸

(受付：平成19年6月1日, 受理：平成19年9月21日)

1. はじめに

医薬品開発の過程で得られる実験動物やヒトでの薬物動態に関する情報は、毒性試験や薬理試験の結果をヒトに外挿し有効性や安全性を予測するのに役立つ。しかし、代謝物がヒトと大きく異なる動物種での結果の解釈は注意を要する。代謝物の安全性評価について、本邦では通知¹⁾及びICH-1²⁾において、主要代謝物の毒性や薬理作用に関する情報の必要性が示された。米国では、米国食品医薬品局 (FDA) と米国研究製薬工業協会 (PhRMA) により代謝物の安全性試験について評価すべき代謝物の生成割合等が議論された³⁻⁵⁾。これらの経緯も踏まえ、本邦では医薬品医療機器審査センターの毒性担当者から個人的な見解として、ヒト特異的な代謝物の毒性学的評価についての考え方が提示された⁶⁾。更に、日本製薬工業協会 (製薬協) の加盟企業に対するアンケート調査で、代謝物の毒性試験は高い関心事であることが明らかにされた⁷⁾。また、2005年にFDAからドラフトガイダンス⁸⁾が発出され、臨床試験で認められた代謝物の安全性試験についての考え方が示され、ヒト特異的、又はヒトで実験動物より多く生成し、投与量あるいは全身曝露量 (どちらか少な

い方)の10%を超える代謝物について安全性評価が必要とされ、その実施時期や方法が示された。このドラフトガイダンスに対し、製薬協は加盟企業の意見をまとめて、主要代謝物の定義基準や毒性標的部位での曝露を反映していない場合等に関するパブリックコメントを提出している。また、欧州医薬品庁 (EMA) の薬物相互作用のガイダンス⁹⁾では、全身クリアランスの30%以上の割合を占める代謝経路については、*in vitro* や *in vivo* の薬物相互作用試験の実施が必要であることを示唆しており、曝露がそれ以下の代謝物であっても、毒性や薬理活性を示す場合は、試験を必要とする可能性を示唆している。現状において、代謝物の安全性評価について参考とすべき論文^{3-5,10,11)} や各国のガイダンス^{8,9,12,13)} では代謝物の取扱いに関する考え方が異なり、毒性試験の必要な代謝物の基準について一致していない。

2006年度の日本薬物動態学会年会¹⁴⁾では、薬物動態研究と毒性研究の連携をテーマに代謝物試験について討議された。このような議論において、医薬品開発にレギュラトリーサイエンスが果たす役割の重要性が認識された。同時に日本薬学会レギュラトリーサイエンス部会において2007年度より、産、

*1 日本製薬工業協会医薬品評価委員会基礎研究部会 東京都日本橋本町3-4-1 (〒103-0023)

*2 昭和大学薬学部 東京都品川区旗の台1-5-8 (〒142-8555)

*3 千葉大学医学部付属病院薬剤部 千葉県千葉市中央区玄鼻1-8-1 (〒260-8677)

*4 独立行政法人医薬品医療機器総合機構 東京都千代田区霞ヶ関3-3-2 (〒103-0013)

*5 米国研究製薬工業協会 東京都港区虎ノ門3-7-8 ランディック第2虎ノ門ビル4F (〒105-0001)

*6 国立医薬品食品衛生研究所 東京都世田谷区上用賀1-18-1 (〒158-8501)

*7 欧州製薬団体連合会日本支部技術委員会 東京都渋谷区千駄ヶ谷4-6-15 GSKビル (〒151-8566)

*8 共立薬科大学 東京都港区芝公園1-5-30 (〒105-8512)

官、学が集う「医薬品評価フォーラム」が設けられ、討論の場にアカデミアが参加することにより、新薬の承認審査に関して中立性・公平性を保ちながら、製薬企業と医薬品医療機器総合機構の担当者が実務面について議論できることとなった。この医薬品評価フォーラムのキックオフミーティングとして、2007年1月に代謝物の安全性評価をテーマとした意義深い討議が行われた¹⁵⁾。今回、本キックオフミーティングで討議された内容を中心に、今後の代謝物の安全性試験についての考え方と課題点を要約した。ただし、本稿は現時点での課題に対する考え方をまとめたものであり、科学の発展により考え方に更なる進歩が必要であることはいままでもない。なお、Journal of Toxicological Scienceにミーティングの詳細を報告する予定である。

2. 代謝物の非臨床安全性評価

医薬品の代謝物に関する毒性試験の実施について、現在のところ、本邦にガイドラインはなく、いわゆるケースバイケースの対応が行われている。そこで、代謝物の毒性試験が必要となるケースを検討した。

例えば、第2相反応の抱合代謝物のうち、グルクロン酸抱合体はアグリコンに大きな分子修飾がされることから、ほとんどの場合で親化合物より活性が低下する。そのため、抱合代謝物を用いた代謝物毒性試験の実施は一般的に不要と考えられる。

また、親化合物と同質の薬理作用を持ち、薬理活性が親化合物と比べ同等又は低い活性代謝物は、薬理効果の延長上にある毒性に関して親化合物の毒性試験で安全性の情報が得られていると考えられる。しかし、活性代謝物の持つ薬理活性が親化合物より強い場合あるいは親化合物と異なる薬理作用を有する場合は、「該当する薬理作用から想定される毒性は何か」、「ヒトで十分な曝露があるか」、「活性代謝物の血中濃度推移にヒトと実験動物で差があるか」などを考察する必要がある。更に、臨床的に、親化合物から予測できない副作用が認められ、代謝物との関連が強く懸念された場合には、代謝物の毒性プロファイルを見直す必要があるだろう。一方、反応性代謝物は毒性学上、活性代謝物の一種であり、代謝過程で生成する中間代謝物等で、他の生理的物質（タンパク質等）に共有結合を示すような反応性に富む代謝物を指す。このような反応性代謝物の安全

性評価では、最終代謝物の抱合体を実験動物に投与しても毒性を考える上では意味がないことがあり、代謝中間体として生成される反応性代謝物は化学合成も難しい。そのためマイクロソーム等の代謝系を組込んだ *in vitro* 毒性試験等も含め、目的に沿った試験を行う必要がある。しかし、臨床での有害事象と反応性代謝物の関連を推定することはなかなか難しいので、臨床での情報には十分注意する必要がある。

一般に親化合物の毒性試験で代謝物の曝露が既に確認されている場合は、基本的に追加の代謝物毒性試験は不要と思われる。しかし、代謝物の安全性評価を目的とした代謝物投与の動物試験において親化合物の臨床投与経路で投与しても十分な曝露量が得られない場合や、静脈内投与しても一過性の曝露しか得られない場合もあるので、投与経路、投与量、投回数等を変更する等の曝露量を大きくする工夫も必要となる。一方、体循環血での曝露がみられたとしても、血漿タンパク結合、膜透過性又はトランスポーターへの親和性等に関連して組織移行性を変化させる要因により、標的毒性部位の組織における曝露量が低下し、毒性を過小評価する恐れがある。そのため、代謝物の安全性評価に資する実行可能な試験を行う必要がある。

ヒト特異的代謝物については、親化合物の非臨床毒性試験の中ではその安全性を確認できない。しかし、ヒト特異的代謝物を検出した臨床試験での投与期間と曝露量までの範囲における安全性が示唆されたことになる。そのため、ヒト特異的代謝物の安全性評価は親化合物と異なる経緯をたどることとなる。見出されたヒト特異的代謝物は化学構造を同定し、ヒト血中濃度を測定する。この段階で構造-活性相関のデータから *in silico* による毒性予測を行うことも有用な場合がある。また、臨床試験の副作用情報からのフィードバックも重要であり、その結果を勘案して代謝物の安全性試験の追加も検討すべきであろう。

良質な医薬品を医療の現場に速やかに提供することは、患者さんにとって最も重要なことである。一方、臨床試験を安全に進めるためにも、非臨床試験は不可欠である。そのため、医薬品開発を行う上で、非臨床試験の実施のタイミングは重要である。初めてヒトに投与（First in Human/第I相臨床試験）する前では、探索段階として代謝安定性や活性代謝物

のスクリーニングを行い、頻度の低い、例えば、特異体質性薬物毒性 (IDT: Idiosyncratic drug toxicity)¹⁰⁾ を引き起こすようなリスクを含めて、これらを軽減するようにすべきかも知れない。第 I 相臨床試験では、ヒト試料を用いてヒトの主要代謝物を検索し、ヒト特異的代謝物の存在の有無を確認することが重要である。この場合、ヒト RI 試験は代謝物に関する有用な情報をもたらす。ヒトにおいて代謝物が関与する毒性が強く懸念される場合には、大規模臨床試験 (Phase III) 開始前までに代謝物の安全性に関する情報を精査しておく必要があると考えられる。また、毒性学的に問題となるヒト特異的代謝物が認められた場合には、第 II 相臨床試験の前までに代謝物の安全性を実験動物で確認し、申請までには、ヒト主要代謝物についての代謝酵素及び代謝経路の推定、構造の推定又は同定、ヒト及び実験動物での血中曝露の確認、薬理活性の推定、ヒト特異的であるか否かの確認と対応が必要である。

更に、市販後 (新薬発売後) 調査においては、日常診療下での医薬品の有効性、安全性の確認とともに、市販前 (治験) では得られなかった医薬品の適正使用についての情報の収集も注意深く行う必要がある。臨床現場で認められた有害事象については、公表されていない成績及び申請時に注目されていなかった成績についても関連性を精査する必要があると考えられる。

以上のように、代謝物の安全性評価は複雑な要因を考慮する必要があるため、たとえ代謝物の安全性試験が不要と判断される場合であっても、十分な説明が必要となるであろう。

3. まとめ

代謝物の安全性評価はひとつの理論的枠組みでの判断は困難であり、基本的にはケースバイケース的な対応が必要となるが、やはり何らかの共通の認識が必要と思われる。そのためには、コンセプトペーパーのような概念を作ることも有用であり、ある程度の柔軟性を持たせた考え方が医薬品開発、ひいては社会にとっても役に立つのではないかと考えられる。また、このような考え方を集約することは、ガイダンスの必要性に関する議論にもつながる。代謝物の安全性を的確に評価して、臨床試験において親化合物から予測できない副作用や代謝物に起因すると考えられる

症状も考慮しながら、代謝物の正確なプロファイルを把握する必要がある。また、代謝物の安全性評価については科学的に無意味な試験は省くことにより、良質な医薬品を医療の現場に速やかに提供することが重要と考える。

最後に、医薬品評価フォーラムの世話人の先生方、製薬協基礎研究部会タスクフォース 11, EFPIA, PhRMA の関係者の方々及び事務局の共立薬科大学の皆様にご挨拶申し上げます。

文 献

- 1) 新医薬品の製造 (輸入) 承認申請に際しての留意事項について、薬審第 526 号、昭和 50 年 3 月 28 日。
- 2) Ohno, Y.: Toxicity testing: Regulatory Perspectives. Proceedings of The First International Conference on Harmonisation. 1991 Nov.; Brussels, Belgium. Ed D'Arcy PFD and Harron DWG. The Queen's University of Belfast. 186-188 (1992).
- 3) Baillie, T. A., Cayen, M. N., Fouda, H., Gerson, R. J., Green, J. D., Grossman, S. J., Klunk, L. J., LeBlanc, B., Perkins, D. G., Shipley, L. A.: *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **182**(3), 188-196 (2002).
- 4) Hastings, K. L., El-Hage, J., Jacobs, A., Leighton, J., Morse, D., Osterberg, R. E.: *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **190**(1), 91-92 (2003).
- 5) Baillie, T. A., Cayen, M. N., Fouda, H., Gerson, R. J., Green, J. D., Grossman, S. J., Klunk, L. J., LeBlanc, B., Perkins, D. G., Shipley, L. A.: *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **190**(1), 93-94 (2003).
- 6) 医薬品研究, **34**(12), 794-795 (2003).
- 7) 井上忠志, 原田喜充, 古田 盛, 河村泰仁, 栗原厚, 黒川美佐男, 中澤隆弘, 佐神文郎: 医薬品研究, **36**(9), 388-397 (2005).
- 8) Guidance for Industry, Safety Testing of Drug Metabolites. FDA CDER Draft Guidance, Published in Federal Register, June (2005).
- 9) The note of guidance on investigation of drug interactions, Committee for Proprietary Medicinal Products, CPMP/EWP/560/95, 17, December, 1997.
- 10) Smith, D. A. Obach, R. S.: *Drug Metab. Dispos.*, **33**, 1409-1417 (2005).

- 11) Prueksaritanont, T., Lin, J. H., Baillie, T. A.: *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **217**(2), 143-152 (2006).
- 12) 非臨床薬物動態試験ガイドライン (平成10年6月26日医薬審第496号).
- 13) Guidance for Industry, Drug Interaction Studies—Study Design, Data Analysis, and Implications for Dosing and Labeling, FDA CDER Draft Guidance, Published in Federal Register, September (2006).
- 14) 第21回日本薬物動態学会年会 講演要旨集, 171-177 (11月29日~12月1日, 2006, 東京).
- 15) 医薬品評価フォーラム キックオフミーティング—画期的新薬を目指して：基礎から臨床へ— 講演要旨集, 社団法人日本薬学会 (1月13日, 2007, 共立薬科大学).
- 16) 山田久陽, 山口順一, 飯田 泉, 奥山 茂：日薬理誌, **127**, 473-480 (2006).

– Review –

CURRENT OPINION: SAFETY EVALUATION OF DRUG METABOLITES IN DEVELOPMENT OF PHARMACEUTICALS

Shinsaku NAITO¹, Shigeru FURUTA¹, Takemi YOSHIDA², Mitsukazu KITADA³,
Osamu FUEKI⁴, Takashi UNNO⁵, Yasuo OHNO⁶, Hiroshi ONODERA⁴,
Nobuyuki KAWAMURA⁷, Misao KUROKAWA¹, Fumio SAGAMI¹,
Kazutoshi SHINODA⁴, Takahiro NAKAZAWA¹ and Tsuneyoshi YAMAZAKI⁸

¹Japan Pharmaceutical Manufacturers Association, Drug Evaluation Committee, Non-clinical Evaluation Subcommittee,
Torii Nihonbashi Bldg., 3-4-1 Nihonbashi-Honcho, Chuo-ku, Tokyo 103-0023, Japan

²Showa University, School of Pharmaceutical Sciences,
1-5-8 Hatanodai, Shinagawa-ku, Tokyo 142-8555, Japan

³Chiba University Hospital, 1-8-1 Inohana, Chuo-ku, Chiba 260-8677, Japan

⁴Pharmaceuticals and Medical Devices Agency,
Shin-Kasumigaseki Building, 3-3-2 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-0013, Japan

⁵Pharmaceutical Research and Manufactures of America, 4F Landic II, Toranomon, Minato-ku, Tokyo 105-0001, Japan

⁶National Institute of Health Sciences, 1-18-1 Kamiyoga Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan

⁷European Federation of Pharmaceutical Industries and Associations Japan, Technical Committee,
GSK Bldg., 4-6-15 Sendagaya, Shibuya-ku, Tokyo 151-8566, Japan

⁸Kyoritsu University of Pharmacy, 1-5-30 Shibakoen, Minato-ku, Tokyo 105-8512, Japan

(Received June 19, 2007; Accepted August 2, 2007)

ABSTRACT — Safety assessment of drug metabolites in the development of pharmaceuticals was discussed in January 2007 at the kick-off meeting of a “Drug Evaluation Forum”, with reference to the views of clinicians and other academic representatives. Safety evaluation of metabolites cannot readily be based on a single theoretical framework, and basically a case-by-case approach is called for. These evaluations should be performed precisely and an accurate profile secured taking into account adverse reactions that are unpredictable from the parent compound administered in clinical studies and any signs or symptoms that may be associated with the metabolites. In addition, elimination of scientifically meaningless metabolite safety assessment studies is essential for prompt supply of high-quality drugs to the medical frontline. Preparation of an outline concept paper would be useful for achievement of shared understanding of issues of this type. Collective viewpoints obtained in this fashion are also relevant to the discussion on the need for guidance, and given a degree of flexibility may also be helpful for drug development and, in turn, society at large.

KEY WORDS: Drug Development, Metabolites, Active metabolites, Reactive metabolites, Safety, Non-Clinical Study, Clinical Study

INTRODUCTION

Information on pharmacokinetics in laboratory animals and humans obtained in the course of drug development is essential for clarifying *in vivo* toxicity mechanisms or pharmacological effects, as well as for

determining appropriate formulations and methods of administration. However, ethnic differences and individual variations in pharmacokinetics exist, and drug-metabolizing activity is affected by diverse factors. Comparative pharmacokinetic studies of animals and humans are useful for extrapolating the results of toxic-

Correspondence: Shinsaku NAITO (E-mail: naitousn@otsukakj.co.jp)

ity and pharmacological studies to humans and for determining drug efficacy and safety, as well as for predicting drug interactions when assessing individual variations in pharmacological effects or consideration to patients with hypersensitive reactions. However, while the results of toxicity studies and pharmacological studies in animals with pharmacokinetics similar to those of humans are valuable for extrapolating the results of animal experiments to humans, care is required in interpreting the results obtained in animal species when the metabolites differ significantly from those in humans. Discussion of safety assessment of metabolites is essential, and to this end this article aims to distil the viewpoints on this subject in order to promote understanding of the research undertaken by companies involved in drug development, the drug approval process, and the medical frontline. Such discussion should be useful for drafting of guidelines. However, this article is only a compilation of viewpoints on current issues, and it goes without saying that these should be updated as the science progresses.

The need to study the toxicity and pharmacological effects of major metabolites for safety assessment of metabolites in drug development was outlined in Japan in a notification from the Ministry of Health and Welfare in 1975 (Yakushin No. 526, 1975). However, this notification did not go so far as to indicate the specific studies required for safety assessment, but in general, metabolites have been assessed in single-dose toxicity studies. Since this notification can also be interpreted as requiring the assessment of all metabolites, at the ICH-1 held in 1991 the Japanese authorities suggested that toxicological assessment of metabolites is necessary when the metabolite is present in humans, but not found in animal species used in toxicity studies, when the metabolite is formed in particularly large amounts in humans, and also when the pharmacologic and toxicologic activity of the metabolite is considered significant (Ohno, 1992). However, the amount of metabolites formed that would necessitate safety assessment was not clearly defined. Such assessments in excess of the minimum have been made on a case-by-case basis by the tripartite authorities in the US, EU and Japan. The US Food and Drug Administration (FDA) and Pharmaceutical Research and Manufacturers of America (PhRMA) have since discussed the degree of metabolite formation requiring safety assessment (Baillie *et al.*, 2002, 2003; Hastings *et al.*, 2003). With reference to this background, the toxicity representative of the Pharmaceuticals and Medical Devices Evaluation Center in Japan presented views on the tox-

icological assessment of unique human metabolites from a personal standpoint (Toxicology Q&A: Question 16; Toxicological evaluation of unique human metabolites, 2003). In addition, a questionnaire survey of the members of the Japan Pharmaceutical Manufacturers Association (JPMA) found that toxicity studies of metabolites are a matter of great concern (Inoue *et al.*, 2005). Further, the FDA released in June 2005 a draft guidance concerning their views on safety testing of metabolites found in clinical studies (FDA CDER, Guidance for Industry, Safety Testing of Drug Metabolites (Draft). 2005).

In the draft guidance, the FDA provided definitions of terms such as unique human metabolites, pharmacologically active metabolites, and major metabolites. They also provided viewpoints on when it is deemed necessary to conduct a safety assessment of metabolites. Circumstances when the safety of metabolites should be considered included when the metabolites are unique to humans; or when they are formed in greater amounts in humans than in animals; or when they exceed 10 percent of (the lower of) the dosage or systemic exposure. The guidance also established the timing and method of performance of such assessments. The four types of metabolite toxicity studies requested by the FDA are primarily: (1) general toxicity studies with direct administration of metabolites (14- ~ 90-day dosing including toxicokinetic (TK) studies, with a modified route of administration); (2) the minimum necessary genotoxicity studies; (3) performance of studies on embryonic-fetal development; and (4) carcinogenicity studies when deemed necessary based on the results of the targeted indication or results from other studies. In addition, the FDA recommends that when metabolite exposure has been inadequate in studies such that safety has not been fully assessed in studies already conducted, a synthesized reference standard should be prepared and the safety of the metabolite assessed using a route of administration whereby adequate exposure can be obtained in an appropriate animal species. The results of these studies should be reported to the FDA prior to the commencement of Phase III clinical studies. The JPMA has submitted public comments on this draft guidance after compiling the views of its members. In particular, the JPMA has pointed to the inadequately clear rationale for the criterion for a major metabolite as being 10 percent of the dose or systemic exposure of the parent. JPMA has also commented on such matters as the cases presented in which the major metabolites in blood and urine differ or in which they do not reflect exposure at

the target site of toxicity, on cases of dosage discrepancies, and also on cases in which manifestations of toxicity are ascribable to the C_{\max} or AUC. However, as of January 2007, the FDA draft guidance has not been finalized.

The guidance from the European Medicines Agency (EMA) on drug interactions (CPMP/EWP/560/95, 1997) recommends that *in vitro* and/or *in vivo* drug interaction studies be conducted for metabolic pathways responsible for 30% or more of total clearance, and that studies may be required even for metabolites with lower levels of exposure that demonstrate toxicity or pharmacological activity.

At present, viewpoints on handling of metabolites vary among reference papers (Baillie *et al.*, 2002, 2003; Hastings *et al.*, 2003; Smith and Obach, 2005, 2006; Davis-Bruno and Atrakchi, 2006; Guengerich, 2006; Prueksaritanont *et al.*, 2006) and guidance documents from different countries concerning the safety assessment of metabolites (CPMP/EWP/560/95, 1997; Iyakushin No. 496, 1998; FDA CDER, Guidance for Industry, Bioavailability and Bioequivalence Studies for Orally Administered Drug Products - General Considerations, 2003, Safety Testing of Drug Metabolites (Draft), 2005, Drug Interaction Studies - Study Design, Data Analysis, and Implications for Dosing and Labeling (Draft), 2006). Opinions are divided on what the criteria should be triggering toxicity studies with metabolites. In Japan, as well, the FDA draft guidance has prompted consideration of the standards for safety assessment of major metabolites. Metabolite studies were discussed at Forum 2006 of the 21st Annual Meeting of the Japanese Society for the Study of Xenobiotics held in November 2006 (JSSX Annual Meeting Abstracts, 2006) with emphasis on collaboration between pharmacokinetic and toxicity scientists. The importance of the role played by regulatory sciences in drug development was recognized in such discussions. At the same time in early 2007 the Division of Regulatory Sciences of the Pharmaceutical Society of Japan established a "Drug Evaluation Forum" bringing together industry, government, and university representatives. Academic participation in the discussions allowed pharmaceutical companies and representatives of the Pharmaceuticals and Medical Devices Agency to discuss practical issues while maintaining neutrality and impartiality concerning the process of new drug approval. A significant industry-government-university discussion on the theme of the safety assessment of metabolites took place in January 2007 at the kick-off meeting of this Drug Evaluation Forum. The view-

points and issues regarding future safety testing of metabolites have now been compiled and are presented in this manuscript. The opinions were gleaned from the discussion at this kick-off meeting concerning the significance and method of metabolite safety assessment with a view to promoting the safety of drugs and identifying their effects in living subjects.

DRUG METABOLISM AND MANIFESTATIONS OF TOXICITY

Drug-metabolizing enzymes and problems associated with metabolites

In addition to exhibiting various effects, drugs administered to living subjects are in many cases excreted after being metabolized in the liver and other organs by enzymes associated with drug metabolism. There are ethnic, individual, gender, and other types of variation in drug-metabolizing enzymes associated with genetic factors, environmental factors and other factors such as clinical condition, concomitant medications, diet, and individual variability.

These considerations reveal major challenges to the safety assessment of metabolites in humans. Moreover, some adverse reactions or adverse effects occurring in humans are associated with the production of "reactive metabolites". However, since reactive intermediates are readily metabolized and may be present only as intermediates in the process of metabolism, it is often difficult to detect reactive metabolites and to supply stable synthesized reference standards. Therefore, in light of the factors exhibiting inter-individual variability referred to above, there are major difficulties with demonstrating the presence of reactive metabolites and with linking them to the mechanisms or manifestations of toxicity. In addition, although the safety of metabolites can in principle be assessed from animal experiments using a parent compound, there are cases in which quantitative or rate-related species differences exist in process of metabolism, or in which unique human metabolites and pharmacologically active metabolites (particularly reactive metabolites) are formed. These cases present significant challenges in assessing the safety of metabolites.

Although the substrate specificity of the CYP1, CYP3, and CYP4 families is relatively well-preserved in both humans and laboratory animals, the CYP2 family exhibits species differences due to its poor substrate correlation (Table 1). In addition, genetic polymorphisms are known to exist among drug-metabolizing enzymes, and effects such as the regulation of enzyme

induction or inhibition by exogenous or endogenous substances have also been identified. Furthermore, it is believed that some of these enzymes are affected by clinical conditions or diseases, concomitant medications, age, smoking, diet, and other circumstances of daily life.

Metabolic activation of drugs and manifestations of toxicity

Examples of metabolic reactions and metabolite formations that may lead to manifestations of toxicity are given in Table 2. In metabolic activation, toxicity is manifested as a result of radical formation (active oxygens, active nitrogens), modification of ribonucleic acids (mutagenicity, carcinogenicity), enzyme inhibition and induction, oxidative phosphorylation, electron transport chain inhibition, inhibition of the liberation or uptake of neurotransmitters (binding with transporters etc.), binding with or modification of receptors (receptor function changes), inhibition or acceleration of ion channels, and binding with or modification of proteins, lipids, and other components of living organisms. In addition, the formation of reactive metabolites (pharmacologically active metabolites linked to manifestations of toxicity) is involved in some adverse reactions, presenting a major challenge to the safety assessment of metabolites (Fig. 1). For example, *N*-acetyl-*p*-benzoquinone-imine, a pharmacologically active metabolite of acetaminophen, has been inferred to cause liver damage through allylation of mitochondrial proteins and other effects. Troglitazone, which has a chroman ring, may also cause liver damage through the formation of semi-quinone radical-mediated quinones and quinone methides in the process of oxidation reactions, as well as through the formation of α -ketoisocyanate by an oxidation reaction at the thiazolidinedione ring site (Yamata *et al.*, 2006). In cases in which glu-

tathione conjugates and acyl glucuronide conjugates are detected as metabolites, concerns exist regarding the possibility of reactive metabolite formation, since there have been cases in which manifestations of toxicity such as serious organ damage were triggered by highly reactive metabolites. Many of the drugs for which concerns exist regarding the possibility of relationships between reactive metabolites and liver damage have not been approved in the US, and of the drugs deemed to have reactive intermediates, five have had approval withdrawn or restrictions on use imposed, and another eight have had black box warnings added to their labels (Table 3). However, given the difficulty of assessing the safety of reactive metabolites despite the conduction of toxicity studies using the glutathione conjugate, acyl glucuronide conjugate, or other final metabolites, there is at present no clear basis for ascribing adverse events induced by such drugs to reactive metabolites. Given the difficulty in detecting reactive metabolite-induced adverse events in clinical studies, it is preferable to reduce the human risks associated with the development of compounds by screening for metabolic stability and pharmacologically active metabolites at the exploratory stage of drug development, and minimizing the development of compounds with reactive metabolites that may cause concern.

In a 2006 questionnaire survey sponsored by the Japanese Society for the Study of Xenobiotics, it was revealed that many pharmaceutical companies are making efforts to detect reactive metabolites through screening early to avoid developing compounds that could cause reactions associated with toxic effects of reactive metabolites. For example, companies perform experiments assessing time-dependent enzyme inhibition reactions; covalent binding to tissue, liver microsomal covalent binding, and GSH adduct formation. Such efforts at screening are expected to reduce

Table 1. Classification of Cytochrome P450 Drug-Metabolism Enzymes.

| |
|---|
| CYP1 Family: Two subfamilies (CYP1A1, CYP1A2, and CYP1B1 are expressed in humans): AhR-mediated induction of 1A, involvement in metabolic activation of carcinogens by epoxidation or <i>N</i> -hydroxylation, and so on |
| CYP2 Family: Many subfamilies (10 types of subfamilies are expressed in humans, including CYP2A, CYP2B, CYP2C, CYP2D, CYP2E, CYP2F, and CYP2J): Major enzymes for metabolism of various drugs with different structures as substrates for CYP2C9, 2C19, 2D6 |
| CYP3 Family: One subfamily; Induced by steroids and macrolide antibiotics; testosterone 6 β -hydroxylation is a prototype: CYP3A4, CYP3A5, and CYP3A7 exist in humans; CYP3A is the most abundant species in human liver |
| CYP4 Family: Four subfamilies, catalysis of ω -hydroxylation of fatty acids |

Safety evaluation of drug metabolites.

the risks associated with development of compounds that form reactive metabolites and that may trigger idiosyncratic drug toxicity (IDT, Yamada *et al.*, 2006).

Clinical problems concerning the manifestation of adverse reactions in pharmacotherapy

Concomitant use of drugs is a daily occurrence in medical practice, and the number of prescriptions given to an individual increases with age as well as the incidence of adverse reactions increases with age. Metabolic profiles vary significantly partly as a result of drug-drug interactions, suggesting that metabolites may also be involved in the manifestation of adverse reactions. Accordingly, while the properties of metabolites constitute essential information for the safe use of drugs, assessment of metabolite toxicity in humans should be based on properties such as the amounts of

metabolites formed or their activity.

The results of a meta-analysis published in 1998 by JAMA, (Journal of the American Medical Association; Lazarou *et al.*, 1998), found that serious drug-induced adverse reactions occur in approximately 2.2 million patients per year, and that of these patients as many as 100,000 suffer life-threatening adverse reactions. While the extent to which the toxicity of metabolites is involved in drug-induced adverse reactions is unclear, these reactions are recognized as a major clinical problem. Post-marketing "Dear Doctor Letters" written after the time of approval include reported adverse events occurring after the clinical trial stage and those events not previously identified or described as "severe adverse reactions". In the case of quetiapine fumarate, edaravone, pioglitazone HCl, cephocelis sulfate, and troglitazone, new and severe adverse reac-

Table 2. Metabolic reaction or metabolite production leading to toxicity.

| |
|--|
| <i>N</i> -hydroxylation (hepatic tumor induction by acetylaminofluorene, hepatotoxicity of acetaminophen, methemoglobinemia by aniline, and some others) |
| Epoxidation (induction of hepatic tumor or hepatotoxicity by aflatoxin, hepatotoxicity by bromobenzene) |
| Desulfuration (neurotoxicity by organophosphorus insecticides) |
| Aldehyde or ketone production (toxicity of ethanol, zomepirac, hexon, etc.) |
| α , β - Unsaturated aldehyde or ketone production (toxicity of acrolein, benzene, 4-hydroxynonenal, etc.) |
| Quinone or quinoneimine production (toxicity of acetaminophen or diethylstilbesterol) |
| Sulfoxide production (hepatotoxicity of thioacetamide) |
| Acyhalide production (toxicity of halothane or chloroform) |
| Thionoacylhalide production (renal toxicity of hexachlorobutadiene) |
| Thioketene production (renal toxicity of hexachlorobutadien) |
| Radical production (hepatotoxicity of carbon tetrachloride or halothane) |
| Carbonium ion production (carcinogenesis by nitrosamine compounds, induction of hepatic cancer or hepatotoxicity by cycasin) |
| Nitronium ion production (carcinogenesis by acetylaminofluorene) |
| Sulfonium ion production (carcinogenesis by 1, 2-dibromoethane) |
| Metal ion production (renal toxicity of mercury or cisplatin) |

tions not noted during the clinical trial stage were subsequently observed in the post-marketing database. In addition, even when the metabolites themselves lack toxicity, interactions in the processes associated with metabolism can sometimes trigger life-threatening drug interactions, e. g., concomitant administration of

5-FU with sorivudine.

To ensure appropriate use of drugs, it is essential to identify fully both factors associated with the drug such as drug receptors, metabolic enzymes, drug transporters, and those that predispose patients such as genetic factors (gene polymorphisms), environmental

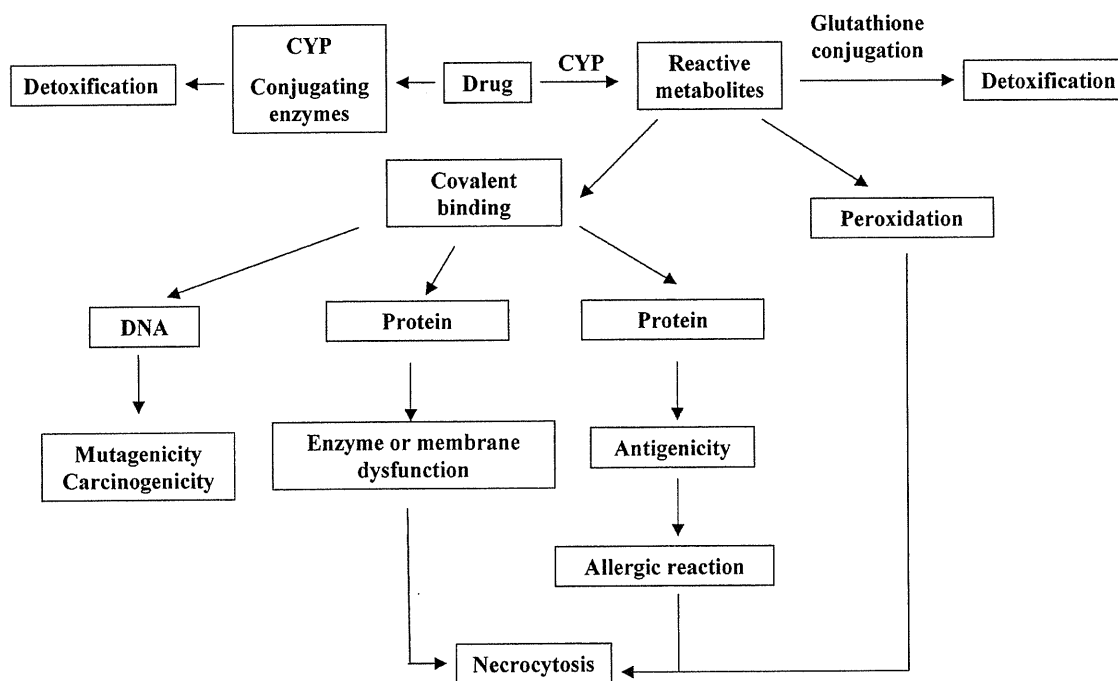


Fig. 1. Metabolic activation and development of toxicity by drugs and chemicals.

Table 3. Hypothesis of Hepatotoxicity of reactive metabolites.

Fourteen drugs with reactive metabolites that have warnings regarding hepatotoxicity

Acetaminophen, Carbamazepine, Clozapine, Diclofenac, Disulfiram, Halothane, Leflunomide, Methyldopa, Rifampin, Tacrin, Tamoxifen, Terbinafine, Ticlopidine, Zileuton

Fourteen drugs with reactive metabolites that have warnings regarding hepatotoxicity & have never been approved in USA

Alpidem, Amineptine, Amodiaquine, Cinchophen, Dihydralazine, Dilevaolo, Ebrotidine, Glafenine, Ibufenac, Isoxanine, Niperotidien, Perhexiline, Pirprofen, Tilbroquinol

Five drugs withdrawn or with restrictions on use due to reactive metabolites

Benoxaprofen, Iproniazid, Nefazodone, Tienilic acid, Troglitazone

Eight drugs with black-box warnings due to reactive metabolites

Dacarbazine, Dantrolene, Felbamate, Flutamide, Isoniazid, Ketoconazole, Tolcapone, Valproic acid