

### 3. ESTR I勧告—電子文書

ICHではM2専門家会議が医薬品規制情報の基礎的電子標準（ESTRI）を勧告している。時代の進展に伴う技術的変化などから、同勧告は改定を重ねてきた。電子文書として満たすべき要件と、これを満たす一例としてPDFがあげられていたが、2011年4月にISO 32000-1（PDF1.7）を電子文書の書式として勧告した。

#### 3. その他

##### (1) 臨床・非臨床段階での評価に資するバイオマーカーについて（高橋、大野）

医薬品開発段階で用いられ得る安全性評価のためのバイオマーカーについて、22年度に引き続き心臓毒性、筋肉毒性、及び神経毒性を対象に文献調査した。また、新たに、肝障害・肝脂肪化、肺炎及び血管炎、精巣毒性に関するバイオマーカーについても文献調査を行った。その結果、心毒性マーカーに関しては、昨年同様Tn、H-FABP、BNP等が報告されていた。メタボロミクスやmiRNA検討による新規物質の報告も散見されており、今後の詳細な検討により理想的なバイオマーカーになる可能性がある。筋肉・神経毒性マーカーに関しては、ヒト臨床研究報告があるが、非臨床での検討は昨年同様に乏しかったが、筋肉毒性マーカーとしてfnTnIが注目された。23年度で新たに検討した肝障害マーカーとしては、逸脱酵素及び逸脱miRNAの報告があった。いずれの項目も、特異性や変化率の大きさに特徴があり、古くから知られているマーカーよりも肝障害を明確に検出できる可能性がある。肝脂肪化マーカーとしては、脂肪化に伴う炎症に関連した炎症系サイトカインについての報告がみられた以外では、脂質代謝の変動に関連したケモカインの報告があった。肺炎及び血管炎のマーカーとして、臨床で既に利用されている炎症バイオマーカーは、炎症の部位、病因及び進行度の特定までに至っておらず、病態特異的なマーカーではなく、診断の補助的役割に留まっている。精巣毒性のマーカーとしてのInhibin B及びFSHの血中濃度の変化は精子形成の異常を反映する可能性がある。その他のホルモンによる精巣毒性の検出感度は病理組織学的検査ほど鋭敏ではないと考えられた。

Creatineの尿及び血液中の生化学的指標の測定によっても精巣毒性の検出が可能であると考えられた。精巣毒性の発現に伴い増加する組織中の特異的蛋白質は、組織変化が生じない用量でも短時間で変動し、精巣毒性を鋭敏に検出できる可能性が示された。精巣毒性物質投与後の精巣特異的なmiRNAの変化は、病理組織変化に伴って変動することが示された。また、精子の酸化ストレスに関連したマーカーやSP22は、精巣毒性の発生を反映している可能性があり、非侵襲的に得られる試料を用いたバイオマーカーとして有用である可能性が示された。

##### (2) 生体試料中の被試験物質分析法のバリデーション（BMV）について（香取、大野）

###### 日本におけるBMVの現状

日本で出された分析法バリデーションの手順を詳細に記述した行政文書は、「分析法バリデーションに関するテキスト」（薬審第755号）が唯一のものだが、これは原薬・製剤の品質試験を念頭に置いたものであり、生体試料中の薬物濃度分析には対応していない。日本におけるBMV関連の最初の文書は、1995年に製薬協が作成した「トキシコキネティクス（TK）試験における生体試料中薬物濃度の測定に関する手引書（分析法バリデーション）」と思われる。なお、1998年に出された「非臨床薬物動態試験ガイドライン」（医薬審第496号）には「定量の方法及びその真度、精度、特異性、定量限界等を明確にする」とあり、TK試験においてはバリデーション報告書の最終化が必要である。同じく、1998年に出された後発医薬品の生物学的同等性試験ガイドラインのQ&Aには、1992年のFDAとAAPS共催シンポジウムの報告書が引用されている。また、2001年に出された「医薬品の臨床薬物動態試験について」（医薬審発第796号）では項目2「薬物の定量分析」において、分析法バリデーションについて述べられている。しかし、これらの分析法に関する記述内容は概念的なものであり、具体的な手法等については述べられていない。なお、FDAが推奨している実サンプルを用いた再現性試験、ISR（incurred sample reanalysis）についてはすでに取り入れている企業が少なからずあることが示されたが、ジェネリック製薬会社については、ま

だ認知度は高くない。

## 海外のBMVガイドライン

FDAが2001年に出した“Guidance for Industry : Bioanalytical Method Validation”は、それまでの米国国内での産官学の議論を集約したもので、生体試料中の定量分析を行う上において、現在に至るまで当局への申請資料作成の際の参考として全世界で使われている。2007年には、BMVの信頼性をより高め、かつ最新の分析技術を取り入れた案を提示する目的で、AAPS/FDA White Paperが出された。ここに挙げられたISRは、日本の製薬企業の薬物動態の関係者に大きな衝撃を与えた。国内ではISRに対しての意識は高いものとは言えなかったが、北米ではAAPSなどで、その方法論や意義などについて、FDAなど行政当局を交えて、盛んに議論が行われていた。

EMAからは2011年にBMVガイドラインが発出された。

## 日本版BMVガイドライン作成

第1回の打合せ会議で、JBFにガイドライン素案の作成を依頼することが決められた。依頼するにあたりガイドラインの適用範囲は低分子化合物のLC分析とされた。これは、バリデーションに必要な項目は低分子分析にすべて含まれており、ICH Q2Aの概念を基本としていること、また、高分子の特に免疫学的測定法（LBA）に関しては議論に時間がかかることが予想されたためである。依頼を受けたJBFからは、まず第2回の打合せ会議までに項目名が出され、続いて平成24年3月末にはガイドライン素案とQ&A案が提出された。

## D. 考 察

### 1. 医薬品の安全性に関する非臨床的研究

(1) 遺伝毒性試験の国際的協調に関する調査研究：  
考察は特でない。

(2) バイオ医薬品の非臨床安全性試験について〔平林〕

バイオ医薬品の非臨床安全性試験法に関するS6ガイドラインの補遺の作成に際しては、動物試験によってヒトでの安全性を担保する上で有効な情報を与えうるか否かという観点から見直しを図り、他の

なんらかの手段によって得られる場合や試験によって得られることが期待される追加情報が多くは期待されない場合は試験を推奨しないこと、及び使用動物数の削減に配慮することとしてまとめることができた。これは「僅かでも非臨床試験で解ることがある場合は試験を行う」というこれまでの考え方を否定するものであった。動物愛護の所謂3Rsのうち代替法の利用（replacement）については、現状で取り上げるべき有効な方法が確立していないことから、今後の試験法の開発を期待する旨の記載にとどめられた。

(3) 光安全性試験について〔小野寺、中江〕

光安全性試験に関わるガイドライン作成に向け、皮膚科専門医にインタビューを行いPhRMAのDr. TresslerとDr. Uemuraから光毒性評価の現状について報告を受けた。その結果、本ガイドラインでは安全性評価を対象とし、臨床に関する項目は扱わないとした。また、光毒性試験実施の必要性の判断は階層的アプローチで行うとし、対象とする投与経路は全身経路と経皮および眼局所に限定した。また、眼科用局所製剤の非臨床安全性評価の現状調査と国内でのROSバリデーションを実施した。各地域での眼科局所剤に対する対応について違いがあることが判明し、これを踏まえセビア会議で協議に臨んだ。また、最終ドラフト案を作成するため意見を収集した。セビア会議では光毒性と皮膚3次元モデルについて、製品によって特性が異なり評価が困難な場合や、製剤の形状によっては適さない事や、アレルゲンに対しては反応しないことが特徴であるとされた（Dr. Helena）。その後の会議を経てStep 1文書が作成された。

(4) がん原性試験について〔中江〕

1. がん原性試験スキームの変更について

FDAは、NEG CARC基準について、早い段階から、発がんに関係ないsignalを試験実施のトリガーとする場合があることと、および遺伝毒性の判断基準に科学的な問題があることから、病理診断に重きを置いて修正すべきであると主張していた。遺伝毒性については、本研究グループも、NEG CARC基準がコアバッテリー試験のうちいずれかの試験で陽性結果

が得られた場合に陽性と判断しており、医薬品の遺伝毒性試験に関するガイダンス（S2（R1）ガイドライン）に基づく遺伝毒性の総合評価とは異なっていることに懸念を抱いていた。さらに、S2（R1）ガイドラインではコアバッテリー試験の組合せを変更することも可能となっているので、NEG CARC基準に基づいたS1Aガイドライン等の改訂が現実化する際には、その基準を適用する場合の遺伝毒性の評価方法と試験の組合せについて規定しておく必要がある。なお、遺伝毒性に関しては、FDAが言及している遺伝毒性陽性代謝物に対する懸念についても、今後検討が必要になる可能性がある。

NEG CARC基準の根本的な問題点のひとつは、偽陰性例の存在であり、それを許容可能な程度に低減する方策が必要である。これについては、FDAも同意見であり、偽陰性となった医薬品について将来問題とならない確証がないことと、NEG CARC基準が適応されるとそれ以降に偽陰性の発生が検出されなくなることに、懸念を表明している。この点に関して、JPMAメンバーは、病理組織学的試験とホルモン作用の検討を詳細に行うことにより偽陰性率を低減できると主張している。

ホルモン作用は、事前に検出できない場合もあり得る。NEG CARC基準を適用してラットがん原性試験を省略するに当たり、確実に増殖性変化やホルモン作用を検出できるようにするためには、一般毒性試験や生殖発生毒性試験等に必要な検査項目を追加することを検討する必要がある。ひとつのアイデアとしては、スクリーニング検査として、ヒト試料を用いて各種成長因子やホルモン分泌への影響やトキシコゲノミクス等の検討を必須とすることも考慮してよからう。ホルモン作用について一般毒性試験および生殖発生毒性試験等で検討する時期、並びに評価項目を定義しておく必要がある。

本研究グループは、上記に加えて、いくつかの懸念を抱いている。たとえば、がん原性試験の省略により検出できなくなる晩発性の非腫瘍性病変がある可能性がある。さらに、本件においては、レトロスペクティブな解析しかなくならず、プロスペクティブな解析も含めた、詳細な検討が、今後必要で

ある。

ICH S1A（I）WGにおける議論の過程で、EMAから、NEG CARC基準だけでなく薬理作用を考慮し、発がん性陽性は主に薬理作用に、発がん性陰性は主に反復投与毒性試験病理組織学的所見に、それぞれ基づいて判断するという提案があった。さらに、薬理作用から発がん性が予測される場合に、ラットがん原性試験を実施せずに注意喚起で対応してもいいとの立場を表明した。しかしながら、FDAは、薬理作用を発がん性と関連してどのように分類し、発がん性の予測に活用するのかが不明であると述べた。本研究グループとしても、いわゆる「off-target作用」による発がんの懸念等が存在するため、簡単にEMAに同意できない。また、JPMAメンバーは、前述の通り病理組織学的試験とホルモン作用の検討を詳細に行うことにより偽陰性率を低減できるという考えなので、NEG CARC基準に薬理作用を追加する必要があると主張した。一方、PMDAメンバーは、PhRMAおよびJPMAにより実施されたがん原性予測に関する検討が企業からのアンケート調査を基にしたデータベースを用いて実施されており、それゆえ、薬理作用等から予測ができず発がん機序が不明である化合物がデータベースに含まれていない可能性があるため、そこから導かれたNEG CARC基準に基づく発がん性予測の偽陰性率を低減するための判断基準に薬理作用を追加することについては慎重に検討する必要があると主張した。

なお、薬理作用から発がん性が予測される場合にラット2年間がん原性試験を実施せずに注意喚起で対応しても良いとするEMAの提案とNEG CARC基準とを両立させる場合、たとえば以下の様な決定樹が想定できる。

- ① 各被験薬について、薬理作用から発がん性の懸念の有無を判断する。
- ② 薬理作用から発がん性の懸念がある被験薬の場合
  - 2年間がん原性試験を不要として、適切な注意喚起で対応する。
  - 2年間がん原性試験を実施する。
- ③ 薬理作用から発がん性が予測されない被験

薬の場合、NEG CARC基準を適用して2年間がん原性試験の可否を検討する。

この決定樹における問題点は、薬理作用から発がんの可能性を表示してラットがん原性試験を省略した場合に、当該薬理作用以外の機序による発がん（off target薬理作用／毒性による発がん）が見落とされる可能性があることである。しかし、薬理作用による発がんリスクが想定される場合でも、慢性毒性試験等の所見から、それ以外の発がんの可能性が示された場合、すなわち、薬効標的以外の部位に増殖性病変が認められた場合等にはラットがん原性試験を必須とする規定を加えることにより、off target発がんを見逃す危険性が回避できると考えられる。この修正により、薬理作用による発がん予測とNEG CARC基準による発がん陰性の予測が矛盾なく統合できると思われる。しかしながら、本修正スキームにおいても、NEG CARC基準の本質的な課題は解消されておらず、偽陰性例に発生する腫瘍の毒性学的意義の評価・検討およびがん原性試験を省略する場合の追加試験の必要性等については引き続き検討する必要がある。

なお、PMDAにおける審査においてラット2年間がん原性試験で腫瘍性病変が認められた場合、発がん機序・用量反応性・安全域も検討した上で承認可能と判断する場合もあったが、ラット2年間がん原性試験を実施しないと、上記のようなリスク評価ができなくなる。従って、PMDAメンバーは、発がんリスクとのトレードオフが成り立つような疾患領域の治療薬に限定される場合のみ、薬理作用から発がん性の懸念がある医薬品についてラット2年間がん原性試験を実施せずとも承認できる可能性もあるとし、そうした疾患領域に限定するという選択肢もあると述べた。また、同メンバーは、がん原性試験の可否の判断基準に、その薬剤のClass effectを考慮すべきか否かについても慎重に検討する必要があるとあり、first-in-classの薬剤についてがん原性試験を必須とし、second以降について不要と判断することには、公平性の観点から問題があるとも指摘した。

ICHにおける日本側メンバーは、本研究グループにおける以上の研究成果に基づいて主張を行った。

その結果、上記成果の多くは、修正concept paperおよびbusiness planに反映された。たとえば、がん原性試験の省略により検出できなくなる晩発性の非腫瘍性病変があるという懸念について、修正concept paperおよびbusiness planは、S1Aガイドライン等の改訂において、場合によってM3（R2）ガイドラインや反復投与毒性試験法ガイドライン（S4/S4Aガイドライン）に影響する可能性を指摘している。

## 2. 関連情報の収集・解析について

医薬品添付文書を用いた検討により、NEG CARC基準に基づいてラット2年間がん原性試験を省略することへの懸念が示唆される事例を見出した。したがって、ラット2年間がん原性試験を省略するか否かは、より厳重に判断されるべきであり、NEG CARC基準にどのような条件を加えるべきかさらに検討することが必要である。今後は、たとえば開発中止事例なども含めた総合的な解析など、様々な観点から検討を続ける方針である。

### (5) *In vitro*光毒性試験について〔小島〕

皮膚三次元モデルを用いた光毒性試験についてはプロトコルの改良余地があり。本モデルをICHガイドラインに加えることはもちろん、議論することは時期尚早であるとする。

### (6) ワクチンの非臨床ガイドライン策定に関する調査研究〔松本〕

今回作成した「治療用ペプチドワクチンのための非臨床試験に関するコンシダレーションペーパー案」は、将来、治療用ワクチン非臨床試験のためのガイドラインについて国際的整合化を図るための有用な出発点になるものと期待される。なお、「感染症予防用ワクチン」のための非臨床試験ガイドラインの国際的整合化に関することとして、2012年10月に“WHO written guidance on nonclinical and preclinical evaluation of adjuvanted vaccines”が策定されることがWHOより表明された（2011年9月）。

### (7) 医薬品・治療薬の有効性及び安全性に係わる製造・品質管理・評価技術に関する非臨床研究〔奥田、安藤〕

ICH Q11ガイドラインはQ-トリオ（Q8-10ガイドライン）の原則を踏まえて作成されているが、いくつ

かの事項に対しては、より詳細な解説が加えられている。即ち、

- 知識管理 (ICH Q11) として、プラットフォーム製造 (同一の申請者が同じタイプの他の医薬品を製造するために使用したことがある、同様の製造工程からなる新医薬品の製造戦略に関する開発の方法論) の概念が追加された。
- 上流における管理に基づく管理戦略の事例が具体的に設定された。
- デザインスペースの事例として、科学的原理に基づく設定事例が提供された。
- プロセス・バリデーションの方法は一律ではないことが示された。
- ライフサイクルマネジメントに関しては製造工程の能力は定期的に評価すべきであること、また、将来の変更提案を見越した初回申請事例が提供された。
- 出発物質はQ11特有の事項であるが、選定の原則が示されるとともに委託合成と市販品を区別すべきであることが提唱された。

Q11が完成し、原薬においてもQbDアプローチが推奨される枠組みが完成した。現在、米国と欧州では「EMA-FDA pilot program for parallel assessment of Quality by Design applications」がスタートしている。このプログラムは、Q-トリオガイドラインを両地域で差異なく実施し、新しい規制の考え方の適用情報を共有することなどを目的とし、いくつかの申請品目に関してQbDに関連した品質部分の評価を並行して実施することを目的とする。当然、原薬も対象となってくるものと思われる。我が国もこのプログラムにオブザーバーとして参加しており、継続的に本ガイドラインの円滑な実施のための努力が必要である。

がんの免疫細胞療法に用いられる最終調製物 (細胞製剤) の有効性及び安全性の評価は、臨床試験により検討されているところであり、今後さらなる研究が行われることにより、その有効性及び安全性、また有用性が明らかにされるであろう。臨床試験を実施する際には使用される最終調製物の品質を一定に管理する必要があるが、その製造工程に培養工程

を含むため一般的に品質管理が難しい。また、製造は医療機関が中心となるため特に製造管理者の医薬品等の製造の知識や経験が十分ではない機関では、製造施設の構造設備は一定の基準は満たしているにもかかわらず、最終調製物の品質が十分に担保されていない可能性もある。

最終調製物で適切な検査項目を設定することにより最低限の品質確保は可能と考えるが、今後の課題として、高度医療として実施されているがんの免疫細胞療法に用いられる最終調製物の品質管理を適切に行うためには、既存の指針等を参考にし、がんの免疫細胞療法に用いられる最終調製物の製造方法の考え方を、指針として示していく必要がある。

(8) 遺伝毒性不純物について [本間、阿曾]

ICH-M7ガイドラインStep 1文書については各パーティ内でのレビュー作業が進められている。Step 1文書において、新規医薬品添加剤が適用範囲に含まれることになり、「新規添加剤とは3極において初めて医薬品に使用される添加剤」と定義された。しかし、日本の規制においては海外において承認された添加剤であっても日本で初めて申請される場合は新添加剤として取り扱われるため、新規添加剤を適用範囲に含めるかについてさらに議論が必要である。また、ICH-Q3A/Bで適用範囲外であるペプチド、オリゴヌクレオチドに関しては化学的に合成されるものについては適用範囲に含めるべきではないかとのコメントがあり、適用範囲に含めるあるいは除外するための合理的な理由の整理が必要と考えられる。

SARによるハザード評価に関してはStep 1文書においては「信頼性の高い一つのIn Silico Systemで構造アラートの有無を調べる。」こととされていたが、FDAが最低でも2種類のQSARが必要とコメントがあった。今後、議論が必要と考えられる。

臨床初期段階 (Phase I) でのDNA反応性不純物のリスク評価に関して、Step 1文書では、Phase Iでの不純物の遺伝毒性評価は不要であり、原薬についてのエームス試験により、不純物の変異原性は評価される内容としたが、これに反対するコメントがあり、この点についての議論も必要と考えられる。

今後、上に述べた論点について論議を行い、2012

年でのStep 2、2013年でのStep 4を目指す。

(9) 重金属不純物に関する毒性学的ならびに薬剤学的研究：金属不純物に関するQ3Dガイドラインについては、品質チームと安全性評価チームによる効率のかつ集中した各局専門家の共同作業により、短期間でQ3Dプレ Step 2文書を完成することができた。今後、関係者による内部レビューとそれに対応した改訂を経て、福岡会議でStep 2文書が合意される予定である。

## 2. 医薬品の有効性・安全性に関する研究

### (1) 小児治験ガイドラインについての研究〔中村〕

小児治験におけるアセント文書統一フォームについては、それをもとにすでに各施設で各治験に応じたアセント文書作成が行われている。それらについての各施設のIRBからの指摘や、専門家の意見も踏まえて、ようやく公開可能なフォームにたどり着いた感がある。4施設共同で作成・改訂作業を行ったことにより、単施設の見解に偏ったものではなく、広く認識してもらえる統一フォームの検討が行えたと考えている。さらに、利用者からのフィードバックを受けて、記載整備や付随資料の検討を進めていきたい。

小児医療施設CRCとの意見・情報交換に関しては、「小児CRCの会」の参加者の施設数は年々増加しており、小児治験ネットワーク等の活動によりCRCの間での小児治験に対する認知度が高まっていることがうかがわれる。今後も継続的に実施し、現場での問題点や取り組みなどを、ガイドライン検討に反映させていきたい。

EMAの「小児集団における医薬品開発での薬物動態の役割に関するガイドライン」は、あくまでアドバイス（推奨）の扱いとされている。しかしこれまでに作られた、例えば、米国の小児薬物動態（PK）ドラフトガイダンス（1998）等と比べてもpopulation PKやPK/PD simulationについて、より踏み込んだ記載がみられた。シミュレーションまたは理論的最適デザインアプローチ等を、EMAが積極的に取り入れていることがうかがわれる。

EUのガイドライン「小児集団を対象に実施される医薬品の臨床試験における倫理的配慮について」は、

EUのGCP履行に関するDirective 2001/20/ECの実施のためのガイドライン作成を目的としたアドホックグループにより作成されており、規制当局としてどのような取扱いをしているのかが気になるところである。内容的には、FDAの規制内容と類似している点も多い。採血量等については「エビデンスがない」ことから、今後さらに見直しが必要であることがうかがわれる。一般論的な記載が多く、今後EMAの小児委員会等による、具体的な臨床試験デザインの検討を踏まえて、実際の配慮点などが明らかになるであろう。FDAのスピルバーグ副長官は、場合によってはICH E-11の改訂も考えるべきであろうとの考えをお持ちであり、もし実際に改訂作業が行われる場合は、これらガイドラインの内容等も踏まえた検討を進めたいと考えている。

### (2) 医薬品情報の標準化—欧米の動向とICH標準に関する考察（岡田）

SDOプロセスでは、要件定義を行うICH、規格開発の主体であるSDO、国際規格制定団体であるISOの3つのプロセスが同時に進行する。開発の鍵を握るのは、規格開発の主体となるSDOである。要件に適う規格を円滑に開発するには、SDOと連携し、時宜を得たテストとフィードバックを行うことが決定的に重要である。

SDOプロセスについては、プロジェクト終了後の事後の評価も必要とされており、2011年度にプロジェクト開始時点における評価基準を再検討したところ、現時点でも各基準が適応可能であることを確認した。今後、各プロジェクトが終了した時点で、評価基準に基づいて具体的な評価を実施することが必要である。

ISO規格が制定された後は、必ず規格改訂の必要が生じるが、ビジネス要件はICH以外に把握しておらず、質の高い国際規格の維持のためにはICHの活動を通じた貴重な知識・経験を蓄積・維持・活用される仕組みが必要である。

医薬品規制情報の電子標準として重要な領域の一つの電子文書がある。ICHでは電子文書書式の要件を定義し、一例としてPDFをあげていた。これに対し2008年にPDF1.7がISO 32000-1として制定された

ことを受け、2011年にはISO 32000-1を電子文書の書式として勧告した。しかし、ISO 32000-1に含まれない拡張が、既に製品版ソフトウェアには組み込まれている。また新規にISOで審議されているISO 32000-2でPDF1.7の拡張が検討されている。エンドユーザーにとって身近なのはソフトウェア製品であり、ISO規格として勧告した上は、ISO規格と製品版との関係を明示する必要がある。

### 3. その他

#### (1) 安全性および有効性バイオマーカーに関する調査研究〔大野、高橋、宇山、熊谷〕

現在、PMDA、FDA、EMAのいずれも医薬品の開発を加速するためバイオマーカー利用に積極的な姿勢を示しており、肝障害、血管炎・肺炎に特異的バイオマーカーあるいは精子の質や受胎能を示すバイオマーカーを見出す取り組みが行われている。このような積極的なバイオマーカー探索により、多くのデータが集積されてきた結果、組織変化に先立ち変動するバイオマーカーも見出されつつあり、より早期の副作用・毒性の把握が期待されている。なお、我が国で行われたトキシコゲノミクスプロジェクトより30を越える肝あるいは腎臓の毒性を予測するバイオマーカーが抽出されており、その基礎となるデータが公開されたことから、その積極的な活用が望まれる。

今後の課題として、最新の技術を駆使したバイオマーカーの探索を継続し、感度及びスループットを向上させた質の高い測定系を確立する必要がある。また、新規のバイオマーカーは、科学的検証によりその堅牢性の十分な確認が必要で、その確認のため、ヒトや実験動物の適切な試料を採取しデータを積み重ねるべきである。これまでのバイオマーカー探索の歴史を考えた場合、1測定項目で毒性発現臓器や病変の進行度を特定できるような極めて特異性の高いバイオマーカーが存在する可能性は低く、堅牢性の確認には、毒性がみられた臓器・組織・部位、病因及び進行度を特定することができるバイオマーカーパネルの考え方も重要と思われる。その他、バイオマーカーパネルで副作用・毒性を検出しようとする場合、多項目の変動シグナルを正確に解析するた

めの統計学的手法も検討されることが望まれる。

#### (2) 生体試料中の被試験物質分析法のバリデーション (BMV) について (香取、大野)

BMVに関して何の規制文書も持たない日本は、今後PK、TKデータの信頼性を担保することが困難になると予想される。さらには、MRAを締結しているEUにおいては、日本でGLP認証した施設の受入を、BMVガイドライン無しの状況で今後も是認してもらえるかなどの懸念もある。このままの状態を続けることは、医薬品開発における安全性有効性を担保するという見地からも、好ましくない。日本においてもBMVガイドライン策定に関して早急な取り組みが必要である。また、今回準備されたガイドライン素案の適用範囲外である高分子についてもなるべく早く検討を開始することが必要である。

### E. 結論

米国の反対で停滞していた遺伝毒性試験についての指針 (ICH-S2 (R1)) が国際的合意に到達した。

バイオ薬品の安全性評価に関するS6ガイドラインの明確化と拡充の為の補遺の策定を支援する目的で、国内研究の協力を得て、国際的な合意に向けて必要な調査研究を進め、S6 (R1) EWGにおけるS6ガイドラインの補遺案を策定し、国際合意文書を完成させた。

光毒性非臨床安全性試験ガイドライン策定を目的にICH S10での議論を行い、国際調和に向けた国内準備とその対応を行い、専門家の間でのStep 2合意到達に向けたメドがついた。

がん原性試験実施に関わるスキームの変更については、ICH S1A (I) WGにより、S1Aガイドライン等の改訂に関する検討の正式なトピック化と専門家ワーキンググループの設置が提言され、ビジネスプランとコンセプトペーパーが提出された。本件は、状況によって、S1Aガイドラインのみに留まらず、複数のガイドラインに影響する可能性がある。なお、NEG CARC基準に基づいてラット2年間がん原性試験を省略することへの懸念が示唆される事例もあり、ラット2年間がん原性試験を省略するか否かは、より厳重に判断されるべきであり、NEG CARC基準

にどのような条件を加えるべきかさらに検討することが必要である。

三次元培養表皮モデルを用いた光毒性試験については、有用なデータは揃っているものの、十分バリデートされている状況ではなく、ICH会議における議論も時期尚早であると考えた。

ワクチンの構成要素のうち②の治療用ワクチンに焦点を当て、「治療用ペプチドワクチンのための非臨床試験に関するコンシダレーションペーパー案」の作成を行った。

遺伝毒性不純物に関するICH-M7ガイドライン策定のため、その適用範囲の明確化、構造活性相関(SAR)、リスクレベルの緩和策、製造方法の管理と製品の品質管理、変異原性不純物の管理、製造工程と製品中の不純物の評価、不純物の管理、ドキュメンテーションについて議論し、Step 1文書を完成させた。現在Step 2文書策定へむけ、意見の集約が行われている。

金属不純物に関するQ3Dガイドラインについては、プレStep 2文書を完成することができた。

小児治験におけるアセント文書の内容について再検討し、プラセボや説明デザインの修正、文書構成や表現の再検討等を行い各施設のウェブサイトで公開することとした。EMA及びEUの小児集団における医薬品開発のためのガイドラインの内容について調査・検討を行った。

SDOプロセスにおいては要件定義を行う団体(ICH)と、開発を担う団体(SDO)、国際規格を制定する団体(ISO)、これらの中で連携、シンクロナイズをはかりながら進めるという非常に複雑な流れとなっている。ICH要件に適うISO規格化を達成するには、開発主体であるSDOとの連携、時宜を得たテストとフィードバックが決定的に重要である。また、各プロジェクトを事後的に評価し、得られた知識・経験が蓄積され、次のプロジェクトに反映され、改善させていく仕組みが必要である。また、国際規格団体による開発を行ったことにより、メンテナンスのプロセスが複雑になる。IGには規格の一部、実際の使い方の説明、コードリスト、XMLスキーマ等が関係しており、IGの作成においては、いかなる範囲

を本文とし、あるいは付録とするのか、さらにはIGとは別にすべきか、SDOパイロットの完了に向けて、ベストプラクティスを見出していかなければならない。

心毒性に関するマーカーに関しては、昨年同様Tn、H-FABP、BNP等比較的以前から報告されているマーカーが主体であった。メタボロミクスによる新規物質やmiRNAを含め新規物質の報告も散見されており、今後詳細な検討により理想的なバイオマーカーになる可能性がある。

筋肉・神経毒性マーカーに関しては、臨床研究の結果が報告されていたが、非臨床での検討は昨年同様に乏しく、知見が少なかった。

筋肉毒性マーカーとしてfnTnlが注目された。

肝毒性のマーカーとしては、逸脱酵素及び逸脱miRNAの報告があった。いずれの項目も、特異性や変化率の大きさに特徴があり、古くから知られているマーカーよりも肝障害を明確に検出できる可能性がある。肝脂肪化のマーカーとしては、脂肪化に伴う炎症に関連した炎症系サイトカイン及び脂質代謝の変動に関連したケモカインの報告があった。

肺炎及び血管炎に関して臨床で利用されている炎症のバイオマーカーは、診断の補助的役割に留まっている。また、比較的早期に発見され、臨床で使用されているバイオマーカー(CRP、Procalcitonin等)が、毒性試験で使用されていることを示す報告は、直近5年の文献検索では見つからなかった。

精巣毒性に関しては、ホルモン濃度は臨床及び非臨床で測定可能である。Inhibin B及びFSHの血中濃度の変化が精子形成の異常を反映する可能性があり、男性不妊のスクリーニングにおける有効性が検証されている。

精巣障害に起因するCreatine等の尿及び血液中の生化学的指標の測定によっても精巣毒性の検出が可能であり、Creatineは有用なマーカーと考えられた。精細管からの漏出蛋白は精巣・血液関門の破壊を反映すると期待されるが、病理組織変化ほど鋭敏ではない。一方、精巣毒性の発現に伴い増加する組織中の特異的蛋白質は、組織変化が生じない用量でも短時間で変動し、精巣毒性を鋭敏に検出できる可能性



が示され、開発初期の精巣毒性スクリーニング等で有用と思われた。精巣毒性物質投与後の精巣特異的なmiRNAの変化は、病理組織変化に伴って変動することが示された。また、精子の酸化的ストレスに関連したマーカーやSP22は、精巣毒性の発生を反映している可能性があり、非侵襲的に得られる試料を用いたバイオマーカーとして有用である可能性が示された。

欧米では学会・セミナーで、バイオアナリシスの方法論や意義などが、FDAおよびEMAなど行政当局を交えて盛んに議論が行われており、日本でのBMVの議論は周回遅れであったことは否めないが、今回、JBFの協力により、約半年という短期間で日本版のガイドライン素案が出来上がったことは、日本においてもBMVに対する認知と活発な議論を呼ぶものと考えられる。

## F. 研究発表

一部研究協力者の発表も含む。

### 1. 論文発表等

- 1) 本間正充：安全性に関するトピックの動向 M7: 遺伝毒性不純物 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス 42, 812-815 (2011)
- 2) 本間正充：医薬品における遺伝毒性不純物の管理と安全性評価 PHARA STAGE 11, 1-2 (2011)
- 3) 中江 大. 安全性に関するトピックの動向. ICH S10. 光安全性の評価. 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス42, 705-708, 2011.
- 4) Sun Y., Gruber M., Matsumoto M., Overview of global regulatory toxicology requirements for vaccines and adjuvants. J Pharmacol Toxicol Methods. 2012 Feb 3(Epub ahead of print)
- 5) 小島肇夫：動物実験代替法における国際協調、日薬理誌、138、103-107 (2011)
- 6) 小島肇夫：経皮吸収と安全性、次世代経皮吸収型製剤の開発と応用、pp.157-164、シーエムシー出版、東京 (2011)
- 7) 小島肇夫：監修および序章、動物実験代替法と動物実験の住み分け、pp.3-9、第1章第2節 日

本における各種承認申請に必要な安全性試験と代替法の受理の現状、pp.19-23、第1章第3節 REACH.GHSなどの各種規制との違い、pp.24-29、第2章 皮膚腐食性試験の実験手法、pp.33-43、第4章 眼刺激性試験代替法の実験手法、pp.71-87、最新 動物実験代替法の技法ノウハウ、技術情報協会、東京 (2011)

- 8) 小島肇夫：第8回国際動物実験代替法会議参加記、COSME TECH JAPAN,1(5)29-33(2011)
- 9) 小島肇夫：技術講座 安全性評価試験(1)、COSME TECH JAPAN,1(6)10-13(2011)
- 10) Pfuhrer S, Fellows M, van Benthem J, Corvi R, Curren R, Dearfield K, Fowler P, Frötschl R, Elhajouji A, Le Hégarat L, Kasamatsu T, Kojima H, Ouédraogo G, Scott A, Speit G: *In vitro* genotoxicity test approaches with better predictivity: Summary of an IWGT workshop, Mutat. Res., 723(2): 101-7 (2011)
- 11) 小島肇夫：技術講座 安全性評価試験(2)、COSME TECH JAPAN,1(7)18-22(2011)
- 12) Kano, S., Todo, H., Furui, K., Sugie, K., Tokudome, Y., Hashimoto, F., Kojima, H., Sugibayashi, K.: Comparison of Several Reconstructed Cultured Human Skin Models by Microscopic Observation: Their Usefulness as an Alternative Membrane for Skin in Drug Permeation Experiments, Altern. Animal Test. EXperiment, 16(2): 51-58(2011)
- 13) 小島肇夫：技術講座 安全性評価試験(3) コスメティックステージ、2(1)73-77(2012)
- 14) 小島肇夫：技術講座 安全性評価試験(4) コスメティックステージ、2(2)65-69(2012)
- 15) 小島肇夫：技術講座 安全性評価試験(5) コスメティックステージ、2(3)44-49(2012)
- 16) 平林容子. 安全性に関するトピックの動向 「S6 (R1) : バイオ医薬品の安全性試験 (見直し)」。医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス 42, 233-240, 2011.
- 17) M Mori, H Kawashima, H Nakamura, M Nakagawa, S Kusuda, T Saji, H Tsutsumi, S Yokota, S Itoh. Nationwide survey of severe

- respiratory syncytial virus infection in children who do not meet indications for palivizumab in Japan. *J Infect Chemother.*, 2011, Apr; 17(2): Page 254-63.
- 18) K Hoppu, G Anabwani, F Garcia-Bournissen, M Gazarian, GL Kearns, H Nakamura, RG Peterson, S Sri Ranganathan, SN de Wildt. The status of paediatric medicines initiatives around the world-what has happened and what has not?. *Eur J Clin Pharmacol*, 2012, 68:1-10
- 19) 中村秀文 : 薬物投与の基本的考え方. 小児科学改訂第10版 編集 五十嵐 隆, 2011, Page1067-1080, 文光堂, 東京
- 20) 飯島一誠, 佐古まゆみ, 木村利美, 服部元史, 亀井宏一, 野津寛大, 宍戸清一郎, 相川厚, 森田研, 後藤芳充, 和田尚弘, 大塚泰史, 長田道夫, 斉藤真梨, 本田雅敬, 土田尚, 中村秀文, : 小児腎移植におけるミコフェノール酸モフェチルの多施設共同オープンラベル臨床試験—有効性・安全性, 薬物動態の評価—. *日本小児腎臓病学会雑誌*. 第24巻第1号, 2011年4月, Page36-46
- 21) 中村秀文 : 小児薬物療法治療薬におけるアンメット・メディカル・ニーズ. *医薬ジャーナル*2011年8月号, Page63-66, 医薬ジャーナル社, 東京
- 22) Garofolo F, Rocci ML Jr, Dumont I, Martinez S, Lowes S, Woolf E, van Amsterdam P, Bansal S, Barra AC, Bauer R, Booth BP, Carrasco-Triguero M, DeSilva B, Dunn J, Gallicano K, Gouty D, Ho S, Hucker R, Jemal M, Katori N, Le Blaye O, Lee J, Li W, Michael S, Nehls C, Nicholson R, Ormsby E, Tang D, Viswanathan CT, Weiner R, Young G. 2011 White paper on recent issues in bioanalysis and regulatory findings from audits and inspections. *Bioanalysis*. 3: 2081-96. (2011)
- 23) 香取典子, 日本のバイオアナリシスの現状, *PHARM TECH JAPAN*, 28(3), 501-503(2012)
- 24) 立木秀尚, バイオアナリシスフォーラム (JBF) の紹介, *PHARM TECH JAPAN*, 28(3), 505-507 (2012)
2. 学会発表
- 1) Honma M.: Assessment of DNA-reactive Impurities by (Q)SAR Approaches. DIA/FDA Quaititative Structure-activity Relationship (Q)SAR Approaches to Assessing Genotoxic Impurities in Pharmaceuticals (2011.4)
- 2) 本間正充; 何故、DNA反応性 (変異原性) 不純物が問題なのか? 第38回日本トキシコロジー学会学術年会 (2011.7)
- 3) 阿曾幸男; ICH DNA反応性 (変異原性) 不純物ガイドライン (M7) の進捗状況. 第38回日本トキシコロジー学会学術年会 (2011.7)
- 4) Honma M.: Risk Assessment and Management of Genotoxic Impurities in Phrmaceuticals. 3th Annual Conference of Environmental Mutagen Society in India (2012.2)
- 5) 野中瑞穂, 三枝由紀恵, 甘粕晃平, 笛木 修, 小野寺博志, 小川久美子, 西川秋佳, 中江 大. ラットがん原性試験を実施せずにごん原性の評価は可能か. 医薬品の添付文書におけるがん原性試験成績の記載からの検討. 第28回日本毒性病理学会年次学術集会 (2012年2月, 東京都千代田区).
- 6) 松本峰男. ワクチン・アジュバントの審査行政. *BioJapan 2011* (2012年10月6日, パシフィコ横浜, 横浜市)
- 7) 松本峰男. 抗体薬・ワクチンの安全性薬理. 日本安全性薬理研究会・第3回学術年会 (2012年10月6日, 東京大学弥生講堂, 文京区)
- 8) Kojima, H.: Update of skin equivalent and its regulatory use, BIT's 4th Annual World Congress of Industrial Biotechnology-2011, Dalin, China (2011.4)
- 9) 小島 肇: 安全性評価のための*in vitro*試験法を確立するために何をなすべきか, 日本組織培養学会第84回大会, 成育医療センター (2011.5)
- 10) 山本直樹, 平野耕治, 小島 肇, 住友万里子, 山下宏美, 中村政志, 原 和宏, 谷川篤宏, 谷口考喜, 堀口正之: ヒト角膜組織より分離した

- 角膜上皮細胞への不死化遺伝子の導入と評価、日本組織培養学会第84回大会、成育医療センター (2011.5)
- 11) 小島 肇 : 医薬品・医療機器の許認可に求められる安全性試験、第7回大阪大学医工連携シンポジウム 第2回 MEI産学官連携部門勉強会講演会 大阪大学銀杏会館 (2011.6)
- 12) Yamamoto, N., Hirano, K. , Sumitomo, M., Yamashita, H., Nakamura ,M., Hara , K., Tanikawa , A., Horiguchi, M., Taniguchi K. and Kojima, H. : Generation and Analysis of a New Immortalized Human Corneal Epithelium Cell Line, 2011 *In vitro* Biology Meeting, Raleigh, North Carolina, USA (2011.6)
- 13) Kojima, H.: Current and future of correlation with japan and Korea on alternative to animal experiments, 8th Congress of Korean Society for Alternative to Animal Experiments, Korea (2011.7)
- 14) 小島 肇: 代替法から *in vitro* toxicology への発想転換、第38回日本トキシコロジー学会学術年会、パシフィコ横浜 (2011.7)
- 15) 小島 肇 : 動物実験代替法の申請資料への活用、皮膚基礎研究クラスターフォーラム第6回教育セミナー、タワーホール船堀 (2011.7)
- 16) 小島 肇 : 欧米、日本における代替法の現状と化粧品品の安全性評価における代替法、千葉科学大学コスメティックサイエンスシンポジウム (第4回)、化学会館・Fホール (2011.7)
- 17) Kojima, H. : Section II-11 The International Cooperation on Alternative Test Methods (ICATM), JaCVAM, 8th World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences, Montreal, Canada (2011.8)
- 18) Uno, Y., Kojima, H., Hayashi, M.: *In vivo* Comet assay: update on the ongoing international validation study coordinated by JaCVAM, 8th World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences, Montreal, Canada (2011.8)
- 19) Kojima, H., Yamakage, K., Oba, S., Tsuge, H., Aoki, M.: Preliminary study of the revision of Japanese Pharmacopoeia test for rubber closure for aqueous infusions, 8th World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences, Montreal, Canada (2011.8)
- 20) Ono, A., Takeyoshi , M., Bremer, S., Jacobs, M., Laws, S., Sozu, T. and Kojima, H.: Results of the validation study of the stably-transfected estrogen receptor alpha transcriptional activation antagonist assay using the HeLa9903 cell line, 8th World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences, Montreal, Canada (2011.8)
- 21) Hayashi, K., Hayashi, T., Sakaguchi, M., Watanabe, S. and Kojima, H.: Inter-laboratory phase II validation study of *in vitro* eye irritation test; Short Time Exposure (STE) test, 8th World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences, Montreal, Canada (2011.8)
- 22) Nakamura, M., Suzuki , T., Shinoda, S., Kato, M. and Kojima, H.: Additional validation of alternative skin irritation test method using LabCyte EPI-MODEL24 of cultured skin, 8th World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences, Montreal, Canada (2011.8)
- 23) McFarland, R., Kulpa-Eddy, J., Isbrucker, R., Halder, M., Kojima, H., Johnson, N., Jones, B., Allen, D., Casey, W. and Stokes, W.: International workshop on alternative methods to reduce, refine, and replace the use of animals in human vaccine potency and safety testing, 8th World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences, Montreal, Canada (2011.8)
- 24) Kulpa-Eddy , J., McFarland, R., Isbrucker, R., Halder, M., Kojima, H., Johnson, N., Jones, B., Allen, D., Casey, W. and Stokes, W.: International workshop on alternative methods to reduce, refine, and replace the use of animals in veterinary vaccine potency and safety testing, 8th World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences, Montreal, Canada (2011.8)
- 25) Stephens, M., Kojima, H., Patlewicz-Tier, G.,

- Spielmann H. and Telley, L.: AltTox.org: communication platform for 21st century toxicology, 8th World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences, Montreal, Canada (2011.8)
- 26) Kojima, H.: Necessity of validation study of new or updated test methods for hazard assessment, Workshop on Validation of 3T3 Neutral Red Uptake Phototoxic Test, Guangzhou, China (2011.11)
- 27) Kojima, H.: JaCVAM update, シンポジウム動物実験代替法センターの国際協調、日本動物実験代替法学会 第24回大会、仙台 (2011.11)
- 28) 小島 肇: 厚生労働省の新規対応、シンポジウム日本における代替法研究の新しい胎動、日本動物実験代替法学会 第24回大会、仙台 (2011.11)
- 29) Kojima, H.: JaCVAM update、日本動物実験代替法学会 第24回大会、仙台 (2011.11)
- 30) 丸山 裕子、湯浅 敦子、日置孝徳、笠原 利彦、小島 肇: LLNA BrdU-ELISAにおけるリンパ節細胞懸濁液調製方法の最適化に関する検討、日本動物実験代替法学会 第24回大会、仙台 (2011.11)
- 31) 篠田伸介、萩原沙織、山口能宏、中村 牧、笠原利彦、芝井亜弥、加藤雅一、小島 肇: 培養表皮モデルLabCyte EPI-MODEL24皮膚刺激性試験法の追加共同研究、日本動物実験代替法学会 第24回大会、仙台 (2011.11)
- 32) 内野 正、竹澤俊明、山下 邦彦、小島 肇、五十嵐良明、西村哲治: ビトリゲルチャンバーを用いた皮膚感作性試験代替法モデルの基礎的検討、日本動物実験代替法学会 第24回大会、仙台 (2011.11)
- 33) 山口宏之、竹澤俊明、小島 肇: コラーゲンビトリゲル膜チャンバー内に構築したヒト角膜上皮モデルの有用性: 化学物質暴露後の経上皮電気抵抗値の経時変化を指標として眼刺激性を外挿する新しいアプローチ、日本動物実験代替法学会 第24回大会、仙台 (2011.11)
- 34) 加藤 義直、山本 直樹、山下 宏美、佐藤 淳、水谷 宏、中田 悟、小島 肇: 新規不死化ヒト角膜上皮細胞株 (iHCE-NY) を用いた眼刺激性試験代替法への取り組み、日本動物実験代替法学会 第24回大会、仙台 (2011.11)
- 35) 濱田修一、高島理恵、嶋田圭祐、財前和代、川上哲、田中仁、松本浩孝、中井智博、鈴木洋、松村奨士、真田尚和、井上健司、武藤重治、萩尾宗一郎、林亜耶、高柳智美、萩原庸介、前田晃央、成見香瑞範、高沢博修、小川いづみ、大山ワカ子、中嶋圓、森田健、小島 肇、林真、本間正充: 反復投与肝臓小核試験法の有用性の検討 (MMS共同研究)、日本環境変異原学会第40回大会、東京 (2011.11)
- 36) 宇野芳文、小島 肇、林真: インビボコメットアッセイ: JaCVAM国際バリデーション試験の進捗状況報告 (第3報)、日本環境変異原学会第40回大会、東京 (2011.11)
- 37) 中村 昌文、武吉 正博、小野 敦、小島 肇: 国際的バリデーションの行われた三種類のエストロゲン様活性測定法の比較検証、環境ホルモン学会、東京 (2011.12)
- 38) 小島 肇: 動物実験代替法の国際的動向とJaCVAM活動について、日本輸入化粧品協会技術部会、東京 (2011.12)
- 39) 小島 肇: 毒性発現機序からみたリスク評価の現実 「毒性試験の代替に病理が果たす役割」、第28回日本毒性病理学会総会、東京 (2012.2)
- 40) 小島 肇: 生物学的製剤基準とワクチンの品質確保にどこまで動物実験は有用か、国際化時代の生物学的製剤基準とワクチンの品質確保のありかた、東京 (2012.2)
- 41) H. Nakamura: Participation in Asia in Global Pediatric Programs, Including Cultural Barriers to Conduct Pediatric Clinical Trials. Asia Regulatory Conference: Asia's Role in Global Drug Development. April27. 2011. Seoul
- 42) 中村秀文: 小児を用いた研究における倫理的問題: 実践の立場から. 第10回医学研究のための倫理に関する国際研修コース. 2011年7月8日. 長崎
- 43) 中村秀文: ユーザビリティと創薬. 日本薬剤

学会第36回製剤セミナー . 2011年7月20日 . 静岡

- 44) 中村秀文 : 小児用薬の臨床試験とその問題点～感染症治療薬を中心に～ . 第4回抗感染症薬開発フォーラム . 2011年10月22日 . 東京
- 45) N. Katori, State of BMV in Japan and Some Comments on Questions from Industry, The 5th Workshop on Recent Issues in Bioanalysis (2011.4 Montreal, Canada)
- 46) 香取典子、バイオアナリシスフォーラムの紹介、第1回JBFシンポジウム (2011.8、東京)
- 47) 井上則子、国内バイオアナリシスディスカッションの歩み、第1回JBFシンポジウム (2011.8、東京)
- 48) 香取典子、バイオアナリシスフォーラム (JBF)

の設立と国際調和に向けての動き、第24回バイオメディカル分析化学シンポジウム (BMAS2011) (2011.8、鳥取)

- 49) 香取典子、日本におけるBMVの現状およびJBF活動報告、第2回JBFシンポジウム (2011.8、東京)

#### G. 知的所有権の取得状況

- 1. 特許取得  
特になし
- 2. 実用新案登録  
特になし
- 3. その他  
特になし

## Ⅱ. 分担研究報告

### 1. 医薬品の安全性に関する非臨床的研究

厚生労働科学研究費補助金（医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業）  
平成23年度分担研究報告書

－安全性評価のためのバイオマーカーについての調査研究－

分担研究者：大野 泰雄（国立医薬品食品衛生研究所 所長）

研究要旨

医薬品開発段階で用いられ得る安全性評価のためのバイオマーカーについて、22年度に引き続き心臓毒性、筋肉毒性、及び神経毒性を対象に文献調査した。また、新たに、肝障害・肝脂肪化、肺炎及び血管炎、精巣毒性に関するバイオマーカーについても文献調査を行った。その結果、心毒性マーカーに関しては、昨年同様Tn、H-FABP、BNP等が報告されていた。メタボロミクスやmiRNA検討による新規物質の報告も散見されており、今後の詳細な検討により理想的なバイオマーカーになる可能性がある。筋肉・神経毒性マーカーに関しては、ヒト臨床研究報告があるが、非臨床での検討は昨年同様に乏しかったが、筋肉毒性マーカーとしてfnTnIが注目された。23年度で新たに検討した肝障害マーカーとしては、逸脱酵素及び逸脱miRNAの報告があった。いずれの項目も、特異性や変化率の大きさに特徴があり、古くから知られているマーカーよりも肝障害を明確に検出できる可能性がある。肝脂肪化マーカーとしては、脂肪化に伴う炎症に関連した炎症系サイトカインについての報告がみられた以外では、脂質代謝の変動に関連したケモカインの報告があった。肺炎及び血管炎のマーカーとして、臨床で既に利用されている炎症バイオマーカーは、炎症の部位、病因及び進行度の特定までに至っておらず、病態特異的なマーカーではなく、診断の補助的役割に留まっている。精巣毒性のマーカーとしてのInhibin B及びFSHの血中濃度の変化は精子形成の異常を反映する可能性がある。その他のホルモンによる精巣毒性の検出感度は病理組織学的検査ほど鋭敏ではないと考えられた。Creatineの尿及び血液中の生化学的指標の測定によっても精巣毒性の検出が可能であると考えられた。精巣毒性の発現に伴い増加する組織中の特異的蛋白質は、組織変化が生じない用量でも短時間で変動し、精巣毒性を鋭敏に検出できる可能性が示された。精巣毒性物質投与後の精巣特異的なmiRNAの変化は、病理組織変化に伴って変動することが示された。また、精子の酸化的ストレスに関連したマーカーやSP22は、精巣毒性の発生を反映している可能性があり、非侵襲的に得られる試料を用いたバイオマーカーとして有用である可能性が示された。

キーワード：バイオマーカー、国際的整合性、ICH、安全性評価

研究協力者

高橋 光一（久光製薬（株）研究開発本部基礎研  
究所薬理チーム）  
宇山 佳明（医薬品医療機器総合機構 レギュ

ラトリーサイエンス推進部研究課  
長）  
熊谷 雄治（北里大学東病院治験管理センター  
長）

## A. 研究目的

医薬品開発においては、候補物質の有効性および安全性をどのようにとらえるか、また、それをどのように評価し、開発過程における意志決定に反映させるかが、重要である。その際、臨床における病気による苦痛の軽減や延命、Quality of Lifeの改善などの真の臨床指標が明確かつ短期的に把握できるものは開発を進めやすい。しかし、長期間における作用の結果現れる薬効や副作用、体外からは観察しにくい副作用については、通常の臨床試験で行われている数ヶ月程度の臨床試験では捉えられないことがある。このような場合、検出された時には既に重篤化してしまっていたり、販売承認を受けた後に思いがけない副作用が現れたりして、回収・販売停止等の措置を講じることが必要な場合がある。したがって、上記のような真の臨床指標に替わるバイオマーカーの把握は、医薬品開発を効率的かつ迅速に進める上で極めて重要である。安全性評価に関わるバイオマーカーでは、毒性が軽症で可逆的なうちに検出できるマーカーが望ましい。米国では国と企業との共同研究として、バイオマーカーコンソーシアムで、そのようなバイオマーカーの開発に努めている。もし、有効なバイオマーカーが特定の企業に独占されるようなことになると、他の企業の医薬品開発に支障を来すことになる。このような背景から、本研究班では、産官の共同研究として、安全性評価に関わるバイオマーカーについて、文献的に探索し、その有用性を調査することとした。

本報告では、課題1として、心臓・筋肉・神経毒性、課題2として、肝障害・脂肪肝化、肺炎及び血管炎、精巣毒性についての調査結果を以下に記載した。

### 課題1. 心臓・筋肉・神経毒性

調査担当者：高橋光一（久光製薬株式会社）

## A. 研究目的

新規毒性バイオマーカーの開発は、医薬品開発時における化合物の早期毒性予測や臨床で使用されている薬物の副作用の早期発見に極めて重要であると

考えられ、様々なアプローチで新規毒性バイオマーカーが開発されている<sup>1)</sup>。

前年度の本研究班では心臓・筋肉・神経領域の毒性バイオマーカーを過去10年間遡って検索し、有用と思われる物質を抽出・報告した。

今年度は、前年度の継続調査として、2011年度に公開された論文を検索し、前年度分と照らし合わせ、新規性がある箇所を中心に詳細な調査を実施した。

## B. 研究方法

MEDLINEあるいはEMBASEを用いて2011年度に発行された文献を検索した（2011.12）。

（[Keyword]：心臓：Biomarker & (heart or cardiac) & toxicity、筋肉：Biomarker & muscle & toxicity、神経：Biomarker & nerve & injury）

## C. 研究結果および考察

上記のkeywordで検索した結果、心臓、筋肉、神経のヒット数はそれぞれ、130、89、98件であった。この中から、今回の目的とは別の趣旨の論文は除外し、前年度に検索・調査した内容と重複する論文も調査対象から外した。

### 1) 心臓

#### 一酸化窒素 (NO)

小児がん患者にdoxorubicin投与後、毒性バイオマーカーとして、NOの安定体として測定したNO<sub>3</sub>が有意に上昇していた<sup>2)</sup>。Doxorubicinの毒性メカニズムは明確になっていないが、一部endothelial NOS (eNOS) の発現と関連すると報告されている。NO自体は、多彩な生理作用を有し、且つ様々な疾患により値が変動する。したがって、特異性としては課題が残るが、doxorubicin投与時の急性反応として捉えれば、薬剤誘発性の毒性バイオマーカーとしては、有益であると考えられる。

NO以外は、前年度抽出した物質と重複していた。

#### N-terminal-proatrial natriuretic peptide (NT-ProANP)

慢性不全に対する有効なマーカーである<sup>3)</sup>が、非臨床での知見は少ない。



## B-type natriuretic peptide (BNP) / N-terminal pro-B-type natriuretic peptide (NT-proBNP)

BNP/NT-proBNPは進行性心不全に対して最も汎用されており有用性が高い<sup>4)</sup>。一方、ヒト薬剤誘発性心障害に対するBNP/NT-proBNPの有用性に関しては報告が少なく、再度確認が必要である。

## Troponin (Tn) 類

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

Tnの中ではTnIとTnTが測定されており、近年はTnIを検討した報告が多い。今年度は、PKパラメータの比較<sup>5)</sup> やラット系統による心障害およびTnI変動の差異<sup>6)</sup>、臨床使用されている薬剤でTnIが上昇することも報告<sup>7、8)</sup> されており、非臨床毒性バイオマーカー以外、臨床治験時や各種疾患治療時の副作用モニターとしての有用性が示唆されている<sup>9)</sup>。

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

Tn類と同様に心筋障害時のバイオマーカーとして汎用されている。一酸化炭素誘発心筋障害モデルで、H-FABPは曝露直後から変動が認められるのに対して、Tnは6時間後から上昇した<sup>10)</sup>。したがって、H-FABPは心障害をモニターするのにより適していると考察している。

## メタボロミクスによる検討

心臓領域ではメタボロミクスにより種々検討されており、2,4,6-trihydroxypyrimidine や pseudouridine, 2-oxoglutarate等の有用性が報告<sup>11-13)</sup> されている。

## miRNA

近年、心障害時のmicroRNA (miRNA) 変動が報告されており、今回の調査でも優れた総説<sup>14)</sup> が存在した。

miRNAは、心障害時に検出されるもの (miR-133等) と心保護作用を有する場合に検出されるもの

(miR-21等) の相反するものがあり、いずれも微細な組織変化でも鋭敏な変化を示す。例えば、心筋梗塞後、血中のmiR-208bや499の発現が1000倍程度上昇し、他の心臓関連の疾患よりも増加の程度がケタ違いに大きく、心筋梗塞の診断応用への可能性を有している。

バイオマーカーとしてのmiRNAは、測定後の補正方法等バリデーションの面で課題が残っているものの、障害により生じる測定値の変動幅が大きくかつ特異性が高いため、今後の発展が注目される。

## 2) 筋肉

前年度では、fatty acid binding protein 3 (Fabp3)、miR-133 $\alpha$ 、fast-twitch skeletal muscle troponin I (fnTnI) について報告しており、今年度はこのマーカーを中心にフォローアップした。

調査結果として対象となる論文数が少なかった。

miR-133 $\alpha$ については、心筋での論文が主であり、骨格筋と心筋を分離し得るfnTnIについての今年度の報告は非常に少なかった<sup>15)</sup>。新規マーカーとしては、1- and 3-methylhistidineが報告<sup>16)</sup> されていた。

(追記：2012.3に再調査した結果、fnTnIと骨格筋に基づく疾患の関連性がトピック<sup>17)</sup> として、非臨床試験への応用が期待されていた)

## 3) 神経

前年度では、SBDP ( $\alpha$ -II-Spectrin Break Down Product)、Cleaved-Tau、S100 $\beta$  Protein、Myelin Basic Protein (MBP) について報告しており、今年度はこのマーカーを中心にフォローアップした。

S100 $\beta$  Proteinに関しては、精神的外傷の患者での臨床報告が散見されている<sup>18-19)</sup>。他のマーカーに関しては、IL-17<sup>20)</sup>、N-myc downstream regulated gene 2 (NDRG2)<sup>21)</sup> の有用性が報告されている。

全般的には、非臨床での知見が前年同様少なかった。

## E. 結 論

心毒性マーカーに関しては、昨年同様Tn、H-FABP、BNP等比較的以前から報告されているマーカーが主

体であった。一方、メタボロミクスによる新規物質やmiRNAを含め新規物質の報告も散見されており、今後詳細な検討により理想的なバイオマーカーになる可能性がある。

筋肉・神経マーカーに関しては、ヒトの臨床研究として報告されているが、非臨床での検討は昨年同様に乏しく、心毒性に比し知見が少なかった。

## F. 参考文献

- 1) Marrer E. and Dieterle F.: Impact of biomarker development on drug safety assessment. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 243(2), 167-179 (2010).
- 2) Guler E. et al.: Nitric oxide: A new biomarker of doxorubicin toxicity in children? *Pediatric Hematology and Oncology* 28, 395-402 (2011).
- 3) Colton HM. et al.: An initial characterization of N-terminal-proatrial natriuretic peptide in serum of Sprague Dawley rats. *Toxicol. Sci.*, 120, 262-268(2011).
- 4) Nagarajan V. and Tang WHW.: Biomarkers in advanced heart failures: Diagnostic and therapeutic insights. *Congest. Heart Fail.*, 17, 169-174 (2011)
- 5) Dunn MF. et al.: The complete pharmacokinetic profile of serum cardiac troponin I in the rat and the dog. *Toxicol. Sci.*, 123, 368-373 (2011).
- 6) Schultze AE. et al.: A comparison of mortality and cardiac biomarker response between three outbred stocks of Sprague Dawley rats treated with isoproterenol. *Toxicologic Pathology*, 39, 576-588 (2011).
- 7) Mikaelian I et al.: Serum cardiac troponin I concentrations transiently increase in rats given rosiglitazone. *Toxicological Letters*, 201, 110-115 (2011).
- 8) Kalyanaraman M, et al.: Serial cardiac troponin concentrations as marker of cardiac toxicity in children with status asthmatics treated with intravenous terbutaline. *Pediatric Emergency Care*, 27, 933-936 (2011).
- 9) Newby LK. et al.: Troponin measurements during drug development-considerations for monitoring and management of potential cardiotoxicity: An educational collaboration among the cardiac safety research consortium, the Duke clinical research institute, and the US food and drug administration. *Am. Heart J.*, 162, 64-73 (2011).
- 10) Yordan T. et al.: The role of heart-type fatty acid-binding protein in the evaluation of carbon monoxide poisoning in rats. *Human and Experimental Toxicology*, 30, 124-128 (2012).
- 11) Griffin JL. et al.: Metabolomics as a tool for cardiac research. *Nat. Rev. Cardiol.*, 8, 630-643 (2011).
- 12) Tan G. et al.: Potential biomarkers in mouse myocardium of doxorubicin-induced cardiomyopathy: A metabolomic method and its application. *PLoS ONE*, 6(11), e27683 (2011).
- 13) Mamas M. et al.: The role of metabolites and metabolomics in clinically applicable biomarkers of disease *Arch Toxicol.*, 85, 5-17 (2011).
- 14) Kukreja RC. et al.: MicroRNAs: New players in cardiac injury and protection. *Mol. Pharmacol.*, 80, 558-564 (2011).
- 15) James RS. et al.: Variation in expression of calcium-handling proteins is associated with inter-individual differences in mechanical performance of rat (*Rattus norvegicus*) skeletal muscle. *J. Exp. Biol.*, 214(Pt21), 3542-3548 (2011).
- 16) Aranibar N. et al.: Identification of 1- and 3-methylhistidine as biomarkers of skeletal muscle toxicity by nuclear magnetic resonance-based metabolic profiling. *Analytical Biochem.*, 410, 84-91 (2011).
- 17) Russel AJ. et al.: Activation of fast skeletal muscle troponin as a potential therapeutic approach for treating neuromuscular diseases. *Nat. Med.*, 18, 452-455(2012).
- 18) Bouvier D. et al: Reference ranges for serum S100B protein during the first three years of life. *Clin. Biochem.*, 44, 927-929 (2011).
- 19) Gonzalez-Mao MC. et al.: Model predicting

survival/exitus after traumatic brain injury: Biomarker S100B 24hr. Clin. Lab., 57, 587-597 (2011).

- 20) Noma N. et al.: Interleukin-17 levels in rat models of nerve damage and neuropathic pain. Neurosci. Lett., 493, 86-91(2011).
- 21) Li Y. et al.: Spatial-temporal expression of NDRG2 in rat brain after focal cerebral ischemia and reperfusion. Brain Res., 1382, 252-258 (2011).

課題2：肝障害・肝脂肪化、肺炎及び血管炎、精巣毒性

## 研究協力者

田口和彦、本山径子、久田茂、永山隆、荻野大和、小林章男（日本製薬工業協会 基礎研究部会 一般毒性課題対応チーム）

## B. 研究方法

主なデータベースとして、肝障害・肝脂肪化に関わるバイオマーカーについてはPubMedを、肺炎及び血管炎についてはEMBASE及びPubMedを、精巣毒性についてはMedlineを利用し、過去5年を目安とした総説及び論文を調査して新規バイオマーカー情報の収集を行なった。新規バイオマーカーの情報は、現状と問題点、問題解決のために近年使われている技術、個別の新規バイオマーカー情報（項目、マーカーとなる理由、測定系など）について、今後の展望と課題として整理した。

## C. 研究結果

### C-1. 現状と問題点

血中バイオマーカーは、臨床試験に容易に組み入れられることから、非臨床のリスクアセスメント結果をヒトに外挿できる可能性があり、創薬ツールとして極めて有用である。しかし、重要な毒性の発現と関連することが証明された予測的血中バイオマーカーはほとんどないのが現状である<sup>1)</sup>。

肝障害バイオマーカーとして古くから知られているアスパラギン酸トランスアミナーゼ (AST)、アラ

ニトランスアミナーゼ (ALT)、アルカリフォスファターゼ (ALP)、ビリルビン (BIL) などは、肝障害特異性が低く、他の細胞障害に伴っても変動するため予見性が高いバイオマーカーとは言いがたい<sup>2)</sup>。

特異体質性肝障害、血管炎、肺毒性（間質性肺炎など）については、有効性が立証された血中バイオマーカーの報告はほとんどないと言われている<sup>1)</sup>。

精巣毒性（セルトリ細胞毒性及び生殖細胞変性）については、バイオマーカーとして、性ホルモンや障害に関連する血液や尿中のバイオマーカーが測定されているが、病理組織検査に対するこれらの優位性は報告されていない。組織中の蛋白質マーカーに関しては、単回投与でも組織変化が発現しない用量で変化した例が報告されており、非臨床における毒性バイオマーカーとしての有用性が考えられる。臨床では精子検査やホルモン測定等が実施されているが、これらの精巣毒性検出感度は薬物による精巣毒性発生のモニタリングには十分ではないと考えられる。一方、精子検査により精子の質や機能への影響が評価できることから、これらは非侵襲的な精巣毒性評価法として期待される。

以上のように、臨床・非臨床ともに肝障害、血管炎、肺炎、精巣毒性のいずれにおいても、特定の毒性に対して特異性があり、かつ、予見性が高い高感度なバイオマーカーが強く求められている。

### C-2. 問題解決のために近年使われている技術

臨床・非臨床共通で、従来からの自動分析機による生化学的検査及び抗体を用いたEnzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 法に加えて、Computed tomography (CT)、Positron emission tomography (PET)、Magnetic resonance imaging system (MRI)、超音波検査 (Ultrasonography, US echo)、Transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)、Liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS)、Luminex<sup>®</sup>が使用されている。また、主に非臨床で使われている技術として、フローサイトメトリー、免疫組織化学的手法、遺伝子改変動物による生物発光を挙げる事ができる<sup>1, 3, 4, 5)</sup>。

### C-3. 肝障害・肝脂肪化のバイオマーカー

#### C-3-1. 血中グルタミン酸脱水素酵素 (GLDH)・ソルビトール脱水素酵素 (SDH)・グアナーゼ (GU)

種を問わず自動生化学分析装置で測定可能である。肝臓中での活性が高く、肝障害により血中に逸脱するマーカーとして報告されている<sup>6, 7)</sup>。ただし、臨床・非臨床ともに広く汎用されているとは言えない。栄養学的な要因等による変動が比較的少ないマーカーであり、従来から用いられているマーカーと併せて測定することで精度よくDrug-induced liver injury (DILI) の有無を評価できる可能性がある。

#### C-3-2. 血中Arginase I

尿素サイクルの中でL-arginineを加水分解し、Ornithineと尿素を精製する酵素である。本活性のほとんどが肝臓に見出されているが他の臓器にも存在する。ラット及びイヌで測定報告があり、急性肝障害時に早期に変動し、AST及びALTよりも変動が大きかった<sup>8)</sup>。なお、半減期が非常に短いこと、測定試薬が市販されていないことが問題点である。

#### C-3-3. 血中Interleukin-6 (IL-6)

炎症性サイトカインの1つである。血液中濃度をマウス、ラット、イヌ、ヒトで測定可能であり、ヒトのアセトアミノフェン (APAP) 試験でDILIを予見するマーカーとして抽出された<sup>9, 10)</sup>。ヒト非アルコール性肝障害でも変動するが、炎症関連物質のため肝臓に対する特異性が低い可能性がある。

#### C-3-4. 血中C反応性蛋白 (CRP)

血液中濃度をマウス、ラット、イヌ、ヒトで測定可能である。炎症反応時に主に肝臓で誘導される急性炎症性蛋白であり、肝臓に脂肪が蓄積して炎症反応が起こると早期に合成され、血中に遊離するとされる<sup>9)</sup>。なお、臨床ではリウマチ等のマーカーとして汎用され、DILIあるいは肝脂肪化への特異性が問題点と考えられる。

#### C-3-5. 血中Interleukin-10 (IL-10)

マクロファージから産生する炎症性サイトカインを抑制するサイトカインである。血液中濃度をマウス、(ラット)、イヌ、ヒトで測定可能とされており、ヒトAPAP試験でDILIを予見するマーカーとして抽出された<sup>9)</sup>。炎症関連物質のため肝臓に対する特異性が低い可能性がある。

#### C-3-6. 血中Interleukin-1 $\alpha$ (IL-1 $\alpha$ )、Tumor necrosis factor $\alpha$ receptor-I (TNF $\alpha$ receptor-I)

血液中濃度をマウス、(ラット)、ヒトで測定可能である。マウスAPAP DILIモデルで上昇するとされている<sup>9)</sup>。初期の炎症反応に関連したサイトカインであることから、予見性のあるマーカーになる可能性を持っている。炎症関連物質のため肝臓に対する特異性が低い可能性がある。

#### C-3-7. 血中Interleukin-8 (IL-8)、Tumor necrosis factor $\alpha$ (TNF $\alpha$ )

血液中濃度をマウス、ラット、イヌ、ヒトで測定可能である。ヒト非アルコール性肝障害で上昇し<sup>10)</sup>、炎症反応に関連したサイトカインであることから、予見性のあるマーカーになる可能性を持っている。しかし、炎症関連物質のため肝臓に対する特異性が低い可能性がある。

#### C-3-8. 血中Vaspin, Pentraxin 3 (PTX3)、Serum prolidase enzyme activity (SPEA)、Cytokeratin-18 (CK18)

ヒト、ラット等で測定可能で炎症に関連したケモカイン・アディポカイン類である。ヒトの肝脂肪化で変動するとの報告<sup>10, 11)</sup>があるが、報告数少ないことから検証が必要と考えられる。動物の報告も少ない<sup>12)</sup>。

#### C-3-9. 酸化ストレス関連物質 (Carbonic anhydrase 3, Heat shock protein 60kDa, Adenylate kinase 4, NADP dependent malic enzyme, 2-Oxoisovalerate dehydrogenase, Steotransferrinなど)

APAP、アミオダロン、テトラサイクリンを投与し