

- 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)
- 61) Kojima, H.: JaCVAM update、日本動物実験代替法学会 第24回大会、仙台 (2011.11)
- 62) 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)
- 63) 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)
- 64) 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)
- 65) 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)
- 66) 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)
- 67) 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)
- 68) 宇野芳文、小島 肇、林 真: インビボコメントアッセイ: 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)
- 69) 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)
- 70) 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)
- 71) 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)
- 72) 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)
- 73) 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. April 27. 2011. Seoul
- 74) 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
- 75) 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
- 76) 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
- 77) 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)
- 78) 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)
- 79) 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)

- 80) 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)

F. 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22年度～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fnTnl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	熊谷雄治（北里大学東病院治験管理センター長）
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）	

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¹⁾。

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NO₃⁻が有意に上昇していた²⁾。

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³⁾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⁴⁾。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⁵⁾ やラット系統による心障害およびTnI変動の差異⁶⁾、臨床使用されている薬剤でTnIが上昇することも報告^{7, 8)} されており、非臨床毒性バイオマーカー以外、臨床試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⁹⁾。

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¹⁰⁾。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¹¹⁻¹³⁾ 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¹⁴⁾ 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 α 、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 α 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¹⁵⁾。新規マーカーとしては、1- and 3-methylhistidineが報告¹⁶⁾ 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¹⁷⁾ 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 (α -II-Spectrin Break Down Product)、Cleaved-Tau、S100 β 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 β 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¹⁸⁻¹⁹⁾。他のマーカーに関しては、IL-17²⁰⁾、N-myc downstream regulated gene 2 (NDRG2)²¹⁾ 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 S100 β 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 S100β 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・肝脂肪化に関す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¹⁾。

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)、アラニン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²⁾。

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¹⁾。

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[®]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ができる^{1, 3, 4, 5)}。

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^{6,7)}。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⁸⁾。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^{9,10)}。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⁹⁾。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⁹⁾。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 α (IL-1 α)、Tumor necrosis factor α receptor-I (TNF α 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⁹⁾。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 α (TNF α)

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¹⁰⁾、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^{10,11)}があるが、報告数が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¹²⁾。

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 maric 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、病理検査と関連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やプ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0.1µg/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 (0.5µg/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2000mg/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、2000mg/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. 精子中酸化的ストレス関連バイオマーカー

ヒト精子における酸化的ストレスによる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。

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. Toxi. 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 micrnas 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 metabolomic 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22年度～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）
オブザーバー：小野寺博志（独立行政法人 医薬品医療機器総合機構 新薬審査第1部）
井上 達（独立行政法人 医薬品医療機器総合機構 新薬審査第1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および日本製薬工業協会）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ことを企図していた。S6ガイドラインのアップデートについては、2008年に、既存ガイドラインは保持したまま、動物愛護の原則（いわゆる3Rs）を考慮しつつ、このものの明確化と拡充を目的として、5項目に限定して補遺を作成することが日・米・EUで合意され、このための専門家ワーキンググループ（S6 [R1] EWG）が構成された。本研究班は、この補遺策定に対する支援を目的に構成され、EWGでの活動を中心に、これを支援する調査研究を行ってきた。補遺の策定作業は2009年にはStep 2に到達したので、このStep 2合意補遺案を翻訳し、パブリックコメントの収集（2010年1～3月）に供した。本報告書における当研究班の活動としては、2010年4月より、収集したパブリックコメントを整理して対応案を作成することから始め、派生ないしは関連する諸問題についての検討も随時行ってきた。またタリン会議および福岡会議におけるEWGに参加し、各極が収集したコメントの集約及びその対応等を補遺に盛り込む作業を中心に討議を重ねた。補遺文書はその後メールベースでの作業などを経て、2011年6月にStep 4に達し、新S6ガイドライン（S6 [R1]）¹の第二部として公表されたため、引き続きこのStep 4の合意補遺文書（新ガイドライン第二部）の日本語版を作成し、厚生労働省によるStep 5作業に貢献した²。今後も、パブリックコメントへの対応並びにここから派生した諸問題に関する検

¹ http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Safety/S6_R1/Step4/S6_R1_Guideline.pdf
尚、旧S6ガイドラインは新ガイドラインの第一部として保持しされている。

² 「バイオテクノロジー応用医薬品の非臨床における安全性評価」薬食審査発0323第1号（平成24年3月23日）

討など関連課題の調査研究を粛々と進めるとともに、新ガイドライン第二部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)

厚生労働科学研究費補助金（医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業）
平成22年度～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－

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

本研究は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目的でSafetyトピックとなった。平成22年11月のICH福岡会議からS10「光安全性の評価」としてEWGの活動が開始され、これを支援することを目的とする。本研究班は厚生労働科学研究補助金「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調査を行い、「医薬品の光安全性に関する現状」を作成した。それをもとにICHでのEWG活動に対する国内対応を行った。第一回ICH-EWG会議は平成23年6月シンシナティ、第二回ICH-EWGの11月セビリア会議においてstep 1のドラフト案を議論し、平成24年6月予定のICH-EWG福岡会議でドラフト案完成を目標として支援する。

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