

たラットの、肝臓プロテオミクス解析により抽出された脂肪酸酸化に関連したタンパク類である。二次元電気泳動の蛋白発現パターンは、病理検査と相関がある結果が得られた¹³⁾。

C-3-10. 血中miR-122、miR-192

DILIにおいてヒト、ラット、マウスの血漿中miRNA量の増加が報告されている^{14、15、16)}。ラットDILIモデルの尿中miR-122及びmiR-192は変動が見られないか、検出されない¹⁷⁾。miR-122及びmiR-192は肝臓に多く存在しているmiRNAで、DILIで血中に逸脱してくると考えられている。

C-3-11. 肝臓中遺伝子AKr73a, Tribbles 3 (Trb3)、Glutathione S-transferase Pi-1 (GSTp1)

Glutathione枯渇に起因したマーカー。ラットにAPAPやブロモベンゼンなど多種類の化学物質を処理して肝臓での遺伝子発現を調べた報告がある¹⁸⁾。

E. 結論（肝障害・肝脂肪化バイオマーカー）

肝障害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った。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についての報告がみられた他、脂質代謝の変動に関連したケモカインの報告があった。肝脂肪化のマーカーは、その特異性や予見性に関するさらなる検討が必要と考えられる。

C-4. 肺炎及び血管炎のバイオマーカー

C-4-1. 血中Procalcitonin

カルシトニンの前駆物質で、116のアミノ酸で構成される蛋白質。肺や腸の神経内分泌細胞から血中に分泌される。ヒトにおける半減期は20～24時間、血漿中濃度は0.1 µg/L未満と報告されている¹⁹⁾。多様な免疫測定法が開発され、定量測定可能である。肺炎^{19、20、21)} や自己免疫疾患²²⁾ の診断マーカーとして、C反応性蛋白 (CRP) より有用である可能性がある。局

所的細菌感染や膿瘍の存在により上昇 (0.5 µg/L以上)¹⁷⁾、感染患者で抗生物質の投与により減少することが報告され、抗生物質治療のモニタリングバイオマーカーとしての有用性が期待されている²¹⁾。非臨床試験での利用報告は見つからなかった。

C-5. 肺炎のバイオマーカー

C-5-1. Keratinocyte-derived chemokine (KC) 及びIL-8

KC及びIL-8とも、LPSによる炎症のマーカーとして知られており、Bronchoalveolar lavage (BAL)、肺組織及び血液を対象試料としてELISAによって測定できる。マウス及びヒト組織を用いて、Phosphodiesterase (PDE) 4 阻害薬の肺・気道炎症抑制効果を検討した実験²³⁾ において、LPS惹起肺炎のバイオマーカーとして肺組織、BAL及び血漿中のKC及びIL-8濃度を測定した結果、PDE4阻害薬はLPS刺激肺炎モデルでは炎症を抑制するが、対照群では炎症を誘発することが確認された。また、ヒト組織を用いた *in vitro* 実験の結果、IL-8は上皮細胞 (BEAS-2B) ではなく内皮細胞 (HUVEC) から分泌されていることが示唆された。以上のような結果から、KC及びIL-8は、臨床試験及び非臨床試験でのPDE阻害薬による炎症誘発性に対する高感度の代用マーカーとなる可能性が報告されている。

C-5-2. γ -Glutamyltranspeptidase (γ -GT)

γ -GTは、下部気道のClara細胞の障害・活性化のマーカー酵素として知られている。ラットにインドネシア製の蚊取線香の煙を吸入させた亜慢性試験 (6時間/日、5日/週、13週間)²⁴⁾ において、肺炎のバイオマーカーとしてBAL液中の γ -GT濃度を測定した結果、 γ -GTは3倍に上昇した。

C-5-3. C反応性蛋白 (CRP ; C-reactive protein)

CRPは、肝臓で合成される非特異的な炎症のバイオマーカーである。炎症に対応して速やかに合成され、刺激が取り除かれると急速に減少する。健康人における血清CRP値は低い (約1 mg/L)、細菌感染、外傷、火傷、手術及び癌などで著しく増加する。

血清CRP測定は、炎症を検知するための迅速で非

侵襲性的方法ではあるが、人工呼吸器肺炎（VAP）の診断マーカーとしての有用性を検討した検証試験に限られており、BAL CRPが増加するかどうか明らかでなく、VAPの診断マーカーとしての有用性は証明されていない²⁵⁾。

C-5-4. Triggering receptor expressed on myeloid cells type 1 (TREM-1)

TREM-1は、免疫グロブリンスーパーファミリーに属するミエロイド系細胞に発現するレセプターであり、Immunoblot及びELISAによって測定される。

可溶性TREM-1 (sTREM-1) は体液中に分泌され、VAP患者の呼気凝縮液や肺胞洗浄液に高濃度に存在するが、試験によっては感受性や特異性が低く、試験間で一貫した結果は得られていない。また、最近の文献では非感染性の炎症によっても増加することが報告されており、感染性の炎症の特異的なマーカーではないことが示唆され、今後、サンプル採取方法や分析など標準化された方法を用いた大規模調査が必要とされている²⁵⁾。

C-5-5. Copeptin

バソプレシンから生成され、39個のアミノ酸で構成されるペプチドである。血清及び血漿中のCopeptin濃度は安定で、EIAキットで容易に測定できる。Copeptinは尿崩症の診断マーカー、敗血症や心不全のモニタリングマーカーとして利用されている。肺炎のマーカーとしては下部気道感染症との相関性が報告されている²⁰⁾。

C-6. 血管炎のバイオマーカー

C-6-1. IL-10, MCP-1 (Monocyte chemoattractant protein-1)

高脂血症モデルマウス (*apoe*^{-/-}) を用いたOPG (Osteoprotegerin、破骨細胞の分化を阻害するサイトカイン) のアテローム硬化症に対する効果を検討した実験²⁶⁾ で、血管炎・全身性炎症のマーカーとして利用されている。フローサイトメトリーにより血清中濃度を測定した。本実験では、OPG投与の結果、アテローム硬化病変部の平滑筋細胞とコラーゲンが

増加して病変部を覆うことにより、病変を安定化させた。一方、炎症の誘発は認められなかった。

C-6-2. Pentoraxin 3 (PTX3)

急性炎症に反応する蛋白。FGF-2で誘導される血管新生や平滑筋細胞の活性化、血管障害後の新生内膜肥厚を抑制する。血管平滑筋細胞と内皮細胞に有意に発現、CRPとは異なり肝臓にはほとんど存在しない。ELISAにより血漿中濃度を測定する。動脈硬化の進展に関与する血管炎症マーカーとして有用性が期待されている²⁷⁾。

C-6-3. Anti-neutrophil cytoplasm antibody (ANCA) (抗好中球細胞質抗体)

自己抗体の一種で、細胞質全体に反応するcANCAと核周辺のみ反応するpANCAの2種類がある。それぞれ、Proteinase-3 (PR3) 及びMyeloperoxidase (MPO) という酵素を対応抗原とする。好中球機能 (蛋白分解酵素で異物の消化や炎症反応を起こし、ミエロペルオキシダーゼで殺菌) を亢進させ、血管の炎症を引き起こす。ELISA等の免疫学的手法で測定する。血管炎のマーカーとして、PR3-ANCA及びMPO-ANCAが臨床で使用されているが、感度及び特異性が不十分で、小血管の血管炎の診断における補助的利用に限定される^{28、29)}。非臨床試験での利用報告は見つからなかった。

C-6-4. miRNA

臨床でリウマチのマーカーとして有望と考えられている³⁰⁾。組織、血液、体液から採取可能。mRNAと比較して、複数の遺伝子の発現変化を検出できるため、測定する種類を少なくできる。また、Exosome中でのmiRNAはmRNAより安定で、ホルマリン固定・パラフィン包埋標本で検出できる。

リウマチ疾患では、慢性関節リウマチ (RA) にmiR-346等、変形性関節症にmiR-146a、全身性エリテマトーデス (SLE) にmiR-184等のバイオマーカー候補が特定されているほか、シェーグレン症候群、各種悪性新生物、臓器移植 (拒否反応)、多発性硬化症で変動するバイオマーカー候補がそれぞれ特定さ

れ、検証試験が実施されている。

E. 結論（肺炎及び血管炎）

臨床で既に利用されている炎症のバイオマーカーは、血管炎に限らず、診断の補助的役割に留まっている。これらは炎症の状態を示唆するものであって、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い。

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、毒性試験で実際に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。

C-7. 精巣毒性のバイオマーカー

C-7-1. 血中Testosterone、Luteinizing hormone (LH)、 Follicle stimulating hormone (FSH)

ヒト、げっ歯類、イヌ、サルなどでELISA法による血中濃度の測定が可能。Testosteroneレベル上昇の要因としては、Androgen受容体阻害に基づくNegative feedbackによるLH上昇やLH産生の直接刺激等が考えられる。Testosteroneの低下には、Leydig細胞の直接障害やLH低下による機序が考えられる。FSHの産生はInhibin Bを介してNegative feedbackにより調整され、精子形成阻害に伴い上昇する³¹⁾。LHはTestosteroneレベルの低下により二次的に上昇することが多い。しかし、LH産生が直接刺激されて上昇した場合にはTestosteroneレベルも上昇する。一方、黄体ホルモン作用等によりLHが低下すれば、Testosteroneレベルも低下する。

C-7-2. 血中Inhibin B

ヒト及びげっ歯類でELISA法による血中濃度の測定が可能。精子形成の状態を反映する指標となる。精細管腔に放出される精子数に応じてセルトリ細胞が分泌するホルモンで、精子形成が減少するとセルトリ細胞に貪食されるResidual bodiesが減少し、Inhibin Bの分泌も減少するとされる³²⁾。従って、Inhibin Bレベルの減少は精子形成の異常を示唆し、Negative feedbackにより、FSH分泌が増加する^{32、33)}。しかし、Inhibin Bの変化は、病理組織検査による精

子形成異常の検出ほど鋭敏ではないと考えられている³³⁾。臨床では、Inhibin Bレベルの減少が性腺不全の直接指標になるとの報告があり^{31、33、34)}、HESI DART (Development and reproductive toxicology) のプロジェクトで、Inhibin Bと*in vivo*精巣毒性発生との関連についての検証が進んでいる³¹⁾。

C-7-3. 尿中Creatine

自動生化学分析装置で種を問わず測定可能。Creatineはセルトリ細胞で生成され生殖細胞でさらに処理される³⁵⁾。塩化カドミウム³⁶⁾、Methoxyacetic acid (MAA)、Di-n-pentyl phthalate (DPP)^{37、38)}のラットへの投与により尿中のCreatine濃度が上昇するが、尿中CreatineはLDH-C4及びTestosteroneに比して精巣毒性検出感度が最も高かった³⁸⁾。一方、Leydig細胞を毒性標的とするEthane dimethanesulphonate (EDS)の投与によっては、Creatineは増加しないとの報告がある³⁷⁾。Creatineは肝臓、心臓及び筋肉にも多量に存在するが、尿中タウリン（肝臓由来）やCreatinine（骨格筋由来）を併せて評価すると鑑別が可能である^{39、40)}。Creatineは腎糸球体でろ過された後、尿細管上皮で再吸収され成人男子ではほとんど尿中に存在しない。また、ヒトでは、げっ歯類に比して精巣比重量が小さいために、精巣障害時でも尿中Creatine濃度は上昇しにくく、臨床バイオマーカーとしては有用性が低いと考えられる。

C-7-4. 血中Lactate dehydrogenase-C4 (LDH-C4)

早期パキテン期精母細胞以降の生殖細胞に発現し、減数分裂以降は発現が増加して成熟精子では尾部に局在する。生殖細胞及び精子における解糖に関与し、ATP産生を介して精子運動を亢進させる^{41、42、43)}。精巣毒性物質として知られているEthylene glycol monomethyl ether (EGME)及びDinitrobenzene (DNB)の投与によりLDH-C4の血中レベルが上昇するため、血中LDH-C4は精巣障害の検出に有効と考えられる。しかし、塩化カドミウムでは高用量で軽度の上昇し、低用量では組織変化の発生にも関わらず変化がみられなかった³⁶⁾。

C-7-5. 血中Androgen binding protein (ABP)

ABPはセルトリ細胞から分泌され、血漿及び間質液におけるABPレベルがセルトリ細胞障害のモニタリングに有用と考えられる。1、3-Dinitrobenzene (DNB)、Ethylene glycol monomethyl ether (EGME)による精巣障害に伴って血漿ABPが上昇したとの報告がある⁴⁴⁾。精子形成阻害の二次的影響として、ABP分泌が変化する可能性もある。

C-7-6. 血中Fatty acid binding protein 9 (FABP9)、VASA蛋白質

血液精巣関門(BTB)の破綻による精巣障害では、間質あるいは血中への精細管蛋白質の漏出が精巣障害時のバイオマーカーとなる可能性が考えられる。そこで、各種の精巣毒性物質を投与後に精細管蛋白質の漏出を検討した結果、低分子蛋白質であるFABP9がBTB機能の喪失に対する有効なバイオマーカーであることが示された。VASAは高分子蛋白質(MW 76kD)のため血中に漏出しにくい、塩化カドミウムの高用量投与で間質に漏出することが確認された。しかし、これらの蛋白質の漏出は、病理組織学的変化に比して低用量からみられることはなく、さらに、BTB破綻が生じない精細管障害では検出されないことが示された⁴⁵⁾。

C-7-7. 精巣中Glutathione S-transferase (GSH)、Testis-specific heat shock protein 70-2 (HSP70-2)、Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)、Phosphatidylethanolamine-binding protein (PEBP)

生殖細胞毒性物質であるEthylene glycol monomethyl ether (EGME)、Cyclophosphamide (CP)及びSulphasalazine (SASP)、並びにセルトリ細胞毒性物質である2、5-Hexandione (HD)を単回投与した後、精巣中で増加した蛋白を測定した。その結果、EGMEの高用量投与群のみに組織変化が発生し、他の群では組織変化を伴わずにこれらの蛋白質が増加した^{46、47)}。

C-7-8. 精巣中miRNA

EGMEを50及び2000 mg/kgの用量で単回投与し、6及び24時間後に精巣の病理組織検査及びmiRNAの測定を行った。その結果、2000 mg/kg群において、組織変化及びmiRNAの変化がみられた。すなわち、投与6時間後では精母細胞の変性及び壊死、24時間後にはセルトリ細胞の空胞変性が観察された。miRNAの変化としては、6時間後にはmiR-760pが増加、24時間後にはmiR-134、miR-320及びmiR-188-5pが増加し、miR-92a及びmiR-449aが減少した。これらのmiRNAの遺伝子標的は、epigenetic関連遺伝子の抑制に関連するもので、ヒストン構造抑制に関与するHigh mobility group AT-hook2の増加、及びヒストン脱アセチル化に関与するHistone deacetylase4の減少であった⁴⁸⁾。

C-7-9. 精子中酸化ストレス関連バイオマーカー

ヒト精子における酸化ストレスによるDNA障害を、ROS形成を指標とした以下の方法で測定できることが示された⁴⁹⁾。

- ・直接検出
- ・Lipid peroxidationの検出
- ・Oxidative DNA damageの測定
- ・8-OHdGの測定
- ・Single cell gel electrophoresis (comet assay) によるDNA断片化の測定
- ・TUNEL法によるアポトーシスの検出

C-7-10. 精子中Sperm surface protein 22 (SP22)

SP22は、ラット、ウサギ、ヒトなど広範な種の精子に発現している蛋白質であり、ラット精子におけるSP22のmRNA及び蛋白発現は、パキテン精母細胞及び円形精子細胞の形成と一致し、SP22の遺伝子発現と生殖能力は相関性が高いと報告されている。この関係は、射精された精子だけでなく、精巣上体中の精子にも応用可能である⁵⁰⁾。SP22の発現及び精子形成異常や精巣上体尾部精子の受胎能の低下がDibromoacetic acid (DBA) やBromoacetic acid (BAC)を投与したラットで報告されている⁵¹⁾。また、抗SP22抗体を作製して臨床での受胎能検査への応用が検討

されている⁵⁰⁾。

E. 結論 (精巣毒性)

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。その他のホルモン濃度の変化に関しては総合的判断が必要であるが、いずれの場合でも、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が、その他のパラメータの精巣毒性検出感度は病理組織学的検査ほどには高くなかった。精細管からの漏出蛋白は精巣・血液関門 (TBB) 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ことも確認された。

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。

F. 今後の展望と課題

現在、日・米・欧ともに肝障害、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のバイオマーカーを見出す取り組みが、産・学ともに積極的に行われている。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、産・官・学が協力してバイオマーカー探索を推進する流れが現れてきている。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。

今後の課題として、最新の技術を駆使した積極的なバイオマーカー探索を継続し、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、堅牢性の確認のため、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。

G. 参考文献

- 1) Tarrant M.: Blood cytokines as biomarkers of *in vivo* toxicity in preclinical safety assessment: Considerations for their use. *Toxicol. Sci.*, 117: 4-16 (2010)
- 2) Laverty H.G. et al.: The potential of cytokines as safety biomarkers for drug-induced liver injury. *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, 66: 961-976 (2010)
- 3) Hadina S. et al.: Comparison of *in vivo* bioluminescence imaging and lavage biomarkers to assess pulmonary inflammation. *Toxicology*, 291: 133-138 (2012)
- 4) Oliveira H. et al.: Flow cytometry evaluation of lead and cadmium effects on mouse spermatogenesis. *Reprod. Toxicol.*, 22: 529-535 (2006)
- 5) Suter L. Meier G. et al.: Flow cytometry as a sensitive tool to assess testicular damage in rat. *Arch. Toxicol.*, 72: 791-797 (1998)

- 6) Kasahara H. *et al.*: β 3-adrenoceptor-mediated increased circulating transaminase levels in mice treated with its agonist BRL 37344. *J. Toxicol. Sci.*, 35: 779-784 (2010)
- 7) O'Brien *et al.*: Advantages of glutamate dehydrogenase as a blood biomarker of acute hepatic injury in rats. *Laboratory Animals*, 36: 313-321 (2002)
- 8) 高橋光一 他 : 心・肝・腎に関する新規毒性バイオマーカーの現状 - 文献的考察 -, *医薬品研究*, 36: 564-576 (2005)
- 9) Laverty H.G. *et al.*: The potential of cytokines as safety biomarkers for drug-induced liver injury. *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, 66: 961-976 (2010)
- 10) Amacher D.E.: Strategies for the early detection of drug-induced hepatic steatosis in preclinical drug safety evaluation studies. *Toxicology*, 279: 10-18 (2011)
- 11) Feldstein A.E. *et al.*: Cytokeratin-18 fragment levels as noninvasive biomarker for nonalcoholic steatohepatitis: A multicenter validation study. *Hepatology*, 50: 1072-1078 (2009)
- 12) Yaman H. *et al.*: Pentraxin 3 as a potential biomarker of acetaminophen-induced liver injury. *Exp. Toxicol. Pathol.*, Aug 29 (2011)
- 13) Yamamoto T. *et al.*: Investigation of proteomic biomarkers *in vivo* hepatotoxicity study of rat liver: toxicity differentiation in hepatotoxicants. *J. Toxicol. Sci.*, 31:49-60 (2006)
- 14) Laterza O.F. *et al.*: Plasma MicroRNAs as Sensitive and Specific Biomarkers of Tissue Injury. *Clinical Chemistry*, 55:1977-1983 (2009)
- 15) Wang K. *et al.*: Circulating microRNAs, potential biomarkers for drug-induced liver injury. *PNAS*, 106:4402-4407 (2009)
- 16) Starkey Lewis P.J. *et al.*: Circulating microRNAs as potential markers of human drug-induced liver injury. *Hepatology*, 54:1767-1776 (2011)
- 17) Yang X. *et al.*: Urinary micrornas as noninvasive biomarkers for acetaminophen-induced liver injury. *J. Postgenom Drug Biomark Develop*, 1:101. doi:10.4172/2153-0769.1000101 (2011)
- 18) Gao W. *et al.*: Mechanism-based biomarker gene sets for glutathione depletion-related hepatotoxicity in rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 247: 211-221 (2010)
- 19) Lippi G. *et al.*: Inflammatory biomarkers for the diagnosis, monitoring and follow-up of community-acquired pneumonia: clinical evidence and perspectives. *Eur. J. Intern. Med.*, 22: 460-465 (2011)
- 20) Summah H. and Qu J-M.: Biomarkers: a definite plus in pneumonia. *Mediators. Inflamm.*, 675753: (2009)
- 21) Palazzo S.J. *et al.*: Biomarkers for ventilator-associated pneumonia: review of the literature. *Heart Lung J. Acute Crit. Care*, 40: 293-298 (2011)
- 22) Buhaescu I. *et al.*: Serum procalcitonin in systemic autoimmune diseases—where are we now? *Semin. Arthritis. Rheum.*, 40: 176-183 (2010)
- 23) McCliskie K. *et al.*: Phosphodiesterase type 4 inhibitors cause proinflammatory effects *in vivo*. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 319(1): 468-476 (2006)
- 24) Pauluhn J. and Mohr U.: Mosquito coil smoke inhalation toxicity. part II: subchronic nose-only inhalation study in rats. *J. Appl. Toxicol.*, 26: 279-292 (2006)
- 25) Palazzo S.J. *et al.*: Biomarkers for ventilator-associated pneumonia: review of the literature. *Heart Lung*, 40(4): 293-298 (2011)
- 26) Ovchinnikova O. *et al.*: Osteoprotegerin promotes fibrous cap formation in atherosclerotic lesions of ApoE-deficient mice – brief report. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 29: 1478-1480 (2009)
- 27) 井上健司: 新規血管炎症性マーカーPentraxin 3. *臨床病理*, 59: 694-701 (2011)
- 28) Miller A. *et al.*: Assessment of systemic vasculitis. *Autoimmun. Rev.*, 8:170-175 (2008)
- 29) Aras G.: Recent aspects of vasculitis and future

- direction. *Intern. Med.*, 50:1869-1877 (2011)
- 30) Alevizos I. *et al.*: MicroRNAs as biomarkers in rheumatic diseases. *Nat. Rev. Rheumatol.*, 6:391-398 (2010)
 - 31) Muller P.Y. and Dieterle F.: Tissue-specific, non-invasive toxicity biomarkers: translation from preclinical safety assessment to clinical safety monitoring. *Expert. Opin. Drug Metab. Toxicol.*, 5: 1023-38 (2009)
 - 32) Anderson R.A. and Sharpe R.M.: Regulation of inhibin production in the human male and its clinical applications. *Int. J. Androl.*, 23: 136-144 (2000)
 - 33) Stewart J. and Turner K.J.: Inhibin B as a potential biomarker of testicular toxicity. *Cancer Biomark.*, 1:75-91 (2005)
 - 34) Cicognani A. *et al.*: Low serum inhibin B levels as a marker of testicular damage after treatment for a childhood malignancy. *Eur. J. Pediatr.*, 159: 103-107 (2000)
 - 35) Moore N.P. *et al.*: Creatine metabolism in the seminiferous epithelium of rats. I. Creatine synthesis by isolated and cultured cells. *J. Reprod. Fertil.*, 112: 325-330 (1998)
 - 36) Draper R.P. and Timbrell J.A.: Comparison of urinary creatine with other biomarkers for detection of cadmium induced testicular damage. *Biomarkers*, 3: 335-346 (1998)
 - 37) Moore N.P. *et al.*: Urinary creatine profiles after administration of cell-specific testicular toxicants to the rat. *Arch. Toxicol.*, 66: 435-442 (1992)
 - 38) Timbrell J.A.: Urinary creatine as a biochemical marker of chemical induced testicular damage. *Arh Hig. Rada. Toksikol.*, 51: 295-303 (2000)
 - 39) Timbrell J.A. *et al.*: Use of urinary taurine and creatine as biomarkers of organ dysfunction and metabolic perturbations. *Comp. Haematol. Int.*, 5: 112-119 (1995)
 - 40) Draper R.P. *et al.*: Studies on the muscle toxicant 2,3,5,6-tetramethyl p-phenylenediamine: effects on various biomarkers including urinary creatine and taurine. *Arch. Toxicol.*, 69: 111-117 (1994)
 - 41) Odet F. *et al.*: Expression of the gene for mouse lactate dehydrogenase C (Ldhc) is required for male fertility. *Biol. Reprod.*, 79: 26-34 (2008)
 - 42) Goldberg E. *et al.*: LDHC: the ultimate testis-specific gene. *J. Androl.*, 31: 86-94 (2010)
 - 43) Odet F. *et al.*: Lactate dehydrogenase-C4 (LDH-C4) is essential for sperm function. *Biol. Reprod.*, 78: 187, 567 (2008)
 - 44) Reader S.C. *et al.*: Acute testicular toxicity of 1,3-dinitrobenzene and ethylene glycol monomethyl ether in the rat: evaluation of biochemical effect markers and hormonal responses. *Fundam. Appl. Toxicol.*, 16: 61-70 (1991)
 - 45) Elkin N.D. *et al.*: Toxicant-induced leakage of germ cell-specific proteins from seminiferous tubules in the rat: relationship to blood-testis barrier integrity and prospects for biomonitoring. *Toxicol. Sci.*, 117: 439-448 (2010)
 - 46) Yamamoto T. *et al.*: Protein expression analysis of rat testes induced testicular toxicity with several reproductive toxicants. *J. Toxicol. Sci.*, 30: 111-126 (2005)
 - 47) Yamamoto T. *et al.*: Integrated NMR-based metabonomic investigation of early metabolic effects of ethylene glycol monomethyl ether (EGME) on male reproductive organs in rats. *J. Toxicol. Sci.*, 32: 515-528 (2007)
 - 48) Fukushima T. *et al.*: MicroRNAs expression in the ethylene glycol monomethyl ether-induced testicular lesion. *J. Toxicol. Sci.*, 36: 601-611 (2011)
 - 49) Ong C-N. *et al.*: Biomarkers for male reproductive health hazards: are they available? *Toxicol. Lett.*, 134: 17-30 (2002)
 - 50) Klinefelter G.R.: Saga of a sperm fertility biomarker. *Anim. Reprod. Sci.*, 105: 90-103 (2008)
 - 51) Kaydos E.H. *et al.*: Haloacid induced alterations in fertility and the sperm biomarker SP22 in the rat are additive: validation of an ELISA. *Toxicol. Sci.*, 81:

430-442 (2004)

G. 健康危険情報

該当なし

H. 研究発表

1. 論文発表

該当なし

2. 学会発表

該当なし

I. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

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

－バイオ医薬品の新しい課題についての調査研究－

研究分担者：平林 容子（国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター毒性部）
協力研究者：真木 一茂（独立行政法人 医薬品医療機器総合機構 生物系審査第1部）
松本 峰男（独立行政法人 医薬品医療機器総合機構 生物系審査第2部）
渡部 一人（中外製薬株式会社 安全性研究部）
中澤 隆弘（アンジェスMG（株））
三分一所 厚司（第一三共株式会社 安全性研究所）
中村 和市（塩野義製薬株式会社 開発薬事部）

研究要旨

本研究は、日米EU医薬品規制調和国際会議（ICH）におけるバイオ医薬品の非臨床安全性試験方法に関するS6ガイドラインのカテゴリーベースでの明確化（clarified）と拡充（amplification）の必要性に対応した補遺（Addendum）の策定を支援する目的で、国内の関係組織（独立行政法人医薬品医療機器総合機構〔PMDA〕および日本製薬工業協会〔JPMA〕）から研究協力者の参加を得て、関連情報の収集や解析を行うものであり、併せてICHの場での議論に資するための国内の意思統一をも図るものである。本年度は、昨年度の成果を元に引き続きS6ガイドラインの補遺策定にむけた専門家ワーキンググループ（S6（R1）EWG）での活動を中心に、これを支援する調査研究を行った。S6（R1）EWGは、平成22年11月のICH福岡会議ではほぼ完成させていた補遺文書の、各極内での最終調整並びにそれを踏まえた修正を終え、平成23年6月のICHシンシナティ会議を前にStep4の合意に達した。合意文書はICH steering committeeの承認を経て公開中であり、現在各極でStep5作業が行われつつある（EUは2011年7月に発出済み）。本研究グループは、こうしたS6（R1）EWGの活動としてStep4文書完成までのメールベースでの作業に参画し、引き続き完成したStep4文書の日本語版を作成した。この過程で、関連する諸問題について随時検討を行っている。Step4文書の日本語版は、厚生労働省によるS6ガイドラインの補遺に関するStep5作業に利用されている。次年度以降も、パブリックコメントへの対応から派生した諸問題に関する検討など関連課題の調査研究を粛々と進めるとともに、補遺による改訂内容の国内周知のための出版物や講演会などを介した発信なども適宜進める予定である。

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

A. 研究目的

本研究は、日米EU医薬品規制調和国際会議（ICH）におけるバイオ医薬品の非臨床安全性試験法に関するS6ガイドラインの、カテゴリーベースでの明確化

（clarified）と拡充（amplification）の必要性に対応したアップデートの手段としての、補遺（addendum）の策定を支援することを目的とし、国内の関係組織（独立行政法人医薬品医療機器総合機構〔PMDA〕

及び日本製薬工業協会 [JPMA]) から研究協力者の参加を得て、関連情報の収集や解析を行い、併せてICHの場での議論に資するための国内の意思統一も図るものである。

S6ガイドラインのアップデートについては、各極から提案された改訂点を集約し、最終的に5項目に限定して、既存ガイドラインは保持したまま、このものの明確化と拡充を目的とした補遺を作成すること、この際に動物愛護の原則（いわゆる3Rs）を考慮すること、が、平成20年6月のポートランド会議で合意されている。

補遺の策定が合意された項目は以下の通り：

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

当該の合意を受け、S6（R1）EWG が構成され、平成20年11月のブラッセル会議から補遺文書の作成作業を開始し、あらかじめ決められていた時程表に従い、平成21年のセントルイス会議でStep2に到達した。ところが、引き続き行われた平成22年6月のタリン会議及び11月の福岡会議でStep4文書の作成作業をおこなうも最終合意には至らなかった。その後FDA内部での調整がまとまり、これを受けて平成23年6月のシンシナティ会議を待たずにポスタル・サインオフでStep4に到達する方針で、最終文書案の作成を進めた。

今年度は、本研究グループはS6（R1）EWGとして、この文書案の記載整備などの修文、最終確認作業などを行い、シンシナティ会議前にStep4の合意に到達した。引き続き合意された補遺文書の翻訳を行い、日本語版を作成した。併行してこれまでに収集したパブリックコメントへの対応並びに、派生ないしは関連する諸問題についても随時検討を行い、一定の成果を得た。

B. 研究方法

本研究は、昨年度に引き続き、PMDAより真木一茂・松本 峰男各氏、JPMAより渡部 一人・中澤 隆弘（2010年6月よりアンジェスMG（株）に移動となるも、引き続き協力いただくこととなった）・三分一所 厚司・中村和司各氏に研究協力者として参加いただくことで進めた。尚、PMDAの井上 達・小野寺博志各氏には、オブザーバーとして、適宜参加していただいた。

1. バイオ医薬品の非臨床安全性試験法ガイドライン（S6ガイドライン）の補遺の策定に向けた専門家ワーキンググループ（S6（R1）EWG）への参画

本研究グループは、昨年度末までに基本的な合意に達していた頭記5項目に関するStep4文書案の完成にあたり、適宜行われたメールベースでの議論に参画し、そこでの議論に対応するなど、Step4文書の完成に向けた修正作業に従事した。

2. Step4文書の日本語版の作成

6月のICHシンシナティ会議の直前にStep4に到達した合意文書に対して翻訳作業を行い、特に専門用語の和訳など、他のガイドラインとの整合性を図りつつ、Step4日本語版を作成した。

3. S6（R1）EWGでの議論に関連する諸問題の検討

本研究グループは、S6（R1）EWGでの議論に関連する諸問題について検討を進めている。本年度は、Step4日本語版の作成に併行して、パブリックコメントへの対応から派生した諸問題など、関連する諸問題について検討した。

C. 研究結果

1. S6（R1）EWGへの参画

S6（R1）EWGは、欧州連合のDr. Jan-Willem van der Laanをラポーター（Rapporteur）として、6極（MHLW、JPMA、食品医薬品局 [FDA]、米国研究製薬工業協会 [PhRMA]、欧州連合 [EU]、欧州製薬団体連合会 [EFPIA]）及び、カナダ保健省 [Health Canada]、バイオテクノロジー工業機構（BIO）からの参加者で構成されていた。Step4達成を目指していた昨年度の福岡会議（平成22年11月8日～11日）で、結論が

持ち越しになって以降、電子メール交信を随時行なってきた。経過中、新たな論点が浮上することもなく、またEWG外のFDA内部の異論についても内部調整により解消されたことから、平成23年6月のシンシナティ会議での面談会議は不要との見通しのもとにStep4到達に向けた合意文書の修正作業を進め、同会議の直前にStep4文書を完成させて、S6 (R1) EWGは解散となった。本研究グループは、それぞれの出身母体における関係者等からの意見も収集した上で、随時こうした電子メール交信によるこれらの作業に対応した。

合意されたStep4文書は、S6ガイドラインをそのまま第一部とするS6 (R1) ガイドラインの第二部として、平成23年6月12日付けでICH steering committeeの承認を経て公開されている。更に、EUでは平成23年7月にStep5作業を終了し、[EMA/CHMP/ICH/731268/1998](#)として発出された。

公表されたStep4文書で、これまでの報告との相違点、問題となった論点とその最終結論の概略は以下の通り。

1-1. 緒言

- S6ガイドラインと補遺文書との関係について：補遺文書はS6ガイドラインを補完するものであること、ただしS6ガイドラインの記載内容と違いがある場合は補遺文書が優先されることとし、この点が明らかになるように記述した。S6ガイドラインは変更すべきではないとのEWG内での多くの意見に基づき、補遺文書が最終的に施行された場合には、2つの独立した文書がセットでダウンロードされるよう各極の規制当局に依頼し、了承されていた。しかし、結果としてS6ガイドラインは、内容はそのままS6 (R1) ガイドラインの第一部として改称され、今回作成した補遺文書はその第二部として統合された。

1-2. Species Selection (動物種選択)

- 変更はなかった。

1-3. Study design (試験デザイン)

- 反復投与毒性試験の最長期間：福岡会議でのStep4到達が叶わなかった要因の一つであった

が、現行のS6ガイドラインの文言（原則6ヶ月でよい）を支持することが再確認された。

- 回復性：試験施行の目的は作用の可逆性をみることにあり、完全な回復までの観察は必ずしも必要ではないこと、また、遅延効果（遅発作用）をみることは目的では無いこととし、またすべての用量ではなく、かついずれか1試験で行えば良いこととしてあった。EWG外のFDAの意見として、完全な回復を要件とすることが求められたが、これを求めないことで合意できた。尚、試験はヒトのリスク評価に適切な用量を選定することとし、どの用量を用いるかの妥当性は、申請者が説明することとした。

1-4. Immunogenicity (免疫原性評価)

- 変更はなかった。

1-5. Reproductive/developmental toxicity (生殖発生毒性評価)

- 一般原則—動物種選択：妊娠への有害作用を示唆する十分な科学的根拠（作用機序に関する遺伝子改変動物等の情報）があれば、追加の非臨床試験は必要ないこととしたが、“**under appropriate circumstances**”を加筆することを条件に、最終合意に達した。

1-6. Carcinogenicity (がん原性評価)

- 福岡でのStep4到達が成らなかった最大の要因として出されたEWG外のFDAの問題提起としては、(1) 発がん性の懸念が不明の場合、リスクの軽減のために実施する追加試験に従来のげっ歯類を用いたがん原性試験を含まないとした点や、(2) 発がんリスクの予測に有用な具体的な試験系や追加検査項目ないしはendpointに関しては、**case by case**であり、現時点では明示しないとした点などであったが、FDA内部調整の結果、変更なしで合意に達した。

2. Step4文書の日本語版の作成

平成23年6月に完成したStep4文書の翻訳作業を行い、2回の分班会議（平成21年9月14日／9月27日）並びにメールベースの討議により、日本語版の作成作業を行った。特に専門用語の和訳など、他のガイドラインとの整合性には留意しつつ作業にあた

った。作成したStep4文書の日本語版は、厚生労働省によるS6ガイドラインの補遺に関するStep5作業に利用されている。(平成24年3月23日に薬食審査発0323第1号として発出された)

3. S6 (R1) EWGでの議論に関連する諸問題の検討

本研究グループは、S6 (R1) EWGでの議論に関連する諸問題について検討を進めている。今回、Step4の最終文書の日本語版作成の過程では、他の既存のガイドラインの関連事項の表記との整合性などについても検討した。

また、昨年度にS6 (R1) EWGで合意に達したStep2文書に対して平成22年1月8日～3月8日の2ヶ月間に国内で収集したのべ194項目のパブリックコメントは、29項目に集約して日本側の見解を補遺策定に反映させるべく、EWGへの提案をおこなったところであるが、今般のStep4合意文書の公開をうけて、改めて集まったパブコメなど諸々の資料を取捨選択して、改定ポイントに関する質問事項(Q)を作成し、これに対して、最終合意との関係での回答(A)をつくることを想定して検討を進めた。

D. 考 察

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

最終合意文書は、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これまでの知見の見直しをはかり、他のなんらかの手段によって得られる情報に対して、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で、動物愛護の所謂3Rsのうち特に使用動物数の削減(reduce)に配慮したガイドラインとしてまとめることができたものとする。

これは一方で、これまでの、僅かでも非臨床試験で解ることは試験を行うという考え方に対しては否定的な立場となった。例えば、高い種特異性の為に通常用いられる動物種での試験が不適切な場合に、

S6ガイドラインで推奨されたモデル動物を作成する手法に対し、結果の正しい解釈の為の問題点として、作成したモデル動物種の背景データの不足などが指摘されており、新ガイドラインでは安全性評価の為にモデル動物を作出することは必ずしも推奨しないこととなった。

また、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、新ガイドラインでは、今後の試験法の開発を期待する旨の記載にとどめた。今後、ヒトでの安全性にかかる予測性のある、動物試験に依らない試験法の開発が望まれる。

E. 結 論

S6ガイドラインの明確化と拡充の為に補遺の策定を支援する目的で、国内の関係組織(PMDAおよびJPMA)から研究協力者の参加を得て、その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の策定作業に携わって国際合意文書を完成させるなど、一定の成果を得た。

F. 健康危険情報

該当しない

G. 研究発表

1. 論文発表

平林容子. 安全性に関するトピックスの動向「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.

2. 学会発表

該当しない

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

該当しない

2. 実用新案登録

該当しない

3. その他

該当しない

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

－光毒性試験に関するガイドライン策定のための調査研究－

総括研究者：大野 泰雄（国立医薬品食品衛生研究所）
分担研究者：小野寺博志（医薬品医療機器総合機構）
研究協力者：中江 大（東京都健康安全研究センター）
 笛木 修（医薬品医療機器総合機構）
 細井 一弘（参天製薬株式会社）
 高木 広憲（大正製薬株式会社）
 小島 肇（国立医薬品食品衛生研究所）
 田中 憲穂（食品薬品安全センター）
 尾上 誠良（静岡県立大学）
アドバイザー：中村 和市（塩野義製薬株式会社）
 岩瀬裕美子（田辺三菱製薬株式会社）

研究要旨

医薬品における光安全性に関する国際的ガイドラインを作成するため平成22年11月のICH福岡会議からSafetyトピックとしてS10「光安全性の評価」EWGの活動が開始した。本邦では厚生労働科学研究費補助金「国際的整合性を旨とする医薬品等の品質、有効性及び安全性に関する研究」（H19-医薬-一般002）において海外での状況を調査し、それを基に国内での「医薬品の光安全性に関する現状」を作成した。「医薬品の（H22-医薬-一般-001）（H22-24年）ではICHでのEWG活動に対する国内対応を目的とした。平成23年6月シンシナティ、11月セビア会議における議論をへて、平成24年6月の福岡会議でのドラフト案完成を目標とする。

なお、ICHガイドラインは光毒性試験実施の必要性に関する項と安全性評価のための適切な試験法に関する項を主旨とし、3Rsの原則に基づいて策定される予定である。

キーワード：光毒性、ICHガイドライン、S10 EWG、光安全性評価

A. 研究目的

ICHで医薬品の光安全性評価のための非臨床毒性試験ガイドラインについて議論が開始されるのに伴いガイドライン作成のための情報収集、EWG会議での議論や問題点を収集分析し、当面はStep1文書作成を目的とする。

B. 研究方法

平成22年11月ICH福岡会議では各極の臨床現場での光安全性に関する対応の違いを知ることが、ガイドライン策定における項目の策定に必要性であるとされた。情報収集の方法として各極の主な皮膚科臨床医にアンケート方式で対応の違いについて情報を得る。ICH会議開催国ではEWG会議で直接、臨床での光毒性について意見を聞く。医薬品の光反応性を

物性的特性から検出する系としてROSアッセイを新規候補とするため、JPMA主導でバリデーション試験を実施した。ICH会議でStep1文書策定のための議論が開始されたのをうけ、それに対応するため班会議を開催し意見の集約を行う。また各種学会等で光毒性に関する最新の話題を収集すると共に、ガイドライン策定の情報を広報し意見を募る。

C. 研究結果

H23年6月のシンシナティ会議が行われ、その対応のため班会議が行われた(資料1)。シンシナティ会議までに日本とEUは皮膚科専門医にインタビューを行いEWG会議ではPhRMAからDr Trssler(資料2)とDr Uemura(資料3)から眼科ならびに皮膚科の臨床医からの光毒性評価の現状について報告された。その結果EWG会議では本ガイドラインはSafetyであり臨床に関する項目は扱わない結論となった。ガイドラインの骨子は光毒性試験実施の必要性は階層的アプローチを採用し、対象とする投与経路は全身経路と経皮そして眼局所に分類した。

シンシナティ会議後に、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バリデーションが実施された(資料5)。セビア会議に対応する班会議(資料6)が実施された。各地域での眼科局所剤に対する対応についての報告があり(資料7)、各極での対応方針に違いがあり、これを踏まえセビア会議で協議に臨む必要があることを確認した。セビア会議に向けて、最終ドラフト案を作成するため班会議で課題について意見を収集した(資料8)。

セビア会議では光毒性と皮膚3DモデルについてDr.Helenaから発表があった(資料11)。現在の3D-skinモデルは、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、アレルギーに対しては反応しないことが特徴である。セビア会議後に電話会議やメール会議を実施し、Step1文書が作成された(資料12、資料13)。

なお班会議は、計6回開催された。

E. 結論

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で議論が開始された。国際調和に向けた国内準備とその対応を行った。

H24.6の福岡会議でのStep 2到達に向けたメドがあった。

今後、具体的な問題点について国内議論し、ガイドライン策定に必要な情報収集を行いICH EWG会議での、早期実現を目指す。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

該当なし

2. 学会発表

該当なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

資料1：第一回班会議議事録

資料2：ICH-S10 Trssler発表

資料3：ICH-S10 Uemura発表

資料4：第二回班会議議事録

資料5：JPMA 調査結果

資料6：第三回班会議議事録

資料7：各極での眼科領域薬の毒性試験

資料8：第四回班会議議事録

資料9：第五回班会議議事録

資料10：第六回班会議議事録

資料11：3D-Skin mode

資料12：Step1 document draft

資料13：Step1 和訳版

資料14：Tire strategy

平成 23 年 5 月 17 日

「光毒性試験に関するガイドライン策定のための調査研究」

平成 23 年度 第一回班会議 議事録

平成 22 年度厚生労働科学研究補助金事業

「医薬品等の品質・有効性及び安全性確保のための手法の国際的整合性を旨とした調査と妥当性研究」

日 時: 2011年5月16日(月)14:00~17:30

場 所: 東京都健康安全研究センター 会議室 (新宿区百人町)

出席者: 小野寺博志 (PMDA)、笛木修 (PMDA)、中江大 (東京健安研センター)、
田中憲穂 (食薬センター)、小島肇 (国衛研)、細井一弘 (参天製薬)、
高木広憲 (大正製薬)、白菊敏之 (大塚製薬)、岩瀬裕美子 (田辺三菱
製薬) 中村和市 (塩野義製薬)

欠席者: 尾上誠良 (静岡県大)

配布資料:

- 1 本年度班員名簿
- 2 臨床家へのアンケート
- 3 上出教授からの回答
- 4 ドキメント(2011/5/16バージョン)

議題内容:

1. 開会の辞、メンバー紹介(資料1)

S10ラポーターをシンシナティー会議のみ中江氏から中村氏が代行。
理由として3月の東日本大震災により、職務上長期不在が困難なため

2. ICH活動について

現時点における安全性に関するトピックの説明

GTGD(遺伝子治療ディスクッショングループ)は消滅

S6(R1)は近日中にStep4に合意する予定

M3(R2)Q&Aはシンシナティー会議の前日(土日)にF2Fを予定

M7はシンシナティーでEWGの継続を討議

S1はメンバー登録を終了しIDGとして検討を開始するがシンシナティーで会合
はしない

S2は進展なし

3. S10-ICH シンシナティーEWG会議に向けての対応

☆ 臨床家へのアンケート

国内では以下の3名の先生にアンケートの依頼を行った(資料2)

上出良一教授（東京慈恵会医科大学付属第三病院 皮膚科）
松永佳世子教授（藤田保健衛生大学 医学部皮膚科学講座）
戸倉新樹教授（浜松医科大学 皮膚科学講座）

上出教授より回答があり（資料3）、堀尾名誉教授が紹介された。

堀尾 武名誉教授（関西医大名誉教授現聖護院皮膚科クリニック院長）
松永、戸倉教授に再度確認し意見を聴取する必要があるとともに、上出教授の回答について英訳を行う（小野寺）

☆ROS の国内バリデーション進行状況について

細井委員より現状説明が行われた。

本年1月と4月に説明会と準備委員会が開催され、プレバリデーション結果が本日（16日）示された。11月までに40-60ケミカルでの本試験を実施し、その結果をもってOECDガイダンスとして申請する予定。S10ドキュメントへの反映については結果を見て判断するが、実際の成績を掲載することは考慮しない。プレバリデーション成績については多少の考察が必要な箇所がある。

- ・セリック社の照明使用時の温度調整について
- ・single oxygen と superoxide 励起に関する8MOPの施設間不一致について
- ・低濃度(20 μ M)での高値、析出への対応について
- ・Top dose(200 μ M)決定の背景と試験濃度の選択について

シンシナティー会議では現在までの結果（プロトコール含む）と上記の問題点をまとめ、今後の予定（本番プロトコールの方針など）を提示する。

☆S10ドキュメントについて（資料4）

現在まで提出があった各担当項目について、議論すべき内容については27日までメールで検討し、EWGで議論する。

今後の予定

メールベースで対応が不十分な場合は直接会議を設定するが、その場合6月10日までとなる。ICH後の会議は新たに予定を調整する。

4. その他

なし

Photosafety Expert Working Group (ICH S10 EWG)

Charles S. Tressler, M.D.
Pfizer
Cincinnati, Ohio
13 June 2011

Incidence and Range of Severity

- > **Skin, eye or other:** varies with skin usually greater than eye, eye protection decreases the risk of damage
- > **Range of Clinical Manifestations and how are they treated:** Burn and blister of skin in the acute phase; eye- conjunctival hyperemia, keratitis, retinal burns acutely; longer term- cataract, pingueculae, pterygia and retinal damage
 - **Treatment:** removal of the offending agent, symptomatic treatment but prophylactic or precautionary treatment preferred

Incidence and Range of Severity

- > **What are the short and long-term prognoses?** ~ to exposure
 - Acute: appropriate burn treatment
 - Chronic: pigimentary changes and cancers associated with 'sun' exposure (e.g., ~to # of severe sun burns in youth)
- > **Do Clinicians observe reversibility of reactions?** Usually, but upon repeat exposure may develop permanent skin changes or ocular surface changes, cataract, and retinal changes
 - The question is when does the tipping point occur for permanent damage

Incidence and Range of Severity

- > **Individual Susceptibility:**
 - **gender:** no significant difference
 - **age:** infants, elderly, infirmed, e.g. CNS damage
 - **skin type:** fair complexion, "burners, not tanners"
 - **genetic** background: white, Northern Europeans
 - **eye color:** lighter color (but for macular degeneration, there was not an association with iris color)

How Assessed Clinically

- > **Differentiation of phototoxicity reactions from other reactions of the skin and eye:**
 - Reaction on the exposed areas worse than body areas covered
 - Appearance of the reaction or rash
- > **Differentiation of phototoxicity and photoallergy:** drug photosensitivity and delayed photosensitivity reaction

How Assessed Clinically

- > **What specific diagnostic tests are utilized for pharmaceuticals?** Will a specific or range of λ of light be absorbed by the targeted tissue? Used to differentiate a response.
- > **How to assess oral route of administration?** HCTZ or sulfa compound
- > **How to assess topical route of administration?** Retinol compounds, Coal tars
- > **How to assess ocular route of administration?** Verteporfin

How Assessed Clinically

- **With a potentially phototoxic compound, what approaches (tests, monitoring) could be taken to assess in the clinic?** A disc with ~7 to 9 uniform holes to deliver light of specific wavelength and intensity, "sunburn" test
- **What nonclinical are you most interested in if you are seeing with a potential phototoxic reaction?** The *in vivo* phototox/photoallergen
- **Would one exclude specific populations in a clinical trials?** possibly, e.g. individuals taking other photoactive drugs, outside workers (farmers), sun bathers. Alternatively, one can prescribe specific clothing, hats, and eye protection

Drug Safety Adverse Event Reporting

- **Would one use specific types of adverse events to distinguish phototoxic reactions from other types of AEs?** Depends upon the clinician performing the assessment. This would require a more controlled environment to closely follow and observe the subjects
- **How does one decide whether a pharmaceutical is associated with a phototoxic liability?** Drug characteristics, *in vitro/in vivo* phototox testing, occurrence of an event, and its repeatability

Drug Safety Adverse Event Reporting

- **Practicality of assessing phototoxicity in a phase II clinical trial:** yes
- **Elements contained in the protocol:** can vary with objectives of the study
 - **Numbers of patients:** 6 per cohort (2:1) up to 25-40 patients per cohort (for between 20-30 patients for assessment)
 - **Specific AEs:** lighting conditions which lead to phototoxicity

Elements contained in the protocol: can vary with objectives of the study

- **Elements contained in the protocol:** can vary with objectives of the study
 - **Informed consent issues:** perform the testing in patients instead of normal, healthy volunteers (NHV), detailed reminders for protection and provide the necessary equipment (e.g., protective lenses, protective skin cover)
 - **Physician Training and Self Reporting Instruments:** Dermatologist trainers and QoL instruments

- Rating: 2002 Dec;22(1):691-7.
- Duration of skin photosensitivity and incidence of photosensitivity reactions after administration of verteporfin.
- Houle JM, Sirzina HA.
- Source
- QLT Inc, 887 Great Northern Way, Vancouver, British Columbia V6T 4T5, Canada.
- Abstract
- **BACKGROUND:** Verteporfin (Visudyne, Novartis AG) is a light-activated drug that reduces the risk of vision loss in patients with certain types of choroidal neovascularization (CNV). Because photosensitivity can occur with photosensitizers, it is important for ophthalmologists providing verteporfin therapy to understand its time course and duration, as well as the incidence of photosensitivity reactions.
- **METHODS:** Data were obtained from three sources: 1) the time course of skin photosensitivity in 17 volunteers by measuring erythema/edema over time after verteporfin using red light exposure; 2) the duration of skin photosensitivity in 30 patients with skin cancer by exposing skin to simulated solar light and calculating the time to minimal erythema dose; and 3) the incidence of photosensitivity reactions as reported in three phase III trials in patients with CNV secondary to age-related macular degeneration or pathologic myopia who received the regimen of verteporfin therapy currently approved by regulatory authorities (infusion of 6 mg/m² body surface area).
- **RESULTS:**
 - 1) Skin photosensitivity was high at the first timepoint of 1.5 hours after dosing and decreased rapidly thereafter; 2) the duration of skin photosensitivity was dose dependent, ranging from 2.0 to 6.7 days at 6 to 26 mg/m², respectively (mean of 2 days at a dose of 6 mg/m²); and 3) photosensitivity reactions occurred in only 2.2% of patients in the phase III trials, including two severe events, one secondary to extravasation. All treatment-related reactions in the phase III trials occurred within the first 2 days after dosing, with the exception of one mild reaction and one moderate reaction that occurred 8 days after treatment.
- **CONCLUSIONS:** Verteporfin is associated with short-lived photosensitivity and a low incidence of photosensitivity reactions in clinical trials, most of which could probably have been avoided by adherence to protocol instructions for skin protection.

Elements contained in the protocol: can vary with objectives of the study

- **Defined Lighting Conditions:** instruments exist with defined lighting output, ? Validation, should select different light intensity/exposure to define a curve
- **Specific Tests:** A disc with ~7 to 9 uniform holes to deliver light of specific wavelength and intensity, "sunburn" test
- **Other recommendations:** possibility of Optical Coherence Tomography (OCT) technology to assess eye and ?skin for cellular changes *in vivo*, other technology for *in vivo* target tissue assessment

Those Responsible for Reviewing Clinical Protocols

> **Protective Measures:**

- **Healthy Volunteers (Phase I), Phase II as in-patient or out-patient, and Phase III:**

- Controlled environment including light meters within the phase I unit
- consider cohort with and without protection while under artificial indoor lighting
- attempt to have the same type of lighting used throughout the unit
- Outside of the unit with a known phototoxicity issue: all precautions previously mentioned apply

Those Responsible for Reviewing Clinical Protocols

> **Product Label:**

- **Be realistic:** the medication may be used off-label or develop other indications, well-defined safety parameters will need to be defined, physicians trained, patient education materials

Human Phototoxicity Testing in Clinical Drug Development

Naoto Uemura, M.D., Ph.D.
Department of Clinical Pharmacology
Merck Research Laboratories

Phototoxicity Expert Working Group
(ICH S10 EWG), June 13, 2011, Cincinnati, OH

This presentation contains the author's personal opinion

6/13/2011 1

Clinical Background

6/13/2011 2

Phototoxicity in Drug Development

Benefit **Risk**

How do we find out and When?

6/13/2011 3

Phototoxicity and Photoallergy

	Phototoxicity	Photoallergy
Mechanism	Direct Damage to cells	Cell-mediated inflammation (Type IV hypersensitivity)
Onset	Rapid	>24-72 hours
Dose Dependency	Yes	No
Repeated (more than once) Exposures required?	No	Yes (for sensitization)
Sun-exposed skin only	Yes	May spread
Clinical Feature	Sun-burn-like	Delayed reaction (Eczema-like)
Prognosis	Good	Good

A number of drugs cause photosensitivity

6/13/2011 4

Translating from Preclinical to Clinical

Preclinical Clinical

Preclinical physiochemical As value goes up...

Preclinical in vitro

Preclinical in vivo

Early Clinical

Late Clinical

6/13/2011 5

Human Phototoxicity Testing

6/13/2011 6