

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

## がん原性試験についての調査研究

研究分担者：中江 大（東京都健康安全研究センター）  
研究協力者：小野寺博志（独立行政法人 医薬品医療機器総合機構）  
野中 瑞穂（独立行政法人 医薬品医療機器総合機構）  
甘粕 晃平（独立行政法人 医薬品医療機器総合機構）  
三枝由紀恵（独立行政法人 医薬品医療機器総合機構、平成23年度のみ）  
小川久美子（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、平成23年度のみ）  
久田 茂（あすか製薬株式会社、日本製薬工業協会）  
青木 豊彦（エーザイ株式会社、日本製薬工業協会）  
務台 衛（田辺三菱製薬株式会社、日本製薬工業協会（当初））  
アドバイザー：中村 和市（塩野義製薬株式会社、日本製薬工業協会）  
西川 秋佳（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、平成23年度のみ）  
オブザーバー：笛木 修（独立行政法人 医薬品医療機器総合機構、平成23年度のみ）

### 研究要旨

本研究は、以下の3部で構成し、遂行している。第1部は、米国研究製薬工業協会（PhRMA）による、医薬品のがん原性に関する非臨床試験のスキームの変更に関する提案と、同提案に基づいた日米EU医薬品規制調和国際会議（ICH）に対する医薬品におけるがん原性試験の必要性に関するガイダンス（S1Aガイドライン）改訂提言に向けた動きを受け、日本としての対応方針を早期に定める目的で、関連情報の収集・解析を行っている。第2部は、第1部の研究に役立てるべく、周辺情報の収集・解析を行っている。第3部は、ICHにおける医薬品の非臨床光安全性試験方法に関するガイドライン（S10ガイドライン）策定において、光がん原性試験に関する部分を支援し、日本における同ガイドラインの確立に資する目的で、関連情報の収集・解析を行い、併せてICHの場での議論に資するため国内の意思統一も図っている。第1部および第2部においては、収集した情報を検証して論点や課題を抽出し、今後の方針を決定した。第3部においては、光安全性試験全般について担当している別の研究グループ（研究分担者：小野寺 博志 博士）の研究を支援した。ICHにおいては、S1Aガイドライン改訂に関する（非公式）ワーキンググループにより、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た。一方、医薬品添付文書を用いた検討によってはNEG CARC基準に基づいてラット2年間がん原性を省略することへの懸念が示唆される事例を見出され、ラット2年間がん原性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。さらに、がん原性試験は医薬品の非臨床安全性試験の中できわめて重要な要素であるので、がん原性試験に直接的・間接的に係わる各種ガイドライン間の整合性は担保されねばならず、さらに、それらの内容は時代の変化に対応する必要がある。

る。こうした状況下で、本研究の成果と今後の遂行は、きわめて重要な意義を有している。また、S10ガイドラインは、ICHの専門家ワーキンググループによりstep 1文書が起草された。本研究は、光安全性試験研究グループの研究を支援し、以てICH S10専門家ワーキンググループの作業に貢献するものである。

キーワード：がん原性試験、非臨床安全性試験、試験法ガイドライン、国際標準化

## A. 研究目的

本研究は、以下の3部により構成される。

- ①米国研究製薬工業協会（PhRMA）による、医薬品のがん原性に関する非臨床試験のスキームの変更に関する提案と、同提案に基づいた日米EU医薬品規制調和国際会議（ICH）に対する医薬品におけるがん原性試験の必要性に関するガイダンス（S1Aガイドライン）改訂提言に向けた動きを受け、日本としての対応方針を早期に定める目的で、関連情報の収集・解析を行う。
- ②第1部の研究に役立てるべく、周辺情報の収集・解析を行う。
- ③ICHにおける医薬品の非臨床光安全性試験方法に関するガイドライン（S10ガイドライン）策定において、光がん原性試験に関する部分を支援し、日本における同ガイドラインの確立に資する目的で、関連情報の収集・解析を行い、併せてICHの場での議論に資するため国内の意思統一も図る。

## B. 研究方法

### 1. がん原性試験スキームの変更について

PhRMAおよび日本製薬工業協会（JPMA）により実施されたがん原性試験に関する調査結果を解析し、それらを基にしたがん原性試験スキームの変更に関するPhRMA提案について、検証した。ICHにおいて（非公式）ワーキンググループ（ICH S1A (I) WG）が設置された後は、その活動を支援し、がん原性試験スキームの変更に関する各パーティの意向や解析結果について、検討・検証した。

### 2. 周辺情報の収集・解析について

現行またはstep 2以上の段階にあるICHガイドライン（案）を対象に、記載の整合性に関する予備的

抽出を行った。

また、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年間がん原性を省略することにより問題が発生する懸念のある事例があるか検索した。

### 3. 光がん原性試験について

本年度は、光安全性試験研究グループの研究を支援し、ICHにおける専門家ワーキンググループ（ICH S10 EWG）によるS10ガイドラインの策定作業に関する日本側の意思統一を行い、その結果をS10 EWGでの議論に反映した。

## C. 研究結果

### 1. がん原性試験スキームの変更について

PhRMAとJPMAにより実施されたがん原性試験に関する調査は、ラットにおける6ヶ月間ないし12ヶ月間の慢性反復投与毒性試験と長期（2年間）がん原性試験の結果を比較したもので、端的に述べると、慢性毒性試験においてがん原性を示唆する組織学的変化をいずこかの組織・臓器に観察することにより、多くの場合、がん原性を予測できるとしている。過去25年間に製薬企業13社で実施された194化合物を対象としたPhRMAの調査では、試験感度79%（長期がん原性試験陽性66化合物中52化合物）・陰性予測率82%（慢性毒性試験陰性78化合物中64化合物）であった。一方、64化合物を対象としたJPMAの調査では、PhRMAの調査とほぼ同様の結果が得られ、試験感度78.5%（長期がん原性試験陽性26化合物中23化合物）・陰性予測率87.5%（慢性毒性試験陰性24化合物中21化合物）であった。ただし、こうした相関性を得るためには、慢性毒性試験における「がん原性を示唆する組織学的変化」と長期がん原性試験における腫瘍発生を全身ベースで比較せねばならず、そ

れぞれの臓器特異性に着目して比較した場合、良好な相関性が得られなかった。また、これらの調査においては、慢性毒性試験における「がん原性を示唆する組織学的変化」として、細胞肥大や（必ずしも前がん性が証明されていない）増殖性病変も包含している。なお、PhRMAとJPMAは、いずれも、慢性毒性試験として6ヶ月間試験だけ、または12ヶ月間試験だけで分析しても、概ね同様の結果が得られたとしている。

これらの結果に基づいたPhRMAによるがん原性試験スキームの変更に関する提案の骨子は、一定の条件を満たす場合、医薬品の非臨床安全性評価においてラット長期がん原性試験を省略できるとするものである。その条件は、以下の3点で、それをNEG CARC (Negative for Endocrine, Genotoxicity, and Chronic study Associated histopathologic Risk factors for Carcinogenicity in the rat) 基準と呼ぶ。

- ①ラット慢性毒性試験において、いかなる組織・臓器にも、がん原性を示唆する組織学的変化（細胞肥大・過形成・増殖性／前がん性病変、腫瘍など）が認められない。
- ②遺伝毒性が認められない。
- ③内分泌系への影響が認められない。

ただし、NEG CARC化合物であっても、薬理作用から発がん性が懸念される場合（細胞増殖に関連する受容体発現等を想定）や、トランスジェニックマウス短期がん原性試験が陽性の場合には、ラットがん原性試験を実施するとしている。

ICHにおいては、このPhRMA提案を基盤としたconcept paperとbusiness planの提出を受けた2011年4月の運営委員会で、ICH S1A (I) WGが設置された。本研究グループからは、小川・野中・久田・青木各研究協力者と西川アドバイザーが参加している。ICH S1A (I) WGは、2011年7月14日・8月25日・9月8日に電話会議を行った後、2011年11月のICHセヴィリヤ会議で対面会合を持ち、さらに2011年12月13日・2012年2月28日に電話会議を行い、議論を重ねた。その結果、ICH S1A (I) WGは、本件を正式にトピック化し、専門家ワーキンググループ (ICH S1 EWG) を設置するのが妥当であるとの結論に達

し、修正版のconcept paperとbusiness planを、work planと共にICH事務局に提出した。それらによれば、本件は、S1Aガイドラインに留まらず、「医薬品のがん原性を検出するためのガイダンス」(S1Bガイドライン) や「医薬品のがん原性試験のための用量選択のガイダンス」(S1C (R2) ガイドライン) にも影響する可能性がある。また、ICHプロセスにおけるタイムラインとしては、2014年6月にstep 2に、2017年6月にstep 4に、それぞれ到達することを目標としている。

ICH S1A (I) WG設置後の本研究は、(I) WGにおける日本側メンバーの立場・意見・提案等を醸成するもので、各パーティから出される意見・提案や、それらに基づく (I) WGの議論の推移に対して、それらを吟味し、その結果を日本側メンバーを通じて (I) WGにフィードバックした。

## 2. 周辺情報の収集・解析について

独立行政法人 医薬品医療機器総合機構 (PMDA) に所属する研究協力者を中心に、現行またはstep 2以上の段階にあるICHガイドライン (案) を対象として行ったところ、整合性に関する問題が2点抽出された。

第1点は、光がん原性試験に係わる、S1C (R2) ガイドラインと、「医薬品の臨床試験及び製造販売承認申請のための非臨床安全性試験実施についてのガイダンス」(M3 (R2) ガイドライン) の間のものである。すなわち、S1C (R2) ガイドラインが「局所適用される医薬品に光がん原性が想定される場合、主としてマウスを用いる経皮投与試験が必要な場合もある」としているのに対し、M3 (R2) ガイドラインは、「光がん原性試験のために現在使用可能な齧歯類モデルが、一般的に推奨されない」としている。したがって、現状では、前者に基づいて試験が必要と判断しても、後者に基づけば実際の試験ができないことになる。

第2点は、バイオ医薬品に係わる、S1C (R2) ガイドラインおよび「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」(S6ガイドライン) と、「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」補遺 (S6 (R1) ガイドライン) の間

のものである。すなわち、S1C (R2) ガイドラインおよびS6ガイドラインが「がん原性試験を実施することが必要な場合もある」という立場を取っているのに対し、S6 (R1) ガイドラインは、「がん原性の懸念がある場合、原則的に「入手可能な情報」に基づいて適切なリスク管理を行う」として、原則としてがん原性試験を行わない立場をとっている。

一方、同じくPMDAに所属する研究協力者を中心に、医薬品添付文書を用いて検討したところ、NEG CARC基準に基づいてラット2年間がん原性を省略することにより問題が発生する懸念のある事例を見出した。

電位依存性カルシウムチャネルの $\alpha 2\delta$ サブユニットに結合して作用する抗てんかん薬であるガバペンチンは、ラット6ヵ月間反復投与毒性試験で増殖性病変が観察されず、遺伝毒性試験が陰性であるので、NEG CARC基準に基づけば、ラット2年間がん原性試験の結果が陰性と予測されるため、同試験を省略してよいことになる。しかし、実際に実施されたラット2年間がん原性試験では、雄に膵臓腺房細胞腫瘍が発生した。

HBV DNAポリメラーゼ阻害作用を持つ抗ウイルス薬であるエンテカビル水和物は、ラット6ヵ月間反復投与毒性試験で増殖性病変が観察されず、遺伝毒性試験が陰性であるので、NEG CARC基準に基づけば、ラット2年間がん原性試験の結果が陰性と予測されるため、同試験を省略してよいことになる。しかし、実際に実施されたラット2年間がん原性試験では、雌雄に脳神経膠腫、雌に肝細胞腺腫／がんが発生した。

炎症性サイトカインの産生抑制作用に基づく特発性肺線維症薬剤であるピレスパは、ラット6ヵ月間反復投与毒性試験で増殖性病変が観察されず、遺伝毒性試験が陰性であるので、NEG CARC基準に基づけば、ラット2年間がん原性試験の結果が陰性と予測されるため、同試験を省略してよいことになる。しかし、実際に実施されたラット2年間がん原性試験では、肝細胞腺腫と子宮癌が発生した。

一方、ある種の事例では、ラット2年間がん原性試験によってはじめて非腫瘍性病変が検出された。

たとえば、末梢性神経障害性疼痛治療剤であるプレガバリン、ドパミン作動性パーキンソン病治療薬であるブラミベキソール塩酸塩水和物、胃潰瘍・十二指腸潰瘍・逆流性食道炎など消化管疾患に用いられるランソプラゾールなどでは、ラット反復投与毒性試験で眼における所見がなかった（プレガバリンの場合、52週間反復投与毒性試験でもなかった）が、2年間がん原性試験において網膜の変性・萎縮を観察した。また、チロシンキナーゼ活性阻害に基づく慢性骨髄性白血病治療薬であるイマチニブメシル酸塩では、ラット6ヵ月間反復投与毒性試験で心における所見がなかったが、2年間がん原性試験において心の肥大・拡張を観察した。さらに、EGFRおよびHER2チロシン自己リン酸化を選択的かつ可逆的に阻害し、HER2過剰発現が確認された手術不能又は再発乳癌を対象とするラパチニブトシル酸塩では、ラット6ヵ月間反復投与毒性試験で腎における所見がなかったが、2年間がん原性試験において雄で腎梗塞・腎乳頭壊死を観察した。

### 3. 光がん原性試験について

ICH S10 EWGは、ICH福岡会議・シンシナティ会議・セヴィリヤ会議、さらにその後数回の電話会議を経てS10ガイドラインのstep 1文書を起草した。現在は、同文書に対する各パーティの内部議論が行われている。本研究グループは、光安全性試験研究グループの研究を支援し、ICH S10 EWGにおける日本側メンバーの立場・意見・提案等を醸成し、各パーティから出される意見・提案や、それらに基づくEWGの議論の推移に対して、それらを吟味し、その結果を日本側メンバーを通じてEWGにフィードバックした。光がん原性試験について、ICH S10 EWGは、M3 (R2) ガイドラインの示す範囲内で光安全性試験に特化したものとしてS10ガイドラインを策定する方針であり、M3 (R2) ガイドラインが「推奨される実験モデルがない」としていることから、現在のところ実施を求めない方針である。

## D. 考 察

### 1. がん原性試験スキームの変更について

PhRMAとJPMAの調査結果と、それらを基にした

PhRMAの提案には、レギュラトリーサイエンスの立場から検討の余地がある。その理由は、この提案が受け容れられた場合、医薬品開発に関する各種のリソース消費の節減が図られ、特に時間的リソース消費の節減により患者への新薬の迅速な供給が可能となり、一方で、動物愛護の推進にも貢献できるからである。しかしながら、純粋科学の立場からはいくつかの疑問があり、PhRMA提案が受け容れられるためにはそれらが解消されるか、少なくともベネフィット・リスクバランスに鑑みて容認される必要がある。

PhRMA提案には、一見して2点の重大な疑問がある。第1点は、慢性毒性試験における「がん原性を示唆する組織学的変化」と長期がん原性試験における腫瘍発生に良好な相関性を得るために全身ベースで比較せねばならず、それぞれの臓器特異性に着目して比較すると相関性が悪かった点である。しかも、慢性毒性試験における「がん原性を示唆する組織学的変化」には、細胞肥大や（必ずしも前がん性が証明されていない）増殖性病変が含まれていて、その妥当性についても議論の余地がある。第2点は、「偽陰性（がん原性試験で陽性なのに、慢性毒性試験で陰性）」を示した化合物が存在したことである。

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、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、「医薬品のための遺伝毒性試験の特定項目に関するガイダンス」（S2Aガイドライン）および「遺伝毒性試験：医薬品の遺伝毒性試験の標準的組み合わせ」（S2Bガイドライン）を受けた「遺伝毒性試験ガイドライン」（S2ガイドライン）や、「医薬品の遺伝毒性試験および解釈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）ガイドラインでは今般の改訂により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NEG CARC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、S2（R1）ガイドラインでは、染色体異常試験の最高用量が下げられたため、染色体異常試験における偽陽性は減少すると考えられる。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である偽陰性例の存在については、それを許容可能な程度に低減する方策が必要である。FDAも、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、本研究グループの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。一方、「偽陰性」化合物の中には、抗真菌作用・抗ウイルス作用を持ち、その機序から遺伝毒性を持つ可能性のあるものがあり、この遺伝毒性を考慮すれば偽陰性が解消されるかもしれないとの指摘がある。しかし、これらの遺伝毒性は、もし存在するとしても、S2ガイドラインやS2（R1）ガイドラインに規定された、標準的な遺伝毒性試験で検出できないので、それがあつかを決定するために、追加の遺伝毒性試験を行う必要がある。この場合、仮に、当該化合物に、追加の遺伝毒性試験でしか検出されない遺伝毒性があり、その遺伝毒性を考慮に入れることにより当該化合物の偽陰性が解消されたとして、純粋科学的にはそれだけでも、S2ガイドラインないしS2（R1）ガイドラインの制限に抵触するため、レギュラトリーサイエンスないし医薬品の開発・規制の上では解決にならない。

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。ただし、がん原性試験の要否を検討する時期には、ほとんどの毒性試験が実施済みであるものと考えられる。したがって、NEG CARC基準を適用する場合には、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ことになると想定されるが、ホルモン作用の検討を行う試験および時期、並びに評価項目を定義しておく必要がある。とはいえホルモン作用について、本研究グループのJPMAメンバーからは病理組織学的所見および臓器重量に基づいて評価できるとの意見が出た。

PhRMAは、前述の調査で、慢性毒性試験として6ヶ月間試験だけ、または12ヶ月間試験だけで分析しても、概ね同様の結果が得られたことから、慢性毒性試験の期間を6ヶ月間としてもよいと考えていると予想される。しかしながら、前立腺のように増殖が遅い組織・臓器のがん原性は、長期がん原性試験でも小さな腫瘍性病変の発生によってかろうじて検出されるので、それを6ヶ月間慢性毒性試験で検出するのが困難であるとの懸念がある。また、そもそも、長期がん原性試験が実施されるということが、ICHプロセスの中で齧歯類慢性毒性試験の期間を短縮できる根拠とされてきた経緯があり、長期がん原性試験が実施されない場合は、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ため、6ヶ月間を越える期間の齧歯類慢性毒性試験を実施する必要が発生するかもしれない。さらに、NEG CARC基準をベースにした、本件においては、そもそもレトロスペクティブな解析しかなされておらず、プロスペクティブな解析も必要である。これらについては、今後詳細な検討が必要である。

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。EMAは、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、EMAの提案を受けて、薬理作用を発がん性と関連してどのように分類し、また、具体的にどのように薬理作用を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、本研究グループの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ないと主張した。一方、本研究グループの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。

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要否を検討する。

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、本研究グループのPMDAメンバーは、これまでの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すると、上記のようなリスク評価ができなくなるため、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という前提を立てる場合のみ、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ので、そうした疾患領域を限定するための条件を検討するという選択肢もあると述べた。また、同メンバーは、がん原性試験の要否の判断基準に、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、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、公平性の観点から問題があるとも指摘した。

修正concept paperおよびbusiness plan提出に至るICH S1A (I) WGの最終的な議論の場において、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、今後の議論においても重要視されるものと予想される。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) ガイドラインや医薬品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. 周辺情報の収集・解析について

ガイドライン間の整合性に係わる光がん原性試験に関する問題点について、当面はS1C (R2) ガイドラインの解釈で対応が可能であるが、がん原性に係わるガイドライン群の改訂が行われる場合には記載の整備・修正を行うことが望ましい。特に、S10ガイドラインが最終的に光がん原性試験を不要とする場合は、S1C (R2) ガイドラインのみならず、S1AガイドラインやS1Bガイドラインについても対応が必要になる可能性がある。

バイオ医薬品に関する問題点については、S6 (R1) ガイドライン発効によるS1A・S1B・S1C (R2) 各ガイドラインへの影響について検討が必要になる可能性がある。

以上に加え、がん原性試験に直接的・間接的に係わる各種ガイドラインについては、それら相互の整合性のみならず、策定後の時代の変化に対応しているかという観点からの検討も必要である。

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。

ただし、今回の事例において、エンテカビル水和物の場合は、遺伝毒性試験でヒトリンパ球染色体異常試験のみ陽性で総合的に陰性と判定したので、厳密に言うとNEG CARC基準を満たさないかもしれ

ない。また、ピレスパの場合は、6ヵ月間反復投与毒性試験で肝細胞肥大が観察されたので、やはり厳密に言うとNEG CARC基準を満たさないかもしれない。

なお、ピレスパに関しては、生殖発生毒性試験で性周期の延長、妊娠期間延長や分娩への影響等があったが、一般毒性試験と薬理作用からホルモンへの影響が明らかに示唆されなかったため、ホルモン作用があると判断されなかった。ホルモン作用は、がん原性試験で子宮癌発生を検出した後、機序解明試験を行うことにより、明らかになったのである。この例からも、NEG CARC基準を採用したS1Aガイドライン等の改訂が行われる場合は、一般毒性試験の中でホルモン作用を詳細に検討することが必要であることが明白である。

### 3. 光がん原性試験について

ICH S10 EWGがS10ガイドラインにおいて光がん原性試験の実施を求めない方針である根拠は、前述の通りM3 (R2) ガイドラインが「光がん原性試験のために現在使用可能な齧歯類モデルが、一般的に推奨されない」と記載している点である。しかし、後者は、続けて、「光がん原性に対する適切な評価系が利用できるようになった場合、光毒性評価で光がん原性リスクの可能性が示唆された化合物について、通常、その試験を販売される前までに完了しておくべきであり、その結果がヒトでのリスク評価に考慮されるべきである」と述べている。すなわち、M3 (R2) ガイドラインは、必ずしも光がん原性試験を行う必要がないと言っているのではなく、むしろ、必要があれば実施すべきであるが、現在のところ信頼できる実験モデルがないので、やむを得ず実施を求めないという立場である。したがって、信頼できる実験モデルが将来確立されれば状況が変わるので、S10ガイドラインは、単に光がん原性試験を不要とするのではなく、そうした将来的状況に対応できるようにしておかねばならない。

本研究は、ICH S10 EWGにおけるS10ガイドライン策定作業の推移を注視しつつ、必要に応じて光がん原性試験に関する検討を行い、光安全性試験研究グループを通じて問題提起を行う。

## E. 総合結論

ICHにおいては、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た。前述の通り、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。ICH S1A (I) WGが提出した修正版のconcept paperおよびbusiness planが受け容れられ、本件が正式にトピック化されるか否かは、まもなく開催されるICH調整者会議とICH運営委員会の判断にかかっている。

がん原性試験は医薬品の非臨床安全性試験の中できわめて重要な要素であるので、がん原性試験に直接的・間接的に係わる各種ガイドライン間の整合性は担保されねばならず、さらに、それらの内容は時代の変化に対応する必要がある。これらに関しては、既存ガイドラインの改訂や新規ガイドライン策定の機会に随時対応すべきものであるが、そのような機会に迅速に対応できるよう、予め準備を進めておくべきである。

医薬品添付文書を用いた検討によっては、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され、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。

S10ガイドラインは、ICHの専門家ワーキンググループによりstep 1文書が起草された。本研究は、光安全性試験研究グループの研究を支援し、以てICH S10専門家ワーキンググループの作業に貢献するものである。

本研究グループとしては、今後も新たな状況の下で粛々と研究を進めつつ、ICHの動きを注視し、必要に応じて臨機応変の対応を取る予定である。ただし、来年度以後の新たな状況下ではICHのワーキンググループ構成に準じる形で、研究分担者間で担当分野の変更を伴う再編が実施される予定である。



## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

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.

### 2. 学会発表

中江 大. S10 : 光安全性の評価. ICH日本シンポジウム2010 兼 第23回ICH即時報告会 (2010年12月, 東京都渋谷区).

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).

## H. 知的所有権の取得状況

### 1. 特許取得

なし

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし

## 医薬品の安全性評価のための*in vitro*毒性試験についての評価

分担研究者：小島 肇（国立医薬品食品衛生研究所）

### 研究要旨

欧州で研究が盛んな*in vitro*生殖毒性試験および3次元培養表皮モデルを用いた光毒性試験について、医薬品の安全性評価という視点で調査した。その結果、いずれの試験法も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。

キーワード：*in vitro*、生殖毒性試験、光毒性試験、医薬品、安全性評価、動物実験代替法

### A. 研究目的

EUでは化粧品における動物実験の規制<sup>1)</sup>および化学物質の規制であるREACH（Registration, Evaluation, Authorisation and restriction of Chemicals）において、安全性の評価に*in vitro*試験の利用が明示され<sup>2)</sup>、国際市場における製造販売に混乱が生じている。

医薬品においても、ICH（International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use：日米EU医薬品規制調和国際会議）の目的が、各国・地域における規制上の不調和であることから、動物実験の3Rs（使用動物数の削減／苦痛の軽減／代替法の利用）の原則に従って、各非臨床試験に関する見直しを行うことは避けられないテーマの一つとなっている<sup>3)</sup>。

本研究では、「代替法としての利用」を最終目的に、*in vitro*試験を使って「使用動物数の削減」を目指している毒性試験のうち、生殖毒性試験および光毒性試験について、医薬品の安全性評価という視点で調査した。

生殖毒性試験は、毒性試験として行われている試験の中で、生殖毒性に関わる試験である2世代試験および／または発生毒性試験に使用する実験動物数

は多く、その削減が大きな課題となってきたことによる<sup>4)</sup>。一方、光毒性試験においては、ICH S10光毒性試験ガイドラインの検討過程で、欧州より3次元培養表皮モデルを用いた光毒性試験の利用が提案されたことによる<sup>5)</sup>

### B. 研究方法

#### B-1) 生殖毒性試験

##### B-1-1) EURL ECVAMの対応<sup>6)</sup>

EURL（European Union Reference Laboratory）ECVAM（European Center for the Validation of Alternative Methods）では、胎児毒性試験として、マイクロマス培養、ラット胎児培養および胎生幹細胞試験のバリデーションを1990年代後半に実施してきた。

##### B-1-2) 欧州支援研究

欧州第6次研究資金において、*in vitro*試験、組織、センサー技術を組み合わせおよび／またはその応用による生殖毒性試験の有害性およびリスク評価アプローチの開発プロジェクトとして、ReProTectが2004年7月から開始されている。本プロジェクトは、5年半に渡り、9.1百万€を投じて実施され、2009年末に終了した<sup>7)</sup>。なお、先に上げたEURL ECVAMもこ

のプロジェクトの中で、開発された試験法のバリデーションを担当している。

#### B-1-3) ICHでのワークショップ

2010年6月6日、エストニア・タリンにて開催されたICH会議の中で、Implementation of *in vitro* approaches in Developmental and Reproductive Toxicity Testing Strategies for Human Pharmaceuticals というブレインストーミングワークショップが開催された。この成果のほとんどは、B-1-1) およびB-1-2) で挙げたReProToxおよびEURL ECVAMでバリデートされた胎生幹細胞試験の改良によるものである。日本からも行政、国立医薬品食品衛生研究所研究員、製薬工業会の代表が参加し、欧州での研究成果を聴講後、医薬品の安全性評価への*in vitro*試験への利用という視点で討論がなされた。

B-2) 3次元培養表皮モデル（欧米で販売されているEpiDerm、EPISKIN、SkinEthicsなど）を用いた光毒性試験

#### B-2-1) EURL ECVAMの対応<sup>6)</sup>

EURL ECVAMでは、1990年代に本試験法のバリデーションが実施され、公定化とともに、3T3ニュートラルレッド取り込み試験（NRU）と組み合わせた評価が検討された経緯がある。

#### B-2-2) ICHでの報告

2011年11月、スペイン・セルビアにて開催されたICH S10会議の中で、対象試験法の皮膚外用剤への利用提案がDr. H. Kandarodvaよりなされた。日本からもS10関係者が参加し、欧州での研究成果を聴講後、医薬品の安全性評価への*in vitro*試験への利用という視点で討論がなされた。

（倫理面への配慮）

倫理的な問題が生じる実験を実施しておらず、特に配慮すべき問題はない。

### C. 研究結果

#### C-1) 生殖毒性試験

##### C-1-1) EURL ECVAM

バリデーションされた3つの試験法のうち、ラット胎児培養および胎生幹細胞試験は、スクリーニングとしての有用性は高いとされた。ただし、それぞれの試験法に問題点（代謝活性化能がない、適用範囲が不明確であるなど）が多く、行政的な判断を行うESAC（ECVAM Scientific Advisory Committee : ECVAM科学諮問委員会）が2001年の時点において、代替法として推奨できないと報告している。

##### C-1-2) 欧州研究支援

ReProTectの構想は、極めて合理的なプロジェクトであり、研究結果が積み重ねられ、すべての試験法が開発された暁には、利用価値が高いものであると考えられる。

しかし、5年半の研究の成果として開発された方法は、レセプター結合試験法および胎児毒性を検出するレポーター試験法（ReProGlo assay）、牛受精卵試験の一部に過ぎなかった。その理由は、このプロジェクト開始時に、EURL ECVAMでバリデーションを行う計画がなかったことにより、研究に重点がおかれたと考えられる。

そのような理由もあり、EURL ECVAMでバリデーションが始まっている試験法は、MELNアッセイ（MCF-7細胞を用いたエストロゲンレポーター結合試験）のみであった。

##### C-1-3) ICHでのワークショップ

ICHでのワークショップの主催者であるDr. van der Laanの目的は、将来的にS5（R2）医薬品における生殖毒性試験ガイドライン（Guideline on Detection of Toxicity to Reproduction for Medicinal Products & Toxicity to Male Fertility）への反映である。

参加者は、ReProToxプログラムおよび胎生幹細胞を用いた試験法の改良について最先端の研究成果を元に、*in vivo*発生・生殖毒性試験の置換えを目標に討論した。

討論の内容をまとめる。

- ▶ *In vivo*研究の解析およびデータベース調査から、種差（ラットとウサギ、1種または2種）を明らかにすべきである
- ▶ *vitro*スクリーニングで用いる被験物質を明確にすべきである
- ▶ 試験システムにおける方法選択を明確にすべきである
- ▶ HESI: Health and Environmental Sciences Institute-DART Committee) のようなコンソーシアムや他のセミナーなどにて専門家の意見を聞く機会を増やすべきである

将来的にICHの正式なプロジェクトとなり、S5 (DETECTION OF TOXICITY TO REPRODUCTION FOR MEDICINAL PRODUCTS & TOXICITY TO MALE FERTILITY) の更新を目指すのであれば、動物種を削減するような戦略が必要であると結ばれた。

#### C-2) 3次元培養表皮モデルを用いた光毒性試験

##### C-2-1) EURL ECVAM

1990年代に、EURL ECVAMにおいてEpiDermによる複数のプレバリデーションが実施された<sup>8)</sup>。その結果、Phase III研究においてコード化した10物質 (*in vivo*陽性5物質、*in vivo*陰性5物質)を用いて、3施設から良い予測性が報告されている。この後、現在、OECDテストガイドラインNo.432となっている光毒性試験3T3 NRU (ニュートラルレッド取り込み試験)<sup>9)</sup>との組み合わせ評価が検討された。検討の結果、それらの予測性は同程度であると結論され、さらなる追加検討が必要と結論された。

##### C-2-2) ICH S10会議での報告

2000～2007年に実施された3次元培養表皮モデルEPISKIN、SkinEthicsを用いた光毒性の検討において、EpiDermと合わせ、40物質の評価がなされた<sup>5)</sup>。3T3 NRUと同様の陽性物質を検出できる一方、3T3 NRUの偽陽性も的確に予測でき、3T3 NRU陽性または判定不能物質の次の評価に有用と提案されている。

外用剤における評価において、3次元培養表皮モ

デルではヒト光毒性と同じ濃度で光毒性を検出することは困難であり、10倍の安全係数が必要であると報告された。炎症性サイトカインの産生を指標に判定する試みもなされているが、良好な結果は得られていない。

ただし、最新の研究においては、培養液に溶解または懸濁させて被験物質を処理する改良方法（旧法ではモデルに直接適用）を推奨している。

#### D. 考 察

生殖毒性試験におけるICHでの会議における結論は、ICH運営委員会でも正当な結論とされており、以後のICH会議でも次の展開はなされなかった。

欧州側としては、5年半で総額9.1百万€を投じた巨大プロジェクトの成果を实らせたいという事情は理解できる。しかし、試験法の開発、バリデーション、行政的な受け入れというプロセスも明確にせず走り出させ、結局、一つひとつの指標毎に開発された方法が少ない上に、十分バリデートされた*in vitro*試験法も少なく、行政的に推奨される方法がない状況を生み出してしまっている。

一方、3次元培養表皮モデルを用いた光毒性試験はプロトコルの改良余地があり、バリデーションを行う必要がある未開発な段階にある。本モデルをICHガイドラインに加えることはもちろん、議論することも時期尚早であると考える。

なお、ICH S10ガイドラインの中では、本モデルは、皮膚外用剤評価の選択しとして残され、感受性などの注意点を考慮して動物実験と併記することになっている。試験法が十分バリデートされている状況ではなく、今後の検討次第で行政的に推奨される方法となるようである。

#### E. 結 論

欧州で研究が盛んな*in vitro*毒性試験のうち、生殖毒性試験および光毒性試験について、医薬品の安全性評価という視点で調査した。その結果、生殖毒性試験はその指標が多岐に渡るにも関わらず、一つひとつの指標毎に開発された方法や十分バリデートされた*in vitro*試験法も少なく、ICHで議論できるよう

な行政的に推奨される方法でないことが明らかになった。また、光毒性試験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。

## F. 参考文献

- 1) Commission Staff Working Documents (2004) Time tables for the phasing-out of animal testing in the framework of the 7<sup>th</sup> Amendment to the Cosmetics Directive (Council Directive 76/768/EEC); EN, SEC82004, 1210
- 2) ECB (2010) <http://ecb.jrc.ir/REACH/>
- 3) 医薬品の臨床試験および販売承認申請のための非臨床安全性試験の実施時期についてのガイドラインM3 (2010) [http://www.pmda.go.jp/ich/m/step5\\_m3r2\\_10\\_02\\_19.pdf](http://www.pmda.go.jp/ich/m/step5_m3r2_10_02_19.pdf)
- 4) Rovida C, Hartung T. (2009) Re-evaluation of animal numbers and costs for *in vivo* tests to accomplish REACH legislation requirements for chemicals - a report by the transatlantic think tank for toxicology (t(4)). ALTEX. 26(3): 187-208.
- 5) ICH S10会議資料より (2011年セルビア、スペイン)
- 6) ECVAM (2010) <http://ecvam.jrc.ec.europa.eu/>
- 7) AXLR8 (2010) <http://www.axlr8.eu/>
- 8) Microbiological associates Inc. and ZEBET (2000) Prevalidation of the “EpiDerm Phototoxicity Test” Final report
- 9) OECD (2004) Test Guideline NO. 432: *in vitro* 3T3 NRU phototoxicity testing. OECD Guideleine for the Testing of Chemicals. Paris, France.

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Kojima, H.: Commentary to the Discussion on Topics 3, “*In Vitro* Test Approaches with Better Predictivity” at the 5<sup>th</sup> International Workshop on Genotoxicity Testing, Genes and Environment, 32(2), 40-42 (2010)
- 2) 小島肇夫: 総合評価の方法、有用性化粧品

方とその活用、鈴木正人監修、シーエムシー出版、東京、pp.147-151 (2010)

- 3) Kojima, H., Takeyoshi, M, Sozu, T, Awogi, T, Arima, K, Idehara, K, Ikarashi, Y, Kanazawa, Y, Maki, E, Omori, T, Yuasa, A, Yoshimura, I.: Inter-laboratory validation of the modified murine local lymph node assay based on 5-bromo-2'-deoxyuridine incorporation. J Appl Toxicol. 31(1)63-74 (2011)
- 4) Yamamoto, N, Hirano, K, Kojima, H., Sumitomo, M, Yamashita, H, Ayaki, M, Taniguchi, K, Tanikawa, A, Horiguchi, M.: Cultured human corneal epithelial stem/progenitor cells derived from the corneal limbus. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 46(9): 774-80 (2010)
- 5) Kojima, H.: 3Rs Activities in Japan, AVLR8 Alternative Testing strategies, Progress report 2010, 266 (2010)
- 6) 小島肇夫: パイロジェン試験、大阪医薬品協会会報第745号31-63 (2011)
- 7) 小島肇夫: 動物実験代替法の現状と展望、創薬研究のストラテジー、pp.41-48、株式会社金芳堂、東京 (2011)
- 8) 小島肇夫: 動物実験の3Rにおける国内外の動向、ドージンニュースNo.138、1-9 (2011)
- 9) 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)
- 10) 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)
- 11) 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)
- 12) 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)
- 13) 小島肇夫：技術講座 安全性評価試験 (1)、COSME TECH JAPAN, 1 (6) 10-13 (2011)
  - 14) 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)
  - 15) 小島肇夫：技術講座 安全性評価試験 (2)、COSME TECH JAPAN, 1 (7) 18-22 (2011)
  - 16) 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)
  - 17) 小島肇夫：技術講座 安全性評価試験 (3) COSME TECH JAPAN, 2(1) 73-77 (2012)
  - 18) 小島肇夫：技術講座 安全性評価試験 (3) COSME TECH JAPAN, 2(2) 65-69 (2012)
  - 19) 小島肇夫：技術講座 安全性評価試験 (3) COSME TECH JAPAN, 2(3) 44-49 (2012)
  - 20) Kojima, H., Ando, Y., Idehara, K., Katoh, M., Kosaka, T., Miyaoka, E., Shinoda, S., Suzuki, T., Yamaguchi, Y., Yoshimura, I., Yuasa, A., Watanabe, Y. and Omori, T.: Validation Study of the *In Vitro* Skin Irritation Test with the LabCyte EPI-MODEL24, *Altern Lab Anim.*, 40, 33-50 (2012)
2. 学会発表
- 1) 山本直樹、谷川篤宏、内藤紘策、綾木雅彦、小島 肇、平野耕治、堀口正之：マウス水晶体上皮細胞の不死化細胞の作出、第114回 日本眼科学会総会 (2010.4)
  - 2) 小島 肇：ヒトiPS細胞を用いた新規*in vitro*毒性評価系の構築、日本製薬工業協会セミナー (2010.5)
  - 3) 小島 肇：パネルディスカッション 新しい感作性および局所刺激性（皮膚・眼）試験法のOECDテストガイドライン、日本トキシコロジー学会学術年会、沖縄 (2010.6)
  - 4) 小島 肇：医薬部外品、化粧品のRegulatory Scienceの展望、第11回光老化研究会、東京慈恵会医科大学 (2010.7)
  - 5) Kojima.H., Global impact of 3'Rs on regulatory process: sharing experiences and future trends. XII International Congress of Toxicology, Barcelona, Spain (2010.7)
  - 6) Kojima.H., Inoue, T. and Ohno.Y., JaCVAM's role of new alternatives to animal testing and international harmonization. XII International Congress of Toxicology, Barcelona, Spain (2010.7)
  - 7) 小島 肇：昨今の国際バリデーション研究の進捗、皮膚基礎研究クラスターフォーラム 第5回教育セミナー (2010.8)
  - 8) 小島 肇：皮膚感作性試験のインビトロ代替法の現状、日本免疫毒性学会学術大会、独立行政法人国立環境研究所 大山記念ホール (2010.9)
  - 9) Kojima, H., Arai, S. and Hojyo M., Importance of each human model and the optimal protocol for regulatory use of skin irritation assay. The 23<sup>rd</sup> Annual and International Meeting of the Japanese Association for Animal Cell Technology, Hokkaido University, Sapporo, Japan (2010.9)
  - 10) 小島 肇：パイロジェン試験、大阪医薬品協会技術研究委員会大阪 (2010.10)
  - 11) 小島 肇、北條麻紀：3次元培養表皮モデルを用いるコメントアッセイの条件検討 第3報、日本環境変異原学会第39回大会、つくば (2010.11)
  - 12) 宇野芳文、小島 肇：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2報)、日本環境変異原学会第39回大会、つくば (2010.11)
  - 13) 小島 肇、中村 牧、山口能宏、泉 瑠名、鈴木民恵、萩原沙織、篠田伸介、加藤雅一、培養

- 皮膚モデルLabCyte EPI-MODEL24を用いた皮膚刺激性試験代替法のバリデーション研究、日本動物実験代替法学会第23回大会、東京 (2010.12)
- 14) 小島 肇、桑原裕史、林卓巳、坂口眞由美、豊田明美、後藤 悠、中村恒彰、渡辺真一、阿彦恭子、大森 崇、音泉 卓、寒水 孝、森本隆史、林 和彦、坂口 斉：眼刺激性試験代替法 (STE試験) バリデーション研究 第3報、日本動物実験代替法学会第23回大会、東京 (2010.12)
- 15) 小島 肇、北條麻紀：3次元培養表皮モデルを用いるコメットアッセイの条件検討日本動物実験代替法学会第23回大会、東京 (2010.12)
- 16) 小島 肇：S5 化学物質の有害性評価に関する代替試験法開発－発癌性、発生毒性、免疫毒性－今後の展望、日本動物実験代替法学会第23回大会、東京 (2010.12)
- 17) 小島 肇：培養皮膚モデルを用いた皮膚刺激性評価の現状、第10回ヒューマンサイエンス研究資源バンクセミナー、大阪 (2011.1)
- 18) 小島 肇：動物実験代替法における国際動向、日本動物実験代替法学会・JaCVAM合同ワークショップ 動物実験の3Rにおける国際動向、東京 (2011.2)
- 19) 小島 肇：皮膚細胞研究の応用とその可能性、日本化粧品技術者会大阪支部 第15回勉強会ワークショップ、大阪 (2011.2)
- 20) Kojima, H.: Update of skin equivalent and its regulatory use, BIT's 4<sup>th</sup> Annual World Congress of Industrial Biotechnology-2011, Dalin, China (2011.4)
- 21) 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)
- 22) 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)
- 23) 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)
- 24) 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)
- 25) Kojima, H.: Current and future of correlation with japan and Korea on alternative to animal experiments, 8<sup>th</sup> Congress of Korean Society for Alternative to Animal Experiments, Korea (2011.7)
- 26) 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)
- 27) 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)
- 28) 小島 肇：欧米、日本における代替法の現状と化粧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)
- 29) Kojima, H.: Section II-11 The International Cooperation on Alternative Test Methods (ICATM), JaCVAM, 8<sup>th</sup> World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences, Montreal, Canada (2011.8)
- 30) Uno, Y., Kojima, H., Hayashi, M.: *In vivo* Comet assay: update on the ongoing international validation study coordinated by JaCVAM, 8<sup>th</sup> World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences, Montreal, Canada (2011.8)
- 31) 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, 8<sup>th</sup> World Congress on Alternatives and

- Animal Use in the Life Sciences, Montreal, Canada (2011.8)
- 32) 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, 8<sup>th</sup> World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences, Montreal, Canada (2011.8)
- 33) 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, 8<sup>th</sup> World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences, Montreal, Canada (2011.8)
- 34) 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, 8<sup>th</sup> World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences, Montreal, Canada (2011.8)
- 35) 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, 8<sup>th</sup> World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences, Montreal, Canada (2011.8)
- 36) 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, 8<sup>th</sup> World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences, Montreal, Canada (2011.8)
- 37) Stephens, M., Kojima, H., Patlewicz-Tier, G., Spielmann H. and Telley, L.: AltTox. org: communication platform for 21<sup>st</sup> century toxicology, 8<sup>th</sup> World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences, Montreal, Canada (2011.8)
- 38) 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)
- 39) 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)
- 40) 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)
- 41) Kojima, H.: JaCVAM update、日本動物実験代替法学会 第24回大会、仙台 (2011.11)
- 42) 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)
- 43) 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)
- 44) 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)
- 45) 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)
- 46) 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)

- 47) 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、荻原庸介、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)
- 48) 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)
- 49) 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)

- 50) 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)
- 51) 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)
- 52) 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)

#### G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

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

厚生労働科学研究費補助金（医薬品・医療機器等レギュトリーサイエンス総合研究事業）  
平成22年度～平成24年度分担研究報告書

## －ワクチンの非臨床ガイドライン策定に関する調査研究－

研究分担者：松本 峰男（医薬品医療機器総合機構）  
研究協力者：真木 一茂（医薬品医療機器総合機構）  
小松 真一（グラクソ・スミスクライン株式会社）  
土本まゆみ（サノフィ・アベンティス株式会社）  
松井 元（化学及血清療法研究所）  
オブザーバー：小野寺博志（医薬品医療機器総合機構）  
笛木 修（医薬品医療機器総合機構）  
伊藤かな子（医薬品医療機器総合機構）  
澤田 純一（医薬品医療機器総合機構）

### 研究要旨

ワクチンとは、投与物に対する生体内での免疫反応を取って惹起させておき、結果として望まぬ外因性もしくは内因性の抗原の不活化を図るといふ生物製剤に冠された語である。これは感染症予防用ワクチン、癌やアルツハイマー病等に対する治療用ワクチン（免疫治療剤）、及びその両者に関わる存在としてのワクチンアジュバント（以下、アジュバント）の大きく三つに分類できる。現状では、これらいずれに関しても非臨床試験のガイドラインについての国際的整合化は達成されていない、もしくは一部達成されていたとしても適切な最新化がなされていない。当研究グループはこのような現状を解決することを活動目的として掲げている。

平成22年度において打ち立てた最大の研究方針は、ワクチンのうち特に治療用ワクチンについてICHガイドライン策定を視野に入れた活動を行うというものである。平成23年度においては、当該方針に基づき治療用ワクチンのうちわが国において特に開発が進んでいると考えられる治療用ペプチドワクチンについて、非臨床試験のためのコンシダレーションペーパー案の作成を行った。<sup>1</sup>

アジュバントの問題については、その製剤の投与量において無害であることを前提とする日本薬局方における添加物としての位置づけと、その実体との間に乖離状態が生じ、規制側及び開発者側両方にとって様々な問題が生じつつある。研究グループでは、この問題を深く掘り下げ、平成22年度において「わが国の法的規制におけるアジュバントの位置づけについての考察」をまとめるに至った。<sup>2</sup>

<sup>1</sup> 平成23年度分担研究報告書「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」

<sup>2</sup> 平成22年度分担研究報告書「わが国の法的規制におけるアジュバントの位置づけについての考察」

感染症予防用ワクチンについては、ICHよりもむしろWHOにおいて従来のガイドラインの改訂という形で非臨床試験ガイドラインの策定が担われることが宣言され、当研究グループとして今のところその活動に積極的に関わるものではない。但し、その毒性審査の現状をまとめた論文を2012年2月に日米EUの規制当局共同で発表した。<sup>3</sup>

キーワード：ワクチン、感染症予防用ワクチン、治療用ワクチン、アジュバント、国際的  
整合化、添加物

---

<sup>3</sup> Sun Y., Gruber M., Matsumoto M., Overview of global regulatory toxicology requirements for vaccines and adjuvants. J Pharmacol Toxicol Methods. 2012 (Mar; 65: 49-57)

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

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

研究分担者：奥田 晴宏（国立医薬品食品衛生研究所 薬品部長）

研究協力者：嶋澤るみ子（長崎大学医歯薬学総合研究科 創薬科学准教授）

安藤 剛（東京大学医学部附属病院トランスレーショナル・リサーチセンター 特任講師）

研究要旨

医薬品の品質確保は有効性及び安全性の基盤であり、高品質の医薬品を恒常的に臨床現場に供給できる規制環境を構築する必要がある。本分担研究では医薬品の品質保証に資するために、医薬品原薬、経口固形製剤およびヒト由来細胞・組織加工医薬品に関して、主にその開発段階に焦点を当て、開発の現状と課題を解析することを目的とした。即ち、1）医薬品原薬に関しては起案作業が進められているICHQ11ガイドラインを分析した。2）経口固形製剤の最近の承認事例を精査し、我が国における開発段階での生物学的同等性の評価に関して考察した。3）ヒト由来細胞・組織加工医薬品に関しては審査報告書や国内ガイドライン等を分析し、品質確保に必要な検査項目について論じた。

キーワード：原薬開発、製造プロセス、管理戦略、細胞治療、生物学的同等性

A. 研究目的

医薬品の品質確保は有効性及び安全性の基盤であり、高品質の医薬品を恒常的に臨床現場に供給できる規制環境を構築することが求められている。品質を確保するには開発段階で十分に製品の特性を解析し、重要な品質特性を保証し得る工程を構築し、最終製品の規格及び試験法（スペック）を設定する必要がある。特に最近の国際的な品質保証の取り組みでは、製品品質は設計段階から組み込まれているべきであるとするQuality by design（QbD）が重視されている。

日米EU医薬品規制調和会議（ICH）は、QbDを「事前の目標設定に始まり、製品及び工程の理解並びに工程管理に重点をおいた、立証された科学及び品質リスクマネジメントに基づく体系的な開発手法」と定義し、品質リスクマネジメントと最新の科学成果を基盤とする医薬品開発を推奨している。ICHはこ

のポリシーに基づき、Q8R2：製剤開発、Q9：品質リスクマネジメントおよびQ10：医薬品品質システムのガイドラインを作成するとともに、Q11：ICH Q11：原薬の開発と製造（化学薬品とバイオテクノロジー応用医薬品／生物起源由来医薬品）の作成に着手し、完成させた（平成24年3月末現在調印に向け手続き中）。

本分担研究では医薬品原薬、経口固形製剤およびヒト由来細胞・組織加工医薬品の品質に関して、主にその開発段階に焦点を当て、開発の現状と課題を解析することを目的とした。

医薬品原薬に関しては起案作業が進められているICHQ11ガイドライン：原薬の開発および製造を分析し、我が国への影響を評価した（1．医薬品原薬の開発と製造）。経口固形製剤については、最近の承認事例を精査し、我が国における開発段階での生物学的同等性の評価に関して考察した（2．医薬品の開